

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAĞDAT HASTALARINDA CAGA VE VACA VİRÜLANS VE GYRA
ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞINA DAYALI OLARAK
HELICOBACTER PYLORI'NİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Nibras Sarhan Khudhair KHUDHAIR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2024

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Nibras Sarhan Khudhair KHUDHAIR tarafından hazırlanan “**Bağdat Hastalarında Caga ve Vaca Virölans ve Gyra Antibiyotik Direnç Genlerinin Varlığına Dayalı Olarak *Helicobacter Pylori*'nin Moleküler Tespiti**” adlı tez çalışması 17/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç Dr. Tarkan YORULMAZ

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Farah Thamer ABDULLAH

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Tamer KEÇELİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Tarkan YORULMAZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Kubilay TOYRAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAVUZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr.Serdar GÖZÜTOK
Yaban Hayatı ve Ekoloji Anabilim Dalı
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Bağdat Hastalarında Caga ve Vaca Virülans ve Gyra Antibiyotik Direnç Genlerinin Varlığına Dayalı Olarak *Helicobacter Pylori*'nin Moleküler Tespiti**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (17/07/2024).

Nibras Sarhan Khudhair KHUDHAIR

ÖZET

Doktora Tezi

BAĞDAT HASTALARINDA CAGA VE VACA VİRÜLANS VE GYRA
ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞINA DAYALI OLARAK
HELICOBACTER PYLORI'NİN MOLEKÜLER TESPİTİ
Nibras Sarhan Khudhair KHUDHAIR

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç Dr. Tarkan YORULMAZ
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Farah Thamer ABDULLAH

Helicobacter pylori (*H. pylori*) dünyada çok sayıda insanı enfekte eden gram-negatif bir bakteridir ve insan midesinin epitelini enfekte eder. Bu çalışma Bağdat'ta (Yarmouk Eğitim Hastanesi, Al Kindi Hastanesi, Medical City) yürütülmüş ve 100 hasta dahil edilmiştir. Tüm hastalara uzman doktor tarafından tanı konulmuş ve hasta örnekleri Eylül 2022 ile Şubat 2023 tarihleri arasında toplanmıştır. Toplanan gastrik biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen RNA sonucu, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA, Gerçek Zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile gen ekspresyonunu ve bu genlerin gastrointestinal hastalık gelişimi ile ilişkisini değerlendirmek için *VagA*, *CagA* virülans ve *GyrA* antibiyotik direnç genleri için spesifik primer setleri kullanılarak çoğaltılmıştır. *16SrRNA* kantifikasyon için referans gen mRNA olarak kullanılmıştır, *VagA* geni için kat değişikliği sonucu 1,9113 iken *VagA* gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu göstermektedir. Öte yandan, *CagA* geni için kat değişimi sonucu 4.6144 olup gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu göstermektedir. Ek olarak, *GyrA* geninin kat değişimi sonucu 4.3664 iken, *GyrA* gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu göstermektedir. Genel olarak, sonuçlar *VagA*, *CagA* ve *GyrA* için gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu ve genler arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p \leq 0,05$). Mevcut çalışmada, *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için gen ifadesi arasındaki fark Tukey testi ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar, RT-qPCR'nin insan mide dokusunda *H. pylori* varlığını ve *H. pylori* genlerinin ekspresyonunu tespit etmek için hassas ve spesifik bir yöntem olduğunu göstermektedir. Bu yaklaşımla *H. pylori* gen ekspresyonunun in vivo olarak saptanması, *H. pylori* enfeksiyonlarının tanısının iyileştirilmesine ve patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

2024, 77 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Helicobacter pylori*, Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR), *VagA*, *CagA*, *GyrA*

ABSTRACT

PhD Thesis

MOLECULAR DETECTION OF *HELICOBACTER PYLORI* BASED ON THE PRESENCE OF CAGA AND VACA VIRULENCE AND GYRA ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN BAGHDAD PATIENTS

Nibras Sarhan Khudhair KHUDHAIR

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Tarkan YORULMAZ
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Farah Thamer ABDULLAH

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram-negative bacterium that infects large numbers of people worldwide and infects the epithelium of the human stomach. This study was conducted in Baghdad (Yarmouk Teaching Hospital, Al Kindi Hospital, Medical City) and included 100 patients. All patients were diagnosed by the attending physician and patient samples were collected between September 2022 and February 2023. RNA extracted from the collected gastric biopsy specimens was converted into cDNA using reverse transcription polymerase chain reaction. cDNA was amplified by Real Time polymerase chain reaction (RT-qPCR) using specific primer sets for *VagA*, *CagA* virulence and *GyrA* antibiotic resistance genes to assess gene expression and their association with gastrointestinal disease development. *16SrRNA* was used as the reference gene mRNA for quantification, the fold change result for the *VagA* gene was 1.9113, indicating up-regulation of *VagA* gene expression level. On the other hand, the fold change result for the *CagA* gene was 4.6144, indicating up-regulation of the gene expression level. In addition, the fold change result for the *GyrA* gene was 4.3664, indicating up-regulation of the *GyrA* gene expression level. Overall, the results showed upregulation of gene expression level for *VagA*, *CagA* and *GyrA* and no significant difference between the genes ($p \leq 0.05$). In the present study, the difference between gene expression for *VagA*, *CagA* and *GyrA* genes was determined by Tukey test. These results indicate that RT-qPCR is a sensitive and specific method to detect the presence of *H. pylori* and the expression of *H. pylori* genes in human gastric tissue. Detection of *H. pylori* gene expression in vivo with this approach may contribute to improving the diagnosis and understanding the pathogenesis of *H. pylori* infections.

2024, 77 pages

Keywords: *Helicobacter pylori*, Real time polymerase chain reaction (RT-qPCR), *VagA*, *CagA*, *GyrA*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Tarkan YORULMAZ'a sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Nibras Sarhan Khudhair KHUDHAIR

Çankırı, Temmuz 2024



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Tarihçe	4
2.2 Morfoloji	4
2.3 Mikrobiyoloji.....	5
2.3.1 Cins tanımı ve filogenisi	5
2.3.2 Genom yapısı.....	6
2.4 Epidemiyoloji.....	7
2.4.1 Yaygınlık ve coğrafi dağılım	7
2.4.2 Genetik çeşitlilik.....	8
2.4.3 Bulaşma ve enfeksiyon kaynakları.....	10
2.5 <i>H. pylori</i> ile ilişkili Patolojik Durumlar	12
2.5.1 Hastalık türleri.....	12
2.6 Bakteriyel Faktörler.....	21
2.6.1 Sitotoksinin vakumlanması.....	21
2.6.2 Cag patojenite adası	23
2.6.3 GyrA geni	25
2.7 Konak Genetiğinin Katkısı.....	26
2.7.1 IL-1.....	27
2.7.2 Diğer sitokinler.....	27
2.8 <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonunun Tanı ve Tedavisi.....	28
2.8.1 <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunun tanısı	28

2.8.2 <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunun tedavisi	30
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1 Malzemeler.....	33
3.1.1 Kimyasal malzemeler	33
3.1.2 Ekipman ve cihazlar	33
3.1.3 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun primerleri	34
3.2 Yöntem	34
3.2.1 RNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması	34
3.2.2 RNA'nın cDNA'ya dönüşümü	36
3.2.3 Genlerin RT-PCR ile amplifikasyonu.....	37
3.2.4 DNA dizilimi.....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1 Moleküler Çalışma: VagA, CagA ve GyrA Genlerinin Gen İfadesi	40
4.2 Gerçek Zamanlı PCR Analizi (RT-PCR).....	40
4.3 VagA, CagA ve GyrA Genleri için Gen İfade Düzeyleri Arasındaki Fark	45
4.4 VagA, CagA ve GyrA Genlerine İlişkin Gen İfade Düzeyleri Arasındaki Korelasyon	47
4.5 DNA dizileme	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece santigrat
µL	Mikrolitre
µM	Mikrometre
mL	Mililitre
ng	Nanogram
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

<i>16S rRNA</i>	16S ribozomal RNA
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
GERD	Gastroözofageal reflü hastalığı
IL-1	İnterlökin-1
RT-qPCR	Gerçek zamanlı PCR
MALT	Mukoza ilişkili lenfoid doku
PAI	Patojenite adası
PUD	Peptik ülser hastalığı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asid
<i>cagA</i>	Sitotoksin ile ilişkili gen
cDNA	Tamamlayıcı DNA
<i>VacA</i>	Vakuolleştirici sitotoksin A

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	<i>Helicobacter pylori</i> 'nin elektron mikroskobu görüntüsü (Kusters <i>et al.</i> 1997)	5
Şekil 2.2	<i>H. pylori</i> 'de genetik değişkenliğin mekanizmaları (Lara-Ramírez <i>et al.</i> 2011)	9
Şekil 2.3	<i>H. pylori</i> enfeksiyonunda mide patolojisine ve hastalık sonucuna katkıda bulunan faktörlerin şematik gösterimi (Ernst and Gold 2000)	13
Şekil 2.4	Angulusta temiz bir tabana sahip bir mide ülserinin endoskopik görünümü (Van Zanten <i>et al.</i> 1999)	15
Şekil 2.5	<i>H. pylori</i> enfeksiyonuna verilen farklı tepkiler (Kuipers <i>et al.</i> 2004)	17
Şekil 2.6	VacA proteinini hücresel süreçleri (Atherton <i>et al.</i> 1995)	22
Şekil 2.7	Cag tip IV salgı sisteminin bağışıklık modülasyonu (Ernst and Gold 2000)	24
Şekil 2.8	Giraz yapısının şeması (Garrett and Grisham 2013)	26
Şekil 4.1	<i>H. pylori</i> 'nin 16srRNA geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri	40
Şekil 4.2	<i>H. pylori</i> 'nin CagA geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri	41
Şekil 4.3	<i>H. pylori</i> 'nin VagA geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri	41
Şekil 4.4	<i>H. pylori</i> 'nin GyrA geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri	42
Şekil 4.5	VagA, CagA ve GyrA genleri için katlanmanın diferansiyel gen ekspresyon seviyesinin dağılımı	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Seçilen <i>Helicobacter</i> türlerinin özellikleri (Solnick and Schauer 2001)	6
Çizelge 2.2	<i>H. pylori</i> enfeksiyonunun tespiti için tanı yöntemleri (Ricci <i>et al.</i> 2007)	30
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	33
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan ekipman ve cihazlar	33
Çizelge 3.3	RT-PCR'de 16 SrRNA, virülans ve direnç genini amplifiye etmek için kullanılan primerler.....	34
Çizelge 3.4	RNA kitlerinin içerikleri	34
Çizelge 3.5	Toplam RNA'dan cDNA sentezinin bileşeni	37
Çizelge 3.6	Genlerin amplifikasyonu için RT-PCR reaksiyon bileşenleri	39
Çizelge 3.7	Genlerin amplifikasyonu için RT-PCR reaksiyon koşulları	39
Çizelge 4.1	VagA, CagA ve GyrA genleri için farklı aşamalarındaki (Ct değeri ve Δ Ct) gen ekspresyon hesaplama seviyeleri.....	42
Çizelge 4.2	VagA, CagA ve GyrA genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ evresindeki gen ekspresyon hesaplama düzeyleri.....	45
Çizelge 4.3	VagA, CagA ve GyrA genleri için gen ifade düzeyleri arasındaki fark	46
Çizelge 4.4	VagA, CagA ve GyrA genleri için gen ifade düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı	47

1. GİRİŞ

Helicobacter pylori (*H. pylori*), Warren and Marshall (1983) tarafından bulunan, gram-negatif, mikraerofilik, spor oluşturmeyan, spiral şekilli bir bakteridir. Mide ülseri ve kronik gastriti olan insanların %80'den fazlasında izole edilebildiği tespit edilmiştir (Blaser 2006). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından birinci sınıf bir karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır ve gastrit, peptik ülser, düşük dereceli mide mukozası ilişkili lenfoid doku lenfomaları (MALT) ve mide kanseri gibi birçok sindirim sistemi bozukluğuyla ilişkilendirilmektedir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, dünya çapında bir sorundur ve dünya nüfusunun yarısının *Helicobacter pylori* ile enfekte olabileceği düşünülmektedir (Baldwin *et al.* 2007). Enfeksiyonun yayılması uygun koşullar altında hızlı bir şekilde gerçekleşebilir. Genellikle enfeksiyon erken çocuklukta edinilirken, klinik belirtiler genellikle yetişkinlikte ortaya çıkar (Tadesse *et al.* 2014).

Yüksek enfeksiyon insidansı ve düşük mortalite oranının ele alınmasında antibiyotikler kullanılabilir (Al-Segar 2007). Patogeneze etki eden mekanizmanın belirsizliği olsa da genellikle virülans genleriyle başlayan ve bakteriyel invazyonla kötüleşebilen konak-bakteri etkileşimleriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Elitsur and Yahav 2005). Birçok virülans faktörü, *cagA*, *vacA* ve *gyrA* antibiyotik direnci gibi genler dahil olmak üzere öne sürülmüştür, ancak bunlardan hiçbirisi belirli bir hastalığın ortaya çıkmasının gerekliliğini öngörmemektedir. Bakteri ne kadar çok virülans faktörü biriktirirse, klinik hastalığın ortaya çıkma riski o kadar yüksek olur (Kao *et al.* 2016, Wen and Moss 2009).

CagA ile ilişkili olan *H. pylori* suşları, patojenite adasının genetik bir işaretidir (PAI). *CagA*, yaklaşık 140 kDa ağırlığındaki bir proteindir, yüksek derecede immünojeniktir ve izole edilen bakterilerin %60-70'inde bulunan *CagA* geni tarafından ifade edilir (Batı ülkelerinde) (Hatakeyama 2004). *CagA* ile ilgili en çok çalışılan moleküler hedef, SHP-2 fosfatazıdır (tirozin fosfataz protein). Karsinogenez ile ilişkili olan kodlama genlerinde mutasyonlar ve polimorfizmeler keşfedilmiştir (Saadat *et al.* 2007). Ayrıca, epitelyal hücrelerde *H. pylori* enfeksiyonu sırasında meydana gelen gen ifadesindeki değişiklikler büyük ölçüde *cag* PAI tarafından kodlanan salgılama sistemi bağımlıdır (Montecucco and

Rappuoli 2001). Bunun yanı sıra, *H. pylori*'nin bazı suşlarının, epitelyal hücrelerde vakuolizasyona, hücre ölümüne ve epitelyal bütünlüğün bozulmasına neden olan kültür süpernatantında bir protein ürettiği ortaya çıkmıştır. Bu protein sitotoksin vakuolizasyon (*VacA*) olarak adlandırılmıştır ve *H. pylori*'nin belirli suşları tarafından üretildiği bulunmuştur (Leunk *et al.* 1988). Tüm *H. pylori* suşları *vacA* proteini üretir, bu protein *vacA* geni tarafından kodlanır; ancak suşların sadece %50'sinde tespit edilebilir sitotoksik aktivite bulunur (Phadnis *et al.* 1994). Bu en az iki değişken bileşene sahip ve yaklaşık 100 kD'lik bir multimerik kompleksin bir parçasıdır. Vakuolizasyon aktivitelerindeki değişkenlik nedeniyle farklılıklar gösterir (Cover *et al.* 1994). *VacA* proteini, sitotoksik Bax ve Bak proteinleri aracılığıyla mitokondrilerden sitokrom C salınımını tetiklediği için vakuolizasyondan bağımsız olarak programlanmış hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir. Fas/CD95 reseptörünün aktive edilmesi, kaspaz 3'ün aktive edilmesi ve mitokondriyal membranın yırtılması, hücre ATP konsantrasyonunu etkileyerek apoptoz sürecine katkıda bulunur (Reyrat *et al.* 1999).

