

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELICOBACTER PYLORI
***cagA* VE *vacA* VİRÜLANS GENLERİNİN**
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
TANIMLANMASI

Bio. Ceren ÖZKUL

Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2009

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELICOBACTER PYLORI
***cagA* VE *vacA* VİRÜLANS GENLERİNİN**
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
TANIMLANMASI

Bio. Ceren ÖZKUL

Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ

ANKARA

2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sibel Ergüven
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz
Hacettepe Üniversitesi



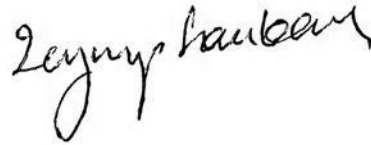
Üye: Prof. Dr. Gülşen Haşcelik
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof Dr. Serap Emre
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez. Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tez danışmanım olarak bilimsel ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda rahatlıkla ulaşım danışabildiğim ve engin tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz'a, bu çalışmanın oluşmasında yol gösteren ve büyük emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş'a, tez izleme komitesinde görev alarak fikirleriyle çalışmaya değerli katkılar sağlayan Prof. Dr. Sibel Ergüven ve Prof. Dr. Gülşen Hasçelik'e, yorum ve önerileriyle çalışmaya katkıda bulunan Doç. Dr. Alpaslan Alp ve Doç. Dr. Ahmet Pınar'a, klinikle ilgili konularda yol gösteren Prof. Dr. Hasan Özen'e, verilerin değerlendirilmesinde yol gösteren Ar. Gör. Erdal Coşgun'a, teknik konularda desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. Dolunay Gülmez'e, katkılarından dolayı Hüseyin Pişkin ve Emrah Ruh'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bütün eğitim hayatım boyunca sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla hep yanımda olan, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen babam Hasan Basri Özkul'a ve yine bana her konuda büyük destek olan ve emeği geçen halam Türkan Özkul'a, ayrıca tez çalışmam boyunca yanımda olan ve manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B 09D03101001)

ÖZET

Özkul, C. *Helicobacter pylori* *cagA* ve *vacA* Virülans Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009. Dünya nüfusunun yarısından fazlası *H. pylori* ile enfektidir. *H. pylori* ile enfekte bütün bireyler kronik gastrik enflamasyon geliştirir ancak bu durum genellikle asemptomatiktir. Ayrıca gastrit, peptik ülser, gastrik kanser, mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoması gibi birçok gastroduodenal hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Enfeksiyonun seyri, bakteriyel virülans faktörleri ve konak ile ilişkilidir. En önemli virülans faktörleri *cagA* ve *vacA* genleri tarafından kodlanan proteinlerdir. Genellikle *cagA* varlığı ve *vacA* allelik tiplerinin dağılımı belirgin bir coğrafi farklılık göstermektedir. Bu çalışmada *cagA* ve *vacA* allelik tiplerinin prevalansının belirlenmesi ve klinik bulgularla ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. DNA örneklerinin ekstraksiyonu için *cetyltrimethyl-ammonium bromide* (CTAB) yöntemi kullanıldı. Stok kültürlerde *H. pylori* varlığını doğrulamak amacıyla *ureA* geninin 411 bp'lik bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Daha sonra *ureA* geni bakımından pozitif olan 120 izolat *cagA* ve *vacA* allellerinin (*s1a*, *s1b*, *s2*, *m1* ve *m2*) özgül dizilerini hedef alan primerler ile çoğaltıldı. Yüz yirmi suşun 64'ünde (%53,3) *cagA* saptandı. Sinyal bölgesinin *s1a*, *s1b* ve *s2* varyantları sırasıyla %70,1, %2,8 ve %27,1 oranında saptandı. Orta bölge varyantlarından *m2* (%65,5), *m1*'e (%33,6) göre daha yüksek oranda bulundu. Bir suşta hem *m1* hem de *m2* genotipleri birlikte bulundu. En sıklıkla *s1a/m2* (%35,6) ve *s1a/m1* (%33,6) allelik kombinasyonları görüldü. Ayrıca *s2/m1* kombinasyonunda hiçbir suş bulunmadı. *cagA* pozitifliği, *vacA* allelleri ve klinik bulgular arasında belirgin bir ilişki bulunamadı. Ancak *vacA* allelik kombinasyonları ve *cagA* pozitifliği arasında bir ilişki saptandı.

Anahtar kelimeler: *H. pylori*, *cagA*, *vacA*, *vacA* allelleri

Destekleyen kurumlar: H.Ü.B.A.B. Tez Destekleme (09D03101001)

ABSTRACT

Özkul, C. Detection of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* Virulence Genotypes by Polymerase Chain Reaction. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MSc Thesis in Microbiology, Ankara, 2009. More than half of the world's population is infected with *H. pylori*. All *H. pylori* infected individuals develop chronic gastric inflammation but this condition is usually asymptomatic. It has been also associated with several gastroduodenal diseases such as gastritis, peptic ulcer disease, gastric cancer and Mucosa Associated Lymphoid Tissue lymphoma (MALT lymphoma). Prognosis of the infection is associated with the bacterial virulence factors and host factors. The most important virulence factors are proteins which are encoded by *cagA* and *vacA* gene. Generally, the presence of *cagA* and distribution of *vacA* allelic types has shown significant geographical variation. The aim of this study was to determine the prevalence of *cagA* and *vacA* allelic types and to evaluate the association between clinical findings. The cetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) method was used for the extraction of the DNA templates. In order to confirm the presence of *H. pylori* in stock strains, a 411 bp fragment of the *ureA* gene was amplified by PCR method. After that, 120 isolates which are positive for *ureA* gene were amplified by primers which target specific sequences of *cagA* and *vacA* alleles (*s1a*, *s1b*, *s2*, *m1* and *m2*). *cagA* was detected in 64 (53.3%) of the 120 strains. The *s1a*, *s1b* and *s2* variants of signal(s) region were detected in 70.1%, 2.8% and 27.1%, respectively. Among middle(m) region variants, *m2* (65.5%) was found more prevalent than *m1* (33.6%). Only one strain was found to have both *vacA m1* and *m2*. Both *m1* and *m2* genotypes were found together in one strain. The most frequently seen allelic combination was *s1a/m2* (35.6%) and *s1a/m1* (33.6%). Furthermore, no strain with the *s2/m1* combination was found. There was no significant association between *cagA* positivity, *vacA* alleles and clinical findings. However, an association between *vacA* allelic combinations and *cagA* positivity was detected.

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

Supported by: H.Ü.B.A.B Thesis Grant (09D03101001)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	5
2.3. Bulaş Yolları	6
2.4. Sınıflandırma	6
2.5. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikler	7
2.5.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri	7
2.5.2. Hücre Duvarı Yapısı ve LPS	9
2.5.3. Hareket	9
2.6. Üreme ve Kültür Özellikleri	10
2.7. Genom ve Plazmidler	10
2.8. Patogenez ve Virülans Faktörleri	11
2.8.1. Patogenez	11
2.8.2. Virülans Faktörleri	13
2.9. Laboratuvar Tanısı	22
2.9.1. İnvaziv Testler	23
2.9.2. Non-invaziv Testler	25
2.10. Tedavi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	27

3.2. Endoskopik ve Histopatolojik Bulgular	27
3.3. PCR Uygulamaları	27
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu İçin Örneklerin Hazırlanması	27
3.3.2. Hedef Bölgelerin Amplifikasyonunda Kullanılan Primer Dizileri	29
3.3.3. PCR ile Amplifikasyon	30
3.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	31
3.5. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. <i>cagA</i> Bulguları	33
4.2. <i>vacA</i> Gen Allelleri Bulguları	36
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Alp	Adezin benzeri protein
AP	Aktivatör protein
BabA	Kan grubu antijenlerini bağlayan adezyon geni
Bç	Baz çifti
BHI	Beyin-Kalp İnfüzyon
C	Sitozin
<i>cagA</i>	Sitotoksinle ilişkili gen A
<i>cagPAI</i>	<i>cag</i> patojenite adası
CTAB	<i>Cetyltrimethyl-ammonium bromide</i>
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü
ERK	Hücre dışı sinyal-ilşkili kinaz
G	Guanin
GTP	Guanozin trifosfat
HGFR	Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
Hpa	<i>Helicobacter pylori</i> adezini
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hsp	Isı şok proteini
HUT	Hızlı üreaz testi
IL	İnterlökin
i	<i>Intermediate</i> bölgesi
LPS	Lipopolisakkarit
m	Orta bölge
MALT	Mukoza ile ilişkili lenfoid doku
MAPK	Mutasyonla aktive edilen protein kinaz
Nod	Nükleotid bağlayan oligomerizasyon domaini
NHL	Non-Hodgkin Lenfoma
NF-κB	Nükleer faktör kapa B
N-WASP	Nöral-Wiskott-Aldrich protein
Oip	Dış membran inflamatuvar proteini

OMP	Dış membran proteini
PAK 1	p-21 aktive edilmiş kinaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RPTP	Reseptör benzeri protein tirozin fosfataz
rRNA	Ribozomal RNA
s	Sinyal bölgesi
Sab	Sialik asit bağlayan adezin
Shp-2	SH2 domainini içeren protein-tirozin fosfataz
TE	Tris-Etilen diamin tetra asetat
<i>ureA</i>	üreaz A
<i>vacA</i>	Vakuol oluşturan toksin A

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. <i>H. pylori</i> 'nin elektron mikroskobu ile görünümü	8
2.2. Sırasıyla Giemsa, Warthin-Starry ve Gram boyama teknikleri ile <i>H. pylori</i> 'nin görünümü	8
2.3. Sitotoksinle ilişkili gen patojenite adası (<i>cagPAI</i>)	17
2.4. Batı ve Doğu izolatlarında CagA EPIYA tekrar bölgeleri	19
2.5. <i>H. pylori</i> 'de <i>vacA</i> geni ve VacA proteini	20
4.1. <i>cagA</i> geninin 348 bç'lik bölgesinin amplifikasyon ürünleri (MB:moleküler belirteç, P:pozitif kontrol, N:negatif kontrol, 1,3:pozitif örnek, 2-4:negatif örnekler)	34
4.2. <i>vacA</i> gen allellerinin amplifikasyon ürünleri m1:290 bç, m2:352 bç, s1a:190 bç, s1b:187 bç, s2:199 bç	37
4.3. <i>cagA</i> varlığına göre <i>vacA</i> genotiplerinin dağılımı	41

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. <i>H. pylori</i> 'nin virölans faktörleri	14
2.2. <i>H. pylori</i> tanısında kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri	23
3.1. Hedef bölgelerin amplifikasyonunda kullanılan özgül primer dizileri	29
4.1. <i>H. pylori</i> izole edilen hastaların cinsiyet dağılımı	33
4.2. Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen suşlarda <i>cagA</i> dağılımı	34
4.3 Çalışmaya alınan <i>H. pylori</i> suşlarında <i>cagA</i> varlığının endoskopik bulgulara göre dağılımı	35
4.4. Çalışmaya alınan <i>H. pylori</i> suşlarında <i>cagA</i> varlığının patoloji bulgularına göre dağılımı	35
4.5 <i>cagA</i> varlığının endoskopi ve patoloji bulgularına göre dağılımı	36
4.6. “s” ve “m” genotiplerinin endoskopik bulgulara göre dağılımı	38
4.7. <i>vacA</i> genotiplerinin endoskopik bulgulara göre dağılımı	39
4.8. <i>vacA</i> genotiplerinin patolojik bulgulara göre dağılımı	40
4.9. Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarında <i>vacA</i> genotiplerinin dağılımı	40
4.10. Çalışmaya alınan suşların <i>vacA</i> genotipleri ile <i>cagA</i> varlığının ilişkisi	41

1. GİRİŞ

Helicobacter pylori (*H. pylori*) tüm dünyada yaygın olarak görülen, insanlarda midede antrum ve korpusta kolonize olup dispepsi, akut ve kronik gastrit, duodenal ülser, peptik ülser, MALT (mucosa associated lymphoid tissue) lenfoma ve gastrik kanser gibi hastalıklara yol açabilen bir patojendir (1) . *H. pylori* ile enfeksiyon tüm dünyada gözlense de, prevalansı ülkeler arasında ve aynı ülkedeki populasyon grupları içerisinde çeşitlilik göstermektedir. Bu durum, sosyoekonomik düzey ile bağlantılıdır. Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori* prevalansı %80'lerin üzerindeyken, gelişmiş ülkelerde bu oran %20-50 oranında değişmektedir (2) .

Dünya genelinde duodenal ülserli hastaların yaklaşık %95'inde ve peptik ülserli hastaların yaklaşık %85'inde *H. pylori* görülmektedir (3) . Fonksiyonel dispepsisi olan hastaların %30-60' ında *H. pylori* pozitifliği olduğu gösterilmiştir. Ancak bu prevalans dispepsisi olmayan popülasyona göre anlamlı derecede farklı değildir (4) . *H. pylori*'nin gastrik kanser riskini arttırdığı kanıtlanmıştır. 1994 yılında beri *H. pylori* Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tip1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. Gelişmiş ülkelerde gastrik kanser vakalarının %60-80'inde *H.pylori* pozitif olarak saptanmıştır (5) . Gastrik MALT lenfoması olan hastalarinsa %72-98 kadarı *H. pylori* pozitif olarak bildirilmiştir (6) .

Ülkemizde ise Sandıkçı ve diğ. (7) 'nin, 500 kişilik bir endoskopi grubunda *H. pylori*, duodenal ülserde %91, gastritte %87, mide malignitelerinde %85 pozitif olarak saptanmıştır.

H. pylori gram-negatif, mikroaerofilik, tek uçtan çıkan 4-6 kamçısı bulunan, hareketli, 0,5-1 µm genişliğinde, 2,5-4 µm uzunluğunda bir bakteridir (8) . Çoğunlukla sarmal şekilli olmasına rağmen antibiyotik tedavisi veya uzun süreli in-vitro kültürü sonucu kokoid forma geçebilir. Bu kokoid formların in-vitro kültürü yapılamaz ve bu formlar 'canlı ama kültürü yapılamayan hücreler' olarak kabul edilirler (9) .

H. pylori enfeksiyonlarının patogeneğinde birçok virülans faktörü rol oynamaktadır. Kamçı, üreaz enzimi ve çeşitli adezinler gastrik mukozaya kolonizasyonda önemli faktörlerdendir (10) . Doku hasarına neden olan faktörler arasında ise üreaz, fosfolipaz A gibi çeşitli enzimler, *cagA* (sitotoksin ile ilişkili gen)

ve *vacA* (vakuol oluşturan sitotoksin) genleri tarafından kodlanan çeşitli proteinler sayılabilir (11,12)

H. pylori ile enfeksiyon çoğunlukla kronik aktif gastritle sonuçlansa da bir çok enfekte hasta enfeksiyonun klinik bulgularından hiçbirini göstermemektedir (13) . Bu da bazı suşların diğerlerinden daha virülan olduğu fikrini doğurmuştur. İn-vitro olarak hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda daha virülan olan bu suşların morfolojik değişiklikleri tetiklediği, vakuolizasyon yaptığı belirlenmiştir (14) . Bu aktivitelerden sorumlu proteinin de 140 kDa molekül ağırlığında, yüksek immünojenik özellikli, *cagA* tarafından kodlanan CagA proteini olduğu belirlenmiştir (15) . Bu gen *H. pylori* suşlarının yaklaşık % 50-70’inde bulunmaktadır (16) . *cagA* geni 40 kb büyüklüğündeki *Cag* Patojenite Adası (*cagPAI*) denilen gen bölgesinin varlığını gösterir (17) . Yapılan çalışmalarda *cagA* pozitifliği ile gastrik mukozal enflamasyonun şiddeti arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (18) . Bu nedenle, *cagA*(+) suşla enfeksiyonun özgül olarak saptanması büyük önem taşımaktadır.

H. pylori’nin bir diğer önemli virülans faktörü, *vacA* geni tarafından kodlanan ve epitel hücrelerinde vakuollerin oluşmasına neden olan bir toksindir. Bu gen, bütün suşlarda bulunsun da suşların vakuolizasyon aktiviteleri birbirinden farklıdır. Bu durum *vacA* geninin sinyal “s” bölgesindeki ve orta “m” bölgesindeki dizi çeşitliliğine bağlıdır. Bu gende 4 farklı “s” (*s1a*, *s1b*, *s1c* ve *s2*) sinyal dizisi ile 3 farklı “m” (*m1a*, *m1b* ve *m2*) bölge dizisi alleli bulunmaktadır. Vakuol oluşturma yeteneği *s1/m1* genotipinde yüksek düzeyde, *s1/m2* genotipinde orta düzeydeyken, *s2/m2* genotipinde yoktur (19) Bu nedenle suşların *vacA* genotiplerinin saptanması önem arz etmektedir. Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi’nde 1999-2009 yılları arasında izole edilen *H. pylori* suşlarının stok kültürlerinden rastgele seçilen örneklerde, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *cagA* ve *vacA* allellerinin tiplendirmesini yapmak, *cagA* varlığı ve farklı *vacA* allelik kombinasyonlarının hastaların histopatolojik ve endoskopik sonuçlarıyla ilişkisinin değerlendirilmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İlk kez 1893 yılında İtalyan Guilio Bizzozero köpek midesinde sarmal mikroorganizmaların varlığını gözlemlemiştir. 1896 yılında da Hugo Salomon kedi ve köpek midesinde benzer mikroorganizmaları gözlemleyerek Bizzozero'nun bulgularını desteklemiştir. 1906 yılında Almanya'dan Krienitz (20) gastrik kanserli hastaların midesinde sarmal mikroorganizmaları gözlemlemiştir. 1938'de James Doenges (21) kaza kurbanlarının otopsileri sırasında mideden alınan 242 örneğin 104'ünde sarmal mikroorganizmaları saptayarak prevalansı %43 bulmuştur, ancak gastrointestinal hastalıklarla ilişkisini gösterememiştir. Stone Freedberg ve Louis Barron (22) isimli araştırmacılar aynı yıllarda peptik ülser ve gastrik kanseri olan 35 hastanın 13'ünün gastrik mukozasında sarmal mikroorganizmaların varlığını göstermişlerdir. İnsan ve hayvanların midesinde sarmal mikroorganizmaların varlığı ve bunun hastalıklarla ilişkisi olabileceği tartışmaları 1950'li yıllara kadar sürmüştür. 1954 yılında Eddie Palmer (23) isimli araştırmacı 1180 gastrik mukozal biyopsi örneğini incelemiş, sarmal bir mikroorganizma gözlemleyememiştir. Bu nedenle sarmal mikroorganizmaların sağlıklı ya da hasta kişilerin midesinde bulunmadığını, mukozal yüzeyde görülen sarmal mikroorganizmaların oral yolla mideye ulaşım geçici bir flora oluşturduğunu, bir doku tutulumunun söz konusu olmadığını belirtmiş ve tartışmaları sona erdirmiştir. Palmer'ın bu bulgusunun ardından konuya olan ilgi giderek azalmış ve gastrik sarmal bakterilerle ilgili takip eden 20 yıl boyunca önemli herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

H. pylori'nin en önemli virölans faktörü olan üreaz enzimini ilk kez 1924 yılında Luck ve Seth (24) tanımlamışlar ve gastrik sıvıdaki amonyağın, kandaki ürenin enzim aktivitesi ile parçalanması sonucu oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. 1950 yılında Fitzgerald ve Murphy (25) gastrik mukoza yüzeyinde üretilen üreaz enzimi ile peptik ülser hastalığı arasında ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir, ancak üreazın kaynağının ne olduğunu açıklayamamışlardır. 1955'de Kornberg ve Davis (26) insan midesindeki gastrik üreazın bakteriyel kaynaklı olduğunu göstermişlerdir.

Gastrik sarmal mikroorganizmalara olan ilgi 1975 yılında Steer ve Colin-Jones (27) isimli araştırmacıların yaptıkları çalışmayla tekrar artmıştır. Bu

araştırmacılar gastrik ülserli hastaların biyopsi örneklerinin %80'inde bakterileri gözlemlemiş ve bu bakterilerin mukozal hasara yol açarak ülseri neden olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ancak bakteriyi in-vitro olarak üretememişlerdir.

1980'li yıllara gelindiğinde Avustralyalı Barry Marshall ve Robin Warren (28) 135 gastrik biyopsi örneğinde küçük, kıvrık basilleri gözlemlemiş ve bunların gastrik mukoza yüzeyinde olmayıp dokuyu örten mukus tabakası içinde bulunduğunu göstermişlerdir. Elektron mikroskop görüntülerinden de yola çıkarak bu sarmal, küçük, kamçılı bakterinin önceleri *Campylobacter* cinsi olabileceğini düşünmüşler. İlk kez 1982 yılında Warren ve Marshall (29) antral biyopsi örneğinden bakteriyi in-vitro olarak üretmiş ve bakterinin ancak beş günlük inkübasyon periyodu sonrası üreyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bakterinin kültürünün yapılmasının ardından bakteriye *Campylobacter pyloridis* adı verilmiştir. Daha sonraları bu konuda yapılan çalışmalar yoğunlaşmış ve 1988 yılında Goodwin (30) bakterinin yapısal ve enzimatik bazı özelliklerinden dolayı *Campylobacter* cinsinde olmadığını göstermiş ve bakterinin *H. pylori* olarak adlandırılması gerektiğini belirtmiştir. *H. pylori*'nin antibiyotikle tedavi edilebildiğinin gösterilmesiyle gastrit ile bakteri arasındaki ilişki netlik kazanmıştır. 1984 yılında *H. pylori* enfeksiyonunun gastrik enflamasyonla (kronik süperfisiyel gastrit) ve özellikle polimorfonükleer hücre infiltrasyonu (kronik aktif gastrit) ilişkisi olduğu belirlenmiştir (31). 1994 yılında Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health) *H. pylori*'nin peptik ülser hastalığının başlıca nedeni olduğunu ve enfekte bireylerin organizmanın eradikasyonu için tedavi edilmesi gerektiğini bildirmiştir (32). 1991 yılında *H. pylori* enfeksiyonu ile gastrik kanser arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmaların yapılması ile 1994 yılında DSÖ'nün bir kolu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Cancer Research) *H. pylori*'yi sınıf 1 karsinojen olarak kabul etmiştir (33).

H. pylori enfeksiyonunun gastrik *Non-Hodgkin* Lenfoma (NHL) ve MALT lenfoma gelişimiyle de ilişkisi bulunmuştur (34). Gastrik MALT lenfomalı hastalara uygulanan *H. pylori* eradikasyon tedavisi, lezyonlarda gerileme sağlamıştır (35).

H. pylori'nin keşfinden bu yana, bakterinin gastroduodenal dokuyla ilgili pek çok önemli hastalıkta rolü olduğu belirlenmiştir. Bu sayede gastrointestinal sistem hastalıklarına yaklaşım değişmiş ve çok daha etkin tedavi sağlanabilmiştir. Bu

önemli keşif Barry Marshall ve Robin Warren’a 2005 yılında “Fizyoloji ve Tıp bilimleri” alanında Nobel ödülünü kazandırmıştır.