DNA giraz, *gyrA* ("A") ve *gyrB* ("B") alt birimleri tarafından kodlanan iki *GyrA* ve iki *GyrB* alt biriminden oluşan tetramerik bir enzimdir (Vanden Broeck *et al.* 2019). Kompleks, iki negatif süperkoili yerleştirmeye ve bir DNA parçasının doğrudan transferine yol açan üç çift "kapı" yapısından oluşur. *GyrB* alt birimlerinin ATPaz etki alanları N-kapılarını oluşturur. İki ATP molekülünün bağlanması dimerizasyona neden olur, bu da kapıların kapanmasını sağlar. Öte yandan, hidroliz kapıların açılmasına neden olur. Tüm giraz alt birimlerinin oluşturduğu DNA-kapılarda bulunan bir katalitik çekirdek, DNA kırılmasından ve birleştirilmesinden sorumludur. *GyrA* alt birimleri C-kapılarını oluşturmak için birleşir (Bush *et al.* 2015).

Bağdat'taki hastalarda *H. pylori* prevalansı %39,2 aralığında değişmektedir, Iraklı hastalarda ise farklı yöntemler kullanılarak belirlenen *H. pylori* prevalansı %47,8 ile %70,4 aralığında değişmektedir (Rasheed and Jebur 2018). Virülans faktörlerinin tespiti için RT-qPCR kullanılarak *H. pylori* tanısının konması önemlidir. Ayrıca, bu işlemin hasta üzerinde az invaziv olması önemlidir, çünkü genellikle gastrik biyopsiler bu amaçla kullanılır.

Bu çalışmanın amacı *H. pylori*'yi değerlendirmek, Irak hastalarında *CagA* ve *VacA* virölansı ile *GyrA* antibiyotik direnç genlerinin gen ekspresyonunu tespit etmek ve bu virölans genleri ile gastrointestinal hastalık gelişimi arasındaki ilişkiyi analiz etmektir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

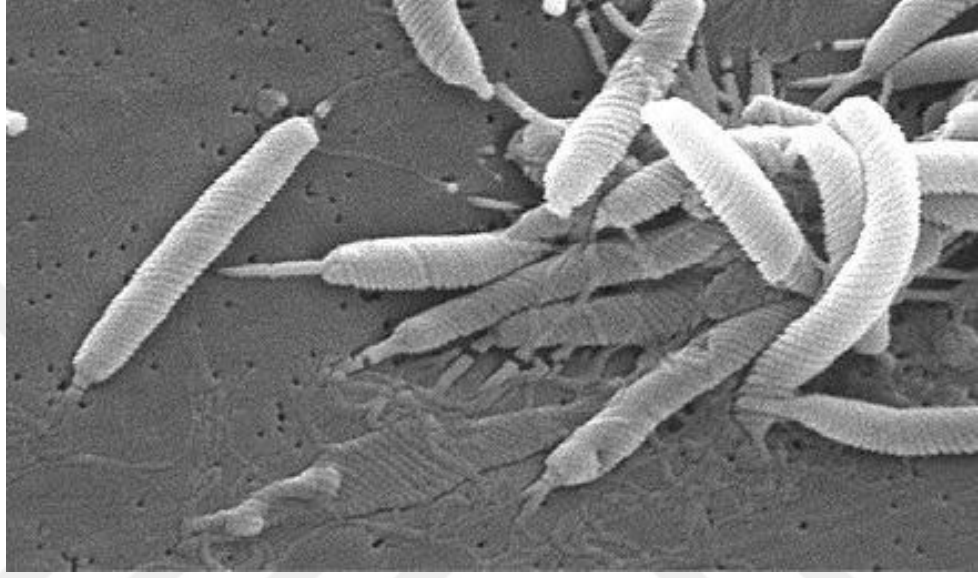
2.1 Tarihçe

Dünya çapında insanların %50'sinden fazlasında, 58,000 yıldan fazla bir süre önce Doğu Afrika'dan göçlerinden bu yana çağdaş insanların çok yakınında bulunan *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu mide enfeksiyonları bulunmaktadır (Linz *et al.* 2007). 1980'lerin başlarından önce, gastrit ve peptik ülser gibi gastrointestinal rahatsızlıklar, yetersiz beslenmeye, aşırı kahve tüketimine veya telaşlı bir yaşam tarzına bağlanıyordu. Bu nedenle, mide asitliğini azaltan ve böylece semptomlardan kurtulan antiasitler ve proton pompa inhibitörleri gibi ilaçlarla sorunlar tedavi edilmiştir. Midede bakteriler 1874 gibi erken bir tarihte keşfedilmiştir. Ancak midenin asidik ortamında hiçbir şeyin hayatta kalamayacağı düşünüldüğü için bu bulgular göz ardı edilmiştir. 1980'lerin başında gastrit ve ülser hastalığı olan kişilerin antrumlarında *H. pylori* keşfedilmiştir. Daha ileri araştırmalar Kosh'un hipotezlerini doğrulamıştır. Daha da önemlisi antibiyotik tedavileri enfeksiyonu ortadan kaldırarak inflamasyonu azaltmıştır (Warren and Marshall 1983). Warren ve Marshall bu keşif nedeniyle 2005 Nobel Tıp ve Fizyoloji Ödülü'nü almıştır. Böylece gastritin ve daha ciddi bir peptik ülser hastalığı olan *H. pylori*'nin etiyolojisi belirlenmiştir. *H. Pylori* enfeksiyonu epidemiyolojik çalışmalarda mide kanseriyle de ilişkilendirilmiştir ve bu da onu onko-patojen yapmıştır (Parsonnet *et al.* 1991). Dünya Sağlık Örgütü, 1994 yılında *H. pylori* varlığını kanserojen olarak sınıflandırmıştır (Iarc 1994). *H. pylori* enfeksiyonunun mide hastalığının birincil nedeni olduğunun farkına varılması, mide rahatsızlıklarının günümüzde ve bulaşıcı hastalıklar olarak tedavi edilme şeklini temelden değiştiren bir paradigma değişikliğine yol açmıştır.

2.2 Morfoloji

Gram-negatif bakteri *H. pylori*'nin boyutları 2 ile 4 μM ve 0,5 ile 1 μM 'dir. Tipik olarak spiral şekilli olmasına rağmen bakteri çubuk şeklinde görünebilir ve uzun süreli in vitro kültür veya antibiyotik tedavisinden sonra kokoid şekiller gelişebilir (Kusters *et al.* 1997) (Şekil 2.1). Kokoid formların canlı, kültüre edilemeyen bir durumu temsil edebileceği öne sürülmesine rağmen (Enroth *et al.* 1999), bu kokoidlerin in vitro kültürü yapılamaz

ve ölü hücreleri temsil ettiği varsayılır (Kusters *et al.* 1997). Organizma, her biri yaklaşık 3 µM uzunluğunda olan ve sıklıkla ucunda karakteristik bir ampul taşıyan 2 ile 6 adet tek kutuplu, kılıflı flagellaya sahiptir (Paul *et al.* 2000). Flagella, mide epitel hücrelerini kaplayan mukus tabakası gibi viskoz sıvılarda hareketlilik sağlar ve hızlı hareket etmeyi sağlar (Paul *et al.* 2000).



Şekil 2.1 *Helicobacter pylori*'nin elektron mikroskobu görüntüsü (Kusters *et al.* 1997)

2.3 Mikrobiyoloji

2.3.1 Cins tanımı ve filogenisi

Proteobakterilerin bir bölümü olan *Helicobacteraceae* familyası *Helicobacter* cinsini içerir. *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* ve *Thiovulum* cinsleri de bu ailenin üyeleridir. Halihazırda 20'den fazla *Helicobacter* türü tanımlanmıştır ve daha pek çoğu resmi olarak tanımlanmayı beklemektedir (Fox 2002). *Helicobacter* cinsinin tüm üyeleri mikraerofilik organizmalardır ve türlerin çoğunluğu aynı zamanda üreaz pozitifdir. Ayrıca tipik olarak katalaz ve oksidaz pozitifler.

Gastrik ve enterohepatik (gastrik olmayan) *Helicobacter* türleri, *Helicobacter* türlerinin ayrılabilceği iki ana soydur. Mide helikobakterleri genel olarak bağırsakta veya

karaciğerde kolonileşemediğinden ve bunun tersi de geçerli olduğundan, her iki grup da yüksek derecede organ spesifikliğı sergiler. Burada, insan hastalıklarıyla bağlantılı olan veya insan *Helicobacter* enfeksiyonlarının hayvan modellerinde önemi olan, pilori dışı *Helicobacter* türlerini kısaca açıklanmıştır. Pilori dışı *Helicobacter* türlerine ilişkin tam bir genel bakış mevcuttur (Çizelge 2.1) (Solnick and Schauer 2001).

Çizelge 2.1 Seçilen *Helicobacter* türlerinin özellikleri (Solnick and Schauer 2001)

Türler	Birincil memeli konakçı	Patoloji	Hayvan modeli
Gastrik <i>Helicobacter</i> spp.			
<i>H. pylori</i>	İnsan, primat	Gastrit, peptik ülser hastalığı, mide adenokarsinomu, MALT lenfoma	Fare, gerbil, Gine domuzu, Gnotobiyotik Domuz yavrusu
<i>H. felis</i>	Kedi, köpek, fare	Doğal konakçıda gastrit; peptik ülsere veya mide ülserine neden olur farede adenokarsinom	Fare
<i>H. mustelae</i>	Gelincik	Gastrit, peptik ülser hastalığı, mide adenokarsinomu, MALT lenfoma	Hiçbiri
<i>H. acinonychis</i>	Çita, kaplan, diğer büyük kediler	Gastrit, peptik ülser hastalığı	Fare
<i>H. heilmannii</i>	İnsan, köpek, kedi, maymun, çita, sıçan	Gastrit, dispeptik semptomlar, MALT lenfoma	Fare
Enterohepatik <i>Helicobacter</i> spp.			
<i>H. hepaticus</i>	Fare, diğer Kemirgenler	Proliferatif tiflokolit, hepatit, hepatoselüler karsinom	Hiçbiri

2.3.2 Genom yapısı

H. pylori'nin pek çok farklı suşu vardır ve bunlardan üçünün genomları tamamen dizilenmiştir (Tomb *et al.* 1997, Oh *et al.* 2006). "26695" suşunun genomu yaklaşık 1,550 gene ve 1,7 milyon baz çiftine sahiptir. Sıralanan iki suş arasında %6'ya kadar değişen nükleotidler nedeniyle aralarında önemli genetik değişiklikler vardır (*Helicobacter pylori* 26695, tüm genom). *H. pylori* genomunu çalışmanın amacı, bu bakterinin hastalığa neden olduğu süreç olan patogenezi daha iyi anlamaktır. Genom veritabanının "patogenezi" kategorisi lokusların yaklaşık %29'unu içerir. Sıralanan suşlardan ikisi, 40'tan fazla gen içeren yaklaşık 40 kb uzunluğunda *Cag* patojenite adasına (patogenezi sorumlu olduğuna inanılan ortak bir gen dizisi) sahiptir. *H. pylori* suşları enfeksiyonun

taşıyıcılarından türetilmiştir ancak asemptomatik kişiler tipik olarak bu patojenite adasından yoksundur (Baldwin *et al.* 2007).

H. pylori tarafından üretilen ana virölans proteinlerinden biri *cagA* geni tarafından kodlanır. Ülsere neden olma potansiyeli *cagA* genini taşıyan bakteri suşlarıyla bağlantılıdır (Broutet *et al.* 2001). *CagA* geni tarafından uzun bir amino asit dizisine (1186) sahip bir protein üretilir. *Cag* patojenite adasını (PAI) yaklaşık 30 gen oluşturur ve bunlardan bazıları karmaşık tip IV salgı sistemini kodlar. *Helicobacter* genomunun geri kalanıyla karşılaştırıldığında *cag* PAI'nin düşük GC içeriği nedeniyle adanın başka bir bakteri türünden yatay transfer yoluyla elde edilmiş olması mümkündür (Tomb *et al.* 1997).

2.4 Epidemiyoloji

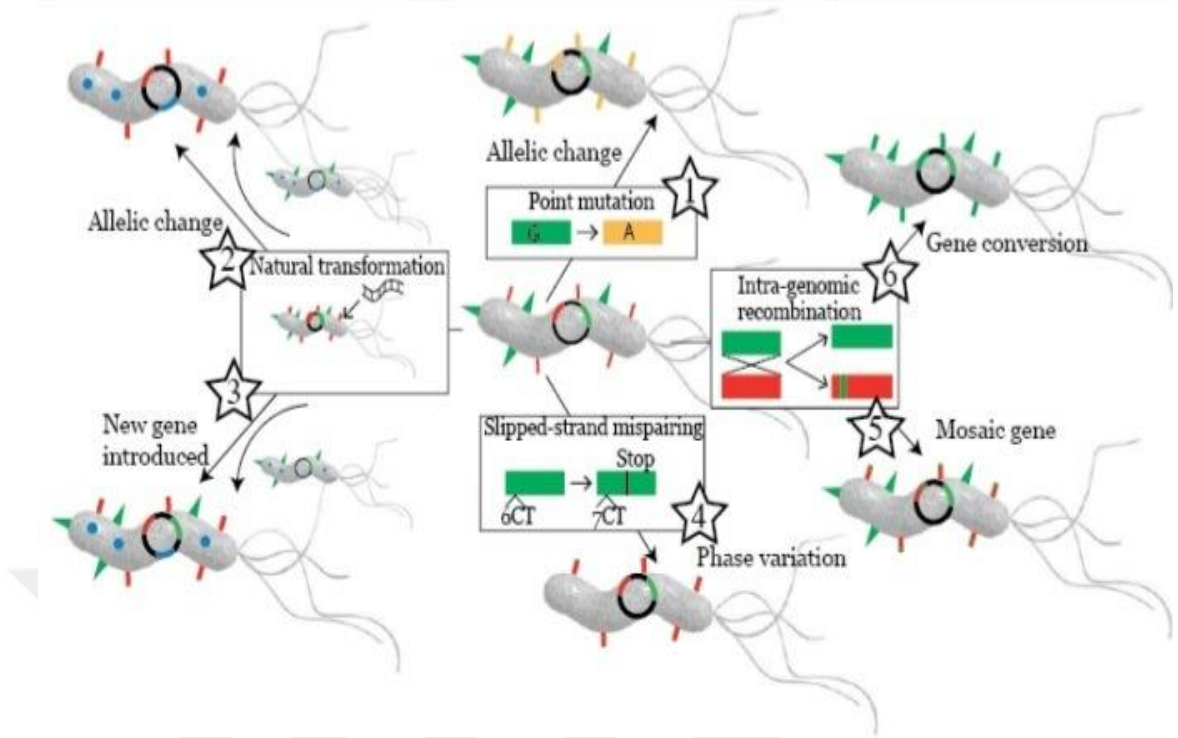
2.4.1 Yaygınlık ve coğrafi dağılım

H. pylori prevalansındaki coğrafi farklılıklar önemlidir. Az gelişmiş ülkelerdeki insanların %80'inden fazlasında genç yaşlarda bile *H. pylori* görülmektedir (Perez-Perez *et al.* 2004). Sanayileşmiş ülkelerde *H. pylori* prevalansı genellikle %40'ın altında kalır ve çocuklarda ve ergenlerde yetişkinlere ve yaşlılara göre önemli ölçüde daha düşüktür (Pounder and Ng 1995). Coğrafi bölgeler içerisinde sosyoekonomik konum ile *H. pylori* prevalansı arasında, özellikle erken yaşam koşulları açısından, ters bir ilişki vardır (Malaty and Graham 1994). Gelişmekte olan ülkelere gelen birinci ve ikinci nesil göçmenler arasında bu bakterinin görülme sıklığı Batı ülkelerinde sıklıkla gözle görülür derecede daha fazladır (Perez-Perez *et al.* 2005, Li *et al.* 2005). *H. pylori* enfeksiyonu geliştirmekte olan ülkelere hala oldukça yaygın olmasına rağmen sanayileşmiş dünyada hızla azalmaktadır (Genta 2002). Az gelişmiş ülkelere *H. pylori* enfeksiyon oranları yaşamın ilk beş yılında hızla artıyor ve sonrasında sürekli yüksek seyrediyor; bu da *H. pylori*'nin çocukluk döneminde erken dönemde edinildiğini göstermektedir (Fiedorek *et al.* 1991). Ancak sanayileşmiş ülkelere *H. pylori* enfeksiyon oranları çocukluk döneminde düşüktür ve yaşla birlikte giderek artmaktadır. Bu artışın yalnızca küçük bir kısmı, insanların daha sonraki yaşamlarında *H. pylori*'ye yakalanmalarına bağlanabilir.

Batı dünyasında yetişkinler arasında yeni *H. pylori* enfeksiyonlarının yıllık görülme sıklığı yılda % 0,5'ten azdır; yaşlılar arasında daha yüksek enfeksiyon prevalansı bu nedenle geçmişte daha yüksek enfeksiyon oranlarına sahip bir doğum kohortu etkisini temsil etmektedir (Kuipers *et al.* 1993, Parsonnet 1995). Yaşam boyu kolonize olan bu bakterinin yaş dağılımı, *H. pylori*'nin popülasyondan aktif olarak yok edilmesini, daha yüksek barınma ve hijyen standartlarını ve gençlerde enfeksiyon oranının azalmasını yansıtmaktadır (Kosunen *et al.* 1997, Rehnberg-Laiho *et al.* 2001, Roosendaal *et al.* 1997).

2.4.2 Genetik çeşitlilik

H. pylori, mide boşluğunda hayatta kalabilmesi için yeni ortamlara sürekli ve hızlı bir şekilde uyum sağlaması gerekmektedir. Bilinen en çeşitli bakteri türlerinden biri olan *H. pylori*, önemli ölçüde heterojenlik ve alelik çeşitlilik sergiler. Hiçbir izolat birbirine benzemez ve aynı suşa ait olmasına rağmen aynı kişiden çeşitli zamanlarda alınan izolatlarda varyasyonlar görülebilir (Kuipers *et al.* 2000, Kersulyte *et al.* 1999, Falush *et al.* 2001, Gressmann *et al.* 2005, Salama *et al.* 2007). Bu çeşitliliğin ilk gözlemleri basit yöntemler kullanılarak yapılmış ve günümüzde daha gelişmiş genom dizileme araçları, bu heterojenliğin altında yatan mekanizmalar hakkında derinlemesine araştırma yapılmasını mümkün kılmıştır. Mikrodizi araştırmaları, yedi ayrı genomun dizilerinin karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlara göre, toplam gen havuzunun %27'ye kadarının suşa özgü olduğunu göstermiştir (Fischer *et al.* 2010, Gressmann *et al.* 2005). *H. pylori*'nin çeşitlenmesine katkıda bulunan iki temel yol vardır. Genom ilk olarak replikasyon sırasında nokta mutasyonları, yeniden düzenlemeler ve yanlış iplik eşleşmesi gibi değişikliklere tabi tutulur. İkincisi, spontan transformasyon ve rekombinasyon yoluyla bu değişiklikler, suş içindeki genetik varyantlar arasında veya karışık bir enfeksiyonda suşlar arasında daha da yayılır (Şekil 2.2). Bazı suşlar, inversiyonlar nedeniyle çeşitli sentezler (gen sıralaması) sergiler (Lara-Ramírez *et al.* 2011). Bu çeşitlilik, değişen bir ortamda, bir genetik varyantın üstün olduğu ve ortamdaki değişikliklerle test edildiğinde diğer klonlardan daha iyi performans gösterebildiği yarı panmikrik bir popülasyon yapısıyla sonuçlanır (Suerbaum *et al.* 1998, Dorer *et al.* 2009).



Şekil 2.2 *H. pylori*'de genetik değişkenliğin mekanizmaları (Lara-Ramírez *et al.* 2011)

Serbest radikaller ve düşük pH gibi mutajenlerin sürekli kaynağı, *H. pylori*'nin büyüdüğü ortamdır. *H. pylori* aynı zamanda düzeltme aktivitesi olmayan ve aşırı eksprese edildiğinde hipermutatör fenotip üreten bir polimeraz kullanır (García-Ortiz *et al.* 2011). Genomun küçük boyutundan dolayı, hızlı mutasyon oranıyla başa çıkmanın birkaç yöntemi vardır ve uyumsuzluk onarım sisteminin herhangi bir homologu yok gibi görünmektedir (Dorer *et al.* 2011). Pek çok geleneksel onarım yönteminin azlığı nedeniyle DNA onarımı için homolog rekombinasyon şarttır. *H. pylori*'nin bir lizozimi ve ortamdaki parçalanmış hücrelerden ek genler elde etmek için ayırt edici comB Tip IV salgılama sistemi gibi doğal yetkinliğe dahil olan genleri yukarı doğru düzenlediğini gösteren sonuçları bunu doğrulamaktadır (Dorer *et al.* 2010, Hofreuter *et al.* 2001). İçerilen gen fragmanları ortalama olarak diğer bakterilerde bulunanlardan önemli ölçüde daha kısadır ve uzunluğu 417 baz çifti olduğu tahmin edilmektedir (Falush *et al.* 2001). Organizmanın genetik çeşitliliğini daha da zenginleştirmek için daha büyük dış DNA parçalarının daha küçük parçalara sindirilmeden ve kromozom tarafından emilmeden önce sindirildiğini görmek ilginçtir (Kennemann *et al.* 2011, Lin *et al.* 2009, Kulick *et al.* 2008).

Genom çapında bir analizde ortalama mutasyon oranı, bölge ve yıl başına $2,5 \times 10^{-5}$ olarak belirlenmiştir. Bu değer aynı veri seti üzerinde değerlendirilen ve başlatma bölgesi başına $5,5 \times 10^{-5}$ olan rekombinasyon oranıyla karşılaştırılabilir (Kennemann *et al.* 2011). Buna göre bu mutasyon sıklığı, *Escherichia coli* mutator fenotipinde gözlemlenenden oldukça yüksektir (Björkholm *et al.* 2001a) Rekombinasyon eşitlilik üretmedeki en önemli faktördür çünkü her 650 rekombinasyon olayından yalnızca biri gen kaybı veya kazancıyla sonuçlanır ve gen kaybı veya kazancından üç kat daha fazla ikame mutasyonuna neden olur (Morelli *et al.* 2010, Kennemann *et al.* 2011). *H. pylori* rekombinaz, RecA, delesyon mutantları etkili kolonizasyon açısından zayıftır ve UV ve DNA'ya zarar veren kimyasallara karşı hassastır, bu da uzun süreli bir enfeksiyon için gerekli genetik çeşitliliğin yaratılmasında rekombinasyon ihtiyaını ortaya koymaktadır (Amundsen *et al.* 2008, Thompson and Blaser 1995).

H. pylori'nin diğer türlerden veya suşlardan DNA'nın alınmasını parçalamak ve sınırlamak için kullandığı çoklu kısıtlama enzimleri (RM sistemi), rekombinasyonla ilgilidir. Humbert *et al.* (2011)'e göre, RM sisteminin tanıma bölgeleri genom boyunca eşit şekilde dağılmamıştır, bu da belirli lokusların rekombinasyon için seçildiğini düşündürmektedir. Bununla uyumlu olarak, son zamanlarda dış zar proteinlerinde en yüksek rekombinasyon frekansından sorumlu genlerin olduğu gösterilmiştir (Kennemann *et al.* 2011, Yahara *et al.* 2012).

2.4.3 Bulaşma ve enfeksiyon kaynakları

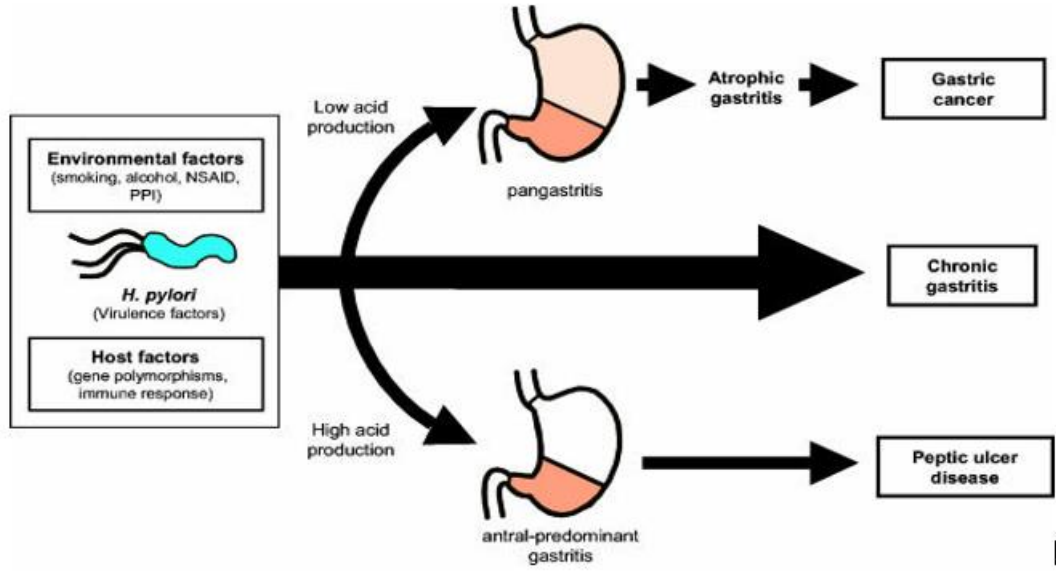
H. pylori'nin edinildiği mekanizmaların çoğu bilinmemektedir. İnsanlarda ve insan olmayan birkaç primatta bulunan *H. pylori*'nin konakçı aralığı sınırlıdır. Nadiren *H. pylori* evcil hayvanlardan izole edilmiştir; sonuç olarak evcil hayvanların varlığı *H. pylori* enfeksiyonu riskini arttırabilmektedir (Brown *et al.* 2001, Brown *et al.* 2002, Dore *et al.* 2001, Herbarth *et al.* 2001). *H. pylori*'nin zoonotik bulaşmasına ilişkin yeterli kanıt bulunmadığından, yeni enfeksiyonların oral-oral veya fekal-oral yol veya her ikisi yoluyla doğrudan insandan insana bulaşmadan kaynaklandığına inanılmaktadır (Fox 1995). Her ne kadar *H. pylori* tükürükte, kusmukta, gastrik reflde ve dışkıda bulunmuş olsa da (Allaker *et al.* 2002, Ferguson *et al.* 1999, Ferguson *et al.* 1993, Kabir 2004,

Leung *et al.* 1999, Parsonnet *et al.* 1999, Sinha *et al.* 2004) bunlardan herhangi birinin birincil bulaşma yolları olduğuna dair sağlam bir kanıt yoktur. Bunun nedeni yetişkin popülasyonlarının bulaşma çalışmalarının çoğunluğunun odak noktası olması olabilir. Diş hekimleri, gastroenterologlar, hemşireler, *H. pylori* pozitifliği olan bir çift ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar için bir kliniğe giden kişiler, bakteriyi taşıma konusunda belirgin yüksek risk altında görünmeyebilir (Mégraud 1995). Bu ve diğer çalışmalar, edinimin çoğunlukla ilk yıllarda, çoğunlukla da yakın aile üyelerinden gerçekleştiği konusunda yaygın bir görüş birliğine yol açmıştır (Kivi *et al.* 2003, Konno *et al.* 2005, Raymond *et al.* 2004, Rowland *et al.* 2006, Taneike *et al.* 2001, Van Der Ende *et al.* 1996). Ebeveynin gıdayı önceden çiğnemesi, *H. pylori*'nin bulaşmasında kanıtlanmamış bir risk faktörüdür (Kurosawa *et al.* 2000). Askere alınanlar arasında olduğu gibi bazı durumlar dışında, yetişkinlerde kalabalıklaşmanın daha az önemli olduğu görülmektedir (Fűrész *et al.* 2004, Kyriazanos *et al.* 2001, Rowland *et al.* 2006), Çocukluk çağındaki *H. pylori* prevalansı ile edinimi pozitif korelasyon göstermektedir (Goodman and Correa 2000, Vincent *et al.* 1994). Her ne kadar çeşitli araştırmalara göre çevresel su kaynaklarında *H. pylori* DNA'sı bulunmuş olsa da (Enroth and Engstrand 1995, Hegarty *et al.* 1999, Queralt *et al.* 2005), bu muhtemelen ya çıplak DNA ya da ölü *H. pylori* kontaminasyonundan kaynaklanmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla sudan etkin bir şekilde yetiştirilen *H. pylori*'nin yalnızca bir örneği mevcuttur. Bununla birlikte, bu raporda atık su kullanılmış olup, bu da su kaynağının dışkıyla kirlenmiş olabileceğini düşündürmektedir (Lu *et al.* 2002). Gastroenterit salgınları sırasında kurumsallaşmış gençler arasında *H. pylori* enfeksiyonlarının varlığı, dışkıdaki kirleticilerin dışkı yoluyla yayıldığı fikrini desteklemektedir (Laporte *et al.* 2004). Diğer potansiyel nedenler arasında kontamine gıdalar yer alır çünkü *H. pylori* soğutulmuş gıdalarda kısa süre hayatta kalabilir (Poms and Tatini 2001). Doğrudan kişiden kişiye bulaşma, *H. pylori*'nin ortamdaki oksijen basıncına karşı büyük hassasiyeti, beslenme eksikliği ve 34 ile 40°C aralığının dışındaki sıcaklıklar nedeniyle en yaygın bulaşma yöntemi olmaya devam etmektedir (Kusters *et al.* 1997).

2.5 *H. pylori* ile İlişkili Patolojik Durumlar

2.5.1 Hastalık türleri

Enfekte kişilerin tamamında midede *H. pylori* kolonizasyonunun bir sonucu olarak histolojik gastrit gelişir, ancak yalnızca küçük bir yüzdesinde herhangi bir açık klinik semptom görülür. Tahminlere göre (Ernst and Gold 2000, Kuipers *et al.* 1995), *H. pylori* pozitifliği olan hastalarda yaşam boyu ülser hastalığı gelişme riski %10 ile 20, distal gastrik hastalık gelişme riski ise %1 ile 2 arasındadır. Çoğu gastritin türü ve ciddiyeti ile bağlantılı olan birçok bakteriyel, konakçı ve çevresel faktör, *H. pylori* enfeksiyonu varlığında çeşitli hastalıkların gelişme olasılığını etkiler (Şekil 2.3).



Pattern of gastritis	Gastric histology	Duodenal histology	Acid secretion	Clinical condition
 Pan-gastritis	- Chronic inflammation - Atrophy - Intestinal metaplasia	Normal	Reduced	- Gastric ulcer - Gastric cancer
 Antral-predominant	- Chronic inflammation - Polymorph activity	- Gastric metaplasia - Active chronic inflammation	Increased	Duodenal ulcer

Şekil 2.3 *H. pylori* enfeksiyonunda mide patolojisine ve hastalık sonucuna katkıda bulunan faktörlerin şematik gösterimi (Ernst and Gold 2000)

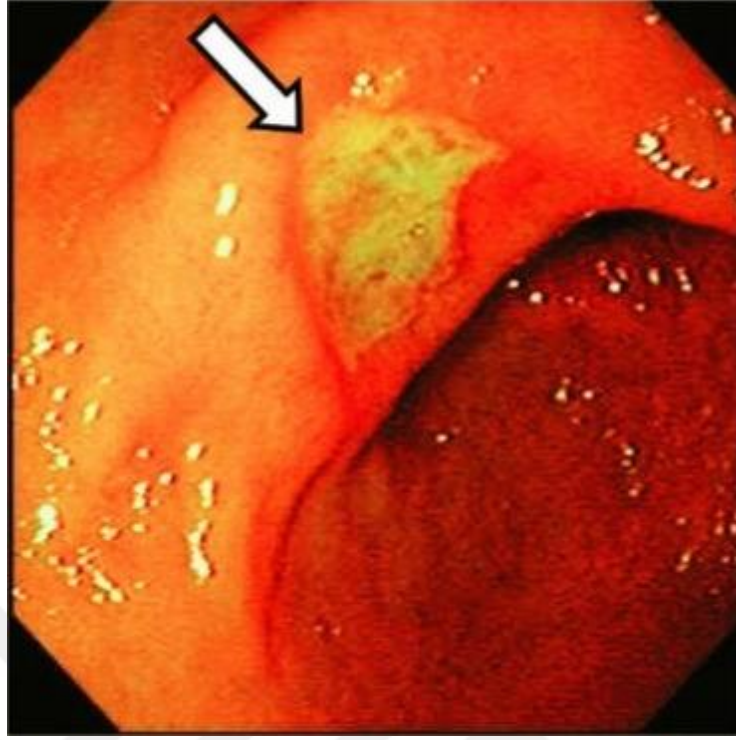
2.5.1.1 Akut ve kronik gastrit

Pek çok çalışma, kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile gastrit ile ilişkili olduğunu ikna edici bir şekilde göstermektedir. Makroskopik nodüler gastrit, gastrik antrumun kolonizasyonu ile anlamlı derecede ilişkilidir (Uc and Chong 2002). Kronik *H. pylori* ile ilişkili gastrit başlı başına asemptomatik bir enfeksiyondur ve birkaç gün içinde düzelen karın ağrısı, bulantı ve kusmaya neden olabilen hipoklorhidri ile akut gastrite neden olur. Peptik ülser hastalığı (PUD) Mide veya duodenal ülserler (genellikle peptik ülser olarak

anılır) muskularis mukozaya nüfuz eden en az 0,5 cm çapında mukozal defektler olarak tanımlanır. Birçok çalışma, midede *H. pylori* kolonizasyonunun olduğunu ikna edici bir şekilde göstermektedir. Mukoza, kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile gastrit ile ilişkilidir. Makroskopik nodüler, aktif kronik gastrit ve foliküler gastrit ile önemli ölçüde ilişkilidir. Gastrik antrumun *H. pylori* tarafından kolonizasyonu, hafif, orta veya belirgin olarak derecelendirilir (ilişkili gastrit başlı başına asemptomatiktir) ancak enfeksiyonun ilk edinimi hipoklorhidrili akut gastrite neden olur ve bu da birkaç gün içinde düzelen karın ağrısı, bulantı ve kusmaya neden olabilir (Fischer *et al.* 2001).