2.2. Epidemiyoloji

H. pylori dünya üzerindeki hemen her bölgede, sadece insanların değil aynı zamanda diğer primatların da midesinde bulunmaktadır. Dünya nüfusunun yarıya yakını bu bakteri ile enfektidir. Enfekte kişilerin hemen hepsinde kronik gastrit gözlenirken, küçük bir kısmında peptik ülser ya da gastrik kanser gibi ciddi hastalıklar gözlenmektedir. Sosyoekonomik koşullarla yakından ilişkili olan *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde büyük farklılıklar göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80’i *H. pylori* ile enfektidir. Gelişmiş ülkelerde ise enfeksiyonun prevalansı daha düşüktür (%25-50). Enfeksiyon genellikle çocukluk çağında kazanılmaktadır. Birçok çalışmada enfeksiyonun kazanılmasında cinsler arasında bir fark bulunmadığı gösterilmiştir (36).

Ülkemizde de *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı yüksek olmasına karşın sosyoekonomik koşullarla ilişkili olarak doğu ve batı bölgeleri arasındaki prevalans oranları birbirinden farklıdır (7) Türkiye’nin doğu illerini kapsayan bir çalışmada çocukluk çağında *H. pylori* seroprevalansı %64,4 bulunmuştur (37). Us ve diğ. (38) tarafından yapılan bir çalışmada ise 10-14 yaş grubundaki çocuklarda *H. pylori* seroprevalansı %47,3, 15-19 yaş grubunda ise %58,4 bulunmuştur. Ülkemizdeki bu prevalans oranları yıllar içinde değişen çevresel koşullar ve artan sosyoekonomik koşullara bağlı olarak düşüş göstermektedir. 1990 yılında çocukluk çağındaki seroprevalans oranı %78,5 iken, 2000 yılında bu oran %66,3 olarak bulunmuştur (39). Yine 2003 yılında yapılan bir çalışmada çocukluk çağındaki seroprevalans oranını % 49,5 bulmuşlardır (40).

Bu bilgiler ışığında, sosyoekonomik koşulların iyi olduğu ülkelerde enfeksiyonun prevalansının daha düşük olduğu, gelişmekte olan ülkelerde ise bu oranın yüksek olduğu söylenebilir. Ancak ülkelerdeki farklı etnik gruplar, bölgelere göre değişen farklı sosyoekonomik yapılar prevalans oranlarını bölgeler arasında da değiştirmektedir. Farklı etnik gruplar arasında değişen bu prevalans oranları,

enfeksiyonun kazanılmasında sosyoekonomik koşulların, genetik yatkınlığın, alışkanlıkların, çevresel faktörlerin rolü olduğunu göstermektedir (41) .

2.3. Bulaş Yolları

H. pylori'nin bilinen tek rezervuarı insan midesidir ve *H.pylori*'nin insanlara nasıl bulaştığı henüz bilinmemektedir. *H. pylori*'nin kabul edilen bulaş yollarından en önemlisi gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülen fekal-oral yolla bulaştır. Diğer bulaş yolları arasında oral-oral bulaş ve kontamine endoskopların kullanılması ile bulaş gösterilmektedir (42) . Enfeksiyonun kontamine sularla bulaştığını gösteren çalışmalarda yapılmıştır. Queralt ve Araujo (43) yaptıkları çalışmada *H. pylori*'nin suda sağkalabildiğini göstermiş, bu nedenle içme sularında bulunması halinde insana bulaşabileceğini öne sürmüşlerdir. Diş hekimleri, hemşireler, gastroenterologlar gibi sağlık çalışanları arasında artmış riskin olduğu gösterilemediği gibi, seksüel yolla geçişin olduğunu gösteren herhangi bir veri de yoktur (44) . Gelişmekte olan ülkelerde prevalansın yüksek olması kişilerin yaşam tarzıyla ilişkilendirilebilir. Kalabalık ve içiçe yaşayan ailelerde enfeksiyonun daha sık görülmesi insandan insana bulaşın olduğunu gösteren önemli bir kanıttır. Enfeksiyonun zoonotik geçişi ile ilgili yeterli kanıt bulunamamıştır. Bu nedenle insandan insana direkt bulaş en olası geçiş yolu olarak görülmektedir (42,44) .

2.4. Sınıflandırma

H. pylori'nin sarmal morfolojisi, mikroaerofilik olması ve biyokimyasal profili *Campylobacter* cinsiyle örtüşmektedir. Ancak *H. pylori*'nin üreaz aktivitesi, birden çok kamçısının bulunması gibi fenotipik özelliklerinin *Campylobacter* cinsinden farklı olduğu gözönüne alınarak taksonomik çalışmalar yoğunlaştırılmış ve 1988 yılında bu özelliklerinin farklılığından dolayı *Campylobacter* cinsinden çıkartılarak *Helicobacteraceae* ailesi *Helicobacter* cinsi içerisinde bir tür olarak yeniden sınıflandırılmıştır (30) . Günümüzde *Helicobacter* cinsine ait 20'nin üzerinde tür tanımlanmıştır (45) . *Helicobacter* cinsinin tüm üyeleri mikroaerofilik olup, katalaz ve oksidaz pozitifdir. Tüm türler olmasa da birçoğu üreaz pozitifdir. *Helicobacter* türleri gastrik *Helicobacter* türleri ve enterohepatik (nongastrik) *Helicobacter* türleri olmak üzere iki alt gruba ayrılabilir. İki grubun üyelerinde de organ tutulumu özgüldür. Gastrik *Helicobacter* türleri barsak, karaciğer gibi

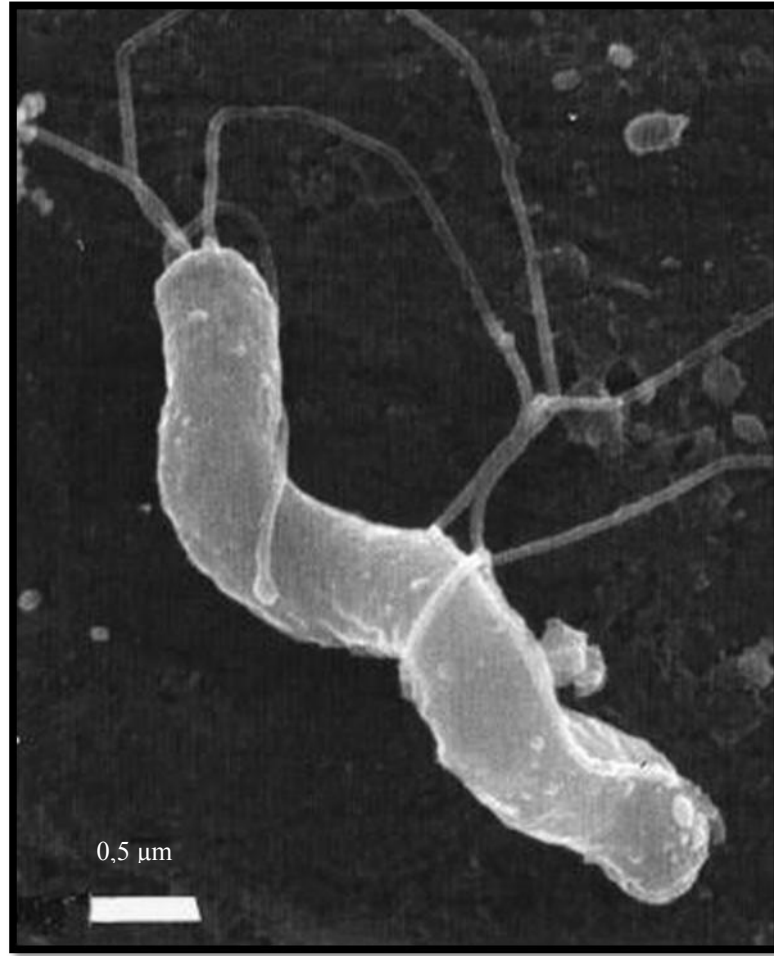
organlarda kolonize olamayacağı gibi, nongastrik olan türlerde midede kolonize olamaz (46) . Gastrik *Helicobacter*'ler cinsinde; *H. pylori*, *H. heilmannii*, *H. musteale*, *H. felis*, *H. nemeistrinae*, *H. acinonyx*, nongastrik *Helicobacter*ler içerisinde ise; *H. fennelliae*, *H. cinaedi*, *H. muridarum* sık görülmektedir. *Helicobacter* türleri içerisinde tıbbi açıdan önemli olan ve en iyi bilinen tür *H. pylori*'dir. Ancak bunun dışında gastrik *Helicobacter* türlerinden *H. heilmannii* ve *H. felis*'in de insanda gastritle ilişkisi olduğu bilinmektedir. Bu türler aynı zamanda kedi, köpek ve insan dışı diğer primatlardan da izole edilmiştir (45) . *H. heilmannii* insan gastrik biyopsi örneklerinde ilk kez 1987 yılında saptanmıştır. Sonraki çalışmalarda da bu bakteri insanlardan izole edilse de izolasyon sıklığı çok düşüktür. 1998 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada Tayland'daki hastaların %6'sının *H.heilmannii* ile enfekte olduğu bildirilmiştir (47,48) .

2.5. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

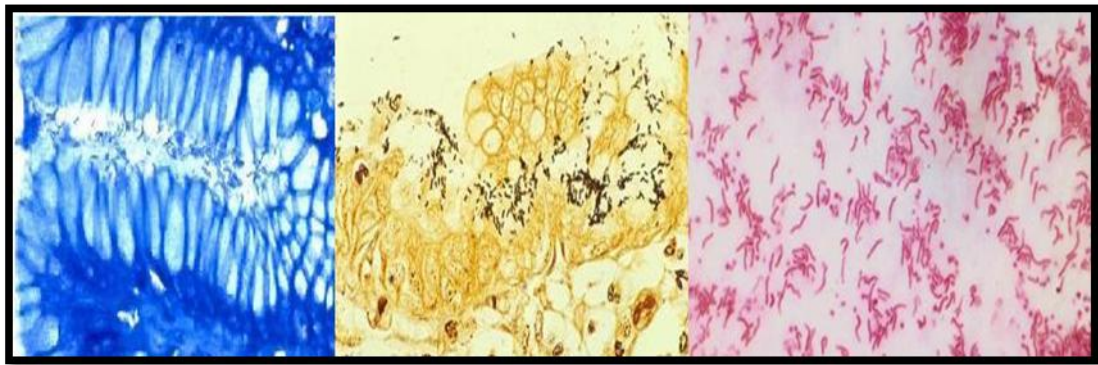
2.5.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

H. pylori gram-negatif, 2 µm uzunluğunda ve 0,5-1 µm genişliğinde, yuvarlak uçlu, unipolar kamçılı bir bakteridir (Şekil 2.1). Çoğunlukla sarmal şekilli olsa da nadiren basil şeklinde veya kokoid formda görülebilir (8,49) . Kokoid formlar genellikle bakterinin uzun süreli in-vitro kültürü sonucu ya da antibiyotik tedavisi sonrası izole edildiğinde görülür. Bu formlar 'canlı ama kültürü yapılamayan formlar' olarak kabul edilirler (9) . *H. pylori* hareketli bir bakteridir ve tek uçtan çıkan, uçları şişkin olan (terminal bulp) yaklaşık 3 µm uzunluğunda 2-6 kamçısı bulunur. Kamçı, gastrik epitel hücrelerinin üzerini örten mukus tabakası gibi yoğun ortamlarda hızlı hareketi sağlar (50) . Gastrointestinal sistemde kolonize olan diğer patojenlerin aksine *H. pylori*'de fimbrial adezinler bulunmaz. Genel olarak *H. pylori*'nin sarmal şekli ve kamçısının kolonizasyon için gerekli olduğu kabul edilmektedir (10) .

Dokudan hazırlanan kesit ve yaymalar veya kültürden hazırlanan preparatlar Gram ile boyanarak gram-negatif kıvrık bakteriler görülebilir. Ayrıca *H. pylori* biyopsi örnekleri Giemsa veya Wartin Starry gümüşleme yöntemi ile boyanarak da incelenebilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. *H. pylori*' nin elektron mikroskobu ile görünümü



Şekil 2.2. Sırasıyla Giemsa, Warthin-Starry ve Gram boyama teknikleri ile *H. pylori*'nin görünümü

2.5.2. Hücre Duvarı Yapısı ve LPS

Hücre duvarı bileşenleri bakteri ve konak arasındaki ilk etkileşim noktaları oldukları için oldukça önemlidir. *H. pylori* hücre yüzeyi hidrofilik ve negatif yüklüdür. Hücre duvarının yapısı diğer gram-negatif bakterilere benzer. *H. pylori* hücre duvarı 3 katmanlı bir iç membran, protein sentezinde etkili ve peptidoglikan tabakayı da içeren bir periplazmik alan ve 30 nm kalınlığında bir dış membrandan oluşur. Dış membran lipopolisakkarit (LPS) ve fosfolipidleri içerir. *H. pylori*'de LPS özellikle 3-hidroksi yağ asitlerinin yapısı bakımından diğer gram-negatif bakterilerinkinden farklıdır. LPS yapısındaki Lipid A molekülü, diğer gram-negatif bakterilerdekine kıyasla daha düşük biyolojik aktivite ve antijenik özellik gösterir (51). *H. pylori* LPS'inde çoğu zaman fukozillenmiş 'O yan zincirleri' bulunur. Bunlar insanlardaki Lewis kan grubu antijenleriyle homoloji gösteren Lewis^x (Le^x) ve Lewis^y (Le^y) antijenlerini oluştururlar. Bu benzerlik bakteriyi konağın immün yanıtına karşı korur veya otoimmün cevaba yol açabilir (52).

H. pylori genomu ayrıca dış membranda bulunan çok çeşitli dış membran proteinlerini (OMP) kodlar. Bu dış membran proteinlerini beş gen ailesine ayırılır. Bunlardan en geniş 21 Hop ve 12 Hor dış membran proteini ile adezinleri içerir. Diğer dış membran proteinleri arasında porin proteinleri, demir bağlayan proteinler, üreaz, ısı şok proteinleri bulunmaktadır (53).

2.5.3. Hareket

Birçok mikroorganizmanın hareketi, ortam yoğunluğu su yoğunluğuna eşit iken en yüksek düzeydedir. Yoğunluğun artması ile hareket hızı gittikçe düşer. Oysa *H. pylori* mukus gibi yoğun ortamlarda bile oldukça hızlı hareket eden bir bakteridir. Bu hareketini sayıları 1-6 arasında değişen unipolar, kılıflı kamçısı ile sağlar. Kamçı, FlaA ve FlaB protein iplikçiklerinden oluşan, uzunluğu 30 µm uzunlukta ve 2,5 nm kalınlıkta, uçları karakteristik olarak topaç görünümlü, kılıflı ve sarmal yapıdadır (54,55). Kamçının etrafını saran kılıfın protein, fosfolipid ve LPS içeriğinin dış membrandakiyle benzer olduğu, görevinin aside karşı direnci arttırmak ve kamçı üzerinde bulunan antijenik epitopları örtmek olduğu gösterilmiştir (54,56).

Hareket özelliği kolonizasyon için gerekli bir faktördür. Bu nedenle hareket özelliği *H. pylori*'nin virülans faktörlerinden biridir. *flaA* ya da *flaB*'yi sentezleyemeyen mutantların daha az virülan olduğu, her ikisini de sentezleyemeyen mutantlarınsa tamamiyle avirülan olduğu gösterilmiştir (10,57) .

2.6. Üreme ve Kültür Özellikleri

H. pylori mikroaerofilik bir bakteridir. Üremek için %5-10 CO₂ içeren ortama ve 34-40°C (optimal 37°C) sıcaklığa gereksinim duyar. *H. pylori* midenin asit ortamında üreyebilmesine rağmen nötrofilik bir bakteridir. Üremesi için gerekli optimal pH 5.5-8 arasındadır (1) .

H. pylori oksijene duyarlıdır, genomu küçüktür ve regülatör genleri azdır. Bu nedenle tanıda altın standart olmasına rağmen in-vitro şartlarda üretilmesi zor bir bakteridir. *H. pylori*'nin üreyebilmesi için kan, hemin, serum, kömür, yumurta sarısı, mısır unu gibi katkı maddeleri içeren özel bir besiyeri gereklidir. %5-7 oranında at kanı içeren *Brain Heart Infusion* (BHI) agar veya *Colombia* agar gibi katı besiyerlerinde, %5-10 CO₂, %85 H veya N, %5 O₂ içeren atmosferde 5-10 günlük inkübasyon süresinde üretilebilirler. Besiyerine vankomisin, polimiksin-B, kanamisin, amfoterisin-b gibi antimikrobiyal ajanlar eklenmesi kontaminasyonu engelleyerek izolasyon şansını artırır. İnkübasyon süresi sonunda küçük, gri, yuvarlak koloniler oluştururlar (58,59) . Koloni morfolojileri, mikroskopik karakterleri, oksidaz, katalaz ve üreaz gibi biyokimyasal özellikleri üretilen bakterinin tanısı ya da tanımlanması için önemlidir.

2.7. Genom ve Plazmidler

1997 yılında *H. pylori* 26695 suşunun, 1999 yılında *H. pylori* J99 suşunun genomik dizi analizi yapılmıştır. Bu suşların gen büyüklükleri yaklaşık 1.700.000 bp olup, G+C içerikleri %35-40 kadardır. Bu düşük G+C oranı, sık görülen rekombinasyonların başlıca nedenidir. *H. pylori* 26695 suşunun genomu 1.587 gen, J99 suşunun genomu 1.491 gen içermektedir. Her iki genom da 16S, 23S ve 5S rRNA genlerinin iki kopyasını bulundurmaktadır (56,60) . Genlerin 300'den fazlası membran yapısı ile ilişkilidir. Birçok gen bölgesi virulansla ilişkilidir. Bunlar arasında vakuolizasyon sitotoksin geni (*vacA*), sitotoksin ilişkili gen (*cagA*), adezin geni (*hpaA*), flagellin genleri (*flaA* ve *flaB*), üreaz gen kümesi yapısal alt birimleri

kodlayan *ureA* ve *ureB* geni, üreaz aktivitesi için gerekli olan *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* ve *ureI* genleri bulunmaktadır (56) . *H. pylori* suşları üreaz, kamçı yüzey proteinleri, VacA ve CagA'yı kodlayan genlerinde yüksek düzeyde dizi çeşitliliği göstermektedir (61-63) .

H. pylori suşlarının en az %40'ında büyüklükleri 1,5-23,3 kbp arasında değişen plazmidler bulunur, ancak bu plazmidler virülansla ilgili herhangi bir gen içermezler (64,65)

2.8. Patogenez ve Virülans Faktörleri

H. pylori'nin tüm suşları konakta gastrik enflamasyona neden olur, ancak *H. pylori* kolonizasyonu görülen kişilerin ancak %10-20'sinde klinik bulgu görülmektedir. Bu durum *H. pylori*'nin neden olduğu gastroduodenal patolojide, mikroorganizmaya ait çok sayıdaki virülans faktörünün yanı sıra, konak ve çevreye ait faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir. Konakta oluşan immün yanıt çoğu zaman konağın lehine olsa da, yüksek düzeyde enflamasyon sonucu denge konak aleyhine bozularak peptik ülser, duodenal ülser, midenin adenokarsinomu gibi mide hastalıklarına yol açabilmektedir (66) .

2.8.1. Patogenez

Bakteriye Ait Faktörler

Gastrik mukoza bakteriyel enfeksiyonlara karşı iyi korunur. *H. pylori* ise bu ortama yüksek oranda adapte olmuştur. Mukus tabakasına girişini, epitel hücrelerine tutunmasını, bağışık yanıttan kaçışını ve böylelikle kalıcı enfeksiyona sebep olmasını sağlayan birçok özelliğe sahiptir. *H. pylori*'nin mukus tabakasına girmesi ve burada kolonize olmasında gerekli en önemli faktörler üreaz aktivitesi ve hareket özelliğidir. Üreaz enzimi üreyi karbondioksit ve amonyağa hidrolize eder. Bu da, bakteriyi mide suyunun asidik pH'sından korur. Üreaz enzimi genlerinden *ureI* dış membrana üreaz taşınmasını düzenler (67) .

H. pylori epitel hücrelerine hücre yüzeyinde bulunan adezin proteinleri sayesinde tutunur. Bu adezin proteinlerinden en iyi bilineni Hop protein ailesinden BabA dış membran proteindir (68) . Bakterinin kolonizasyonu ve patogenezinde rol oynayan diğer dış membran proteinleri SabA, OipA, AlpA/B dir (69,70) .

H. pylori suşlarının büyük kısmı 95-kD molekül ağırlığındaki bir toksin olan VacA proteinini üretir. Toksin epitel hücre membranına etki eder ve burda voltaja bağımlı anyon transport kanalı oluşturur (71) . VacA aynı zamanda mitokondriyal membrana da etki ederek sitokrom c'nin serbest kalmasına ve apoptozise neden olur (72) . VacA'nın patolojik rolü hala tartışmalıdır. VacA-negatif mutantların hayvan modellerinde kolonizasyon yapabildiğinin gösterilmesi ve bazı hastalardan inaktif *vacA* geni bulunan suşların izole edilmesi VacA'nın kolonizasyon için gerekli olmadığını göstermektedir (73) .

Çoğu *H. pylori* suşu *cag* patojenite adasını (*cagPAI*) bulundurur. *cagPAI* 40 kb büyüklüğünde *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagI*, *cagL*, *cagM* ve *virB* gibi 31 gen içeren bir açık okuma bölgesidir (ORF). Bu gen adası virülans ve adaptasyonla ilgili proteinleri ve özellikle Tip-IV sekresyon sisteminde rol alan proteinleri kodlar. Tip-IV sekresyon sistemi 120-kD molekül ağırlığındaki CagA proteinin taşınmasında rol oynar. CagA epitel hücrelerine girdikten sonra fosforile olur, tirozin bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla konak hücreye ait farklı moleküllerle ilişkiye geçer ve konak hücre intrasitoplazmik sensörü olan NodI tarafından algılanır. Bu sensörde nükleer faktör kappa B'yi aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1b, IL-6 ve IL-8) salınımını başlatır. Özellikle interlökin-8 (IL-8) kronik aktif gastritin en önemli histopatolojik bulgusu olan enflamasyondan sorumludur (17,74-76) .

Konağa Ait Fakörler

H. pylori enfeksiyonlarının patogeneğinde hastaya ait yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, eğitim düzeyi, aile yapısı ve genetik yatkınlık gibi faktörler önemlidir (77) Yapılan çalışmalarda bazı genlerin aşırı ekspresyonu veya ekspresyonunun inhibisyonunun *H. pylori* enfeksiyonlarının prognozunu etkilediği gösterilmiştir.

H. pylori'nin tüm suşları yaşam boyu kalıcı enfeksiyona neden olur ve gastrik enflamasyon meydana getirir. Ancak bu enfeksiyonların ancak %15'i peptik ülserle ve %0,5-2'si gastrik adenokarsinom ile sonuçlanmaktadır. Bu durum *H. pylori* enfeksiyonlarının patogeneğinde konak faktörlerinin önemli olduğunu düşündürmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunda peptik ülser gelişiminin, aile bireylerinde daha önceden bu hastalığın geçirilmiş olması ile yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir (78) . Genetik olarak aktarılan konak immün yanıtındaki

faktörlerin, *H. pylori* ile ilişkili hastalıklarda rolü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *H.pylori* enfeksiyonlarına konak duyarlılığında kan grubu fenotipinin ve Lewis b antijenlerinin rolü olduğuda bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada duodenal ve gastrik ülserli hastalarda O kan grubunun baskın olduğu gösterilmiştir (79) . *H. pylori*'nin kolonizasyonunda en önemli konak reseptörlerinden biri Lewis b kan grubu antijenleridir. Bu reseptörler A ve B kan grubundaki bireylerde, O kan grubundaki bireylere oranla daha azdır. Bu da O kan grubundaki bireylerde yüksek ülser prevalansını açıklayabilmektedir (80) .

2.8.2 Virülans Faktörleri

Virülans veya patojenite mikroorganizmanın hastalık oluşturabilme yeteneğiyle ilişkilidir. *H. pylori*'nin virülansından sorumlu birçok faktör vardır. Kamçı ve üreaz gibi bütün *H. pylori* suşlarında bulunan virülans faktörleri kolonizasyon ve sağkalım için gerekli faktörlerdir. Virülans faktörleri özetle Tablo 2.1'de görülmektedir. *H. pylori* ve hastalık ilişkisinde önemli olduğu düşünülen ve tanımlanan virulans faktörlerinden en önemlileri olarak *cagA* ve *vacA* geni tarafından kodlanan proteinler gösterilmektedir.

Tablo 2.1. *H. pylori*'nin virölans faktörleri (81)

	Virölans Faktörü	Etki Mekanizması
Kolonizasyon	Kamçı	Mukus içinde aktif hareket
	Üreaz	Asit nötralizasyonu
	Adezinler	Epitele tutunma
Doku Hasarı	Proteolitik enzimler (Glikosülfataz)	Mukusun niteliğinde bozulma
	CagA	Sitotoksin oluşumu
	VacA	Epitel hücresi hasarı
	Üreaz	Epitel hücrelerine toksik etki, sıkı bağlantılarda bozulma
	Fosfolipaz A	Hücre membranındaki fosfolipidlerin sindirimi
	Alkol dehidrogenaz	Gastrik mukozal hasar
Sağkalım	Süperoksit dismutaz	Fagositoz ve öldürmenin engellenmesi
	Katalaz	Gastrik ortamda ve fagositik vakuollerde H ₂ O ₂ 'nin toksik etkisinden korunma
	Kokoid form	Dayanıklı form
	Isı şok proteinleri (Hsp A ve B)	Proteinlerin stabilizasyonu ve tamiri
	Üreaz	Antikorların opsonizan etkisine karşı bakteriyi koruma (Salgısal Ig'leri sülfidril bağlarından koparır)
Diğer	Lipopolisakkarit	Düşük biyolojik aktivite
	Lewis X/Y kan grubu homolojisi	Otoimmünite

Kamçı ve Hareket

H. pylori'nin sarmal şekli ve sayıları 1-6 arasında değişen polar kamçısı mukus içerisinde hızlı hareketi ve mukus tabakasına girişini sağlayan en önemli faktörlerdir. *H. pylori*'nin hareketi mukus tabakası gibi yoğunluğu yüksek ortamlarda daha da artar (81) .

Üreaz

Üreaz enzimi *H. pylori*'nin kolonizasyonunda ve çoğalmasında, aynı zamanda patogenezinde anahtar enzimlerden biridir. Aktivitesi için Ni^{+2} 'e ihtiyaç duyan, 564 kDa ağırlığında bir metalloproteinazdır. Ürenin hidrolizini katalizler. Üreaz enzimi *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG* ve *ureH* olarak tanımlanan yedi gen tarafından kodlanır ve *UreA* ve *UreB* olmak üzere iki fonksiyonel alt üniteden oluşur. Üreaz enziminin küçük bir parçası intrasitoplazmik olarak yerleşirken, büyük parça hücre duvarının dış katmanında lipopolisakkarite bağlı olarak bulunur. Üreaz ile ilişkili gen kümesi tarafından kodlanan *UreE*, *UreF*, *UreG* ve *UreH* proteinleri, bir apoenzim olan *UreA* ve *UreB*'nin aktivitesi için gerekli Ni^{+2} 'nin bağlanmasında ve enzim sentezinin düzenlenmesinde rol oynarlar. *UreI* ise ortamın pH'sına bağlı olarak dış membrana üreaz transportunu düzenler (11,67,73) .

H. pylori üreaz aktivitesiyle üreyi amonyak ve karbondioksit'e yıkarak etrafında bir amonyak tabakası oluşturmakta ve asidi nötralize etmektedir. Üreaz negatif mutantlar kolonize olamazlar (82) . Hayvan modellerinde asit salınımı bloke edildiğinde de kolonizasyon gözlenmemiştir. Bu durum bakterinin asit ortamdan korunmasının üreazın tek fonksiyonu olmadığını, amonyak üretimi sonucu doku hasarına yol açtığını ve apoptozise neden olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (83,84) .

Bakteriyel Adezinler

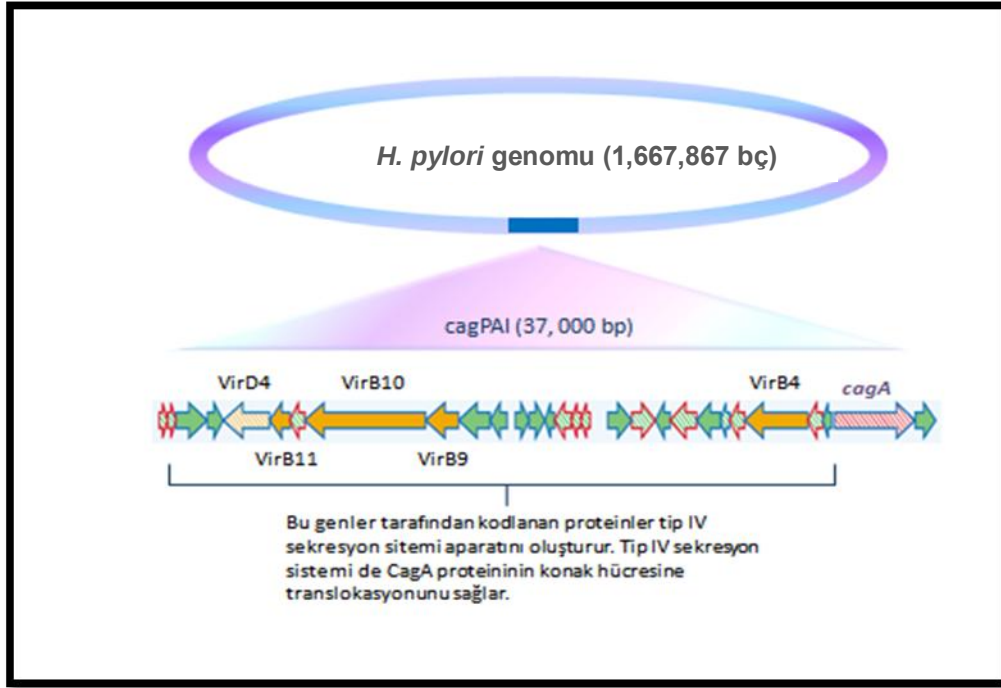
Adezin proteinleri bakterinin dış membranında bulunur ve her biri konak hücre yüzeyindeki farklı moleküller için özgüdür. Bu nedenle *H. pylori* birçok farklı adezini kodlar. Bunlardan en önemlisi *H. pylori* ile ilişkili hastalıkların patogenezinde de önemli rolü olan *BabA*'dır. *BabA*, gastrik epitelde Lewis b kan grubu antijenlerine bağlanır (85) . İki iyi bilinen *babA* allelinden (*babA1* ve *babA2*)

babA2'nin bağırsak metaplazisi ve gastrik adenokarsinom ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (86) . *H. pylori* mide epitel hücrelerine tutunabilmek için birden çok adezin kullanmaktadır. Bunlardan en iyi bilinenleri kamçı membranında bulunan HpaA proteini ve dış membranda yer alan HspA'dır. Buna ek olarak dış membran yapısında 19 yeni lipoprotein bulunmuştur. Bunlardan çok azının fonksiyonu tam olarak belirlenebilmiş olsa da birçoğunun bakterinin konak hücre yüzeyine tutunmasında rol oynadığı bilinmektedir (87) .

Sitotoksinle İlişkili Gen Patojenite Adası (*cagPAI*) ve *cagA*

Patojenite adaları bakterinin virülansında rol oynayan, birbiriyle bağlantılı, geniş DNA bölgeleridir. *H. pylori*'de *cagPAI* yaklaşık 40 kb büyüklüğünde ve 31 genden oluşan bir açık okuma bölgesidir (Şekil 2.3). *H. pylori* suşları bütün patojenite adasını bulundurabilir (*cag+*), tamamından yoksun olabilir (*cag-*) ya da bazı bölgelerini bulundurabilir. Bazı bölgelerini içeren bu suşlar da fenotipik olarak *cag* negatif suşlara benzemektedirler (88) . Bölgesel olarak, *cag+* ve *cag-* suşların görülme oranları farklılık gösterse de *cag+* suşlar baskındır. *CagPAI*'nin terminal bölgesinde bulunan *cagA* varlığı, ya da CagA proteinine karşı oluşan bağışık yanıt, *cagPAI*'nin varlığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda *cagA* pozitif suşların peptik ülser ve gastrik adenokarsinom ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (89,90) .

H. pylori izolatları, *cagA* ve *vacA* genlerinin ifadesine bağlı olarak tip I ve tip II gruplarına ayrılmaktadır. Daha virulan özellikteki tip I izolatlar, *cagA* ve *vacA* gen ürünlerini üretmekte ve hücrelerde vakuolizasyona yol açmaktadır. Bu *H. pylori* suşlarının, şiddetli gastroduodenal hastalığı olan kişilerden izole edildiği bildirilmektedir. Tip II izolatların ise *cagA* bulundurmadıkları, kromozomlarında *vacA* homoloğu diziler bulunsa da, hücrelerde vakuolizasyona yol açmadıkları belirtilmektedir (17)



Şekil 2.3. Sitotoksinle İlişkili Gen Patogenite Adası (*cagPAI*)

H. pylori'de *cagPAI*, CagA proteinini ve diğer bakteriyel ürünleri gastrik epitel hücre sitozolüne gönderen tip IV sekresyon sistemi aparatını kodlar (17). *cagA* geni tarafından kodlanan 145 kDa ağırlığındaki CagA proteini, konak epitel hücre sine girdikten sonra burada EPIYA kasetindeki tirozin fosforilasyon motifleri sayesinde konak protein kinazı ile bağlanarak fosforile olmaktadır. Oluşan kompleks konak hücre de bir dizi sinyal iletim yolunu aktive edebilmektedir (91,92). Fosforillenen CagA proteini SHP-2 ile bir kompleks oluşturur. *Nöral Wiskott – Aldrich* sendromu proteini (N-WASP) ile bağlanan CagA'nın Arp2/3 aktin nükleatörünü aktive ederek hücre de aktin polimerizasyonunu ve kaide (pedestal) oluşumunu uyarabileceği görüşü öne sürülmektedir (93). Diğer bir mekanizma ise CagA ve SHP-2 protein kompleksinin oluşarak, hücre nin aktin iskeletinin organizasyonunu kontrol eden Rho ailesinden küçük GTP bağlayan proteinleri aktive etmesine dayandırılmaktadır. Bu durum hücre de *hummingbird* fenotipi de denilen bir dizi hücre sel morfolojik değişime sebep olmaktadır (76). Bir çalışmada, bir onkogen olan hepatosit büyüme faktörü reseptörü HGFR'nin CagA ile indüklenmesi sonucu hücre de *hummingbird* değişimlerinin görüldüğü gösterilmiştir (94). Tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak, CagA'nın hücre ler arası apikal bağlanma

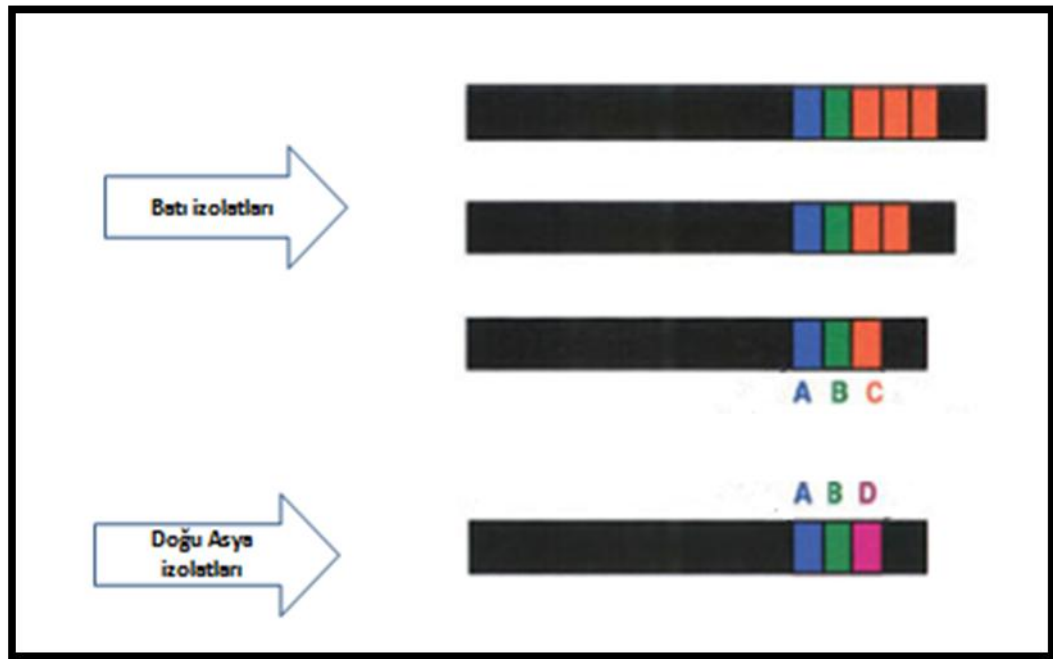
komplekslerine zarar vererek hücrel bütünlüğü bozduğu gösterilmiştir (95) . Son yapılan çalışmalarda *cagPAI*'da bulunan *cagD* geni tarafından kodlanan CagD proteininin CagA'nın konak hücrelerine taşınmasında gerekli olduğu ve IL-8 salınımında artışı indüklediği gösterilmiştir (96,97) .

Birçok *H. pylori* suşu CagA proteinini salgılar ancak yapısı suşlar arasında değişebilmektedir. CagA proteini 0-5 arasında değişen sayıda aktif fosforilasyon bölgesi içerebilmektedir. Ne kadar çok tirozin varsa, o kadar yüksek düzeyde CagA fosforilasyonu olduğu ve buna bağlı olarak da hücrelerde daha fazla morfolojik değişim görüldüğü gösterilmiştir (98,99) . Ayrıca Doğu Asya'dan izole edilen suşlarda CagA proteininin farklı bir SHP-2 bağlanma bölgesi taşıdığı ve bunun da hücrede daha yüksek düzeyde morfolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Bu suşlar yüksek düzeyde enflamasyon ve atrofi ile ilişkilendirilmiş olup gastrik kanserli hastalardan daha sıklıkla izole edilmektedir (100) .

cag+ suşlar epitel hücrelerinde yüksek düzeyde IL-8 üretimine neden olmaktadır. IL-8, enfeksiyon bölgesine nötrofillerin infiltrasyonuna neden olan bir kemokindir. Bu durum gastrik mukozada güçlü bir enflamasyona yol açmaktadır. *H. pylori* konağı kronik olarak enfekte eden sınırlı sayıda patojenden biri olduğundan dolayı, neden olduğu sürekli enflamasyonun gastrik hastalıkların gelişiminde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (17) . *H. pylori*'de, IL-8 salınımını tetikleyen 2 farklı *cag*-bağımlı yolak tanımlanmıştır. Birincisi, p21-aktive edilmiş kinaz (PAK1) aracılığıyla nükleer faktör-kappa B (NF- κ B)'nin aktivasyonuna dayanmaktadır. Transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, IL-8'i kodlayan genlerin pozitif regülasyonuna neden olmaktadır (101-103) . Bu genlerin pozitif regülasyonuna neden olan bir diğer transkripsiyon faktörü, aktivatör protein 1 (AP-1)'dir (104) . AP-1 aktivasyonunun moleküler mekanizması, Rho ailesinden küçük GTPazların ERK/MAP kinaz kaskadlarını aktive etmesi ile başlamaktadır. AP-1 de benzer şekilde çeşitli moleküllerle kompleks oluşturarak IL-8 promotor bölgesine bağlanır ve IL-8 transkripsiyonunu indükler (104,105)

CagPAI hastalık oluşturmada gereklidir, ancak bütün *cag+* suşlar hastalıkla ilişkili değildir. *cagPAI*'nın peptik ülser ve gastrik kanserle ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (106,107) . *cagPAI* pozitif suşların sözü geçen hastalıklara neden olması *cagA* tarafından kodlanan CagA proteini ile ilişkilendirilmektedir.

CagA proteini, tirozin fosforilasyonunda da büyük rol oynayan, EPIYA tekrar bölgelerindeki (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) yapısal çeşitliliğe göre karakterize edilmektedir. A,B,C ve D olmak üzere 4 farklı EPIYA segmenti tanımlanmıştır. Batı izolatları ABC segmentlerini taşıırken, Doğu Asya izolatları ABD segmentlerini taşımaktadır. Batı izolatlarında C segmenti sıklıkla tekrar eder ve ABCC, ABCCC paternleri görülmektedir (Şekil 2.4). EPIYA-C segmenti sayısı arttıkça CagA fosforilasyonun arttığı ve buna bağlı olarak konak hücresindeki değişikliklerinde arttığı gösterilmiştir (98,108,109) . Ayrıca yapılan bir çalışmada da EPIYA-C segmenti sayısı ne kadar fazlaysa, gastrik kanser gelişimi riskinin de o kadar arttığı gösterilmiştir (110) .

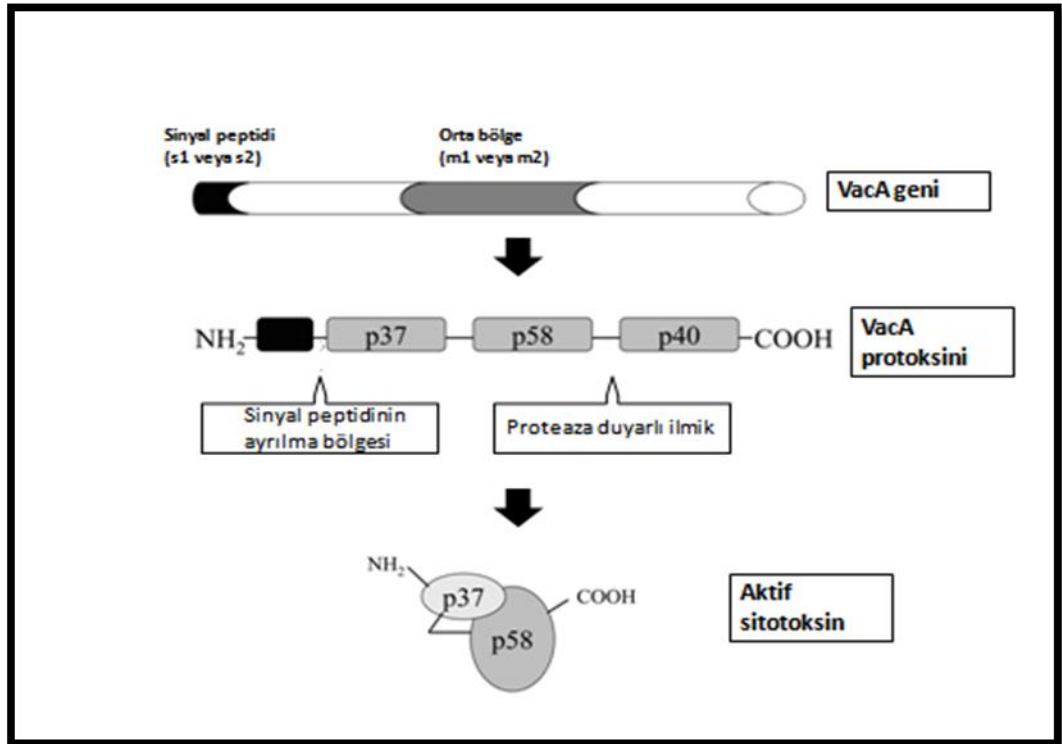


Şekil 2.4. Batı ve Doğu izolatlarında CagA EPIYA tekrar bölgeleri

Vakuolizasyon toksini (VacA)

Vakuolizasyon toksini geni 3933 bp büyüklüğünde bir açık okuma bölgesidir (ORF). *H. pylori*'nin virülans faktörlerinden biri olan ve memeli hücrelerinde vakuolizasyona sebep olan 87-93 kDa ağırlığında VacA proteinini kodlamaktadır. *H. pylori* suşlarının tamamında bu gen bulunmasına rağmen ancak %50'si aktif VacA toksini oluşturmaktadır (19,111) . *H. pylori*'de *vacA* geni önce 140 kDa ağırlığında öncül bir VacA proteini kodlamaktadır. Bu protoksin sinyal peptidi, p37 parçası,

proteaza duyarlı ilmik, p58 parçacığı ve p40 karboksi terminal domaininden oluşmaktadır (Şekil 2.5). Öncül protoksin kodlandıktan sonra karboksi ve aminoterminal bölgelerinden delesyona uğramaktadır. Geriye kalan non-kovalent olarak bağlı p37 ve p58 parçacıkları 87-93 kDa ağırlığındaki aktif toksinin fonksiyonel alt ünitelerini oluşturmaktadır. Küçük parça olan p37 domaininin vakuolizasyon aktivitesi olduğu, daha büyük parça olan p58'in ise VacA proteininin hücrelere bağlanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (112-115) .



Şekil 2.5. *H. pylori*'de vacA geni ve VacA proteini

VacA proteininin memeli hücre yüzey reseptörlerine bağlanması, gastrik epitelyum hücrelerinde toksin aktivitesinin ilk basamağıdır. VacA proteini reseptör benzeri protein tirozin fosfataz (RTP) β ve α (116) , epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) (117) gibi farklı hücre reseptörlerine bağlanabilmektedir.

Hücre dışında, biyolojik olarak aktif VacA monomerleri birleşerek biyolojik olarak inaktif olan oligomerler haline gelebilmektedir. Oligomerlerden her biri 6-7 adet VacA monomerinden oluşmaktadır. Asidik ve bazik pH'nın, oligomerlerin monomerlere dönüşerek aktive olmasına neden olduğu ileri sürülmektedir. Aktive

olmuş monomerlerin hücre içine alınımının hızlandığı ve sitotoksiteyi arttırdığı bildirilmiştir (118) . Oligomerize olmuş VacA kompleksi por oluşturan bir toksindir (119) . VacA, anyon ve üre dahil diğer küçük nötral moleküller için seçici hekzamerik porlar oluşturmaktadır. Üre geçirgenliğinin artması sonucu, üreaz enzimi için substrat artmaktadır. Üre, asidik ortamda aktive olan pasif üre taşıyıcısı UreI yardımıyla bakteri tarafından alınmakta, üreaz ve karbonik anhidraz enzimleri tarafından amonyum ve bikarbonata dönüştürülmektedir. Bu bulgular ışığında VacA proteininin üre geçirgenliğini arttırmasının, bakterinin asidik ortamda sağkalımını sağlayan önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (120) .