2.5.1.2 Peptik ülser hastalığı

Mide veya duodenal ülser olarak da bilinen peptik ülserler, muskularis mukozaya nüfuz eden ve en az 0,5 cm çapa sahip mukozal defektler olarak sınıflandırılır (Şekil 2.4). Çoğu mide ülseri, midenin küçük eğriliği çevresinde, özellikle de korpus ve antrum mukozasının birleştiği yerde gelişir (Van Zanten *et al.* 1999). Mide asidine en çok maruz kalan bölge olan duodenal ampul, duodenum ülserlerinin tipik olarak geliştiği yerdir. Batı ülkelerinde duodenal ülserler mide ülserlerinden neredeyse dört kat daha yaygındır; başka yerlerde mide ülseri daha yaygındır. 20 ile 50 yaşları arasında duodenal ülserler özellikle yaygındır, ancak 40 yaşın üzerindeki bireylerde mide ülseri gelişme olasılığı daha yüksektir.



Şekil 2.4 Angulusta temiz bir tabana sahip bir mide ülserinin endoskopik görünümü (Van Zanten *et al.* 1999)

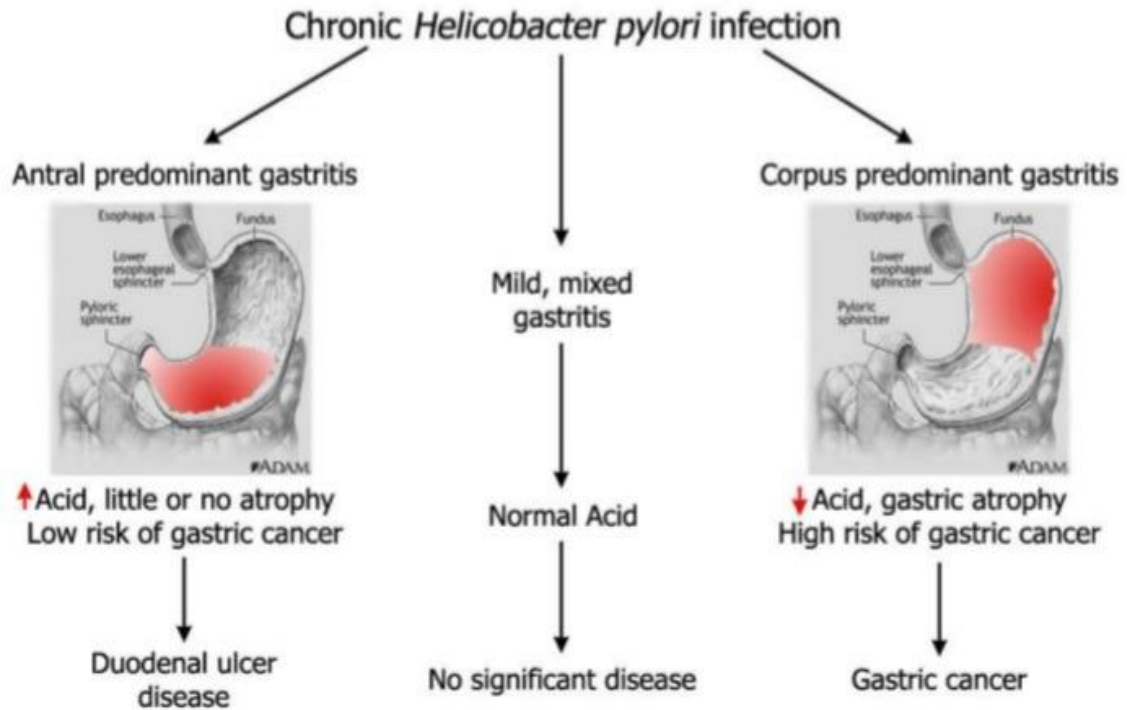
H. pylori bakterisi hem mide hem de duodenum ülseri bozukluklarıyla yakından bağlantılıdır. Bakterinin keşfini takip eden ilk on yılda, duodenal ülserlerin yaklaşık %95'inin ve mide ülserlerinin %85'inin *H. pylori* enfeksiyonu varlığında meydana geldiği rapor edilmiştir (Kuipers *et al.* 1995). Çeşitli kohort araştırmalarına göre, *H. pylori* pozitif hasta sayısı, *H. pylori* negatif kişilerden 3 ile 10 kat daha fazla, yaşam boyu ülser hastalığı geliştirme riski altındadır (Nomura *et al.* 1994) ve *H. pylori* vakalarının %10 ile 15'i - pozitif denekler bunu uzun süreli takip sırasında yaparlar (Sipponen *et al.* 1990). Gelişmekte olan ülkelerdeki *H. pylori* pozitif bireylerin hastalık açısından benzer risk altında olup olmadığı bilinmemektedir. *H. pylori* yok etme rejimlerinin uygulanmasıyla ülser hastalığının tekrarlama olasılığının önemli ölçüde azaldığının gösterilmesiyle (Rauws and Tytgat 1990), *H. pylori* ile ülser hastalığı arasındaki nedensel ilişkiye dair kanıtlar tamamlanmıştır. Bu durum, peptik ülser hastalığının nasıl yönetildiğini ve rutin klinik uygulamada nasıl ilerlediğini önemli ölçüde etkilemiştir. Bu durum eskiden kronik, tekrarlayan, ciddi morbiditeye sahip bir sorun olarak bilinmektedir ve sıklıkla asit baskılanması için ameliyat veya idame tedavisi gerektirir. Bir yıl içinde *H. pylori*'nin neden olduğu peptik ülser hastalarının %50'sinde ülser nüksetmesi yaşanmıştır

(Hentschell *et al.* 1993, Rauws and Tytgat 1990). *H. pylori*'nin ortadan kaldırılmasıyla ülser hastalığının doğal seyri önemli ölçüde değiştirilir ve neredeyse tamamen önlenir (Hentschell *et al.* 1993, Rauws and Tytgat 1990, Treiber and Lambert 1998, Van Der Hulst *et al.* 1997). *H. pylori* yok etme tedavisini takiben, devam eden veya yeniden aktive olan *H. pylori* enfeksiyonu, NSAID kullanımı veya idiyoatik ülser hastalığı nedeniyle ülser nüksleri meydana gelebilir.

2.5.1.3 Atrofik gastrit, bağırsak metaplazisi ve mide kanseri

H. pylori'nin yol açtığı kronik inflamasyon, mide bezlerinin tahrip olması ve bunların yerini fibrozis ve bağırsak tipi epitelin almasıyla, sonuçta mide mukozasının normal yapısının kaybına neden olabilir. *H. pylori* enfeksiyonu olan kişilerin çoğunluğu, öncelikle bu kişilerde ve inflamasyonun en şiddetli olduğu bölgelerde atrofik gastrit ve bağırsak metaplazisi yaşar (Kuipers *et al.* 1995). Kronik aktif inflamasyonun dağılımı ve şekli, atrofik gastrit gelişme olasılığını etkiler. Sonuç olarak, asit üretimi azalmış hastalarda atrofi daha hızlı gelişir (Kuipers *et al.* 1996). Mide kanseri riskinde 5 ile 90 kat artış, zamanla çok odaklı olarak yayılan ve herhangi bir belirgin semptom oluşturmeyen bez kaybı alanları ve bağırsak metaplazisinden kaynaklanır (Sipponen *et al.* 1985). Bu risk atrofinin derecesine ve ciddiyetine bağlıdır. Pek çok çalışmada, *H. pylori* pozitif kişilerin enfekte olmayan kontrollere göre daha sık atrofi ve metaplazi yaşadıkları bulunmuştur (Kuipers 1998), bu da *H. pylori*'nin atrofi ve metaplazinin ilerlemesi yoluyla mide kanseri oluşumu riskini arttırdığına dair kanıt sağlamaktadır. Forman *et al.* (1990) istatistiklerine göre, *H. pylori* prevalansı ile mide kanseri görülme sıklığı arasında coğrafi korelasyonlar vardır. Yine kronik inflamatuvar yanıtın yoğunluğunu etkileyen konakçı ve bakteriyel faktörler, *H. pylori* varlığında atrofi ve kanser gelişimi riskiyle bağlantılıdır. Sonuç olarak *cagA* pozitif suşlarla kolonize olan bireylerde risk artar (Kuipers *et al.* 1995, Parsonnet *et al.* 1997); ayrıca kolonizasyona yanıt olarak daha fazla IL-1 üretmeye genetik eğilimi olan bireylerde de artar (El-Omar *et al.* 2000). Batılı ülkelerde *H. pylori* pozitifliği olan bireylerin yaşam boyu mide kanserine yakalanma riskinin %1-2 civarında olduğuna inanılmaktadır (Kuipers 1999). Bu nedenle, *H. pylori*'nin kronik varlığı, gelişmiş dünyadaki mide kanserlerinin %60 ile %80'iyle bağlantılıdır. Geçtiğimiz birkaç on yılda Batı ülkelerinde mide kanseri vakalarının dramatik bir şekilde düştüğünü

belirtmek ilginçtir. Bu düşüş, *H. pylori* prevalansındaki daha önceki düşüşle örtüşmektedir. Ancak bu, yıllar ve nesiller boyunca meydana gelen aşamalı bir süreç olduğundan, *H. pylori* pozitif olan belirli bir kişi için önemli değildir. Ek olarak, mide kanserinin prevalansı Batı ülkelerinde azalmış olmasına rağmen, hastalığın dünyanın birçok yerinde, özellikle Doğu Asya ve Güney Amerika'da devam eden yüksek prevalansı nedeniyle hala dünya çapında dördüncü en yaygın kanserdir (Parkin 2001). Önümüzdeki 20 yıl içinde, bu ülkelerde mide kanseri vakalarının sürekli olarak yüksek olması ve nüfuslarının artması nedeniyle, mevcut yıllık 850,000 mide kanseri vakasının teşhis oranının daha da artacağı tahmin edilmektedir. Bu faktörlerden dolayı, pek çok araştırma şu anda *H. pylori*'yi yok ederek hem genel halkta hem de halihazırda atrofik gastrit ve bağırsak metaplazisi gibi kanser öncesi rahatsızlıkları olan kişilerde kanseri önleme becerisine odaklanmaktadır. Bir dizi plasebo kontrollü randomize çalışmada, *H. pylori*'nin uzaklaştırılmasının lezyonların gelişimini yavaşlatabildiğini ve bazı durumlarda atrofinin geri dönmesine neden olabileceğini ortaya çıkarmıştır (Kuipers *et al.* 2004, Leung *et al.* 2004, Ley *et al.* 2004, Schenk *et al.* 2000) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 *H. pylori* enfeksiyonuna verilen farklı tepkiler (Kuipers *et al.* 2004)

2.5.1.4 Ülser dışı dispepsi

Fark edilebilir herhangi bir yapısal anormallik olmadan üst gastrointestinal rahatsızlık semptomlarının varlığı, ülser dışı veya fonksiyonel dispepsi olarak bilinir. Buna tanısal çalışmanın bir parçası olarak üst gastrointestinal endoskopi de dahildir. *H. pylori* fonksiyonel dispepsili bireylerin %30-60'ı tarafından taşınmaktadır, ancak bu sıklık genel popülasyondakine benzerdir (Talley and Hunt 1997). Ülser dışı ve açıklanamayan dispepsisi olan bireylerde *H. pylori*'nin yok edilmesinin etkisi çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Dispepsi sonuçları minimal/çözülmüş ve aynı/daha kötü semptomlara bölündüğünde, ülser dışı dispepsi üzerine yapılan 13 randomize çalışmanın meta-analizi, *H. pylori*'nin yok edilmesinin plaseboya kıyasla %8 bağıl risk azalmasıyla ilişkili olduğunu bulmuştur (%95 GA) (Moayyedi *et al.* 2005). Bir dispepsi vakasını başarıyla tedavi etmek için 18 (%95 GA, 12 ile 48) gereklidir. Semptomların tedavisine verilen önemin yanı sıra, daha büyük hasta popülasyonlarının tedavisinde maliyet etkinliği de bir endişe kaynağıdır. Tedavi edilmesi gereken hasta sayısı dikkate alındığında *H. pylori*'nin ortadan kaldırılmasının uygun maliyetli bir teknik olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Başka bir Cochrane meta-analizi (Delaney *et al.* 2005), üzerinde çalışılmamış olan dispepsi için farklı tedavi yöntemlerini değerlendirmiştir. Bireysel yaklaşımlar arasında erken endoskopi, erken farmakolojik tedavi, *H. pylori* testi ve sadece testi pozitif çıkanlarda endoskopi veya önce test yapılarak veya yapılmadan *H. pylori* yok etme tedavisi yer almıştır. Analize göre ÜFE'ler dispepsi tedavisinde faydalıdır. Bazı dispepsi hastaları, endoskopi veya *H. pylori* testi yoluyla erken araştırmadan yararlanmış, ancak genel yönetim stratejisinin bir parçası olarak maliyet etkin değildir (Delaney *et al.* 2005).