H. pylori suşlarının yaklaşık %50'si tarafından salgılanan VacA, hücrede endozomal fonksiyonlarda değişikliği indükleyerek mide epitelyum hücrelerinde ileri derecede vakuolizasyon oluşmasına neden olmaktadır. Vakuolizasyon etkisinin yanı sıra VacA proteinin mitokondriyal hasara neden olduğu, apoptozisi indüklediği, antijen sunumunu bozduğu, polarize tek tabaka epitelyal hücrelerde permeabilite artışına neden olduğu bildirilmektedir (72,113,121,122) .

Suşların vakuolizasyon toksin aktivitesinin, *vacA* geninin transkripsiyon seviyelerindeki farklılığa ve *vacA* alellerindeki dizi çeşitliliğine dayandığı düşünülmektedir (123) . Farklı *H. pylori* suşlarında *vacA* dizi analizleri, genin bazı bölgelerinde diğer bölgelere oranla daha belirgin allelik farklar olduğunu göstermiştir. Bu dizi farkları *vacA* geni 5' ucundaki sinyal dizisi (s) ve orta bölgede (m) görülmektedir. Bu gende 4 farklı sinyal dizisi alleli (*s1a*, *s1b*, *s1c*, *s2*) ve 2 farklı orta bölge dizisi alleli (*m1*, *m2*) bulunmaktadır (123,124) .

Bakterinin bulundurduğu farklı bölge dizisi allelleri, kodlanan proteinin toksisitesini dolayısıyla suşlar arasındaki virülans farklılıklarını belirlemektedir. Örneğin, sinyal bölgesinde *s2* alttipini bulunduran suşlarda, üretilen olgun protein kısa bir N-terminal peptidi bulundurmaktadır. Bu, vakuolizasyon aktivitesini bloke ederek daha az efektif por oluşumuna neden olmakta ve apoptozisi engellemektedir (125,126) . Ayrıca sinyal bölgesi *s1a* dizisini bulunduran suşların *s2*'yi bulunduranlara oranla gastrik enflamasyonda daha fazla artışa neden olduğu ve *vacAs1a* tipinin peptik ülser gelişimi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir(127) . Bu allellerin bütün kombinasyonları görülebilmektedir (*s1m1*, *s1m2*, *s2m1*, *s2m2*) ancak *s2m1* allelik kombinasyonu nadiren görülmektedir (123) . Yapılan çalışmalarda,

s1m1 vacA allelleri bulunduran suşların in-vitro olarak HeLa hücrelerinde yüksek sitotoksinite gösterdiği, *s1m2*'nin orta düzey ve *s2m2 vacA* allelleri bulunduran suşların düşük düzey bir sitotoksinite meydana getirdiği gösterilmiştir (115) .

Sinyal ve orta bölgesi tipleri belirgin bir bölgesel farklılık göstermektedir. Doğu izolatlarında genellikle *s1m1* genotipi baskındır. Doğu Asya'da peptik ülser ve gastrik kanser insidansının oldukça yüksek olması, *s1m1* genotipinin daha virülan olduğu hipotezini desteklemektedir (128) . Türkiye'deki izolatlarda ise Batı izolatlarında olduğu gibi orta düzeyde virülan olan *s1/m2* genotipinin baskın olduğu gösterilmiştir (129) . Bu durum Türkiye'deki şiddetli gastroduodenal hastalık prevalansının Doğu Asya'ya göre daha düşük oluşunu açıklayabilmektedir.

H. pylori'de *vacA* geni *cagPAI*'nın dışında bulunsada, *vacA s1* genotipi ve *cagA* arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (123) . Çoğunlukla *s1* genotipi ve *cagA* pozitifliği bir arada bulunmakta ve bu bulgular bize *H. pylori* suşunun ülserojenik potansiyeli hakkında bilgi vermektedir (127) .

2007 yılında Rhead ve diğ. (130) *vacA* gen bölgesinde *intermediate region* (*i* bölgesi) olarak adlandırılan bölgeyi tanımlamışlardır. “*i*” bölgesi VacA proteininin p33 alt ünitesini kodlamaktadır ve *i1* ve *i2* olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Diğer *vacA* allelleriyle bu bölgenin ilişkisini de karşılaştırdıkları çalışmalarında sadece *s1/m2* suşlarının farklı *i* bölgesi tipleri bulundurduğu (*i1* veya *i2*), *s1/m1* ve *s2/m2* suşlarının ise *i1* veya *i2* tiplerinden sadece birini bulundurduğunu belirlemişlerdir. *vacA* geni *i* bölgesinin, *H. pylori*'nin toksisitesini ve VacA ile ilişkili patojeniteyi belirleyen önemli bir belirteçtir. Bu bölgenin tespiti için geliştirdikleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı bir yöntemle, İran'dan izole ettikleri suşlarda *i* bölgesini tespit etmiş ve *i1* tipini bulunduran suşların gastrik kanser ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra, Basso ve diğ. (110) yaptıkları çalışmada, hem CagA proteini EPIYA-C segmenti sayısının hem de *i* bölgesi tipinin, *H. pylori* kaynaklı hastalıklarla ilişkisini değerlendirmiş ve EPIYA-C segmenti sayısının kanser riskiyle, *i1* tipinin ise peptik ülser riskiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

2.9. Laboratuvar Tanısı

H. pylori enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler invaziv (histoloji, kültür, hızlı üreaz testi) ve non-invaziv (üre nefes testi, serolojik testler, dışkıda antijen testi, moleküler testler) yöntemler olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır.

H. pylori tanısında kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü, kullanılacak yöntemin değerlendirilmesinde önemli parametrelerdir (Tablo 2.2) (131)

Tablo 2.2. *H. pylori* tanısında kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri (81,131)

		Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)
İnvaziv Testler	Kültür	95	100
	Histoloji	95,6	100
	Hızlı üreaz testi	98,6	100
Non-invaziv Testler	Üre nefes testi	93,3	98,1
	PCR	93,2	96,2
	Seroloji	95,6	92,6
	İmmünoblot	95,6	92,6
	Dışkıda antijen testi	88,9	94,4

2.9.1. İnvaziv Testler

Histoloji

Çeşitli boyama yöntemleriyle dokunun boyanması ve dokudaki enflamasyonun, prekarsinojen değişimlerin ve varsa etkenin gösterilmesine dayalı bir yöntemdir. Warthin-Starry ve modifiye Giemsa boyaları etkenin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan boyama yöntemleridir. Hemotoksilen-eozin, *Alcian blue* ve Genta boyalarının kullanıldığı üçlü kombinasyon *H. pylori*'nin ve gastrik morfolojinin etkin

olarak görüntülenmesini sağlamaktadır (132,133) . Ayrıca immunohistokimyasal boyalarda etkenin tespitinde yüksek duyarlılık ve özgüllükte yöntemlerdir (134) .

Son yıllarda tanımlanan bir diğer yöntem, floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemidir. Bu yöntem histolojik örneklerde, hem etkenin tespitine hem de klaritromisin direncinin saptanmasına olanak tanımaktadır. Analiz süresi yaklaşık üç saat olduğu için hızlı bir yöntemdir (135) . In situ hibridizasyon ve immunokimyasal yöntemler ayrıca virülans faktörlerinin ve etkenin gastrik mukozadaki lokalizasyonunun da belirlenmesine imkân sağlamaktadır (136) .

Kültür

H. pylori tanısında altın standart etkenin kültürde izolasyonudur. Ancak duyarlılık örneğin niteliğine, transport şekli ve süresine, inkübasyon koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Mikroaerofilik karakterdeki bakteri dış koşullardan kolaylıkla etkilendiği ve kültürde üretilmeyen kokoid forma dönüştüğü için örneğin hemen laboratuara iletilmesi ve kültürünün yapılması önem arz etmektedir. %5-7 oranında at kanı içeren BHI besiyerinde, mikroaerofilik koşullarda, 5-10 günlük inkübasyon süresinin ardından küçük, gri, yuvarlak koloniler gözlenebilmektedir (58) . Bakterinin tanımlanması koloni morfolojisi, Gram boyama veya üreaz testi ile yapılabilmektedir.

Hızlı Üreaz Testi (HUT)

Mide biyopsi örneklerinde *H. pylori* üreaz aktivitesinin tespitine dayalı bir yöntemdir. *H. pylori* pozitif biyopsi örneği, üre içeren besiyerine eklendiğinde, bakterinin üreaz enzimi üreyi amonyak ve karbondioksit çevirmektedir. Amonyak ortam pH'ını arttırmakta ve bunun sonucunda besiyerindeki pH indikatörü olan fenol kırmızısı renk değiştirmektedir. Reaksiyon hızı kullanılan biyopsi materyalinin büyüklüğü ve sayısı ile doğru orantılıdır. Hızlı üreaz testinin etkinliği bakteri yoğunluğuna da bağlı olduğundan antibiyotik tedavisi almış hastalarda yanlış negatiflik görülebilmektedir. Ayrıca etüv gibi sıcaklığın oda ısısına göre daha yüksek olduğu bir ortamda da reaksiyon hızı artmaktadır (137,138) . Ticari olarak kullanımda olan çeşitli hızlı üreaz testleri bulunmaktadır(139) .

2.9.2 Noninvaziv Testler

Üre Nefes Testi

Bu test *H. pylori*'nin üreaz aktivitesine dayanmaktadır. Hastaya sitrik asit içerisinde izotopkarbonla işaretli üre kapsülü içirilir, midede açılan kapsüldeki üre *H. pylori* üreazı tarafından parçalanır. Oluşan karbondioksitin tespiti için işaretleyici olarak ^{13}C veya ^{14}C kullanılmaktadır. Serbest kalan işaretli karbondioksit molekülü özel yöntemlerle saptanmaktadır. İşaretleme maddesi olarak radyoaktif madde içermediğinden dolayı ^{13}C kullanılması daha güvenilir bir yöntemdir. Sıklıkla tedavinin takibinde tercih edilen bir yöntemdir (140) .

Serolojik Testler

H.pylori ile gastrik mukozanın enfeksiyonu lokal immun yanıt yanında sistemik yanıt da neden olmaktadır. Serum, tükürük, idrar, gastrik sıvılarda anti-*H.pylori* antikorlarının saptanması (IgG, IgM, IgA) ile etkenin tespiti oldukça kolay ve hızlı bir yöntemdir. IgM ve IgA yanıtının saptanamadığı olgular olabildiğinden dolayı özellikle ticari kitler genellikle IgG yanıtını saptamaya yöneliktir (141) . Serolojik testlerde antijen olarak *H. pylori* tüm hücre veya üreaz, CagA, ısı şok proteinleri, katalaz antijenlerinin kullanıldığı kompleks antijen karışımları kullanılmaktadır (142) .

Dışkıda Antijen Testi

Gastrik epitelyum hücreleri 1-3 gün içerisinde rejenere olmaktadır. Dökülen gastrositler *H. pylori* ile birlikte gaita ile atılmaktadır. Gaitada epitelle atılan *H. pylori*'nin tespiti için özgül monoklonal veya poliklonal antikorların kullanıldığı testler, son yıllarda noninvaziv testler içinde en umut vaad eden test olarak görülmektedir (143) .

Moleküler Yöntemler

Son yıllarda moleküler yöntemler, *H. pylori*'nin tespiti, özgül virülans faktörlerinin tayini, antibiyotik direncinin belirlenmesi, eradikasyon sonrası tekrarlayan enfeksiyonların nedenlerinin belirlenmesi, kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması için sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerle kültürde üretilen bakterinin yanı sıra direkt klinik örneklerde de (tükürük, mide sıvısı,

mide biyopsisi, dışkı) *H. pylori* suşlarına ait özgül nükleik asit dizileri direkt olarak saptanabilmektedir. Bu amaçla pek çok amplifikasyon ve restriksiyon bazlı yöntem kullanılmaktadır (144) . *H. pylori*'nin tespitinde, hedef bölge olarak 16s rRNA geni (145) , üreaz genleri (*ureA*, *ureC*) (146,147) , *cagA* ve *vacA* allelleri (123) gibi özgül virülans faktörlerini kodlayan genler kullanılabilmektedir.

2.10 Tedavi

2005 yılında yapılan Maastricht-3 Uzlaş toplantısına göre, proton pompası inhibitörü (PPI), klaritromisin ve amoksisilin (veya metranidazol)'den oluşan birinci basamak üçlü tedavi rejimi geçerliliğini korumaktadır. Bu tedavi rejiminin süresi 7 gün yerine 14 gün olarak önerilmektedir. Ancak klaritromisin direncinin %15-20'den yüksek olduğu toplumlarda bu tedavi rejiminin etkinliği düşmektedir. Metranidazol direncinin %40'dan az olduğu toplumlarda, metranidazol içeren birinci basamak tedaviler önerilmektedir. Klaritromisin ve metranidazol direnci tedavi başarısızlıklarının en önemli nedenidir. Alternatif olarak bizmut, metranidazol, tetrasiklin ve PPI'den oluşan dördü tedavi rejimi, metranidazol direncinin düşük klaritromisin direncinin ise yüksek olduğu bölgelerde kullanılabilmektedir. Maastricht-3 Uzlaş bildirisinde; değişen direnç oranlarına bağlı olarak bölgelere göre tedavi rejiminin değişmesi gerektiğinde ve uygulanacak tedavi rejiminin antibiyotik direncine bakıldıktan sonra seçilmesi konusunda bir fikir birliğine varılmıştır (148) .

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde 1999-2009 yılları arasında izole edilen *H. pylori* suşlarının stok kültürlerinden rastgele seçilen 120 örnek çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Endoskopik ve Histopatolojik Bulgular

Çalışmaya alınan suşların izole edildikleri hastaların dosyalarına ulaşarak 120 hastanın endoskopik bulguları belirlenmiştir. Yüz yirmi hastadan; 66'sı (%82,5) çocuk, 14'ü (%17,5) erişkin toplam 80 hastanın patoloji raporuna ulaşılabilmiştir. Endoskopik ve patolojik bulgular 5 kategoride toplanarak değerlendirilmiştir.

1. Normal
2. Gastrit
3. Gastroduodenit (gastrit+duodenit)
4. Özofajit
5. Ülser

3.3. PCR Uygulamaları

Yüz yirmi *H. pylori* stok kültüründen boncuklar Tris-Edta (etilen diamin tetraasetat) (TE) içine alındı. Örneklerin DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA ekstraktları önce ureA gen dizisinin tespiti yönünden özgül primerler yardımı ile incelendi. UreA geni pozitif bulunan ve hasta bilgilerine ulaşılan 120 örneğin DNA ekstraktları, *cagA* ve *vacA* gen alellerinin tespiti için özgül primerler kullanılarak değerlendirildi.

3.3.1 DNA Ekstraksiyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

Daha önceden biyopsi örneklerinden kültürü yapılan ve -80°C'de saklanan stok kültürlerden 4-5 boncuk veya üreme olan kültürlerden bir plak dolusu bakteri 500 µl TE tamponu içeren 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.

TE tamponunun hazırlanması:

2M Tris HCL stok çözeltisi (pH 8.0)

Tris base (Sigma) 10,6 g

Tris HCL (Sigma) 17.7 g

Steril distile su	100 ml'ye tamamlandı.
0.5M EDTA stok çözeltisi (pH 8,0)	
EDTA (Sigma)	18.61 g
Steril distile su	100 ml'ye tamamlandı
TE tamponu (pH 8.0)	
2M Tris HCL	0,5 ml
0.5 M EDTA	0,2 ml
Steril distile su	100 ml'ye tamamlandı.

DNA Ekstraksiyonu

Bakterilerin DNA ekstraksiyonu için CTAB yöntemi kullanıldı (149) .

CTAB solüsyonunun hazırlanması:

4,1 g NaCl, 80 ml suda çözüldü. İçerisine 10 g CTAB, 650C'lik su banyosunda yavaş yavaş ilave edilerek CTAB solüsyonu hazırlandı.

CTAB yöntemiyle DNA ekstraksiyonu:

1. 500 µl TE tamponu içindeki bakteri örneğine 40µl %10 SDS(sodyum dodesil sülfat) ve 4µl 20mg/ml Proteinaz K eklendi, pipetlemeyle iyice karıştırılarak bir gece 37⁰C'de inkübe edildi.
2. 100 µl 5M NaCl eklenerek vortekslendi.
3. 80 µl CTAB solüsyonu eklenerek vortekslendi. 65⁰C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
4. 750 µl kloroform eklenerek vortekslendi ve 8 dakika 1600 rpm'de santrifüj edildi.
5. Süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alındı. 24 ml kloroform/1ml izopropanol karışımından süpernatanta 700 µl eklendi, vortekslendikten sonra 8 dakika 1600 rpm'de santrifüj edildi.
6. Süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alındı. 700 µl izopropanol eklendi ve çok nazik olarak sallayarak karıştırıldı ve DNA hava kabarcıkları şeklinde görüldü. 13 dakika 1600 rpm'de santrifüj edildi.
7. Süpernatant pipet yardımıyla alınıp atıldı. Kalan çökeltinin üzerine 200 µl %70'lik etanol eklendi ve 6 dakika 1600 rpm'de santrifüj edildi.

8. Çökeltiye dokunmadan pipet yardımıyla etanol alındı ve atıldı. Çökelti oda sıcaklığında 2,5 saat bekletilerek kuruması sağlandı.
9. Çökelti üzerine 100 µl TE eklendi. DNA hemen kullanılacaksa +4°C’de, daha sonra kullanılacaksa -20°C’de bekletildi.

Ekstrakte edilmiş DNA içeren tüpler, araştırılacak olan gen bölgelerinin amplifikasyonları tamamlanıncaya kadar -20°C’de saklandı.

3.3.2. Hedef Bölgelerin Amplifikasyonunda Kullanılan Primer Dizileri

H. pylori ureA, cagA ve vacA allelleri (*m1, m2, s1a, s1b, s2*) hedef bölgelerinin tespitinde kullanılmış olan özgül primer dizileri tabloda verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Hedef bölgelerin amplifikasyonunda kullanılan özgül primer dizileri

Hedef bölge	Primer adı	Primer dizisi	Çoğaltılacak bölgenin büyüklüğü
<i>ureA</i>	HPU1 HPU2	5' GCCAATGGTAAATTAGTT 3' 5' GCCAATGGTAAATTAGTT 3'	411 bç
<i>cagA</i>	F1 B1	5' GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG 3' 5' CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA 3'	348 bç
<i>m1</i>	VA3F VA3R	5' GGTCAAAATGCGGTCATGG 3' 5' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'	290 bç
<i>m2</i>	VA4F VA4R	5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3' 5' CATAACTAGCGCCTTGCAC 3'	352 bç
<i>s1a</i>	SS1F VA1R	5' GTCAGCATCACACCGCAAC 3' 5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	190 bç
<i>s1b</i>	SS3F VA1R	5' AGCGCCATACCGCAAGAG 3' 5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	187 bç
<i>s2</i>	SS2F VA1R	5' GCTAACACGCCAAATGATCC 3' 5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	199 bç

3.3.3. PCR ile Amplifikasyon

PCR, 100 µl'lik tüplerde 25 µl hacminde reaksiyon karışımında yapıldı. Her tüpe aşağıda yazılan miktarla hazırlanan karışımdan 23 µl ve DNA örneğinden 2 µl eklendi.

Apirojen distile su	16,2 µl
PCR tamponu (10x) (Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM) (Fermentas)	1,5 µl
dNTP (2,5 mM) (Metis Biyoteknoloji)	2 µl
Primer1 (100 µM)	0,3 µl
Primer2 (100 µM)	0,3 µl
TaqPolimeraz (5U/µl)(Fermentas)	0,2 µl

ureA Geninin Amplifikasyonu

Çalışmaya alınan suşların hem *H. pylori* olduğunun doğrulanması için *H. pylori* için özgül *ureA* genine bakıldı. DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 120 örnek *ureA* geni varlığı bakımından değerlendirildi. *ureA* geninin 411 bp'lik bölgesini çoğaltmak için HPU1 ve HPU2 primerleri kullanıldı (bkz. Tablo 3.1). Amplifikasyonu için PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına (MJ-Research, Inc, USA) yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

1. 95°C (ilk denatürasyon)	2 dakika	1 döngü
2. 94°C (denatürasyon)	1 dakika	} 35 döngü
48°C (bağlanma)	1 dakika	
72°C (uzama)	1 dakika	
3. 72°C (son uzama)	5 dakika	1 döngü

Amplifikasyonu gerçekleştirilen ürünler, % 2'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak incelendi ve *ureA* geni pozitif bulunan örnekler *cagA* ve *vacA* genleri yönünden araştırıldı.

***cagA* Geninin Amplifikasyonu**

Çalışmaya alınan *H. pylori* suşlarını *cagPAI* varlığının bir göstergesi olan *cagA* geni varlığı açısından değerlendirmek için *cagA* gen bölgesinin 348 bp uzunluğundaki bölgesine özgül olan F1 ve B1 primer dizileri kullanıldı (bkz. Tablo 3.2). Bu gen bölgesinin amplifikasyonu için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

1. 94°C (ilk denatürasyon)	2 dakika	1 döngü
2. 95°C (denatürasyon)	1 dakika	} 35 döngü
55°C (bağlanma)	1 dakika	
72°C (uzama)	1 dakika	
3. 72°C (son uzama)	5 dakika	1 döngü

***vacA* Gen Allellerinin Amplifikasyonu**

vacA gen allellerinin (*s1a*, *s1b* ve *s2*, *m1* ve *m2*), tablo 3.2 de verilen özgül primer dizileri kullanılarak amplifikasyonu yapıldı. Bu allellerin amplifikasyonu için termal döngü cihazında uygulanan protokol aşağıdaki gibidir:

4. 94°C (ilk denatürasyon)	2 dakika	1 döngü
5. 95°C (denatürasyon)	1 dakika	} 35 döngü
52°C (bağlanma)	1 dakika	
72°C (uzama)	1 dakika	
6. 72°C (son uzama)	5 dakika	1 döngü

3.4 Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Çoğaltılan PCR ürünlerinin elektroforezi için % 2'lik (ağırlık/hacim) agaroz jel hazırlandı. Hem tank tamponu olarak, hem de agaroz jelinin hazırlanmasında TAE (Tris, asetat, EDTA) tamponu kullanıldı. TAE konsantre şeklinde (50xTAE) stok solusyon olarak hazırlandı ve gerektiğinde, 1xTAE olacak şekilde sulandırıldı.

50X TAE Hazırlanışı:

Tris base (Sigma)	242 g
Konsantre asetik asit	57.1 ml
EDTA 500mM pH8.0 (Sigma)	100 ml
Distile su ile 1 litreye tamamlandı.	

Jeldeki çukurlara 10µl örnek, 5µl yükleme tamponu (Orange G; BioLabs) ile karıştırılarak yüklendi. Her çalışmada 100 bç uzunluğunda moleküler belirteç (BioLabs), pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanıldı. Pozitif kontrol olarak *cagA* ve *ureA* gen bölgelerinin belirlenmesinde *H. pylori* NCTC 11637'den ekstrakte edilmiş DNA, *vacA* allellerinin belirlenmesinde ise pozitif olduğu bilinen örnekler kullanıldı. Örnekler jele yüklendikten sonra 1xTAE ile tanka yerleştirilerek güç kaynağına bağlandı. 100V'luk elektrik akımında yaklaşık 90 dakika yürütüldü %0,1 (hacim/hacim) etidyum bromür çözeltisinde jeller 30 dakika boyandı. Boyanan jeller jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi (UVP, White/UV Transilluminator). Özgül bölgelerde bant oluşumu olup olmadığı 100 bç'lik moleküler belirteç ve pozitif kontroller ile kıyaslanarak değerlendirildi. Her örnek, doğrulama için iki kez çalışıldı. PCR uygulamasının her aşamasında kontaminasyonun önlenmesi ve toksik maddelerden korunmak amacıyla eldiven kullanıldı, tepkime karışımlarının hazırlanması ve örneklerin PCR için hazırlanması aşamaları laminar flow kabinde gerçekleştirildi. Çalışma öncesinde kabinin içi % 10'luk çamaşır suyu ve % 70'lik etil alkol kullanılarak temizlendi.

3.5 İstatistiksel Analiz

Gruplar arası farklılıkların araştırılmasında çok gözlü ki kare analizi yapılmıştır. Uygulanan testte $p < 0,05$ değeri gruplar arası anlamlı farklılığı ifade etmiştir. Çapraz tablolarda sıfır olan gözlemlere düzeltme uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya ureA geni pozitif, *cagA* ve *vacA* geni allellerinin varlığı değerlendirilen 120 stok suş dahil edilmiştir. Bu 120 suşun 84'ü çocuk, 36'sı erişkin hastalardan izole edilmiştir. Çocuk hastaların yaş aralığı 6-18, yaş ortalaması $12,37 \pm 2,94$ olarak, erişkin hastaların yaş aralığı 20-67, yaş ortalaması $42,13 \pm 18,95$ olarak belirlenmiştir. Erişkin ve çocuk hastaların cinsiyete göre dağılımları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. *H. pylori* izole edilen hastaların cinsiyet dağılımı

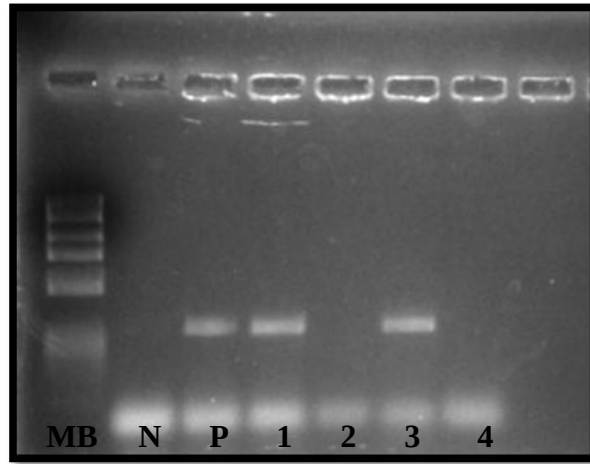
	Kadın n(%)	Erkek n(%)	Toplam n(%)
Çocuk	48(40,0)	36(30,0)	84(70,0)
Erişkin	22(18,3)	14(11,7)	36(30,0)
Toplam	70(58,3)	50(41,7)	120(100,0)

4.1. *cagA* Bulguları

Çalışmaya alınan *H. pylori* suşlarının 64'ünün (%53,3) *cagA* pozitif olduğu saptanmıştır. *cagA* geninin 348 bç'lik bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.1'de verilmiştir. Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen suşlar arasında *cagA* pozitifliği bakımından fark bulunmamıştır ($p=0,472$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen suşlarda *cagA* dağılımı

	<i>cagA</i> - n(%)	<i>cagA</i> + n(%)	Toplam n(%)
Çocuk	41(48,8)	43(51,2)	84(100,0)
Erişkin	15(41,7)	21(58,3)	36(100,0)
Toplam	56(46,7)	64(53,3)	120(100,0)



**Şekil 4.1 *cagA* geninin 348 bp'lık bölgesinin amplifikasyon ürünleri
(MB:moleküler belirteç, P:pozitif kontrol, N:negatif kontrol, 1,3:pozitif örnek,
2-4:negatif örnekler)**

Çalışmaya alınan *H. pylori* suşlarında *cagA* pozitifliği ve endoskopik bulgular arasında bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,793$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Çalışmaya alınan *H. pylori* suşlarında *cagA* varlığının endoskopik bulgulara göre dağılımı

	<i>cagA</i> - n(%)	<i>cagA</i> + n(%)	Toplam n(%)
Normal	2(25,0)	6(75,0)	8(100,0)
Gastrit	34(48,6)	36(51,4)	70(100,0)
Gastroduodenit	12(52,2)	11(47,8)	23(100,0)
Özofajit	3(37,5)	5(62,5)	8(100,0)
Ülser	5(45,5)	6(54,5)	11(100,0)
Toplam	56(46,7)	64(53,3)	120(100,0)

Çalışmaya alınan *H. pylori* suşlarından patoloji raporlarına ulaşılan 80 hastadan 41'i (%51,2) *cagA*+’dir. Patolojik bulgular ve *cagA* pozitifliği arasında bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p=0,554$) (Tablo 4.4)

Tablo 4.4. Çalışmaya alınan *H. pylori* suşlarında *cagA* varlığının patoloji bulgularına göre dağılımı

	<i>cagA</i> - n(%)	<i>cagA</i> + n(%)	Toplam n(%)
Normal	1(100,0)	0(0)	1(100,0)
Gastrit	27(45,0)	33(55,0)	60(100,0)
Gastroduodenit	6(54,5)	5(45,5)	11(100,0)
Özofajit	2(40,0)	3(60,0)	5(100,0)
Ülser	3(100,0)	0(0)	3(100,0)
Toplam	39(48,8)	41(51,2)	80(100,0)

Tablo 4.5’de, 80 hastanın *cagA* sonuçlarının endoskopik ve patolojik tanılarına göre dağılımı birlikte verilmiştir.

Tablo 4.5. *cagA* varlığının endoskopi ve patoloji bulgularına göre dağılımı

	<i>cagA</i> +		<i>cagA</i> -		Toplam	
	n (%)		n (%)		n (%)	
	E	P	E	P	E	P
Normal	2 (66,6)	0 (0)	1 (33,3)	1 (100,0)	3 (100,0)	1 (100,0)
Gastrit	25 (52,1)	33 (55,0)	23 (47,9)	27 (45,0)	48 (100,0)	60 (100,0)
GD	7 (41,2)	5 (45,4)	10 (58,8)	6 (54,6)	17 (100,0)	11 (100,0)
Özofajit	3 (60,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	5 (100,0)	5 (100,0)
Ülser	4 (57,1)	0 (0)	3 (42,9)	3 (100,0)	7 (100,0)	3 (100,0)
Toplam	41 (51,2)	41 (51,2)	39 (48,75)	39 (48,75)	80 (100,0)	80 (100,0)

E:Endoskopik bulgular

P:Patolojik bulgular

GD:Gastroduodenit

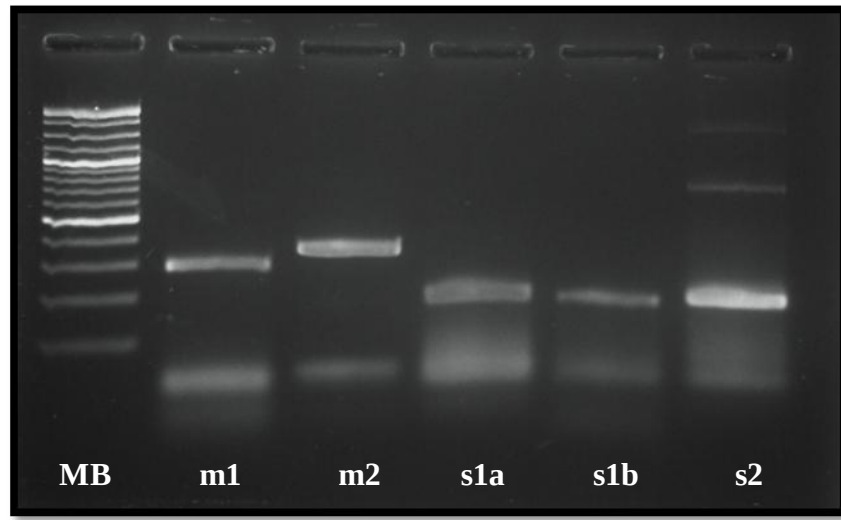
4.2. *vacA* Gen Alelleri Bulguları

vacA geni *m1*, *m2*, *s1a*, *s1b* ve *s2* allelerinin sırasıyla 290, 352, 190, 187 ve 199 bç uzunluğundaki amplifikasyon ürünlerinin %2’lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir.

vacA geni sinyal(s) bölgesinin tespiti için özgül primerler kullanılmış ve 120 *H. pylori* suşundan 13 tanesinin “s” bölgesi saptanamamıştır. Sinyal bölgesi

saptanan 107 örnekten 75'i (%70,1) *vacAs1a*, 3'ü (%2,8) *vacAs1b*, 29'u (%27,1) *vacAs2* genotipindedir.

vacA orta (*m*) bölgesinin genotiplendirmesi için özgül primer setleri ile incelenen 120 *H. pylori* suşundan yedi tanesinin “*m*” bölgesi saptanamamıştır. Orta (*m*) bölgesi saptanan 113 örnekten 38'i (%33,6) *vacAm1*, 74'ü (%65,5) *vacAm2* genotipindedir. Suşlardan 1'inde (%0,9) hem *vacAm1* hem de *vacAm2* genotipi saptanmıştır. Hastaların endoskopik bulguları ile farklı *vacA* genotiplerini bulundurmaları arasında bir ilişki saptanamamıştır ($p=0,349$) (Tablo 4.6).



Şekil 4.2. *vacA* gen allellerinin amplifikasyon ürünleri
***m1*:290 bç, *m2*:352 bç, *s1a*:190 bç, *s1b*:187 bç, *s2*:199 bç**

Tablo 4.6. “s” ve “m” genotiplerinin endoskopik bulgulara göre dağılımı

	<i>s1a</i> n(%)	<i>s1b</i> n(%)	<i>s2</i> n(%)	<i>m1</i> n(%)	<i>m2</i> n(%)
Normal	7(9,3)	0(0)	0(0)	4(10,5)	4(5,4)
Gastrit	42(56,0)	3(100)	17(58,6)	20(52,6)	43(58,1)
Gastroduodenit	13(17,4)	0(0)	9(31,0)	6(15,8)	17(23,0)
Özofajit	6(8,0)	0(0)	0(0)	5(13,2)	3(4,0)
Ülser	7(9,3)	0(0)	3(10,4)	3(7,9)	7(9,5)
Toplam	75 (100)	3(100)	29(100)	38(100)	74(100)

Bu çalışmada “s” ve “m” bölgesine özgül primer setleri kullanılarak 120 suşun 105’inde (%87,5) vakuolizasyon toksini genotiplendirmesi yapılabilmektedir. *m1* ve *m2* genotiplerinin ikisinin de saptandığı bir örnek *vacA* genotiplendirmesi ile hastaların endoskopi ve patoloji sonuçlarının ilişkisinin analizine alınmamıştır. Orta ve sinyal bölgelerinin tiplendirmesi yapılabilen suşların 35’i (%33,6) *s1a/m1*, 37’si (%35,6) *s1a/m2*, 1’i (%1) *s1b/m1*, 2’si (%1,9) *s1b/m2*, 29’u (%27,9) *s2/m2* genotipinde bulunmuştur. En sıklıkla görülen *vacA* genotipi *s1a/m2* genotipidir. Suşların hiçbirinde *s2/m1* genotipi saptanmamıştır. Orta bölgesi ve/veya sinyal bölgesi saptanamadığı için *vacA* genotiplendirmesi yapılamayan 15 suşun 5’inde “m” ve “s” bölgeleri saptanamadığı gibi *cagA* de saptanamamıştır.

Çalışmaya alınan suşların *vacA* genotiplerinin hastaların endoskopik bulgularına göre dağılımı incelenirken istatistiksel analiz için yeterli örnek sayısı olmadığından frekanslar üzerinden yorum yapılmıştır. Gastrit tanısı almış hastalarda 5 *vacA* genotipi de saptanmıştır. Ancak *vacAs1b/m1* ve *vacAs1b/m2* genotiplerinin frekansları diğerlerine göre daha düşüktür. Endoskopik olarak ülser tanısı almış 10 hastadan 4’ünün (%40) *vacAs1a/m2*, özofajit tanısı almış 6 hastadan 4’ünün (%66,7)

ise yüksek virülan olarak bilinen *vacAs1a/m1* genotipinde olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *vacA* genotiplerinin endoskopik bulgulara göre dağılımı

<i>vacA</i> genotipi						
	<i>s1a/m1</i> n(%)	<i>s1a/m2</i> n(%)	<i>s1b/m</i> n(%)	<i>s1b/m2</i> n(%)	<i>s2/m2</i> n(%)	Toplam n(%)
Normal n(%)	4(57,1)	3(42,9)	0(0)	0(0)	0(0)	7(100,0)
Gastrit n(%)	18(30,5)	21(35,6)	1(1,7)	2(3,4)	17(28,8)	59(100,0)
GD (%)	6(27,3)	7(31,8)	0(0)	0(0)	9(40,9)	22(100,0)
Özofajit n(%)	4(66,7)	2(33,3)	0(0)	0(0)	0(0)	6(100,0)
Ülser n(%)	3(30,0)	4(40,0)	0(0)	0(0)	3(30,0)	10(100,0)
Toplam	35(33,6)	37(35,6)	1(1,0)	2(1,9)	29(27,9)	104(100,0)

GD: Gastroduodenit

Patolojik bulguları bulunan hastalardan izole edilen 80 *H. pylori* suşunun *vacA* genotiplerinin hastaların patolojik bulgularına göre dağılımı incelenirken istatistiksel analiz için yeterli örnek sayısı olmadığından frekanslar üzerinden yorum yapılmıştır. Patolojik olarak mide ülseri tanısı almış 3 hastanın 2'si (%66,7) *vacAs2/m2* genotipindedir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. *vacA* genotiplerinin patolojik bulgulara göre dağılımı

<i>vacA</i> genotipi						
	<i>s1a/m1</i> n(%)	<i>s1a/m2</i> n(%)	<i>s1b/m1</i> n(%)	<i>s1b/m2</i> n(%)	<i>s2/m2</i> n(%)	Toplam n(%)
Normal n(%)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Gastrit n(%)	20(36,4)	18(32,7)	0(0)	1(1,8)	16(29,1)	55(100,0)
GD n(%)	3(27,3)	6(54,5)	0(0)	0(0)	2(18,2)	11(100,0)
Özofajit n(%)	1(25,0)	2(50,0)	0(0)	0(0)	1(25,0)	4(100,0)
Ülser n(%)	0(0)	1(33,3)	0(0)	0(0)	2(66,7)	3(100,0)
Toplam	24(32,9)	27(37,0)	0(0)	1(1,4)	21(28,7)	73(100,0)

GD: Gastroduodenit

Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen *H.pylori* suşları arasında *vacA* genotiplerinin dağılımı bakımından bir fark bulunamamıştır ($p=0,480$) (Tablo4.9).

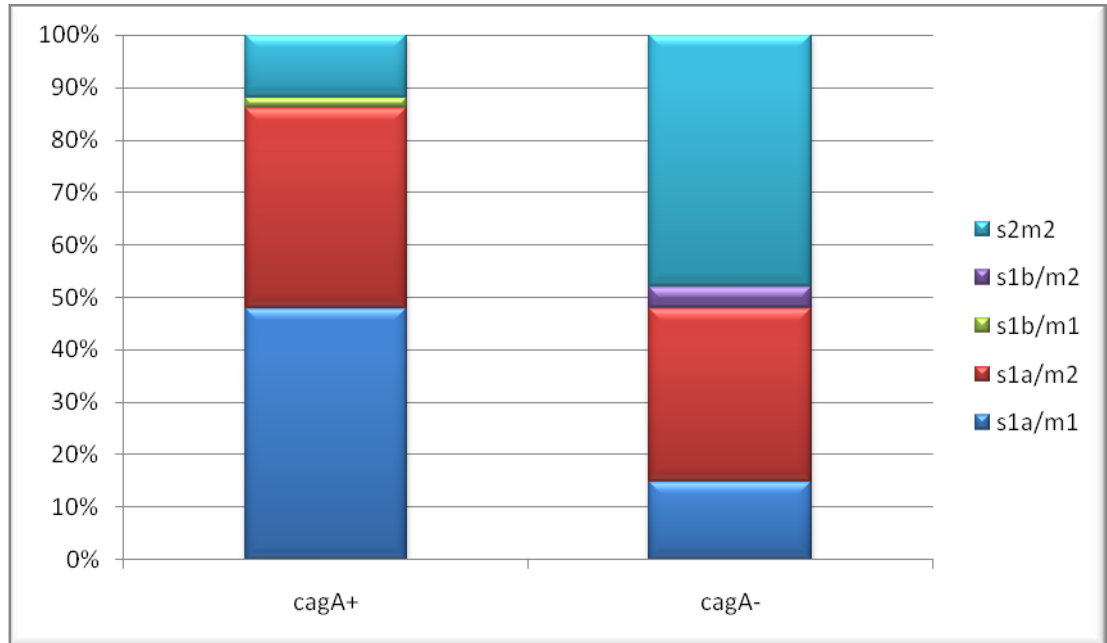
Tablo 4.9. Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarında *vacA* genotiplerinin dağılımı

<i>vacA</i> genotipi						
	<i>s1a/m1</i> n(%)	<i>s1a/m2</i> n(%)	<i>s1b/m1</i> n(%)	<i>s1b/m2</i> n(%)	<i>s2/m2</i> n(%)	Toplam n(%)
Çocuk n(%)	23(29,9)	28(36,4)	1(1,3)	2(2,6)	23(29,9)	77(100,0)
Erişkin n(%)	12(44,5)	9(33,3)	0(0)	0(0)	6(22,2)	27(100,0)
Toplam	35(33,6)	37(35,6)	1(1,0)	2(1,9)	29(27,9)	104(100,0)

vacA genotipleri ile *cagA* varlığının ilişkisi incelendiğinde *cagA*⁺ suşların çoğunlukla yüksek virülan *vacAs1a/m1* genotipini taşıdığı saptanırken, *cagA*⁻ suşların büyük bölümünün (%47,8) düşük düzeyde virülan olan *vacAs2/m2* genotipini bulundurduğu gözlenmiştir (p=0.000) (Tablo4.10) (Şekil 4.3) .

Tablo 4.10. Çalışmaya alınan suşların *vacA* genotipleri ile *cagA* varlığının ilişkisi

<i>vacA</i> genotipi						
	<i>s1a/m1</i> n(%)	<i>s1a/m2</i> n(%)	<i>s1b/m1</i> n(%)	<i>s1b/m2</i> n(%)	<i>s2/m2</i> n(%)	Toplam n(%)
<i>cagA</i> ⁺ n(%)	28(48,3)	22(37,9)	1(1,7)	0(0)	7(12,1)	58(100,0)
<i>cagA</i> ⁻ n(%)	7(15,2)	15(32,6)	0(0)	2(4,4)	22(47,8)	46(100,0)
Toplam	35(33,6)	37(35,6)	1(1,0)	2(1,9)	29(27,9)	104(100,0)



Şekil 4.3. *cagA* varlığına göre *vacA* genotiplerinin dağılımı

5. TARTIŞMA

H. pylori'nin PCR yöntemiyle tespitinde hedef bölge olarak *ureA* geni kullanılabilmektedir (147) . Bu çalışmada HPU1 ve HPU2 primerleri kullanılarak *ureA* geninin 411 bp'lik bölgesinin amplifikasyonu stok kültürlerde *H. pylori* varlığının doğrulanması amacıyla yapılmıştır.

H. pylori enfeksiyonlarının klinik seyrini hem konağa hem de bakteriye ait birçok faktör belirlemektedir. Özellikle farklı virülans faktörlerinin enfekte kişilerde saptanan farklı gastroduodenal patolojilerle ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (150,151) . Bununla bağlantılı olarak virülansla ilişkili birçok gen bölgesi tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri *cagA* ve *vacA* genleridir (15,123) .

Bu çalışmada; *ureA* geni PCR ile pozitif bulunan ve hasta bilgilerine ulaşılan 120 örnekte bakteriye ait muhtemel *cagA* ve *vacA* geninin *s1a*, *s1b*, *s2* ve *m1*, *m2* allellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

cagA, *cagPAI* denilen gen bölgesinin yaklaşık 40 kb'lık bir bölgesini oluşturmaktadır ve *cagPAI*'nin varlığını gösterir (17) . Bu nedenle bu çalışmada da *cag*-PAI varlığının bir belirteci olan *cagA* varlığı özgül primerler kullanılarak PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

Dünyanın farklı bölgelerinden izole edilen *H. pylori* suşlarında *cagA* prevalansı ve bu virülans belirleyicisinin gastroduodenal hastalıklarla ilişkisi belirgin bir coğrafi dağılım göstermektedir (152) . Bu çalışmada *cagA* varlığı bakımından test edilen 120 *H. pylori* suşundan 64'ü (%53,3) *cagA*+ bulunmuştur. Farklı coğrafik bölgelere göre *cagA* pozitifliği oranı değişmektedir. Genel itibariyle Avrupa ve Amerika' da *cagA* pozitifliği oranı %60-70 arası değişirken, Doğu Asya ülkelerindeki *H. pylori* suşlarının tamamına yakını *cagA*+'dır (153-157) . Asya ülkelerinde yapılan farklı çalışmalarda *cagA* prevalansları, Hindistan'da %96 (158) , Çin'de %86 (159) , Bangladeş'de %95 (160) , İran'da %77 (161) , bulunmuştur. Asya ülkelerinde görülen yüksek *cagA* prevalansı ile uyumsuz olarak 2009 yılında Ahmad ve diğ. (162) tarafından Pakistan'dan yapılan bir çalışmada 78 *H. pylori* suşundan %24,2'si *cagA*+ bulunmuştur. Ghasemi ve diğ. (163) tarafından İran'dan yapılan bir çalışmada *cagA* pozitifliği %85 bulunmuş ve *cagA* varlığının peptik ülserle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Podzorski ve diğ. (155) tarafından Amerika'dan

izole edilen 61 suşun %66'sının *cagA*+ olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde Gatti ve diğ. (164) tarafından yapılan çalışmada, Brezilya'dan izole edilen 95 *H. pylori* suşunun %73,4'ünün *cagA*+ olduğu belirtilmiştir. Qabandi ve diğ. (165) tarafından Kuveyt'de yapılan ve farklı coğrafik kökenli 98 *H. pylori* pozitif hastayı kapsayan çalışmada *cagA* prevalansını Orta Doğu kökenlilerde %48, Hint yarımadası kökenlilerde %82, Mısır ve Somali'den gelen Afrika kökenlilerde %22 bulmuşlardır. Astrat ve diğ. (166) tarafından yapılan çalışmada Afrika ülkelerinde görülen düşük prevalans değerlerinden farklı olarak Etiyopya'da *cagA* pozitifliğini %79 olarak belirlemişlerdir.