2.5.1.5 Mide MALT lenfoması

Normal mide mukozasında lenfoid doku bulunmaz ancak *H. pylori* kolonizasyonu neredeyse her zaman MALT'ın gelişmesine neden olur. Nadiren bu doku, yavaş yavaş çoğalarak MALT lenfomasını oluşturan monoklonal bir B hücresi popülasyonuna yol açabilir. MALT lenfoma tanısı için histolojik kriterler ve poliklonal reaktif infiltrasyonlardan ayrımı konusunda devam eden tartışmalar vardır. Tanı, özellikle

düzenli mikroskopi sırasında gözlemlenen histolojik görünüme ve immünohistokimya veya PCR gibi moleküler yöntemlerle elde edilen klonalite kanıtına dayanır. *H. pylori* neredeyse tüm MALT lenfoma hastalarında mevcuttur (Eidt *et al.* 1994) ve *H. pylori* pozitif olanların gastrik MALT lenfoması geliştirme şansı çok daha yüksektir (Parsonnet *et al.* 1994). *H. pylori* pozitif kişilerde kesin insidans, teşhis sorunları ve bu durumun göreceli nadirliği nedeniyle belirsizdir, ancak MALT lenfomaları, *H. pylori* pozitif kişilerin %1'inden azında görülür (Parsonnet and Isaacson 2004). Bu nedenle MALT lenfoma hastalarında *H. pylori* eradikasyonunun etkilerini belirlemek için randomize çalışmalar yapmak mümkün değildir. Ancak bazı vaka serileri, mideyle sınırlı evre IE MALT lenfoma hastalarında ortadan kaldırılmasının tam remisyonla sonuçlanabileceğini göstermiştir (De Mascarel *et al.* 2005, Fischbach *et al.* 2004a, Nakamura *et al.* 2005, Wundisch *et al.* 2005). Genel olarak, bu bireylerin %60 ila 80'i *H. pylori*'nin çıkarılmasından sonra tam bir iyileşme yaşar, %10'u hala küçük kalıntı hastalık belirtileri gösterir ve diğer hastalar tedaviye yanıt vermez veya hastalığın ilerlemesini yaşar. İyi huylu lenfoid agregatları olan bazı bireyleri içerebilen MALT lenfoma için farklı tanı kriterleri, farklı seriler arasındaki yanıt farklılığına kısmen katkıda bulunmuş olabilir. *H. pylori*'nin uzaklaştırılmasının ardından, başlangıçta tam iyileşme yaşayan hastaların %10 ile 35'i bunu tekrar yapmaktadır. Bu nedenle MALT lenfoma hastalarının hatırı sayılır bir süre takip edilmesi gerekmektedir (Raderer *et al.* 2005). Bir translokasyon yanıtın anahtar belirleyicisi gibi görünmektedir. Bu translokasyon, kaspaza benzeyen ancak biyolojik işlevi hala bilinmeyen bir protein olan API2-MALT1'in füzyonuyla bağlantılıdır. Birincisi apoptozun düzenlenmesinde rol oynar. Füzyon sonucunda apoptoz baskılanır. Bir dizi çalışmaya göre, *H. pylori*'nin uzaklaştırılmasının bu translokasyon ile MALT lenfomaları üzerinde çok az etkisi vardır veya hiç etkisi yoktur (Inagaki *et al.* 2004, Liu *et al.* 2002).

2.5.1.6 Gastroözofageal reflü hastalığı (GERD)

GERD'nin uzun süredir *H. pylori* kolonizasyonundan bağımsız olarak ortaya çıktığı, yani *H. pylori* pozitif ve *H. pylori* negatif hastalarda aynı sıklık ve şiddette ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu görüş, GERD hastalarında *H. pylori* prevalansının kontroller arasındakile karşılaştırılabilir olduğunu ortaya koyan kesitsel araştırmalara

dayanmaktadır (Werdmuller and Loffeld 1997). Ancak daha fazla araştırma, *H. pylori*'nin GERD'nin başlangıcını önleyebileceğini ve bunun sonucunda konakçılara avantajlı olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Yavaş yavaş ortaya çıkan bu kavram GERD hastaları arasında *H. pylori* prevalansının düşük olduğuna, özellikle de daha virülen suşlara ilişkin tekrarlanan gözlemlerden gelmiştir (Fallone *et al.* 2000); *H. pylori* prevalansı ile GERD ve komplikasyonlarının görülme sıklığı arasındaki karşıt zaman ve coğrafi eğilimler; *H. pylori*'nin yok edilmesinden sonra potansiyel olarak GERD insidansının artması (Labenz *et al.* 1997); ve *H. pylori* kaynaklı korpus gastritin asit sekresyonunu azalttığına tanınması olarak ortaya çıkmıştır. Buradaki ana fikir, *H. pylori*'nin neden olduğu gastrik korpus iltihabının asit baskılayıcı bir etkiye sahip olması ve hastaları GÖRH gelişmesinden korumasıdır. Eradikasyon tedavisinin yalnızca *H. pylori* tanısı ve tedavisi için açık bir endikasyon olduğunda reçete edilmesi gerektiği fikrini vurgulamaları dışında, bu görüşlerin şu ana kadar belirli konulara çok az uygulaması olmuştur. Artık daha fazla bilgi mevcut olduğundan, *H. pylori*'nin eliminasyonunun GERD'nin ortaya çıkışı (Vakil *et al.* 2000) ve hastalığın remisyonu sırasında tedavi kesildiğinde önceden var olan GERD'nin kötüleşmesi (Schwizer *et al.* 2001) üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur (Kuipers *et al.* 2004, Schenk *et al.* 2000).

2.5.1.7 Ekstragastroduodenal bozukluklar

Çok sayıda ekstragastrik bozukluk *H. pylori*'ye bağlanmıştır. Bunlara koroner kalp hastalığı, otoimmün tiroid hastalığı ve trombositopenik purpura, demir eksikliği anemisi, Raynaud fenomeni, skleroderma, migren ve Guillain-Barré sendromu dahildir. *Rosacea* ve idiyopatik ürtiker gibi dermatolojik durumlar da dahildir. Aterosklerozun hızlanması, *H. pylori* ile konakçı epitoplari arasındaki otoimmün hastalıklara neden olan antijenik taklit ve pıhtılaşma kademesinin kalıcı düşük dereceli aktivasyonu, varsayılan altta yatan mekanizmalardan bazılarıdır (Gasbarrini *et al.* 2004). Bunun sonucunda bu bozuklukları olan hastalarla ilgili çok sayıda vaka çalışması üretilmiştir. İdiyopatik trombositopenik purpura hastalarında *H. pylori* kolonizasyonu olduğunda, çeşitli çalışmalar yok etme tedavisinin trombosit sayısını iyileştirme açısından plasebodan daha iyi performans gösterdiğini göstermiştir (Gasbarrini and Franceschi 2005, Jackson *et al.* 2005, Suzuki *et al.* 2005). Bu hastalar için *H. pylori* testi ve tedavisi dikkate alınmalıdır. Yukarıda

belirtilen diğer bozuklukların bulunduğu hastalarda *H. pylori*'nin yok edilmesinin şu anda bir amacı yoktur ve daha uygun, randomize çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır (Bamford *et al.* 1999, Kusters and Kuipers 1999, Leontiadis *et al.* 1999).

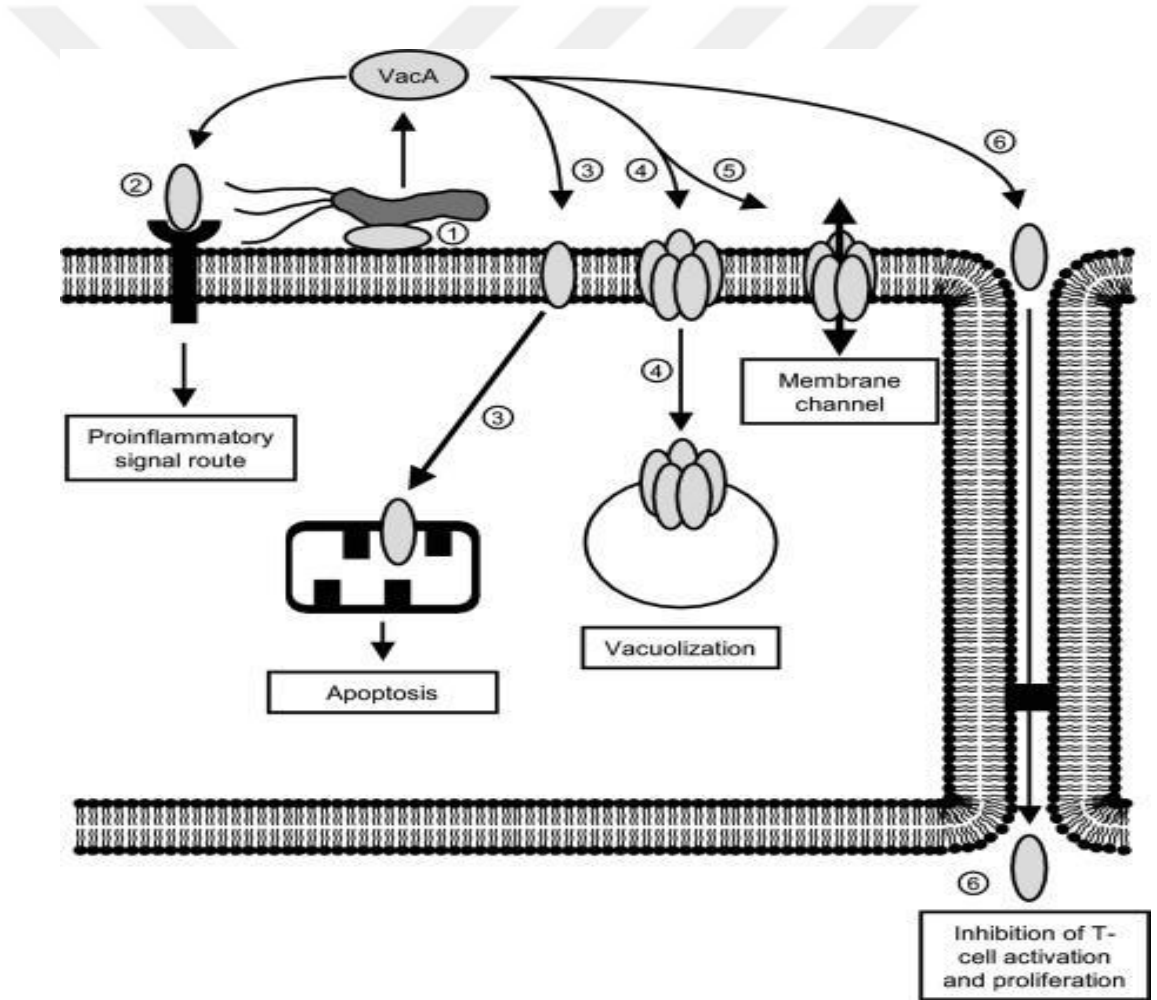
2.6 Bakteriyel Faktörler

Bakteriyel virülans faktörlerinin tanımına göre, bunlar konakçıda hastalığın ilerlemesi için gereklidir ve eksik olduklarında kolonileşen bakterileri konakçıya zararsız ve hastalığa neden olamayacak hale getirirler. Bu tanıma göre *H. pylori* artık herhangi bir gerçek virülans faktörüne sahip değildir. *H. pylori* ve konağın uzun süredir devam eden bir evrimsel etkileşime sahip olduğu ve bu durumun daha ortak ortak bir ilişkiye adaptasyonu desteklediği varsayılmıştır (Falush *et al.* 2003, Suerbaum and Achtman 2004). Hatta bazı araştırmalar *H. pylori*'ye sahip olmanın avantajlı olduğunu bile iddia etmektedir. Örneğin, epidemiyolojik kanıtlar *H. pylori* enfeksiyonunun gastrik özofageal reflü hastalığının (GERD) başlangıcına karşı koruduğunu göstermektedir (Blaser 1999). Bağışıklık sistemi normal olan kişilerin *H. pylori* ile ilişkili hastalıklara yakalanma riskinin yüksek olmaması, bakterilerin öncelikle bir patojen olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca, keşfedilen tek rezervuarın primatlarda olduğu göz önüne alındığında, *H. pylori*'nin hayatta kalması için ortak bir ilişkinin avantajlı olacağı makul görünmektedir. Bununla birlikte, kolonizasyon bağışıklık sistemini tetikler ve *cag* patojenite adası (PAI) ve vakumlayıcı sitotoksin (*VacA*) dahil olmak üzere birçok *H. pylori* proteininin ve yapısının konakçıya zarar verdiğine dair kanıtlar vardır. *H. pylori*'nin insan konakçıda hastalığa neden olmasının net bir nedeni olmasa da bazen bakteriyel genlerin ekspresyonu, konak faktörleri ve çevresel faktörler nedeniyle patogeneze ortaya çıkabilmektedir. Aşağıda *H. pylori* enfeksiyonu ve hastalığının gelişimini etkileyen bazı bakteriyel faktörlerin açıklaması bulunmaktadır.

2.6.1 Sitotoksinin vakumlanması

Vakuolleştirici sitotoksin (*VacA*) olarak bilinen, salgılanan 95 kDa'lık bir ekzotoksin, insan hücrelerinde vakuollerin gelişmesine neden olur. Çeşitli *H. pylori* suşları arasındaki sinyal sekansındaki (s1, s2) ve/veya orta bölgedeki (m1, m2) farklılıklar nedeniyle, *vacA*

genotipik varyasyonları mevcuttur (Atherton *et al.* 1995) (Şekil 2.6). s2/m2 genotipine sahip suşlar toksik *VacA* ifade etmezken, s1/m1 suşlarının çoğunluğu ve bazı s1/m2 suşları sitotoksin sergiler. Araştırmalar, toksin eksprese eden suşlar ile konakçıdaki hastalığın ciddiyeti arasında bir korelasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır; bu da *VacA* proteininin patogeneze potansiyel rolüne işaret eder (Xiang *et al.* 1993). Her ne kadar *VacA* ve *CagA*'nın bir arada bulunması hastalıkla ilişkili olsa da, ikisi arasında genetik bir bağlantı yok gibi görünmektedir (Xiang *et al.* 1995) ve saf *VacA* tek başına farelerde mide ülserlerine neden olabilir (Telford *et al.* 1994). *VacA*'nın fare modellerinde mide ülserlerine neden olma kapasitesi, *VacA*'nın epitelyal hastalığın ortaya çıkışındaki işlevini güçlü bir şekilde desteklemektedir.



Şekil 2.6 *VacA* proteini hücresel süreçleri (Atherton *et al.* 1995)

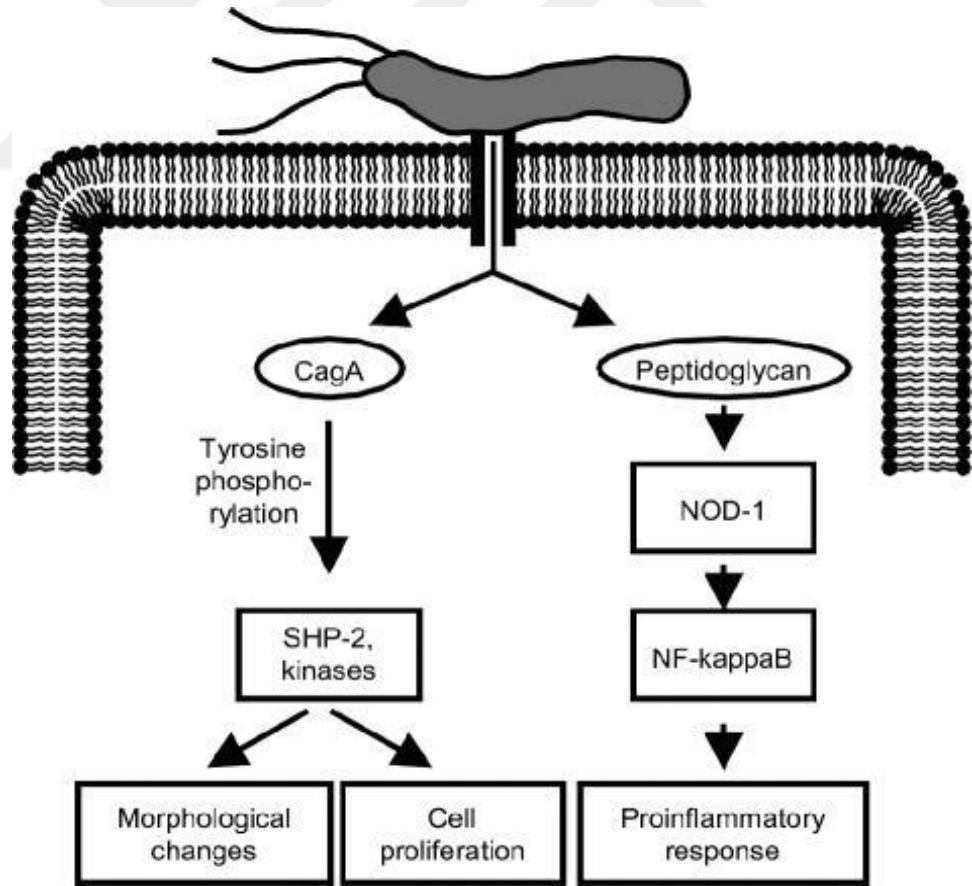
2.6.2 Cag patojenite adası

H. pylori'de immünodominant bir proteinin varlığının, enfekte hastalardaki peptik ülser hastalığıyla bağlantılı olduğunun keşfedilmesi nedeniyle, genin *VacA*'nın sitotoksik etkisi ile bağlantısının tanınması amacıyla eşleşen gene *cagA* (sitotoksinle ilişkili gen) adı verilmiştir. Bu virülans belirtici, *VacA* ile *H. pylori* suşlarını iki gruba ayırmak için kullanılmıştır: *cagA* genine sahip olan ve *VacA*'nın toksik bir formunu eksprese eden tip I suşlar ve *cagA* genini içermeyen ancak *VacA* olmayan *vacA*'yı eksprese eden tip II suşlar. Daha sonra *cagA* geninin 31 farklı gen içeren bir patojenite adasının (PAI) bir bileşeni olduğu keşfedilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* tip IV salgı sistemi, salgı sistemini oluşturan bu genlerin birçoğuna homologdur (Christie and Vogel 2000). Bu tür bir mekanizma kullanılarak moleküller konakçı hücrelere dahil edilebilir. Epitel hücrelerine enjekte edilen ve daha sonra tirozin fosforile hale gelen ve konakçı SHP-2 tirozin fosfataz ile etkileşime giren *CagA* proteini, *cag* PAI tip IV sekresyon sisteminin efektör molekülüdür (Higashi *et al.* 2002a). Konakçı hücreler bu olayın sonucunda bir dizi hücre içi reaksiyon yaşarlar. Yetiştirilen epitelyal hücrelerdeki bu fenotip, hücrelerin morfolojik olarak görünme şekline dolaylı olarak sinek kuşu olarak bilinir. *CagA*'nın EPIYA motifleri fosforile olanlardır. *CagA* proteini değişken sayılarda tekrarlanan çeşitli motiflere sahiptir ve bunların coğrafi konumlarla bağlantılı genetik varyasyonları da mevcuttur (Higashi *et al.* 2002b). *CagA*'nın fosforilasyonu, tekrarların miktarına ve EPIYA motiflerinin hangi genetik varyasyonlarının mevcut olduğuna bağlı olarak az çok belirgindir ve bu da inflamasyonun ne kadar meydana geldiğini etkiler (Argent *et al.* 2004, Higashi *et al.* 2002a).