Avrupa'daki *cagA* prevalansı ise Amerika ile benzer bir profil göstermektedir. İspanya'da %66, İngiltere'de ise %68 oranında *cagA* pozitifliği saptanmıştır (167,168) .

Bizim çalışmamızda, *cagA* pozitifliği ile hastaların endoskopik ve patolojik bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Özellikle batı toplumlarında *cagA* pozitifliği ile daha şiddetli klinik bulgular arasında ilişki olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (169-172) . Ancak daha yüksek *cagA* prevalansının görüldüğü Asya ülkelerinde genellikle bu ilişki gösterilememiştir (173-176) . Zhou ve diğ. (177) 'nin Doğu Asya ülkelerinden izole ettikleri 143 *H. pylori* suşu ile yaptıkları çalışmada, benzer şekilde *cagA* pozitifliği ile duodenal ülser veya kronik gastrit varlığı arasında bir ilişki olmadığı gösterilmiştir.

Dünyada farklı coğrafik bölgelerdeki *cagA* profilleriyle ilgili yapılan bu çalışmalar göz önüne alındığında, bu çalışmada bulunan %53,3 *cagA* pozitifliği değeri Orta Doğu ve Avrupa ülkelerinde görülen *cagA* profili ile benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde *cagA* varlığı ile endoskopik ve patolojik bulgular arasında bir ilişki bulunamamış olması da Orta Doğu profili ile uyumludur.

Türkiye'den Barik ve diğ. (178) gastrit ve peptik ülser tanısı almış 35 hastadan izole ettikleri *H. pylori* suşlarında *cagA* varlığına bakmış, gastrit tanısı almış hastaların %57,1'inde, peptik ülser tanısı almış hastaların %92,9'unda *cagA*'yı saptamış ve peptik ülser ile *cagA* pozitifliği arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Kantarçeken ve diğ. (179) tarafından yapılan çalışmada dispeptik yakınması olan hastalardan izole ettikleri 107 *H. pylori* suşunda *cagA* pozitifliği %61,7 olduğu bulunmuş ve *cagA* varlığının peptik ülser ve duodenal ülser ile ilişkili olduğu

bildirilmiştir. Akyön ve diğ. (180) tarafından Türkiye’den izole edilen 42 *H. pylori* suşu ile yapılan çalışmada *cagA* pozitifliği oranı %67 bulunmuş ve *cagA* varlığının peptik ülserle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Saruç ve diğ. (181) tarafından yapılan çalışmada 345 *H. pylori* izolatında *cagA* pozitifliği %68,1 bulunmuş, *cagA* pozitifliği ile gastroduodenal bulgular arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir. Saltık ve diğ. (182) tarafından yapılan çalışmada 45 izolatta *cagA* pozitifliği %55,6 bulunmuş ve *cagA* pozitifliği ile gastroduodenal bulguların şiddeti arasında bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamız, *cagA* prevalansı ve *cagA* varlığı ile gastroduodenal bulgular arasında bir ilişki olmadığının belirlenmesi açısından Saltık ve diğ.’nin yaptıkları çalışma ile uyumludur. Türkiye’den yapılan çalışmaların büyük kısmında *cagA* prevalansı %65-80 arasında bulunmuştur. Bu çalışmada bulunan %53,3 *cagA* pozitifliği değeri Türkiye’deki diğer çalışmaların birçoğuna göre daha düşüktür. Ancak başka ülkelerde de aynı bölgede yapılan çalışmalarda prevalans oranları arasında farklılıklar görülebilmektedir. Bu farklılıklar kullanılan yöntem, laboratuvar koşulları, çalışmayı yapan kişilerin deneyimi gibi değişkenlerden kaynaklanıyor olabileceği gibi hasta gruplarının farklılığından da kaynaklanıyor olabilir. Özellikle kullanılan primer setlerinin farklı olması sonuçları etkileyebilmektedir. Gonzalez-Valencia ve diğ. (182) , *cagA*’nın PCR ile amplifikasyonu için F1-B1 ve B7628-B7629 primer setlerini karşılaştırmış ve, farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Ülser tanısı almış hastalardan izole edilen suşlarda, *cagA*’nın amplifikasyonunda B7628-B7629 primer setinin F1-B1 primer setine göre daha duyarlı olduğu, ancak F1-B1 primer setinin ülser olmayan hastalardan izole edilen suşlarda daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda *cagA*’nın amplifikasyonu için F1-B1 primer seti kullanılmıştır. Çalışmaya alınan ülserli hasta sayısı oldukça az olduğu için, kullanılan primer setinin sonuçları etkileyeceği düşünülmemektedir.

Bu çalışmada çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen suşlar arasında *cagA* pozitifliği bakımından fark bulunmamıştır. Meksika’dan Gonzalez-Valencia ve diğ. (182) tarafından yapılan çalışmada, 56 erişkin ve 34 çocuk hastadan izole ettikleri hastalarda *cagA* varlığına bakmış ve çocuk hastalardaki *cagA* pozitifliği oranının erişkin hastalardakine göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada *cagA* pozitifliği ve hastaların klinik bulguları arasında bir ilişki bulunamamıştır.

H. pylori suşlarının tamamında *vacA* geni bulunmasına rağmen ancak %50'si aktif VacA toksini oluşturmaktadır (82) . Bu gen, suşlar arasında belirgin bir dizi çeşitliliği gösteren sinyal(s) bölgesi ve orta(m) bölge olmak üzere 2 bölge bulundurmaktadır. Sinyal bölgesi genin 5' ucunda, "m" bölgesi ise genin orta bölgesinde bulunmaktadır. "s" bölgesi *s1* (*s1a* veya *s1b*) ve *s2*, "m" bölgesi ise *m1* ve *m2* alttiplerini bulundurmaktadır.

Vakuolizasyon toksini "s" genotipleri ile bakterinin virülansını açıklamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (123,124). Yapılan çalışmalarda *vacA* geni *cagPAI*'nin dışında bulunsa da *vacAs1* genotipi ile *cagA* arasında güçlü bir ilişki olduğu, *vacAs1* genotipindeki suşların çoğunun *cagPAI* taşıdığı gösterilmiştir (183,184) . Bizim çalışmamızda *vacA* genotiplendirmesi yapılan 105 *H. pylori* suşundan *cagA* bulunduran 59 suşun 52 (%88,1)'sinin *vacA s1* genotipini bulundurduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur.

Ayrıca *s1* genotipindeki sinyal bölgesinin daha yüksek düzeyde VacA ekspresyonunu ve toksinin bakteriden daha etkin salınımını sağladığı ileri sürülmektedir (185) . Tüm bunlar *vacAs1* genotipi ve *cagA* 'nın daha virülen suşlarda bir arada bulunduğunu ve bu suşların konakta ülser geliştirme potansiyelinin daha yüksek olduğunu düşündürmektedir (127,186) . Bu çalışmada endoskopik veya patolojik değerlendirme sonucu en az birinde ülser tanısı almış olan 12 hastadan 7'sinden (%58,3) izole edilen suşlarda *vacAs1* genotipi saptanmıştır. Bu genotipi taşıyan 7 suşun 5'i (%71,4) aynı zamanda *cagA* pozitifdir. Bu çalışmaya alınan endoskopik veya patolojik olarak ülser tanısı almış hasta sayısı, bu hasta grubunda *vacAs1* genotipi ve *cagA* varlığı arasındaki ilişkiyi göstermek açısından yeterli değildir.

Bu çalışmada 13 örnekte "s" bölgesi saptanamamıştır. Bu örneklerde farklı bir sinyal bölgesi genotipi bulunduğu akla gelmektedir. Doorn ve diğ. (187) *s1a* ve *s1b*'den başka farklı bir *s1* alttipi olarak *s1c*'yi tanımlamışlardır. Ancak *s1c* genotipi dünyada baskın olarak Doğu Asya ülkelerinde görülmekte, diğer bölgelerde ise nadiren görülmektedir (188) . Bu nedenle ülkemizde yapılan çalışmalarda "s" bölgesi tiplendirmelerinde *s1c* genotipinin varlığına genellikle bakılmamaktadır. Erzin ve diğ.(189) 'nin yaptıkları çalışmada 93 *H. pylori* izolatından hiçbirinin *s1c* genotipini bulundurmadığı belirlenmiştir. Yine de "s" bölgesi tiplendirmesi

yapılamayan bu 13 suşun *s1c* tipinde olabileceği akla gelmektedir. Ülkemizin Asya ve Avrupa arasında bir geçiş bölgesi olduğu düşünülecek olursa, Türkiye'deki suşların her iki bölgenin *vacA* genotipi profilini taşıyabileceği muhtemeldir. Şimdiye kadar *s1c* genotipine rastlanmamış olsa da bundan sonraki çalışmalarda bu bölgenin varlığına da bakılması epidemiyolojik açıdan faydalı olacaktır.

Bu çalışmada, “s” bölgesi saptanabilen 107 örnekten %70,1'i *vacAs1a*, %2,8'i *vacAs1b*, %27,1'i *vacAs2* genotipindedir. En sıklıkla görülen genotip *vacAs1a* genotipidir. Farklı *vacA* “s” ve “m” genotipleri ile hastaların endoskopik bulguları arasında bir ilişki bulunamamıştır. Vakuolizasyon toksini genotipleri ve bu genotiplerin hastaların klinikleriyle ilişkisi, *cagA* dağılımında olduğu gibi belirgin bir coğrafi dağılım göstermektedir. Van Doorn ve diğ. (188) 'nin 1999 yılında yaptıkları çok merkezli çalışmada farklı bölgelerden 611 *H. pylori* izolatının analizi yapılmış ve farklı kıtalara göre *vacA* “s” ve “m” genotiplerinin bulunma sıklığı tespit edilmiştir. Avrupa'dan izole ettikleri suşları incelediklerinde genellikle *s1a* ve *s1b* bulunma oranlarının benzer olduğunu belirlemişlerdir. Kuzey ve Doğu Avrupa'dan izole edilen suşlardan %89'unun *s1a* genotipinde olduğu, Fransa ve İtalya'dan izole edilen suşlarda *s1a* ve *s1b* bulunma oranlarının eşit olduğu, İspanya ve Portekiz'den izole edilen suşların %89'unun *s1b* genotipinde olduğu belirlenmiştir. Avustralya'dan izole ettikleri suşların %78,6' sının *s1a* genotipinde olduğu, Kuzey Amerika'dan izole edilen suşların yaklaşık yarısında *s1a* diğer yarısında *s1b* genotipinin görüldüğü, Orta ve Güney Amerika'dakilerin tamamına yakınının *s1b* genotipinde olduğu ve Doğu Asya'dan izole edilen suşlarda ise *s1c* (%77,1) genotipinin baskın olduğu bildirilmiştir. Qabandi ve diğ. (165) tarafından yapılan çalışmada da yine farklı coğrafi kökenli 98 *H. pylori* pozitif hastadan izole edilen suşlarda *vacA* allellere bakılmış ve Orta Doğu kökenli hastalardan izole edilen suşlarda *s2* (%45) ve *s1* (%39) genotipinin bulunma oranlarının birbirine yakın olduğu, Güney Doğu Asya kökenlilerde %73 oranında *s1* genotipinin, Afrika kökenlilerde ise %56 oranında *s2* genotipinin bulunduğu gösterilmiştir. Valencia ve diğ.'nin (182) Meksika'da yaptıkları çalışmada, Amerika'dan yapılan çalışmalarla uyumsuz olarak *s1a* genotipinin değil de *s1b* ve *s2* genotiplerinin baskın olduğu ileri sürülmüş ve *s1a* genotipi ile ülser gelişiminin ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Gusmao ve diğ. (190) tarafından Brezilya'dan yapılan çalışmada duodenal ülserli hastalardan

izole edilen suşların tümünün *vacAs1* genotipini bulundurduğu, ülser dışı dispepside ise bu oranın %58,3 olduğu saptanmış ve *vacAs2* genotipinin sadece ülser dışı dispepsi hastalarından izole edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada *vacAs1* alt tiplerine de bakılmış ve *vacAs1* genotipinin %97,5'inin *s1b* allelini bulundurduğu tespit edilmiştir. Kore'de Kim ve diğ. (153) tarafından yapılan bir çalışmada 41 *H. pylori* suşunun %80,4'ünün *vacAs1c* genotipinde olduğu belirtilmiş, ancak bu genotipin gastroduodenal patolojiyle ilişkisi gösterilememiştir.

Avrupa ve Amerika'da *s1a* ve *s1b* genotiplerinin hemen hemen eşit oranda olduğu, Asya ülkelerinde *s1c* genotipinin baskın olduğu, Afrika'da virülansı daha düşük olan *s2* genotipinin baskın olduğu görülmektedir (188) . Bizim çalışmamızda "s" bölgesi analizi sonuçlarına göre, *vacAs1a* genotipinin baskın olduğu saptanmıştır. Dünya genelindeki profile bakıldığında, bu çalışmadaki sonuçların Kuzey ve Doğu Avrupa'ya daha yakın olduğu söylenebilir. Erzin ve diğ. (189) , yaptıkları çalışmada farklı gastroduodenal patolojiler gösteren hastalardan izole ettikleri suşlarda %83,5 oranında *vacAs1a* genotipini saptamışlar ve bu genotipin peptik ülserle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olarak, Sarıbaşak ve diğ.(129) 'nin yaptıkları çalışmada gastrit, peptik ülser veya duodenal ülser tanısı almış hastalardan izole edilen 65 *H. pylori* suşunda %83 oranında *vacAs1a* genotipinin bulunduğu ve bu genin varlığının ülser gelişimi ile ilişkisi olmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar, Türkiye'den yapılan diğer çalışmaların verileriyle uyumludur.

Çalışmamızda, PCR duyarlılığını arttırmak için farklı yöntemler (191) denenmiş olmasına rağmen 7 suşun *vacA* "m" bölgesi genotiplendirmesi yapılamamıştır. Atherton ve diğ. (192) tarafından yapılan bir çalışmada Kuzey ve Güney Amerika ve Asya'dan izole edilen 36 *H. pylori* suşundan 22'sinin "m" bölgesi tiplendirmesinin bu çalışmada da kullanılan VA3R-VA3F ve VA4R-VA4F primer çiftleriyle yapılamadığını saptamış, bu primer çiftlerinin bağlanma oranının düşük olduğunu belirtip "m" bölgesi tiplendirmesi için farklı primer setleri kullandıkları bir amplifikasyon önermişlerdir. Benzer şekilde Yamaoka ve diğ. (12) yaptıkları çalışmada VA3R-VA3F ve VA4R-VA4F primer setlerini kullanarak 468 *H. pylori* izolatının sadece 28'inin *m1* veya *m2* olarak tiplendirilebildiğini, yeni primer setleriyle (VAG-F/VAG-R) ise 468 izolatın 454'ünün *m1* olarak

belirlendiğini bildirmişlerdir. Ancak her iki çalışmada da bu primer setiyle de “*m*” bölgesi tespit edilemeyen suşlar bulunmaktadır. Bu durum, bu suşların *m1* ve *m2* genotiplerinden farklı bir genotipe sahip olabileceği fikrini akla getirmektedir. Strobel ve diğ. (184) Almanya’dan izole ettikleri 158 *H. pylori* suşundan %18,5’inin “*m*” bölgesi tipini belirleyememiş, *m1* bölgesinin tespiti için kullandıkları VA3R primerinin bağlandığını ancak bağlanma bölgesinin farklı olduğunu belirlemişlerdir. Dizi analizleri sonucu belirleyemedikleri “*m*” bölgesinin *m1* suşları ile *m2* suşlarına oranla daha yüksek bir homoloji gösterdiğini tespit etmişler ve bu “*m*” bölgesi tipini *m1a* olarak adlandırmışlardır. Doorn ve diğ. (187) farklı coğrafi bölgelerden izole ettikleri suşlarla yaptıkları çalışmada *m1*, *m2a* ve *m2b* olmak üzere 3 farklı “*m*” bölgesi genotipi tanımlamışlardır. Pan ve diğ. (193) yaptıkları çalışmada, proksimal bölgesi *m1* ile, distal bölgesi ise *m2* ile benzerlik gösteren yeni bir “*m*” bölgesi varyantı tanımlamışlardır. Bu ihtimallerden başka, tanımlanamayan “*s*” ve “*m*” bölgelerinde özgül primer dizilerinin bağlanmasını ve dolayısıyla bölgenin amplifikasyonunu engelleyebilecek mutasyonlar olduğu ihtimali de düşünülebilir. Ayrıca suşlar arasında sıklıkla rekombinasyonlar (194) olduğu düşünülecek olursa Türk toplumunda daha önce rastlanmayan alttiplerin görülebilmesi ihtimali de vardır.

Bu çalışmada bir suşda *m1* ve *m2* bölgesi birlikte tespit edilmiştir. Bu durum birden fazla *H. pylori* suşuyla enfeksiyonun söz konusu olduğunu düşündürmektedir. Literatürde, birden fazla suşla enfeksiyonun sıklıkla olduğunu belirten çok sayıda çalışma mevcuttur (186,195) . Direkt biyopsi örneği midedeki bütün suşları bulunduracağından, biyopsi örneğinden yapılan *vacA* genotiplendirmelerinde birden fazla genotipe daha fazla rastlanmaktadır. Bu nedenle kültürden alınan tek koloniden *vacA* genotiplendirmesi yapılması daha sağlıklı sonuçlar vermektedir (188) .. Aynı zamanda kültürden yapılan çalışmalar, bazı suşları seçeceği için midedeki tüm *H. pylori* florasını yansıtmayabilir. Bu nedenle kültürden PCR yapmak, konaktaki bütün suşları tespit edemeyecektir. Birden fazla “*m*” genotipinin tespit edilmesine bir diğer açıklama suşlar arasında görülen rekombinasyon sıklığının yüksek olmasıdır (194) Rekombinasyonlar sonucu *m1-m2* hibridleri görülebilmektedir (190) .

H. pylori ile ilişkili gastroduodenal patolojiyle *vacA* “*m*” bölgesi varyantlarının (*m1* ve *m2*) ilişkisi hala tartışma konusudur. Yapılan çalışmalarda,

vacAm1 genotipini buşunduran suşların hücrede vakuoller oluşturduğu (123) *vacAm2*, genotipini bulunduran suşlarınsa HeLa hücrelerinde vakuoller oluşturamadığı bu nedenle de daha az toksijenik form olarak düşünüldüğü belirtilmiştir (125) . Amerika'dan izole edilen *H. pylori* suşlarının *vacA* “*m*” bölgesi tiplerinin in-vitro olarak HeLa hücrelerinde vakuolizasyonu indüklemeye yeteneğiyle ve in-vivo olarak da epitel hasarıyla ilişkili olduğu ancak gastrik enflamatuvar hücre infiltrasyonu veya peptik ülser gelişimi ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (127) . Tayvan'dan izole edilen suşlarla yapılan çalışmada ise *m1* genotipi ve peptik ülser gelişiminin ilişkili olduğu bildirilmiştir (196) . Daha önce tartışılan *vacAs* bölgesi varyantlarında olduğu gibi *vacAm* bölgesi varyantları da belirgin bir coğrafi dağılım göstermektedir. Bu çalışmada “*m*” bölgesi saptanabilen 113 örnekten %65,5'inin *m2*, %33,6'sının *m1* genotipinde olduğu saptanmıştır. Sinyal bölgesi varyantlarında olduğu gibi, orta bölge varyantlarının da gastroduodenal patolojiyle ilişkisi saptanamamıştır. Doorn ve diğ. farklı bölgelerden 24 farklı ülkeden izole ettikleri suşlarla yaptıkları çalışmada Kuzey Amerika'da *m2a*, Orta ve Güney Amerika'da *m1*, Fransa ve İtalya'da *m2a*, Portekiz ve İspanya'da *m1*, Kuzey ve Güney Avrupa'da *m2a*, Avustralya'da *m2a* ve Doğu Asya'da *m1* genotipinin baskın olduğunu belirtmişlerdir (188) . Salehi ve diğ. İran'da gastirik ülser, gastrit ve duodenal ülserli hastalardan izole ettikleri 77 *H. pylori* suşu ile yaptıkları çalışmada *m1* genotipinin %40, *m2* genotipinin ise %60 oranında görüldüğünü saptamış, *vacAm1* genotipinin duodenal ve gastrik ülserle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (197) . Gusmao ve diğ. Brezilya'da 24 duodenal ülserli, 41 ülser dışı dispepsili hastadan izole ettikleri suşlarda %61,8 oranında *m1*, %36,4 oranında ise *m2* genotipi bulunduğunu saptamış, *m1* genotipinin duodenal ve peptik ülserle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (190) . Rudi ve diğ. (157) , yaptıkları çalışmada 54 *H.pylori* izolatının %36,9'unun *m1*, %63,1'inin *m2* genotipinde olduğunu, Almanya'dan izole edilen suşlarda *m2* genotipinin baskın olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve diğ. (153) Kore'de 22 peptik ülserli ve 19 gastritli hastadan izole ettikleri *H. pylori* suşlarıyla yaptıkları çalışmada *m1* genotipinin %78,9, *m2* genotipinin ise %5,3 oranında bulunduğunu ve bu genlerin peptik ülser gelişimi ile bir ilişkisi olmadığını belirtmişlerdir. Türkiye'den Sarıbaşak ve diğ. (129) , yaptıkları çalışmada, izole ettikleri 65 suştan 29'unda *m1* ve *m2*'yi birlikte saptamış, %12'sinde *m1*, %43'ünde ise *m2* genotipinin bulunduğunu ancak

bu genotiplerin peptik ülser gelişimi ile ilişkisi olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamız *m2* genotipinin baskın olduğunun belirlenmesi ve *vacA* genotiplerinin gastroduodenal patolojiyle ilişkisinin olmadığını gösterilmesi açısından Türkiye'deki verilerle ve dünya üzerinde farklı coğrafi bölgelerden yapılan çalışmalarla kıyaslandığında genel itibariyle batı profiliyle uyumludur.

Bütün *H. pylori* suşlarında *vacA* geni bulunmasına rağmen, aktif sitotoksin üretebilme yeteneğini bu gen bölgelerinin farklı kombinasyonları belirler (123,127) . Bu nedenle *vacA* genotiplendirmesinin klinik olarak ve epidemiyolojik açıdan önemli olduğu düşünülmektedir (190) . Sinyal ve orta bölge alellerinin oluşturduğu farklı kombinasyonlar suşun virülansı hakkında bilgi vermektedir. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar, *vacAs1m1* genotipindeki bakterilerin HeLa hücrelerinde yüksek sitotoksisite gösterdiği, *vacAs1m2* genotipinin orta düzey ve *vacAs2m2* genotipindeki bakterilerin ise zayıf bir toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (115) .

Bu çalışmada 120 suşun 105'inin *vacA* genotiplendirmesi yapılabilmektedir. Orta ve sinyal bölgeleri saptanabilen suşlarda sırasıyla, %35,6 *s1a/m2*, %33,6 *s1a/m1*, %27,9 *s2/m2*, %1,9 *s1b/m2*, %1 *s1b/m1* genotipi bulunmuştur. Bazı çalışmalarda seyrek de olsa *s2/m1* genotipinin saptandığı belirtilse de (198,199) bu çalışmada suşların hiçbirinde bu genotip saptanamamıştır. Genel itibariyle bu genotipin bulunmaması veya çok düşük oranda bulunmasının nedeni bu suşların kültürü yapıldığı zaman seleksiyona uğraması ve izole edilememesi veya mide dışında canlılığını uzun süre muhafaza edememesi olabilir.

Bizim çalışmamızda, hastaların endoskopik ve patolojik bulguları birlikte değerlendirilmiştir. Endoskopi ve patoloji sonuçlarının birbiriyle uyumsuzluğu düşünülecek olursa, çalışmalarda iki bulgunun da değerlendirilmesi daha sağlıklı sonuçlar verecektir. Yapılan çalışmalarda genellikle hastaların endoskopi sonuçlarına göre *cagA*, *vacA* genotipleri değerlendirilmiştir.

Çalışmaya alınan suşların endoskopik ve patolojik bulgulara göre dağılımı incelenirken istatistiksel analiz için yeterli örnek sayısı olmadığı için frekanslar üzerinden yorum yapılmıştır. Bu çalışmada endoskopik olarak ülser tanısı almış hastaların %40'ının *s1a/m2* genotipinde olduğu, patolojik olarak ülser tanısı almış olan hastalarinsa %66,7'sinin düşük virülan olan *s2/m2* genotipinde olduğu

bulunmuştur. Oysa yapılan çalışmalar *s2* genini bulunduran suşların ülserojenik olmadığını, yüksek virülen olan *s1/m1* genotipindeki ve *cagA* pozitif suşların ülser gelişimi ile ilişkisi olduğunu göstermiştir (123,127) . Türkiye’den ve dünyadan yapılan çalışmalarda da peptik ülserli hastalarda baskın genotipin *s1am1*, gastritli hastalarda ise *s2m2* olduğu belirtilmiştir (178,200) . Bölek ve diğ. (201) tarafından gastrit, duodenal ülser veya peptik ülser tanısı almış 52 hastadan izole edilen suşlarla yapılan çalışmada *s1/m1* genotipinin duodenal ülserli hastalarda %80,7, peptik ülserli hastalarda %60 ve gastritli hastalarda %57 oranında bulunduğu saptanmış ve *cagA* pozitifliği, *vacA s1m1* genotipi ve peptik ülser arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamız *vacA* genotiplerinin gastroduodenal patolojiyle ilişkisi bakımından literatürle uyumlu değildir. Ancak bu durumun nedeni bu çalışmadaki ülser tanısı almış hasta popülasyonunun çok düşük olması olabilir.

Torres ve diğ. (202) , 2009 yılında yaptıkları çalışmada Küba’dan 130 dispeptik hastadan izole ettikleri suşlarda en sık görülen *vacA* genotiplerinin *s1/m1* (%56,9) ve *s2/m2* (%35,4) olduğunu belirtmişler, *s2/m1* genotipini ise suşların 1’inde (%0,8) saptamışlardır. Ayrıca *s1/m1* veya diğer *vacA* genotipleri ile gastroduodenal patolojinin ilişkisiz olduğunu belirtmişlerdir.

Rudi ve diğ. (157) , Almanya’da 65 *H.pylori* suşu ile yaptıkları çalışmada en yüksek oranda *s1/m2* genotipini (%47.7) saptadıklarını, *s1/m1* genotipini %35.4, *s2/m2* genotipini ise %15.4 oranında bulduklarını, *s2/m1* genotipini suşların hiçbirinde saptayamadıklarını belirtmişlerdir.

Ahmad ve diğ. (162) , 2008 yılında yaptıkları çalışmada Pakistan’dan izole ettikleri 66 *H. pylori* suşunda *vacA* genotipi kombinasyonlarına bakmışlar ve *s1b/m2*’yi %55, *s1a/m1*’i %20, *s2/m2*’yi %17, *s1a/m2*’yi %6, *s1c/m2*’yi ise %3 oranında saptamışlar; *s1b/m1*, *s1c/m1*, *s2/m1* genotiplerinin çalışmaya aldıkları hiçbir suшта bulunmadığını belirtmişlerdir. Kumar ve diğ. (203) , Hindistan’dan yaptıkları çalışmada en sık görülen *vacA* genotipinin *s1/m1* (%58) olduğunu ve *s2/m1* kombinasyonunu ise suşların hiçbirinde saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Kim ve diğ. (153) yaptıkları çalışmada 22 peptik ülserli, 19 gastritli hastadan izole ettikleri 41 *H. pylori* suşunda en sık görülen *vacA* genotipinin *s1c/m2* olduğunu saptamışlar ve *s1/m1* genotipleri ile peptik ülser veya gastrit gelişimi arasında bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir. Zhou ve diğ. (177) yaptıkları çalışmada Japonya ve

Çin’de duodenal ülser veya kronik gastriti olan hastalardan izole ettikleri 143 *H. pylori* izolatının *vacA* genotiplerini incelemişler ve baskın *vacA* genotipinin Japonya’da *s1c/m1*, Çin’de ise *s1c/m2* olduğunu, her iki ülkede de *vacA* genotiplerinin gastroduodenal patolojiyle ilişkili olmadığını belirtilmişlerdir.

Astrat ve diğ. (166) Etiyopyalı hastalardan izole ettikleri suşlarda en sık görülen *vacA* genotipinin *s1/m1* (%48) genotipi olduğunu belirtmişler, *s2/m1* genotipini ise %2 oranında tespit etmişlerdir. Dünyanın diğer bölgelerinden yapılan çalışmalarda *s2/m1* genotipi genellikle hiç saptanamazken Afrika’dan yapılan diğer çalışmalarda da bu genotip düşük oranda da olsa saptanmıştır (204,205) .

Bu çalışmada *vacA* genotipleri ile hastaların cinsiyeti arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen *H. pylori* suşları arasında *vacA* genotiplerinin dağılımı bakımından da anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ahmad ve diğ. (162) , yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi, *vacA* genotiplerinin yaş ve cinsiyetle ilişkisi olmadığını belirtmişlerdir. Valencia ve diğ. (182) tarafından yapılan çalışmada da çocuk ve erişkin hastalarda *vacA* genotiplerinin dağılımı bakımından fark olmadığı bildirilmiştir. Ancak Gusmao ve diğ. (190) ’nin yaptıkları çalışmada yüksek derecede virülen olan *s1/m1* genotipinin bulunma oranının yaşla beraber arttığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak *cagA* pozitifliği ile *vacA s1a/m1* genotipi ilişkili bulunmuştur. Aynı zamanda *cagA* negatif suşların büyük bölümünün düşük düzeyde toksik etkiye sahip *s2/m2* genotipinde olduğu saptanmıştır. Bu ilişki ilk kez 1995 yılında Atherton ve diğ. (123) tarafından İngiltere’de yapılan çalışmada gösterilmiştir. Andreson ve diğ. (206) tarafından Estonya’da yapılan çalışmada en sık görülen genotipin *s1a/m1* genotipi olduğu, bu genotipin peptik ülserle ilişkili olmadığı ancak *cagA* pozitifliği ile *s1a/m1* ve *s1a/m2* genotiplerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Torres ve diğ. (202) tarafından 130 *H. pylori* izolatıyla yapılan çalışmada ve Ahmad ve diğ. (162) tarafından 66 *H. pylori* suşu ile yapılan çalışmada *s1/m1* genotipi ve *cagA* pozitifliğinin birbiriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu ilişki, Türkiye’den Bölek ve diğ. (201) tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir. Farklı olarak Podzorski ve diğ. (155) tarafından yapılan çalışmada ise *cagA* pozitif suşların büyük bölümü (%74) *s1b/m1* genotipinde bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

cagA varlığı ile *vacA* genotiplerinin dağılımı bölgesel özellik göstermektedir. Ülkemizde *H. pylori* *cagA* ve *vacA* genotiplerini araştıran birçok çalışma vardır. Ülkemiz gibi *H. pylori* enfeksiyonlarının yüksek insidans ve prevalansa sahip olduğu ülkelerde farklı hasta gruplarındaki allel ve genotiplerin belirlenmesi hem bakterinin genotipi ile hastanın kliniği arasında kurulacak ilişki açısından hastaya, hem de bölgesel farklılıklarının belirlenmesi açısından bilim dünyasına katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma sonunda, *cagA* prevalansı ve *vacA* genotipleri belirlenmiştir. Çalışılan suşlarda baskın *vacA* genotipinin *s1a/m2* (%35,6) ve *s1a/m1* (33,6) olduğu saptanmıştır. Ancak farklı hasta gruplarını kapsayan çalışmada hem *cagA* varlığı hem de *vacA* genotipleri ile gastroduodenal patolojiler arasında bir ilişki bulunamamıştır. Sonuçlarımız, *cagA* prevalansı (%53,3), baskın *vacA* genotipleri (*s1a/m2* ve *s1a/m1*) ve *s1a/m1* genotipi ile *cagA* pozitifliği arasında ilişki olması bakımından genel itibariyle batı izolatlarıyla uyumludur. Ancak batı izolatları ile yapılan çalışmaların çoğunda gastroduodenal patolojiyle *cagA* ve *vacA* genotipleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Genelde doğu izolatlarında, özellikle yüksek derecede virülen suşların bulunduğu Doğu Asya’da bu ilişki gösterilememektedir.

Bu çalışmada genotiplendirmesi yapılamayan suşlar bulunmaktadır. Daha sonraki çalışmalarda bu suşların farklı primer setleriyle amplifikasyonunun yapılarak DNA dizi analizlerinin yapılması, son yapılan çalışmalarda bulunan farklı alt tiplere (*m1a*, *m2a*, *m2b*, *s1c*) özgül primerler kullanılarak amplifikasyonlarının yapılması bu suşların genotiplendirilmesini sağlayabilir.

H. pylori *cagA*’nın 3’ ucunda yer alan CagA proteinin fosforilasyonunda rolü olan EPIYA segmenti sayısına ve tekrarına göre *H. pylori* izolatları Batı ve Doğu Asya izolatları olmak üzere 2 temel gruba ayrılmaktadır (110) . Ancak, özellikle son yıllarda *cagA* tespitine yönelik çalışmalarda EPIYA-C segmenti sayısına da bakılıyor olsa da EPIYA gen kasetlerinin endoskopik veya patolojik bulgularla ilişkisini gösteren yeterli kanıt henüz olmadığı ve bu bölgeleri tespiti yönelik standardize edilmiş belirli bir moleküler yöntem bulunmadığı için *cagA* gen varyantları çalışılmamıştır.

Bazı çalışmalarda *cagPAI*'da meydana gelen delesyonlar sonucu *cagA* promotor bölgesinin bulunmayabileceği, bazı suşlarda *cagE* varlığının *cagPAI* varlığı açısından daha iyi bir belirteç olduğu gösterilmiştir (173) . Bu nedenle yapılacak çalışmalarda *cagPAI* varlığı araştırılırken *cagA* ve *cagE* varlığına birlikte bakmak daha faydalı olabilir. Ancak, *cagPAI*'da meydana gelebilecek delesyonlar göz önüne alınarak yapılan bir çalışmada *cagPAI* varlığının belirteci olarak *cagA* ve *cagE* varlığına beraber bakılmış, bütün *cagE* pozitif suşların aynı zamanda *cagA* pozitif olduğu belirtilmiştir (155) . Literatürde henüz yeterli kanıt olmadığından ve yeni yapılan birçok çalışmada da hala *cagPAI* varlığının belirteci olarak *cagA*'ya bakıldığından dolayı bu çalışmada da sadece *cagA* varlığı *cagPAI* açısından bir belirteç olarak kabul edilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *vacA* geninde sinyal bölgesi ve orta bölge dışında “i” bölgesi olarak adlandırılan bir bölge tanımlanmıştır. Yeni tanımlanan bu gen bölgesi ile *vacA* geninin sinyal bölgesi varyantları ve peptik ülser gelişimi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Ülkemizde henüz bu bölgenin tespiti ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, daha sonraki çalışmalarda bu bölgenin tanımlanması hem hastalığın prognozu hem de epidemiyolojik açıdan önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- 1.Kusters, J.G., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 19 (3), 449-490.
- 2.RA, F. (2001). *Helicobacter pylori*: molecular and cellular biology. Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press.
- 3.Kuipers, E.J., J. C. Thijs, ve H. P. Festen. (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 9 (2), 59-69.
- 4.Talley, N.J., ve R. H. Hunt. (1997) What role does *Helicobacter pylori* play in dyspepsia and nonulcer dyspepsia? Arguments for and against *H. pylori* being associated with dyspeptic symptoms. *Gastroenterology* 113, 67-77.
- 5.Parkin, D.M. (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*, 2, 533-543.
- 6.Parsonnet J, H.S., Rodriguez L. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330, 1267-1271.
- 7.Sandikci, M.U., Doran, F., Koksall, F., Sandikci, S., Uluhan, R., Varinli, S. ve diğ erleri. (1993) *Helicobacter pylori* prevalence in a routine upper gastrointestinal endoscopy population. *Br J Clin Pract*, 47 (4), 187-189.
- 8.Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J. (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*, 10 (4), 720-741.
- 9.Enroth, H., K. Wreiber, R. Rigo, D. Risberg, A. Uribe ve L. Engstrand. (1999) In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties *Helicobacter*, 4, 7-16.
- 10.Eaton, K.A., D.R. Morgan ve S. Krakowka. (1992) Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiology* 37, 123-127.

- 11.Hocker M, H.P. (2003) *Helicobacter pylori* Virulence Factors - one Part of a Big Picture. *Lancet Oncol*, 362 (9391), 1231-1233.
- 12.Yamaoka Y, K.T., Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. (1999) Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*, 37, 2274-2279.
- 13.Blaser, M.J.,Atherton, J.C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, 113 (3), 321-333.
- 14.Leunk, R.D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, ve D. R. Morgan. (1988) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiology*, 26, 93-99.
- 15.Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia ve diğ erleri. (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *PNAS*, 90, 5791-5795.
- 16.Ching, C.K., Wong, B.C., Kwok, E., Ong, L., Covacci, A.,Lam, S.K. (1996) Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *Am J Gastroenterol*, 91 (5), 949-953.
- 17.Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M. ve diğ erleri. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (25), 14648-14653.
- 18.Queiroz, D.M., Mendes, E.N., Rocha, G.A., Oliveira, A.M., Oliveira, C.A., Magalhaes, P.P. ve diğ erleri. (1998) *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer*, 78 (2), 135-139.
- 19.Cover, T.L. (1996) The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 20 (2), 241-246.

- 20.W., K. (1906) Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr*, 28, 272.
- 21.JL, D. (1938) Spirochetes in gastric glands of *Macacus rhesus* and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 38, 536-538.
- 22.AS, F. (1940) The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am J Dig Dis*, 7, 443-445.
- 23.Palmer, E.D. (1954) Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. *Gastroenterology*, 27 (2), 218-220.
- 24.Luck JM, S.T. (1924) Gastric urease. *Biochem J*, 18, 1227-1231.
- 25.Fitzgerald O, M.P. (1950) Studies on the physiological chemistry and clinical significance of urease and urea with special reference to the stomach. *Ir J Med Sci*, 292, 97-159.
- 26.Kornberg HL, D.R. (1955) Gastric urease. *Physiol Rev*, 35, 169-177.
- 27.Steer, H.W.,Colin-Jones, D.G. (1975) Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut*, 16 (8), 590-597.
- 28.Marshall BJ, W.J. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1273-1275.
- 29.Marshall BJ, W.J. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1311-1314.
- 30.Goodwin CS, A.J., Chilvers T ve diğ. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*, 39, 397-405.
- 31.Blaser, M.J. (1990) *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis*, 161 (4), 626-633.

- 32.NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. (1994) *JAMA*, 272 (1), 65-69.
- 33.Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. (1994) *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 61, 1-241.
- 34.Eidt, S., M. Stolte ve R. Fischer. (1994) *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Pathol*, 47, 436-439.
- 35.Walt, R.P. (1996) Regression of MALT lymphoma and treatment for *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 348 (9033), 1041-1042.
- 36.Taylor, D.N., J. Parsonnet. (1995). Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. New York: Raven Press.
- 37.Selimoğlu M.A., E.V.v.İ.T. (2002) Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children living in eastern Turkey. *Pediatrics International*, 44, 666-669.
- 38.Us D, H.G. (1998) Seroprevalance of *Helicobacter pylori* infection in an asymptomatic Turkish population. *J. Infect*, 37, 148-150.
- 39.Ozden, A., Bozdayi, G., Ozkan, M.,Kose, K.S. (2004) Changes in the seroepidemiological pattern of *Helicobacter pylori* infection over the last 10 years. *Turk J Gastroenterol*, 15 (3), 156-158.
- 40.Ertem, D., Harmanci, H.,Pehlivanoglu, E. (2003) *Helicobacter pylori* infection in Turkish preschool and school children: role of socioeconomic factors and breast feeding. *Turk J Pediatr*, 45 (2), 114-122.
- 41.Türkölmez S., Ç.D., Aydoğan F. ve Korkmaz M. (2007) The Relationship of *Helicobacter pylori* Positivity with Age, Sex, and ABO/Rhesus Blood Groups in Patients with Gastrointestinal Complaints in Turkey. *Helicobacter*, 12, 244-250.

42. Akamatsu, T., Tabata, K., Hirong, M., Kawakami, H., Uyeda, M. (1996) Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am J Infect Control*, 24 (5), 396-401.
43. Queralt, N., Araujo, R. (2007) Analysis of the survival of *H. pylori* within a laboratory-based aquatic model system using molecular and classical techniques. *Microb Ecol*, 54 (4), 771-777.
44. Megraud, F. (1995) Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther*, 9 Suppl 2, 85-91.
45. Fox, J.G. (2002) The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*, 50, 273-283.
46. Sommer, F., Faller, G., Rollinghoff, M., Kirchner, T., Mak, T.W., Lohoff, M. (2001) Lack of gastritis and of an adaptive immune response in interferon regulatory factor-1-deficient mice infected with *Helicobacter pylori*. *Eur J Immunol*, 31 (2), 396-402.
47. Heilmann, K.L., Borchard, F. (1991) Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut*, 32 (2), 137-140.
48. Yang, H., Goliger, J.A., Song, M., Zhou, D. (1998) High prevalence of *Helicobacter heilmannii* infection in China. *Dig Dis Sci*, 43 (7), 1493.
49. Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Van Strijp, J.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M. (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*, 65 (9), 3672-3679.
50. O'Toole, P.W., M. C. Lane ve S. Porwollik. (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect*, 2, 1207-1214.
51. Muotiala, A., Helander, I.M., Pyhala, L., Kosunen, T.U., Moran, A.P. (1992) Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 60 (4), 1714-1716.

- 52.Appelmelk, B.R.N., A. P. Moran ve E. J. Kuipers. (1997) Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol.*, 5, 70-73.
- 53.Alm, R.A., Bina, J., Andrews, B.M., Doig, P., Hancock, R.E.,Trust, T.J. (2000) Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun*, 68 (7), 4155-4168.
- 54.Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Lying, H.,Opferkuch, W. (1993) Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 38 (5), 371-377.
- 55.Goodwin, C.S., McCulloch, R.K., Armstrong, J.A.,Wee, S.H. (1985) Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol*, 19 (2), 257-267.
- 56.Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C. ve diğ erleri. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397 (6715), 176-180.
- 57.Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C. ve Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun*, 64, 2445-2448.
- 58.Goodwin, C.S.,Armstrong, J.A. (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 9 (1), 1-13.
- 59.Henriksen, T.H., Brorson, O., Schoyen, R., Thoresen, T., Setegn, D.,Madebo, T. (1995) Rapid growth of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14 (11), 1008-1011.
- 60.Boneca, I.G., de Reuse, H., Epinat, J.C., Pupin, M., Labigne, A.,Moszer, I. (2003) A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes. *Nucleic Acids Res*, 31 (6), 1704-1714.

- 61.Cover, T.L., Tummuru, M.K., Cao, P., Thompson, S.A.,Blaser, M.J. (1994) Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem*, 269 (14), 10566-10573.
- 62.Desai, M., Linton, D., Owen, R.J.,Stanley, J. (1994) Molecular typing of *Helicobacter pylori* isolates from asymptomatic, ulcer and gastritis patients by urease gene polymorphism. *Epidemiol Infect*, 112 (1), 151-160.
- 63.Garner, J.A.,Cover, T.L. (1995) Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and non-cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. *J Infect Dis*, 172 (1), 290-293.
- 64.Kleanthous, H., Clayton, C.L.,Tabaqchali, S. (1991) Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 5 (10), 2377-2389.
- 65.Minnis, J.A., Taylor, T.E., Knesek, J.E., Peterson, W.L.,McIntire, S.A. (1995) Characterization of a 3.5-kbp plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid*, 34 (1), 22-36.
- 66.Atherton, J.C. (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 63-96.
- 67.HLT, M. (2001). *Helicobacter pylori* urease (c. 1). Wymondham: Horizon Scientific Press.
- 68.Guruge, J.L., Falk, P.G., Lorenz, R.G., Dans, M., Wirth, H.P., Blaser, M.J. ve diğ erleri. (1998) Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (7), 3925-3930.
- 69.Baldwin, D.N., Shepherd, B., Kraemer, P., Hall, M.K., Sycuro, L.K., Pinto-Santini, D.M. ve diğ erleri. (2007) Identification of *Helicobacter pylori* genes that contribute to stomach colonization. *Infect Immun*, 75 (2), 1005-1016.
- 70.Lu, H., Wu, J.Y., Beswick, E.J., Ohno, T., Odenbreit, S., Haas, R. ve diğ erleri. (2007) Functional and intracellular signaling differences associated with the

Helicobacter pylori AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem*, 282 (9), 6242-6254.

71.Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L. ve diğerleri. (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J*, 18 (20), 5517-5527.

72.Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S. ve diğerleri. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J*, 19 (23), 6361-6370.

73.Suerbaum, S.,Michetti, P. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 347 (15), 1175-1186.

74.Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. ve diğerleri. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 295 (5555), 683-686.

75.Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W.,Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 287 (5457), 1497-1500.

76.Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S.,Tompkins, L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (25), 14559-14564.

77.Brown, L.M. (2000) *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiol Reviews*, 22 (2).

78.Brenner, H., Rothenbacher, D., Bode, G.,Adler, G. (1998) The individual and joint contributions of *Helicobacter pylori* infection and family history to the risk for peptic ulcer disease. *J Infect Dis*, 177 (4), 1124-1127.