Cag PAI aynı zamanda sitokin IL-8'in indüksiyonunu da başlatır. Transkripsiyon faktörü NF- κ B'yi yukarı regüle eden hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolu, bakteri ile konakçı arasındaki, IL-8'in indüksiyonuna yol açan iletişimde rol oynar (Nozawa *et al.* 2002).

Cag PAI'yi çevreleyen 31 bp'lik tekrarlar nedeniyle, *H. pylori* genomuna tam *cag* PAI eklenebilir veya silinebilir ve aynı kişi hem *cag* PAI negatif hem de *cag* PAI suşlarını barındırabilir (Björkholm *et al.* 2001b, Gustavsson *et al.* 2005, Kersulyte *et al.* 1999).

Hastalıkla ilgili olarak tüm *cag* PAI'nin analizine göre *cag* PAI'nin kısmi silinmesi dikkate alınmalıdır. İzolatların *cagA* pozitif veya *cagA* negatif olmasına bakılmaksızın, *cag* PAI'nin sadece bir kısmını taşıyorlarsa hastalıkla bağlantılı olma olasılıkları daha düşüktür (Nilsson *et al.* 2003). Çok sayıda araştırmada, *H. pylori* izolatlarında *CagA* molekülünün varlığı, konakçıda peptik ülser ve mide kanseri hastalıklarının gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Blaser 1998, Crabtree *et al.* 1991). Bununla birlikte, *cag* PAI içermeyen *H. pylori* izolatlarına sahip bazı hastalarda hala hastalık görülmektedir (Nilsson *et al.* 2003). Bununla birlikte, *H. pylori* taşıyıcılarının yalnızca %10'u hastalığa yakalanır, dolayısıyla asla hastalık geliştirmeyen çok daha fazla *cagA* pozitif suş taşıyıcısı vardır. Tüm suşların yaklaşık %70-95'i *cagA* pozitifdir (Ernst and Gold 2000). Dolayısıyla ne *cagA* geni, ne de bugüne kadar üzerinde çalışılan *H. pylori*'deki diğer genetik belirteçler veya genetik belirteç kombinasyonları, bir hastalığın seyrini tahmin etmede kullanılamaz (Şekil 2.7).

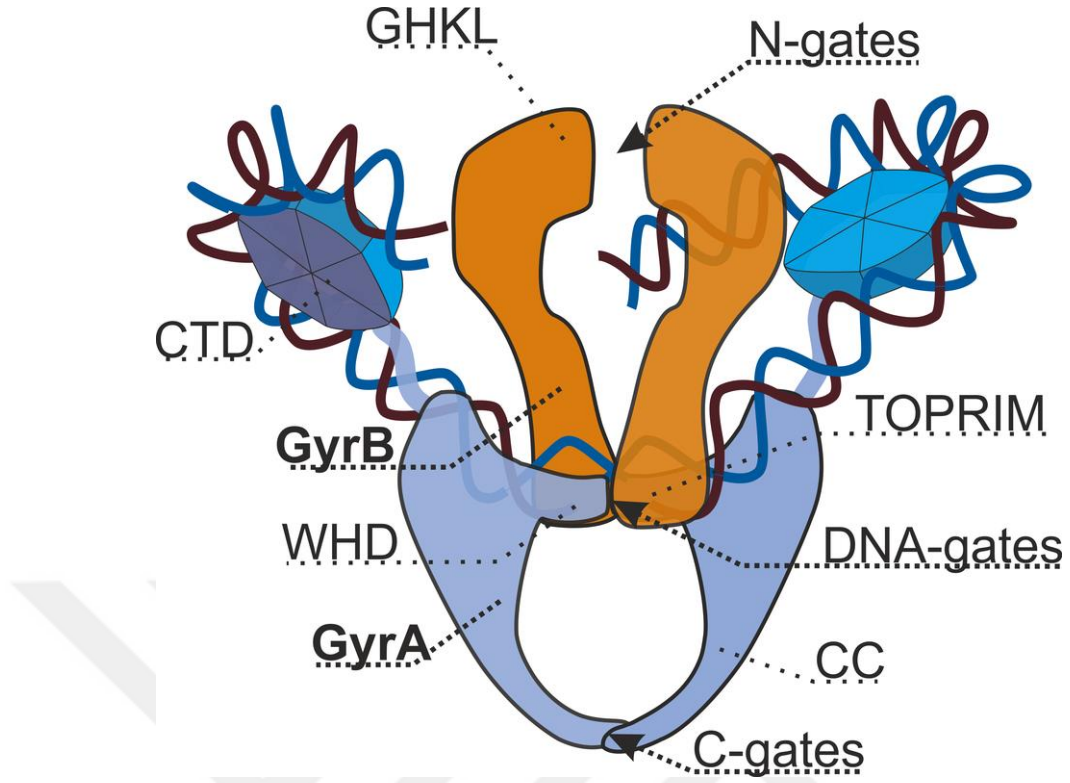


Şekil 2.7 *Cag* tip IV salgı sisteminin bağışıklık modülasyonu (Ernst and Gold 2000)

2.6.3 GyrA geni

DNA giraz veya basitçe giraz, topoizomeraz sınıfına ait bir enzimdir ve Tip II topoizomerazların bir alt sınıfıdır (Şekil 2.8) (Garrett and Grisham 2013), çift sarmallı DNA ise uzayan RNA-polimeraz tarafından çözölmektedir (Sutormin *et al.* 2019) veya ilerleyen replikasyon çatalının önündeki helikaz yoluyla, ATP'ye bağımlı bir şekilde topolojik gerilimi azaltır (Wigley *et al.* 1991, Cabral *et al.* 1997). Enzim veya enzim tarafından pozitif olarak sarılır. Bu, bir geçiş oluşturmak için şablonun ilmeklenmesi, çift sarmallardan birinin kesilmesi, diğerinin içinden geçirilmesi ve son olarak kopuşun serbest bırakılmasıyla gerçekleştirilir; her enzimatik adım, bağlantı sayısını iki artırır. Bakterilerde DNA giraz, tek dairesel DNA'larını keserek iki ucun birbirinin etrafında dönmesine ve süper sarmallar oluşturmaya neden olur. Giraz, sıtma paraziti *Plasmodium falciparum*'un apikoplastında keşfedilmiştir (Gyrase 2007, Dar *et al.* 2009) ve ökaryotik plastidler olan çeşitli bitkilerin kloroplastlarında (Evans-Roberts *et al.* 2016), nalidiksik asit, novobiyosin, albicidin ve siprofloksasin gibi çok sayıda antibiyotik bakteriyel DNA girazı hedef alır.

Bakteriyel DNA, girazın ATP hidrolizi pahasına bunları ekleme konusundaki olağanüstü kapasitesi nedeniyle serbest negatif süper sarmallara sahiptir (Garrett and Grisham 2013). DNA replikasyonu ve bakteriyel transkripsiyon sırasında girazın pozitif süpersarmalları gevşetme kapasitesi önemlidir. Pozitif süper bobinler, DNA'nın sarmal yapısından dolayı yer değiştiren bir enzimin, bu durumda bir DNA polimerazın önünde oluşur, bu nedenle süper bobinler pozitifdir. Girazın (ve topoizomeraz IV'ün) pozitif süpersarmalları denatüre etme kapasitesinin bir sonucu olarak, polimerazın önündeki süperhelikal gerilim hafifletilebilir ve replikasyonun ilerlemesine olanak sağlanır.



Şekil 2.8 Giraz yapısının şeması (Garrett and Grisham 2013)

2.7 Konak Genetiğinin Katkısı

Hastalıklara duyarlılığın ve ciddiyetinin belirlenmesinin hem konakçının genetiğine hem de patojenin özelliklerine bağlı olduğu ortaya çıkmıştır. Transkripsiyon faktörü bölgelerini oluşturarak veya silerek veya RNA birleştirmeyi ve ardından gelen translasyonu etkileyerek genetik polimorfizmler, ifade edilen gen ürünlerinin miktarlarını doğrudan etkileyebilir. Alternatif olarak, belirli maddelerin metabolizmasını bozabilir veya belirli polimorfizme sahip genin aşağı akışında yer alan bağışıklık araçlarının üretimini hafifçe etkileyebilirler.

Son yıllarda *H. pylori* ile ilişkili hastalıklarda konakçı genetik varyantlarının önemini destekleyen bilgi miktarında önemli bir artış görülmüştür. İlk araştırmalar, PPT'lerin ve antibiyotiklerin metabolizmasını etkileyen ve sonuç olarak *H. pylori*'nin yok etme tedavisiyle tedavisinin etkinliğini etkileyen sitokrom P450 genindeki spesifik mutasyonların fonksiyonuna odaklanmıştır (Furuta *et al.* 2004). Ancak bu değişiklikler *H. pylori* kolonizasyonunu doğrudan etkilemez, bu durum, antiinflamatuvar medyatörlerin

karmaşık etkileşimi tarafından yönetilen ve sürdürülen kronik aktif inflamasyonla bağlantılıdır (Macarthur *et al.* 2004). Bu inflamatuvar araçların *H. pylori* ile ilişkili mide hastalıklarındaki işlevi, son yıllarda çok sayıda bağımsız araştırmayla ortaya konmuş ve bu araçların ekspresyon düzeylerini değiştiren birçok genetik varyant rapor edilmiştir. Genel olarak, IL-1 için zarif bir şekilde gösterildiği gibi, proinflamatuvar genetik polimorfizmlerin mide kanseri gelişme riskini artırma eğiliminde olduğu söylenebilir.

2.7.1 IL-1

Salgılanan mide asidi miktarı ve proinflamatuvar yanıtın varlığı duodenal ülser hastalığı veya atrofik gastritin gelişiminde önemli rol oynar. Polimorfik IL-1B'yi (IL-1'i kodlayan) içeren bir gen kümesi β sitokin ve IL-RN (IL-1 reseptör antagonistini kodlayan) genleri, IL-1 sitokin kodlanmasından sorumludur. IL-1 β , asit salgısının bilinen en güçlü inhibitörü ve güçlü bir proinflamatuvar sitokindir (Calam 1999, El-Omar *et al.* 2000). IL-1 gen kümesi, IL-1'in yüksek ekspresyonuyla sonuçlanan birçok polimorfizme sahiptir. β , IL-1B*-31C, IL-1B*-511T ve IL-1RN*2/*2 daha sonra *H. pylori*'nin korpusta baskın kolonizasyonu ile bağlantılı olan asit üretiminde bir azalmaya neden olur ve pangastrit, atrofik gastrit gelişimi ve mide kanseri riskinde artışla sonuçlanır (El-Omar 2001, El-Omar *et al.* 2000, El-Omar *et al.* 2003, Furuta *et al.* 2002, Hwang *et al.* 2002, Machado *et al.* 2003, Rad *et al.* 2003, Zambon *et al.* 2002).

2.7.2 Diğer sitokinler

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) kodlayanlar gibi inflamasyonla ilişkili ek genlerdeki polimorfizmler ve IL-10'un benzer etkilere sahip olduğu bulunmuştur. TNF α -inflamasyonu destekleyen bir sitokindir ve TNF-A geninin bilinen çok sayıda polimorfizmi vardır. TNF-A*308A genotipi artan TNF-A ile bağlantılıdır. IL-1 ve TNF-A yoluyla gastrik parietal hücreler tarafından gastrin ve asit oluşumunu etkileyen α üretimini sağlar (Suzuki *et al.* 2001). Sonuç olarak, TNF-A*308A genotipi *H. pylori* enfeksiyonu ve daha yüksek mide kanseri gelişme riski ile bağlantılıdır (El-Omar *et al.* 2003, Ohya *et al.* 2004, Rad *et al.* 2004, Yea *et al.* 2001, Zambon *et al.* 2005). Benzer şekilde IL-10 geninin haplotipleri, antiinflamatuvar sitokin IL-10'un ekspresyonu üzerinde

etkiye sahiptir. ATA haplotipi, IL-10 seviyelerinin azalmasına ve proinflamatuvar yanıtı doğru bir kaymaya neden olurken, GCC haplotipi, IL-10'un daha yüksek ekspresyon seviyesiyle ilişkilidir ve dolayısıyla antiinflamatuvar yanıtı teşvik eder (El-Omar *et al.* 2003, Hamajima *et al.* 2003, Hellmig *et al.* 2005, Lu *et al.* 2005, Rad *et al.* 2004, Wu *et al.* 2003, Zambon *et al.* 2005). ATA haplotipi mide kanseri riskinin artmasıyla bağlantılıdır (El-Omar *et al.* 2003, Hamajima *et al.* 2003, Hellmig *et al.* 2005, Lu *et al.* 2005, Wu *et al.* 2003, Zambon *et al.* 2005), GCC haplotipi ise daha virülan *H. pylori* suşları ile kolonizasyonla bağlantılıdır (Rad *et al.* 2004). Çok sayıda proinflamatuvar genotip mide kanseri gelişme riskini önemli ölçüde arttırmaktadır, ancak tek bir polimorfizm bu riski yalnızca iki ile üç kat artırabilir (El-Omar *et al.* 2003, Lu *et al.* 2005, Macarthur *et al.* 2004, Machado *et al.* 2003, Rad *et al.* 2004, Zambon *et al.* 2005).

Genel olarak, belirli bir mutasyonu yüksek mide kanseri gelişme riskine bağlamak zordur çünkü *H. pylori* enfeksiyonu denklemde çok önemli bir faktördür (Queiroz *et al.* 2004, Rad *et al.* 2004, Zambon *et al.* 2005). Bunun yerine, çeşitli proinflamatuvar ve antiinflamatuvar polimorfizmler, konağın bağışıklık durumu ve kolonileşen *H. pylori* suşunun özellikleri arasındaki etkileşim, hastalığın seyrini belirler.

2.8 *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Tanı ve Tedavisi

2.8.1 *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tanısı

Bir hastanın *H. pylori* enfeksiyonuna sahip olup olmadığını belirlemek için çok sayıda invaziv ve invazif olmayan tanısal prosedür mevcuttur (Ricci *et al.* 2007). İnvaziv teknikler için mide mukozasından biyopsi ve endoskopi gereklidir.

Enfeksiyonun teşhisine yönelik bir teknik, seçici bir ortamda mide biyopsisi örneğinden *H. pylori*'nin in vitro büyümesidir. Antibiyotik duyarlılığının test edilmesine olanak sağladığı göz önüne alındığında, bu yaklaşım, ilaç direncinin oldukça yaygın olduğu popülasyonlarda giderek daha önemli hale gelmektedir (Rautelin *et al.* 2003). Endoskopi sırasında elde edilen mide biyopsisi histolojik analiz için daha ileri işlemlere tabi

tutulabilir ve parafine gömülebilir. *H. pylori*'yi tanımlamak için en popüler renklendirme teknikleri modifiye Giemsa ve Warthin-Starry boyalarıdır. Mikroorganizmanın tanımlanması ve mide mukozasının morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi histoloji ile mümkün olmaktadır. Beş farklı kriter (aktivite, inflamasyon, atrofi, bağırsak metaplazisi ve *H. pylori* enfeksiyonu) araştırılır ve hafif, orta veya şiddetli olarak derecelendirilir. Tekrarlanabilir ve terapötik açıdan anlamlı tanıların üretilmesine yardımcı olan revize edilmiş Sidney Sistemi, mide biyopsilerinde bu verilerin kapsamlı bir şekilde raporlanması için pratik rehberlik sunmaktadır (Dixon *et al.* 1996). Ayrıca *H. pylori* DNA'sı, PCR'ye dayalı moleküler yöntemler (multipleks PCR, Gerçek Zamanlı PCR) kullanılarak mide biyopsilerinde, mide suyunda, ağız mukozasında ve dışkı örneklerinde doğrudan tespit edilebilir (Lehours *et al.* 2003, Chisholm *et al.* 2002, Monteiro *et al.* 2001), ayrıca virülans faktörlerini (Figueiredo *et al.* 2002), makrolidi (Oleastro *et al.* 2003) ve tetrasiklin duyarlılığını (Glocker *et al.* 2005) tanımlamak için kullanılır. Birçok teşhis prosedürü *H. pylori*'nin üreaz enzimi üretimine dayanmaktadır. Hızlı üreaz testi için üre içeren bir solüsyonun içine biyopsi materyali yerleştirilir. *H. pylori*, amonyak üreterek pH'ta bir yükselmeye neden olur ve bu, çözeltideki gösterge boyanın rengindeki değişikliklerle tanımlanır (McNulty and Wise 1985). Üre nefes testi, etiketli ürenin yenildiğinde *H. pylori* üreazı tarafından parçalanacağı fikrine dayanmaktadır. Nefesle ne kadar karbondioksit verildiği ölçülür ve etiketlenir. Canlı, aktif enfeksiyonları tanımlama yeteneği, bu invaziv olmayan yaklaşımın faydalarından biridir. Sonuç olarak, bu tekniğin tedaviden hemen sonra ortadan kaldırılmasının doğrulanması için önerilmektedir (Rautelin *et al.* 2003). *H. pylori* tanısı aynı zamanda çeşitli serolojik analizlerin kullanılmasını da içerir. Kültür süpernatantlarının filtreleri ve hatta tüm hücre sonikatları gibi ham antijen preparasyonlarının kullanılması mümkündür (Gerstenecker *et al.* 1992, Talley *et al.* 1991). Anti-H'nin varlığını belirlemek için en popüler teknik, serum numunelerindeki *H. pylori* antikorlarının tespiti, enzim bağlantılı immünosorbent testidir (ELISA) (Vaira *et al.* 1999). İmmüno blot, *H. pylori* antijenlerini elektroforez kullanarak ayıran ve daha sonra antijen içermeyen proteinleri nitroselülozdan yapılmış bir zar üzerine elektriksel olarak aktaran farklı bir serolojik test türüdür. Bu test formatının faydası, her bireyin çeşitli antijenlere karşı serolojik tepkisinin tanımlanmasına izin vermesidir (Oleastro *et al.* 2002). Serum ve tam kan testlerine ek olarak idrar, tükürük ve mide suyunun tümü *H. pylori* antikorları açısından test edilebilir.

Ancak bu analizlerde düşük hassasiyetler bulunmuştur (Rautelin *et al.* 2003). Enfeksiyon tedavi edildikten sonra antikorların kalıcılığı serolojik testlerin ana dezavantajıdır. Bu nedenle seroloji, bir enfeksiyonun varlığını değerlendirmek için sıklıkla yapılmaması gerekse de tanısal bir tarama yöntemi olarak kullanılabilir (Kosunen *et al.* 1992). Daha yakın zamanlarda, dışkı örneklerinde *H. pylori* antijenlerini saptamak için bir yöntem geliştirilmiştir (Vaira *et al.* 1999). Çocuklarda bir enfeksiyonun tanısı, bu invaziv olmayan analiz için faydalı olabilir (Van Doorn *et al.* 2001). *H. pylori* tanı testinin seçimi testin özelliklerine, maliyet etkinliğine ve klinik koşullara dayanmaktadır. Aynı zamanda hedef popülasyonda uygun bir doğrulamayı da gerektirir (Ricci *et al.* 2007) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 *H. pylori* enfeksiyonunun tespiti için tanı yöntemleri (Ricci *et al.* 2007)

Teşhis yöntemi	Duyarlılık ve özgüllük	Sıradan uygulama	Notlar
İnvaziv yöntemler			
Histoloji	>%95	Rutin hastane teşhislerinde “altın standart”	Uzman patolog gerektirir; ayrıca inflamasyon ve atrofi hakkında histolojik veriler sağlar
Kültür	>%95	Alternatif altın standardı	Antimikrobiyal duyarlılığın test edilmesine olanak tanır; spesifik mikrobiyolojik uzmanlık gerektirir
Biyopsi			
Hızlı üreaz (CLO) testi	>%90	Uygun maliyetli ve hızlı test	H'nin doğrulanması için ek bir test gerektirir. pilori enfeksiyonu
Noninvaziv Yöntemler			
Üre nefes testi		Alternatif altın standardı	<i>H. pylori</i> 'nin yok edilmesi tedavisinin başarısını değerlendirmek için çok yararlı, güvenilir bir test; Pahalı ekipman gereksinimi nedeniyle sınırlı kullanılabilirlik
Dışkı antijen testi	>%90	Henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır	Basit bir test ancak <i>H. pylori</i> 'nin yok edilmesi tedavisinin başarısının değerlendirilmesi için güvenilir olmayabilir.
Seroloji	%80-90	Esas olarak epidemiyolojik çalışmalar için kullanılır	Rutin tarama için yetersiz güvenilirlik; immünolojik hafıza nedeniyle devam eden enfeksiyonu kanıtlamıyor

2.8.2 *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tedavisi

H. pylori enfeksiyonunu tedavi etmek için çok sayıda tedavi planı mevcuttur. Birincil taktik üçlü terapi etrafında inşa edilmiştir (Malfertheiner *et al.* 2002). Proton pompa

inhibitörleri (PPI'ler) ve iki antibiyotik tipik olarak üçlü tedavide kullanılır; en popüler seçenekler metronidazol, amoksisilin ve klaritromisindir (Malfertheiner *et al.* 2002). Her ne kadar bazı ülkelerde bu madde kolaylıkla temin edilemese de dördümlü terapi, bizmut bazlı üçlü rejime salgı önleyici bir ajanın (PPI veya histidin-2-reseptör antagonistleri) eklenmesiyle geliştirilmiştir. Üçlü tedavi başarısızlığından sonra artan iyileşme oranı nedeniyle, dördümlü tedavi genellikle ikincil tedavi olarak kullanılır (Malfertheiner *et al.* 2002). Ancak bu, her gün daha uzun bir süre boyunca çok daha fazla tablet almayı gerektiren daha zor bir rejimdir ve genellikle daha olumsuz yan etkilere sahiptir (Fischbach *et al.* 2004b). Avrupa *Helicobacter pylori* Çalışma Grubu'nun *H. pylori*'nin tedavisine ilişkin fikir birliği kılavuzları, PUD'lu tüm *H. pylori* pozitif hastalar için, yok etme tedavisini şiddetle tavsiye etmektedir. Ek olarak, düşük dereceli MALT lenfomalı hastalar, bilinen herhangi bir semptom nedeni olmaksızın fonksiyonel dispepsisi olan hastalar ve gastritlerinde atrofik gastrit gibi ciddi anormallikler olan kişiler de yok edilmeye aday olabilirler. Mide kanseri olan kişilerin birinci derece akrabalarına da *H. pylori* enfeksiyonundan kurtulmaları şiddetle tavsiye edilmektedir (Malfertheiner *et al.* 2002). Tedavinin etkinliği hastanın uyumu, yan etkileri ve en önemlisi antimikrobiyal direnci gibi birçok değişkene bağlı olacaktır (Wolle and Malfertheiner 2007, Megraud 2007). İdeal olarak, enfeksiyona neden olan *H. pylori* suşunun duyarlılık testi tedavi kararına ışık tutmalıdır. Antibiyotiklerin kontrolsüz ve yaygın kullanımı sonucunda dirençli *H. pylori* suşlarının görülme sıklığı artmıştır. Bir dizi çalışmaya göre, metronidazol ve klaritromisin, En sık kullanılan iki anti- *H. pylori* ilaçları dünya çapında *H. pylori*'ye karşı giderek daha az etkili hale gelmektedir (Megraud 2007, Glupczynski *et al.* 2001, Gerrits *et al.* 2006, Zullo *et al.* 2007). Bakteriyel direncin gelişimi, şiddetli ve uzun süreli antibiyotik tedavisinin olumsuz etkilerinden de kaynaklanabilir ve bu da hastaların tedavi planlarına daha az uymasına neden olabilir. Bunun sonucunda başka tedavi biçimleri de ortaya çıkmıştır. Son yıllarda probiyotikler, sığırlaktoferrin ve kurkuminin kullanıldığı adjuvan tedaviler araştırılmıştır (De Bortoli *et al.* 2007, Egan *et al.* 2007).

H. pylori aşısının oluşturulmasına yönelik girişimler devam etmektedir. Sonuç olarak antibiyotik tedavi rejimlerine uyum sorunları ortadan kalkacak ve antibiyotiklere karşı direnç azalacaktır. Üreaz (Fujii *et al.* 2004), katalaz (Radcliff *et al.* 1997) ve sitotoksinler,

VacA ve *CagA* (Rossi *et al.* 2004) dahil olmak üzere aşılar için bazı potansiyel olasılıklar vardır. Ancak bu aşıların hiçbirisi etkili sonuçlar vermemiştir. DNA aşıları gibi diğer deneysel aşılama teknikleri son zamanlarda erişilebilir hale gelmiştir. Ökaryotik hücrelerde protein ekspresyonu ve antijene spesifik humoral ve hücresel yanıtların üretimi, hedef antijenleri kodlayan DNA'yı içeren ökaryotik ekspresyon vektörleriyle immünizasyonun sonuçlarıdır (Herrmann 2006).



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Malzemeler

3.1.1 Kimyasal malzemeler

Mevcut çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

No	Malzeme	CAT#	Şirket
1	Primerler	---	Alfa DNA/ABD/Kanada
2	Quick-RNA Mantar/Bakteriyel DNA MiniPrep	R2014	ZYMO/ABD
3	KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Evrensel	KK4600	KAPA/ABD
4	PrimeScript™ RT reaktif Kiti	RR037A	TaKaRa/Japonya

3.1.2 Ekipman ve cihazlar

Çalışmada kullanılan ekipman ve cihazlar Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan ekipman ve cihazlar

Sıra	Aparat	Şirket	Menşei
1	AURA TM PCR kabini	EuroClone	İtalya
2	Microspin 12, Yüksek hızlı mini santrifüj	Bio San	Almanya
3	V-1 plus, tüpler için kişisel vorteks	Digsystem	Almanya
4	Biyopet Değişkeni	Labnet	Almanya
	Hacim 0,5-10 µL		
	Cilt 2-20 µL		
	Hacim 10-100 µL		
	Hacim 100-1000 µL		
5	MultiGeneOptiMax Gradyan termal döngüleyici	Labnet	ABD
6	Mikro dönüş	Biosan	Letonya
7	Kombi-spin	Biosan	Yerli
8	RT-PCR	Sacace	İtalya

3.1.3 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun primerleri

Çalışmada kullanılan gen ekspresyonuna yönelik *16SrRNA*, *VagA*, *CagA* ve *GyrA* primer dizileri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 RT-qPCR'de *16 SrRNA*, virülans ve direnç genini amplifiye etmek için kullanılan primerler

Hedef gen	Primer dizisi (5'-3')	Ürün boyutu (bp)	Referans
<i>16SrRNA</i>	F: CTGAC GCTGATTGCCGCGAA R: TGGCTCCACTTCGCAGTATT	535	(Toledo and López-Solís 2010, Ribeiro <i>et al.</i> 2004)
<i>CagA</i>	F:GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG R:CTGCAAAAGATTGTTTGCCAGA	349	(Kalaf <i>et al.</i> 2013)
<i>VagA</i>	F: ATGGAAATACAACAAACACAC R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	286	(Kalaf <i>et al.</i> 2013)
<i>GyrA</i>	F:AGCTTATCCATGAGCGTGA R:TCAGGCCCTTTGACAAATTC	582	(Wang <i>et al.</i> 2010)

3.2 Yöntem

Çalışmada kullanılan RNA kitlerinin içerikleri Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 RNA kitlerinin içerikleri

Quick-RNA™ Mantar/Bakteriyel Miniprep	R2014 (50 hazırlık)
RNA Lizis Tamponu	50 mL
RNA Hazırlık Tamponu	25 mL
RNA Yıkama Tamponu I (konsantre)	24 mL
DNaz/RNaz İçermeyen Su	1 mL
ZR BashingBead™ Lizis Tüpleri (0,1 ve 0,5 mm)	50
Zymo-Spin™ IIIGC Sütunları	50
Zymo-Spin™ IICR Sütunları	50
Toplama Tüpleri	100

3.2.1 RNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması

Protokol, (I) Tampon Hazırlığı ve (II) Toplam RNA olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır;

(I) Tampon Hazırlığı

24 mL RNA Yıkama Tamponuna 96 mL %100 etanol (104 mL %95 etanol) eklenerek hazırlanmıştır.

(II) Toplam RNA Saflaştırması

Belirtilmediği sürece tüm adımları oda sıcaklığında gerçekleştirilir ve 10,000-16,000 xg'de 30 saniye boyunca santrifüjlenir.

- Taze veya dondurulmuş hücre peletini 1 800 µL RNA Lizis Tamponunda yeniden süspansiyon edilir ve karışım bir ZR BasingBead Lizis Tüpüne (0,1 ve 0,5 mm) aktarılır.
- Tüpü, 2 mL'lik bir tüp tutma düzeneği ve işlemi ile donatılmış bir boncuk çırpıcıya sabitlenir.
- Kalıntıyı peletlemek için tüp 1 dakika boyunca santrifüjlenir.
- Temizlenmiş süpernatant 400 µL'ye kadar bir Toplama Tüpü içindeki Zymo-Spin™ IIICG Kolonu'na aktarılır ve santrifüjlenir.
- Akışa eşit hacimde etanol (%95-100) (1:1) eklenir ve iyice karıştırılır.
- Karışım bir Toplama Tüpündeki Zymo-Spin™ IICR Kolonu 'na aktarılır ve santrifüjlenir.
- Kolona 400 µL RNA Prep Buffer eklenir ve santrifüjlenir. Akış yoluyla atılır.
- Kolona 700 µL RNA Yıkama Tamponu ekleyin ve santrifüjleyin. Akış yoluyla atılır.
- 400 µL RNA Yıkama Tamponu eklenir ve yıkama tamponunun tamamen çıkarıldığından emin olmak için kolon 1 dakika boyunca santrifüjlenir. Daha sonra kolonu dikkatlice nükleaz içermeyen bir tüpe (ürünle birlikte verilmez) aktarılır.
- Doğrudan kolon matrisine 50 µL DNaz/RNazsız Su eklenir ve santrifüjlenir.
- Alternatif olarak yüksek konsantrasyonlu RNA için ≥ 25 µL elüsyon kullanılır.
- Elde edilen RNA hemen kullanılabilir veya dondurularak saklanabilir.