- 79.Aird, I., Bentall, H.H., Mehigan, J.A.,Roberts, J.A. (1954) The blood groups in relation to peptic ulceration and carcinoma of colon, rectum, breast, and bronchus; an association between the ABO groups and peptic ulceration. *Br Med J*, 2 (4883), 315-321.
- 80.Boren, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G.,Normark, S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262 (5141), 1892-1895.
- 81.Harry L.T. Mobley, G.L.M., ve Stuart L. Hazell. (2001). *Helicobacter pylori*. Washington: ASM Press.
- 82.Montecucco, C.,Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (6), 457-466.
- 83.Fan, X., Crowe, S.E., Behar, S., Gunasena, H., Ye, G., Haeberle, H. ve diğerleri. (1998) The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med*, 187 (10), 1659-1669.
- 84.Smoot, D.T., Mobley, H.L., Chippendale, G.R., Lewison, J.F.,Resau, J.H. (1990) *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun*, 58 (6), 1992-1994.
- 85.Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T. ve diğerleri. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279 (5349), 373-377.
- 86.Zambon, C.F., Navaglia, F., Basso, D., Rugge, M.,Plebani, M. (2003) *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol*, 56 (4), 287-291.
- 87.Yu, J., Leung, W.K., Go, M.Y., Chan, M.C., To, K.F., Ng, E.K. ve diğerleri. (2002) Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut*, 51 (4), 480-484.

- 88.Nilsson, C., Sillen, A., Eriksson, L., Strand, M.L., Enroth, H., Normark, S. ve diğ erleri. (2003) Correlation between cag pathogenicity island composition and Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease. *Infect Immun*, 71 (11), 6573-6581.
- 89.Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S. ve diğ erleri. (1991) Mucosal IgA recognition of Helicobacter pylori 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet*, 338 (8763), 332-335.
- 90.Nomura, A.M., Perez-Perez, G.I., Lee, J., Stemmermann, G.,Blaser, M.J. (2002) Relation between Helicobacter pylori cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol*, 155 (11), 1054-1059.
- 91.Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F.,Backert, S. (2002) Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 277 (9), 6775-6778.
- 92.Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J.,Covacci, A. (2002) c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol*, 43 (4), 971-980.
- 93.Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J. ve diğ erleri. (1999) Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol*, 146 (6), 1319-1332.
- 94.Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T.F., Birchmeier, W.,Naumann, M. (2003) Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol*, 161 (2), 249-255.
- 95.Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J.,Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. *Science*, 300 (5624), 1430-1434.

- 96.Cendron, L., Couturier, M., Angelini, A., Barison, N., Stein, M.,Zanotti, G. (2009) The *Helicobacter pylori* CagD (HP0545, Cag24) protein is essential for CagA translocation and maximal induction of interleukin-8 secretion. *J Mol Biol*, 386 (1), 204-217.
- 97.Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Blaser, M.J.,Kerr, L.D. (1998) Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol*, 160 (5), 2401-2407.
- 98.Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T. ve diğ erleri. (2002) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (22), 14428-14433.
- 99.Peek, R.M., Jr., Moss, S.F., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Wang, S., Miller, G.G. ve diğ erleri. (1997) *Helicobacter pylori* cagA⁺ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst*, 89 (12), 863-868.
- 100.Azuma, T., Yamazaki, S., Yamakawa, A., Ohtani, M., Muramatsu, A., Suto, H. ve diğ erleri. (2004) Association between diversity in the Src homology 2 domain--containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis*, 189 (5), 820-827.
- 101.Maeda, S., Yoshida, H., Ogura, K., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Yamaji, Y. ve diğ erleri. (2000) H. pylori activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology*, 119 (1), 97-108.
- 102.Mori, N., Sato, H., Hayashibara, T., Senba, M., Geleziunas, R., Wada, A. ve diğ erleri. (2003) *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB. *Gastroenterology*, 124 (4), 983-992.
- 103.Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P. ve diğ erleri. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 5 (11), 1166-1174.

- 104.Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R. ve diğeri. (1999) Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem*, 274 (44), 31655-31662.
- 105.Meyer-ter-Vehn, T., Covacci, A., Kist, M.,Pahl, H.L. (2000) *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem*, 275 (21), 16064-16072.
- 106.Palli, D., Masala, G., Del Giudice, G., Plebani, M., Basso, D., Berti, D. ve diğeri. (2007) CagA+ *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk in the EPIC-EURGAST study. *Int J Cancer*, 120 (4), 859-867.
- 107.Peek, R.M., Jr.,Blaser, M.J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, 2 (1), 28-37.
- 108.Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoe, K., Yamazaki, S. ve diğeri. (2006) Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*, 130 (4), 1181-1190.
- 109.Zhang, Y., Argent, R.H., Letley, D.P., Thomas, R.J.,Atherton, J.C. (2005) Tyrosine phosphorylation of CagA from Chinese *Helicobacter pylori* isolates in AGS gastric epithelial cells. *J Clin Microbiol*, 43 (2), 786-790.
- 110.Basso, D., Zambon, C.F., Letley, D.P., Stranges, A., Marchet, A., Rhead, J.L. ve diğeri. (2008) Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 135 (1), 91-99.
- 111.Donati, M., Storni, E., D'Apote, L., Moreno, S., Tucci, A., Poli, L. ve diğeri. (1999) PCR-based restriction pattern typing of the vacA gene provides evidence for a homogeneous group among *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol*, 37 (4), 912-915.

112. Basso, D., Plebani, M. (2004) H. pylori infection: bacterial virulence factors and cytokine gene polymorphisms as determinants of infection outcome. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 41 (3), 313-337.
113. de Bernard, M., Burroni, D., Papini, E., Rappuoli, R., Telford, J., Montecucco, C. (1998) Identification of the Helicobacter pylori VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect Immun*, 66 (12), 6014-6016.
114. Garner, J.A., Cover, T.L. (1996) Binding and internalization of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun*, 64 (10), 4197-4203.
115. Papini, E., Zoratti, M., Cover, T.L. (2001) In search of the Helicobacter pylori VacA mechanism of action. *Toxicon*, 39 (11), 1757-1767.
116. Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T. ve diğ erleri. (2003) Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a Helicobacter pylori VacA receptor. *J Biol Chem*, 278 (21), 19183-19189.
117. Seto, K., Hayashi-Kuwabara, Y., Yoneta, T., Suda, H., Tamaki, H. (1998) Vacuolation induced by cytotoxin from Helicobacter pylori is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett*, 431 (3), 347-350.
118. Montecucco, C., de Bernard, M. (2003) Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of Helicobacter pylori. *Microbes Infect*, 5 (8), 715-721.
119. Czajkowsky, D.M., Iwamoto, H., Cover, T.L., Shao, Z. (1999) The vacuolating toxin from Helicobacter pylori forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (5), 2001-2006.
120. Tombola, F., Morbiato, L., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Zoratti, M., Papini, E. (2001) The Helicobacter pylori VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest*, 108 (6), 929-937.

- 121.Kimura, M., Goto, S., Wada, A., Yahiro, K., Niidome, T., Hatakeyama, T. ve diğerleri. (1999) Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog*, 26 (1), 45-52.
- 122.Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A. ve diğerleri. (1998) Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med*, 187 (1), 135-140.
- 123.Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Jr., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., Cover, T.L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, 270 (30), 17771-17777.
- 124.Atherton, J.C. (1997) The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*, 40 (6), 701-703.
- 125.Cover, T.L., Krishna, U.S., Israel, D.A., Peek, R.M., Jr. (2003) Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*, 63 (5), 951-957.
- 126.McClain, M.S., Cao, P., Iwamoto, H., Vinion-Dubiel, A.D., Szabo, G., Shao, Z. ve diğerleri. (2001) A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *J Bacteriol*, 183 (22), 6499-6508.
- 127.Atherton, J.C., Peek, R.M., Jr., Tham, K.T., Cover, T.L., Blaser, M.J. (1997) Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 112 (1), 92-99.
- 128.Yamaoka, Y., Orito, E., Mizokami, M., Gutierrez, O., Saitou, N., Kodama, T. ve diğerleri. (2002) *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett*, 517 (1-3), 180-184.
- 129.Saribasak, H., Salih, B.A., Yamaoka, Y., Sander, E. (2004) Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol*, 42 (4), 1648-1651.

- 130.Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Eshagh Hosseini, M. ve diğerleri. (2007) A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, 133 (3), 926-936.
- 131.Monteiro, L., de Mascarel, A., Sarrasqueta, A.M., Bergey, B., Barberis, C., Talby, P. ve diğerleri. (2001) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol*, 96 (2), 353-358.
- 132.el-Zimaity, H.M., Wu, J.,Graham, D.Y. (1999) Modified Genta triple stain for identifying *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, 52 (9), 693-694.
- 133.Genta, R.M.,Graham, D.Y. (1994) Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of H. pylori density and distribution. *Gastrointest Endosc*, 40 (3), 342-345.
- 134.Ascencio, F., Fransson, L.A.,Wadstrom, T. (1993) Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *J Med Microbiol*, 38 (4), 240-244.
- 135.Trebesius K, P.K., Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, ve diğerleri. (2000) Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut*, 46, 608-614.
- 136.Camorlinga-Ponce M, R.C., Gonzalez-Valencia G, Munoz O, Torres J. (2004) Topographical localisation of *cagA* positive and *cagA* negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an in situ hybridisation study. *J Clin Pathol*, 57, 822-828.
- 137.Laine, L., Chun, D., Stein, C., El-Beblawi, I., Sharma, V.,Chandrasoma, P. (1996) The influence of size or number of biopsies on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc*, 43 (1), 49-53.

- 138.Laine, L., Estrada, R., Lewin, D.N.,Cohen, H. (1996) The influence of warming on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc*, 44 (4), 429-432.
- 139.Goh, K.L., Cheah, P.L., Navaratnam, P., Chin, S.C.,Xiao, S.D. (2007) HUITAI rapid urease test: a new ultra-rapid biopsy urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Dig Dis*, 8 (3), 139-142.
- 140.Francis Megraud, P.L. (2007) *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev*, 20 (2), 280-322.
- 141.Ekstrom, A.M., M. Held, L. E. Hansson, L. Engstrand, and O. Nyren. (2001) *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*, 121, 784-791.
- 142.Herbring P, v.D.L. (2000) Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19, 164-173.
- 143.Alexander M. Hirschl, A.M. (2007) Methods to Detect *Helicobacter pylori*: From Culture to Molecular Biology. *Helicobacter*, 12 (2), 6-11.
- 144.Marta Granstrom, P.L., Carina Bengtsson, Francis Mégraud. (2008) Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 13 (1), 7-12.
- 145.Chong, S.K., Lou, Q., Fitzgerald, J.F.,Lee, C.H. (1996) Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 34 (11), 2728-2730.
- 146.Bickley, J., Owen, R.J., Fraser, A.G.,Pounder, R.E. (1993) Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol*, 39 (5), 338-344.
- 147.Clayton, C.L., Kleanthous, H., Coates, P.J., Morgan, D.D.,Tabaqchali, S. (1992) Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30 (1), 192-200.

- 148.Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D. ve diğerleri. (2007) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56 (6), 772-781.
- 149.Wilson, K. (1987). Current protocols in molecular biology. New York: Willey.
- 150.Gatti, L.L., Labio, R., Silva, L.C., Smith Mde, A.,Payao, S.L. (2006) CagA positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. *Braz J Infect Dis*, 10 (4), 254-258.
- 151.van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Sanna, R., Plaisier, A., Schneeberger, P., de Boer, W. ve diğerleri. (1998) Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 115 (1), 58-66.
- 152.Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.J. ve diğerleri. (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*, 32 (3), 459-470.
- 153.Kim, S.Y., Woo, C.W., Lee, Y.M., Son, B.R., Kim, J.W., Chae, H.B. ve diğerleri. (2001) Genotyping CagA, VacA subtype, IceA1, and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci*, 16 (5), 579-584.
- 154.Maeda, S., Ogura, K., Yoshida, H., Kanai, F., Ikenoue, T., Kato, N. ve diğerleri. (1998) Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut*, 42 (3), 338-343.
- 155.Podzorski, R.P., Podzorski, D.S., Wuerth, A.,Tolia, V. (2003) Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 46 (2), 83-88.
- 156.Ribeiro, M.L., Godoy, A.P., Benvengo, Y.H., Mendonca, S.,Pedrazzoli, J., Jr. (2003) Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 36 (3), 181-185.

- 157.Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M., Kuck, D., Sieg, A., Galle, P.R. ve diğerleri. (1998) Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol*, 36 (4), 944-948.
- 158.Arachchi HS , K.V., Lal B. (2007) Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (dupA) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population. *Helicobacter*, 12, 591-597.
- 159.Qiao, W., Hu, J.L., Xiao, B., Wu, K.C., Peng, D.R., Atherton, J.C. ve diğerleri. (2003) cagA and vacA genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol*, 9 (8), 1762-1766.
- 160.Sarker, S.A., Nahar, S., Rahman, M., Bardhan, P.K., Nair, G.B., Beglinger, C. ve diğerleri. (2004) High prevalence of cagA and vacA seropositivity in asymptomatic Bangladeshi children with *Helicobacter pylori* infection. *Acta Paediatr*, 93 (11), 1432-1436.
- 161.Kamali-Sarvestani, E., Bazargani, A., Masoudian, M., Lankarani, K., Taghavi, A.R.,Saberifiroozi, M. (2006) Association of H pylori cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*, 12 (32), 5205-5210.
- 162.Ahmad, T., Sohail, K., Rizwan, M., Mukhtar, M., Bilal, R.,Khanum, A. (2009) Prevalence of *Helicobacter pylori* pathogenicity-associated cagA and vacA genotypes among Pakistani dyspeptic patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 55 (1), 34-38.
- 163.Ghasemi, A., Shirazi, M.H., Ranjbar, R., Khorramizadeh, M.R., Daryani, N.E.,Hosseini, M. (2008) The prevalence of cagA and cagE genes in *Helicobacter pylori* strains isolated from different patient groups by polymerase chain reaction. *Pak J Biol Sci*, 11 (22), 2579-2583.
- 164.Gatti, L.L., Modena, J.L., Payao, S.L., Smith Mde, A., Fukuhara, Y., de Oliveira, R.B. ve diğerleri. (2006) Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, iceA and

babA2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Trop*, 100 (3), 232-240.

165. Al Qabandi, A., Mustafa, A.S., Siddique, I., Khajah, A.K., Mada, J.P., Junaid, T.A. (2005) Distribution of *vacA* and *cagA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Kuwait. *Acta Trop*, 93 (3), 283-288.

166. Asrat, D., Nilsson, I., Mengistu, Y., Kassa, E., Ashenafi, S., Ayenew, K. ve diğeri. (2004) Prevalence of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Ethiopian dyspeptic patients. *J Clin Microbiol*, 42 (6), 2682-2684.

167. Alarcon, T., Domingo, D., Martinez, M.J., Lopez-Brea, M. (1999) *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 24 (2), 215-219.

168. Warburton, V.J., Everett, S., Mapstone, N.P., Axon, A.T., Hawkey, P., Dixon, M.F. (1998) Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Clin Pathol*, 51 (1), 55-61.

169. Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H. ve diğeri. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 55 (10), 2111-2115.

170. Kuipers, E.J., Perez-Perez, G.I., Meuwissen, S.G., Blaser, M.J. (1995) *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst*, 87 (23), 1777-1780.

171. Nomura, A.M., Lee, J., Stemmermann, G.N., Nomura, R.Y., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. (2002) *Helicobacter pylori CagA* seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population. *J Infect Dis*, 186 (8), 1138-1144.

172. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., Vogelman, H. (1997) Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40 (3), 297-301.

173. Baghaei, K., Shokrzadeh, L., Jafari, F., Dabiri, H., Yamaoka, Y., Bolfion, M. ve diğerleri. (2009) Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the cag pathogenicity island isolated from Iranian patients. *Dig Liver Dis*.
174. Hussein, N.R., Mohammadi, M., Talebkhan, Y., Doraghi, M., Letley, D.P., Muhammad, M.K. ve diğerleri. (2008) Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori*-associated disease. *J Clin Microbiol*, 46 (5), 1774-1779.
175. Mansour-Ghanaei, F., Abbasi, R., Joukar, F., Besharati, S., Askari-Jirhandeh, N. (2008) Anti CagA antibody among patients with non-cardia gastric cancer in comparison with non-ulcer dyspepsia in an area with high incidence of gastric cancer. *Saudi Med J*, 29 (11), 1606-1610.
176. Talebkhan, Y., Mohammadi, M., Mohagheghi, M.A., Vaziri, H.R., Eshagh Hosseini, M., Mohajerani, N. ve diğerleri. (2008) cagA gene and protein status among Iranian *Helicobacter pylori* strains. *Dig Dis Sci*, 53 (4), 925-932.
177. Zhou, W., Yamazaki, S., Yamakawa, A., Ohtani, M., Ito, Y., Keida, Y. ve diğerleri. (2004) The diversity of vacA and cagA genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40 (1), 81-87.
178. Salih, B.A., Abasiyanik, M.F., Ahmed, N. (2007) 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*, 7 (4), 509-512.
179. Bulent, K., Murat, A., Esin, A., Fatih, K., H, M.M., Hakan, H. ve diğerleri. (2003) Association of CagA and VacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol*, 9 (7), 1580-1583.
180. Akyon Y, Y.K., Hardie JM, Feldman RA. (1998) Prevalence of the cagA gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from Turkish patients. *Institute of Child Health, University of Capetown*, 540-543.

- 181.Saruc, M., Demir, M.A., Kucukmetin, N., Kandiloglu, A.R., Akarca, U.S.,Yuceyar, H. (2002) Histological and clinical predictive value of determination of tissue CagA status by PCR in Helicobacter pylori infected patients; results of the large population based study in western Turkey. *Hepatogastroenterology*, 49 (45), 878-881.
- 182.Gonzalez-Valencia, G., Atherton, J.C., Munoz, O., Dehesa, M., la Garza, A.M.,Torres, J. (2000) Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis*, 182 (5), 1450-1454.
- 183.Han, S.R., Schreiber, H.J., Bhakdi, S., Loos, M.,Maeurer, M.J. (1998) vacA genotypes and genetic diversity in clinical isolates of Helicobacter pylori. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5 (2), 139-145.
- 184.Strobel, S., Bereswill, S., Balig, P., Allgaier, P., Sonntag, H.G.,Kist, M. (1998) Identification and analysis of a new vacA genotype variant of Helicobacter pylori in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol*, 36 (5), 1285-1289.
- 185.Audibert, C., Burucoa, C., Janvier, B.,Fauchere, J.L. (2001) implication of the structure of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. *Infect Immun*, 69 (3), 1625-1629.
- 186.Arents, N.L., van Zwet, A.A., Thijs, J.C., Kooistra-Smid, A.M., van Slochteren, K.R., Degener, J.E. ve diğeri. (2001) The importance of vacA, cagA, and iceA genotypes of Helicobacter pylori infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol*, 96 (9), 2603-2608.
- 187.van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Sanna, R., Pena, S., Midolo, P., Ng, E.K. ve diğeri. (1998) Expanding allelic diversity of Helicobacter pylori vacA. *J Clin Microbiol*, 36 (9), 2597-2603.
- 188.Van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Megraud, F., Pena, S., Midolo, P., Queiroz, D.M. ve diğeri. (1999) Geographic distribution of vacA allelic types of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*, 116 (4), 823-830.

- 189.Erzin, Y., Koksall, V., Altun, S., Dobrucali, A., Aslan, M., Erdamar, S. ve diğlerleri. (2006) Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*, 11 (6), 574-580.
- 190.De Gusmao, V.R., Nogueira Mendes, E., De Magalhaes Queiroz, D.M., Aguiar Rocha, G., Camargos Rocha, A.M., Ramadan Ashour, A.A. ve diğlerleri. (2000) vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol*, 38 (8), 2853-2857.
- 191.Roux, K.H. (1995) Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl*, 4 (5), S185-194.
- 192.Atherton, J.C., Cover, T.L., Twells, R.J., Morales, M.R., Hawkey, C.J.,Blaser, M.J. (1999) Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 37 (9), 2979-2982.
- 193.Pan, Z.J., Berg, D.E., van der Hulst, R.W., Su, W.W., Raudonikiene, A., Xiao, S.D. ve diğlerleri. (1998) Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct vacA alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis*, 178 (1), 220-226.
- 194.Suerbaum, S., Smith, J.M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E. ve diğlerleri. (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (21), 12619-12624.
- 195.Figueiredo, C., Van Doorn, L.J., Nogueira, C., Soares, J.M., Pinho, C., Figueira, P. ve diğlerleri. (2001) *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol*, 36 (2), 128-135.
- 196.Wang, H.J., Kuo, C.H., Yeh, A.A., Chang, P.C.,Wang, W.C. (1998) Vacuolating toxin production in clinical isolates of *Helicobacter pylori* with different vacA genotypes. *J Infect Dis*, 178 (1), 207-212.

- 197.Salehi, Z., Abadi, A.S., Ismail, P.B., Kqueen, C.Y., Jelodar, M.H.,Kamalidehghan, B. (2008) Evaluation of Helicobacter pylori vacA Genotypes in Iranian Patients with Peptic Ulcer Disease. *Dig Dis Sci*.
- 198.Evans, D.G., Queiroz, D.M., Mendes, E.N.,Evans, D.J., Jr. (1998) Helicobacter pylori cagA status and s and m alleles of vacA in isolates from individuals with a variety of H. pylori-associated gastric diseases. *J Clin Microbiol*, 36 (11), 3435-3437.
- 199.Morales-Espinosa, R., Castillo-Rojas, G., Gonzalez-Valencia, G., Ponce de Leon, S., Cravioto, A., Atherton, J.C. ve diğerleri. (1999) Colonization of Mexican patients by multiple Helicobacter pylori strains with different vacA and cagA genotypes. *J Clin Microbiol*, 37 (9), 3001-3004.
- 200.Blaser, M.J.,Berg, D.E. (2001) Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest*, 107 (7), 767-773.
- 201.Bolek, B.K., Salih, B.A.,Sander, E. (2007) Genotyping of Helicobacter pylori strains from gastric biopsies by multiplex polymerase chain reaction. How advantageous is it? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58 (1), 67-70.
- 202.Torres, L.E., Melian, K., Moreno, A., Alonso, J., Sabatier, C.A., Hernandez, M. ve diğerleri. (2009) Prevalence of vacA, cagA and babA2 genes in Cuban Helicobacter pylori isolates. *World J Gastroenterol*, 15 (2), 204-210.
- 203.Kumar, S., Kumar, A.,Dixit, V.K. (2008) Direct detection and analysis of vacA genotypes and cagA gene of Helicobacter pylori from gastric biopsies by a novel multiplex polymerase chain reaction assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 62 (4), 366-373.
- 204.Letley, D.P., Lastovica, A., Louw, J.A., Hawkey, C.J.,Atherton, J.C. (1999) Allelic diversity of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the vacA s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *J Clin Microbiol*, 37 (4), 1203-1205.

- 205.Martinez, A., Gonzalez, C., Kawaguchi, F., Montoya, R., Corvalan, A., Madariaga, J. ve diğ erleri. (2001) [Helicobacter pylori: cagA analysis and vacA genotyping in Chile. Detection of a s2/m1 strain]. *Rev Med Chil*, 129 (10), 1147-1153.
- 206.Andreson, H., Loivukene, K., Sillakivi, T., Maaroos, H.I., Ustav, M., Peetsalu, A. ve diğ erleri. (2002) Association of cagA and vacA genotypes of Helicobacter pylori with gastric diseases in Estonia. *J Clin Microbiol*, 40 (1), 298-300.