3.2.2 RNA'nın cDNA'ya dönüşümü

PrimeScript™ RT reaktif Kiti, gerçek zamanlı RT-PCR için optimize edilmiş ters transkripsiyonu gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Rtase, PrimeScript™'i kullanır mükemmel genişletilebilirlik özelliğine sahip olan ve Gerçek Zamanlı PCR için hızlı, verimli cDNA şablonu sentezini mümkün kılar. Adım deneysel prosedür basit ve yüksek verimli analizler için uygundur. Bu kit, Real Time PCR reaktifi SYBR® Premix ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

3.2.2.1 Kit bileşenleri

- PrimeScript™ RT Enzim Karışımı I 100 µL
- RNazsız dH₂O 1 mL
- EASY Seyreltme Tamponu (Gerçek Zamanlı PCR için) *2 1 mL

3.2.2.2 Reaktifler ve cihazlar

- Termal döngüleyici (veya 37°C, 42°C Su banyosu, 85°C ısı bloğu)
- 0,2 mL ve 1,5 mL mikro tüp (ters transkripsiyon için)
- Mikropipetler ve pipet uçları (otoklavlanmış)

3.2.2.3 Prensip

- Gerçek zamanlı PCR için cDNA şablonlarının hızlı ve verimli sentezini mümkün kılar. Bu kit, iki adımlı gerçek zamanlı RT-PCR için en uygundur.
- Kit, ters transkripsiyon primerleri olarak kullanılmak üzere Random 6 mers ve Oligo dT Primer içerir. Reaksiyon bu iki primerin karışımı kullanılarak gerçekleştirilebilir veya primer deneyin amacına göre seçilebilir. Ayrıca, Gene Spesifik Primerler spesifik gen tespiti için kullanılabilir.
- Gerçek zamanlı RT-PCR'nin miktarının belirlenmesi için standart bir eğri oluşturulmalıdır. Uygulanabilir bir standart eğri için düşük konsantrasyonlar gerekli

olduğundan, ters transkripsiyondan sonra toplam RNA veya cDNA'nın seyreltilmesi gereklidir. Ancak su veya TE ile seyreltme, düşük konsantrasyonlarda kararsız seyreltme nedeniyle eğrinin aralığını daraltabilir. Seyreltme için EASY Dilüsyon Solüsyonunun (Gerçek zamanlı PCR için) kullanılması, sonuçların daha düşük konsantrasyonlarda doğru olmasını sağlar ve geniş aralıkta standart bir eğri oluşturulmasını kolaylaştırır.

3.2.2.4 Test prosedürü

Aşağıdaki reaksiyon karışımını buz üzerinde hazırlanır. Pipetleme kayıplarını telafi etmek için gerekenden biraz daha fazla miktarda ana karışım hazırlanmalıdır. Bu karışımın kısımlarını mikro tüplere dağıttıktan sonra, Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi RNA örneğini eklenir.

Çizelge 3.5 Toplam RNA'dan cDNA sentezinin bileşeni

Reaktifler	Birimler
5 × PrimeScript™ karışımı	2 µL
Toplam RNA	8 µL
RNaz içermeyen dH ₂ O	----
Toplam hacim	10 µL

Reaksiyon karışımını aşağıdaki koşullar altında inkübe edilir.

- 37°C, 15 dakika (Ters transkripsiyon)
- 85°C, 5 saniye (Ters transkriptazın ısıl işleme etkisizleştirilmesi)

3.2.3 Genlerin RT-qPCR ile amplifikasyonu

3.2.3.1 Ürün açıklaması

KAPA SYBR FAST RT-qPCR Master Mix (2X), yüksek performanslı gerçek zamanlı PCR için tasarlanmıştır. Kit, moleküler evrim süreciyle geliştirilen ve SYBR Green I boya

kimyası kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) için özel olarak tasarlanmış benzersiz bir enzimle sonuçlanan yeni bir DNA polimeraz içerir. KAPA SYBR FAST DNA Polimeraz, sıkı RT-qPCR reaksiyon koşullarında optimum performans gösterecek şekilde tasarlanmış ve sinyal-gürültü oranı (floresan), nicelik döngüsü (Cq), doğrusallık ve hassasiyette çarpıcı gelişmeler sergilemiştir. KAPA SYBR FAST DNA Polimeraz ve tescilli tampon sistemi hem GC hem de ATrich şablonları dahil olmak üzere zor hedeflerin amplifikasyon verimliliğini artırır.

KAPA SYBR FAST RT-qPCR Master Mix (2X) Kitleri, RT-qPCR'de DNA'nın amplifikasyonu ve tespiti için tüm bileşenleri (primerler ve şablon hariç) içeren, kullanıma hazır bir karışımdır. KAPA SYBR FAST RT-qPCR Kiti, bütünleşmiş antikor aracılı sıcak başlatma, SYBR Green I floresan boya, MgCl₂, dNTP'ler ve stabilizatörlerle birlikte 2X ana karışım olarak sağlanır.

3.2.3.2 Protokol

Standart döngü koşulları kullanılarak verimli bir şekilde gerçekleştirilen mevcut herhangi bir RT-qPCR testi, KAPA SYBR FAST RT-qPCR Kitleri ile hızlı bir RT-qPCR testine dönüştürülebilir. Tipik olarak reaksiyon parametrelerinin minimum düzeyde yeniden optimizasyonu gerekir.

3.2.3.3 Ana karışımın hazırlanması

- Tüm reaksiyon bileşenlerinin uygun şekilde çözüldüğünden ve karıştırıldığından emin olunmalıdır (Çizelge 3.7).
- Gerçekleştirilecek reaksiyonların tümü veya bir alt kümesi için ortak olan tüm reaksiyon bileşenlerinin uygun hacmini içeren bir ana karışım hazırlanır.
- Reaksiyon bileşenlerinin kontaminasyonunun tespit edilmesini sağlamak için her zaman Şablonsuz Kontrol (NTC) eklenir.
- Her bir bileşenin gerekli hacmini Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Genlerin amplifikasyonu için RT-qPCR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	20 µL (Son hacim)	Nihai konsantrasyon
KAPA SYBR FAST RT-qPCR Master Mix (2X) Evrensel	10 µL	2 x
İleri primer	1 µL	0,2 µM
Ters primer	1 µL	0,2 µM
Nükleaz içermeyen su	3	--
Şablon DNA Numune Hacmi	5	1pg-100ng

Çizelge 3.7 Genlerin amplifikasyonu için RT-qPCR reaksiyon koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95 °C	5 dakika	Tutmak
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	* 40
Tavlama	51°C	30 saniye	
Eklenti	72°C	30 saniye	
	90°C	15 saniye	* 100

3.2.4 DNA dizilimi

Primerleri (R+F) olan *16srRNA* geninin DNA örnekleri, şirket MacroGen Inc, (Güney Kore Geumchen Seul) ve sonuçlar yazılıma göre analiz edilmiştir. DNASTAR lazer geni EditSeq, Nitrojen bazların sırası ve sayısı için NCBI web sitesinde mevcuttur.

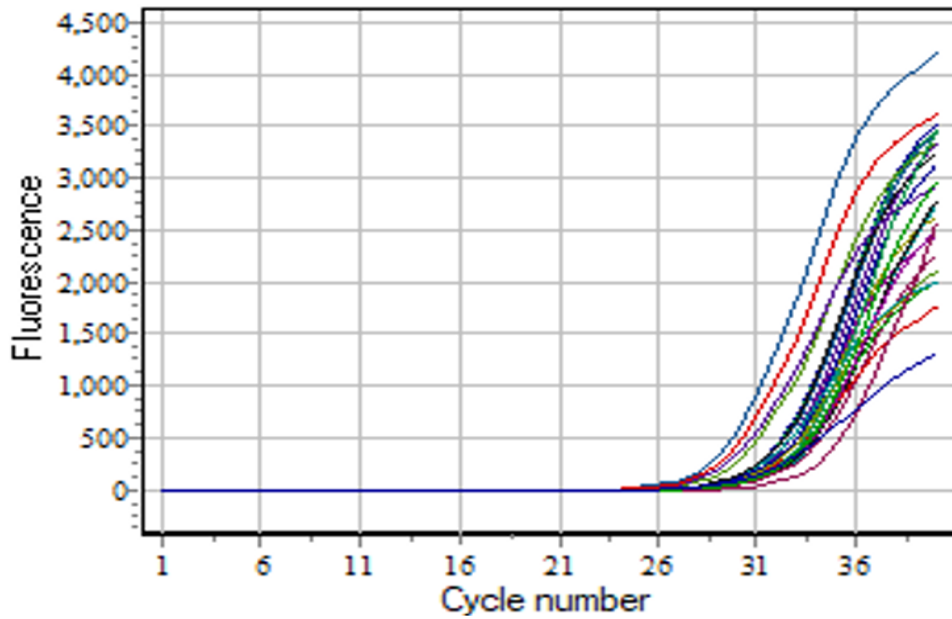
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Moleküler Çalışma: *VagA*, *CagA* ve *GyrA* Genlerinin Gen İfadesi

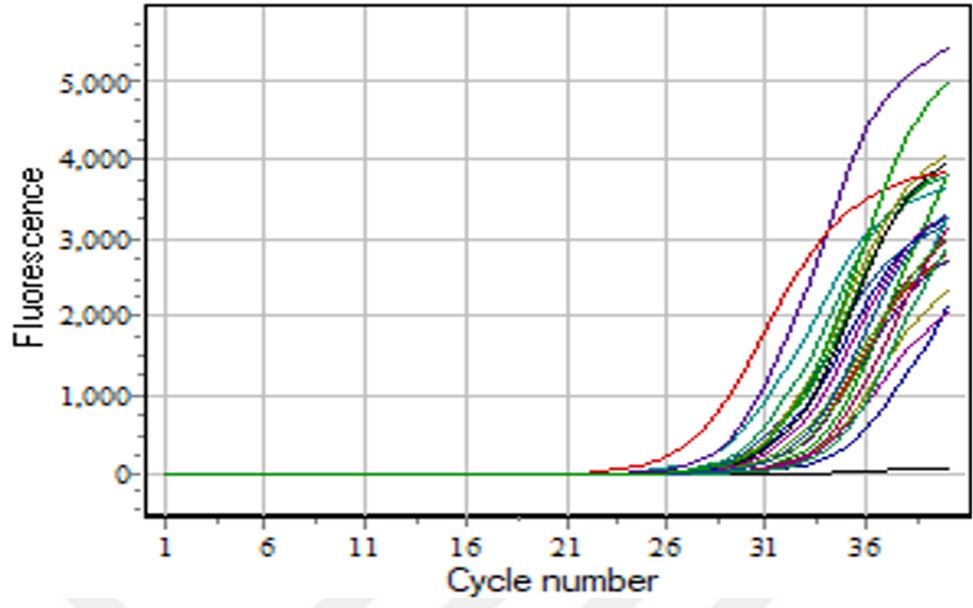
Toplanan gastrik biyopsi örneklerinden çıkarılan total RNA'nın sonucu, *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için Gerçek Zamanlı PCR (RT- qPCR) ile gen ekspresyon seviyesi analizi için cDNA'ya dönüştürülmüştür.

4.2 Gerçek Zamanlı PCR Analizi (RT-qPCR)

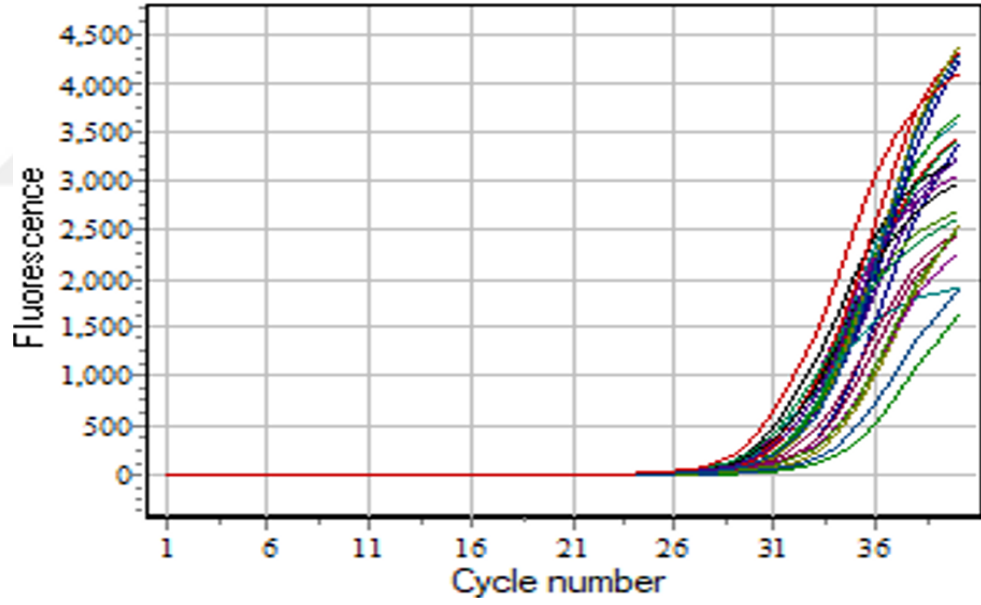
Total RNA tüm gastrik biyopsi örneklerinden başarıyla ekstrakte edilmiş ve total RNA konsantrasyonu 78 ile 199 ng/μL arasında değişmiştir. Ek olarak, 260/A280 oranı toplam RNA'nın 1,9 ile 2 saflığı arasında değişmektedir. Ters Transkripsiyon-PCR tekniği kullanılarak RNA'dan tersine çevrilen cDNA'nın sonuçları, (16SrRNA) ile karşılaştırıldığında *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için farklı seviyelerde Ct-değeri üreten gastrik biyopsi örnekleri için Ct-değeri üzerindeki amplifikasyon belgelenmiştir (Şekil 4.1) (Şekil 4.2) (Şekil 4.3) (Şekil 4.4).



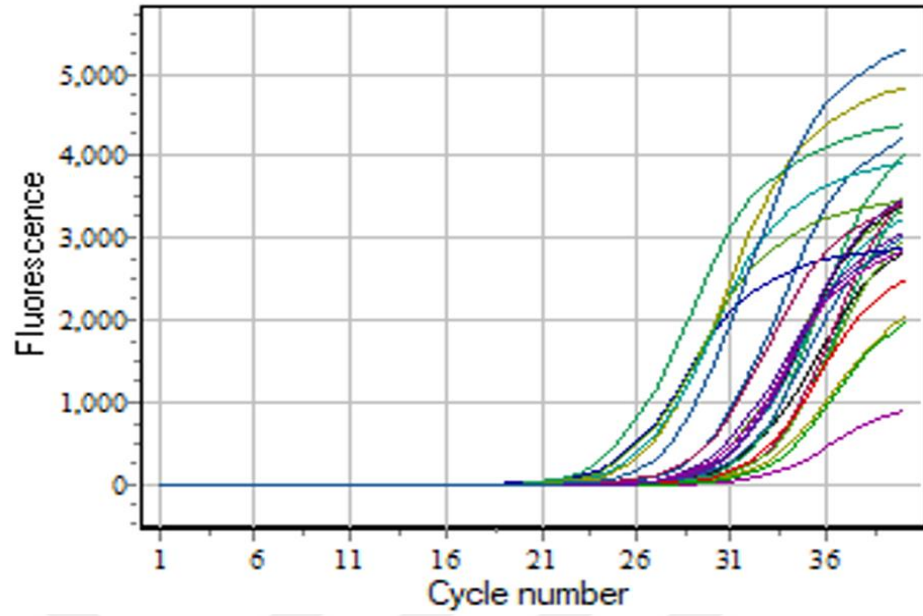
Şekil 4.1 *H. pylori*'nin 16srRNA geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.2 *H. pylori*'nin *CagA* geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.3 *H. pylori*'nin *VagA* geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.4 *H. pylori*'nin *GyrA* geninin RT-qPCR ile tespiti için amplifikasyon eğrileri

VagA, *CagA* ve *GyrA* genleri için gen ifadesi RT-qPCR ile analiz edilmiş ve Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi gen ifadesi seviyesinin farklı aşamalarında kantifikasyon ve karşılaştırma için referans gen *16SrRNA* kullanılmıştır. Düşük Ct-değeri, hedef genin daha yüksek kopyalarının varlığını göstermektedir ve bunun tersi de geçerlidir. Gen ifadesi açısından, yüksek Ct-değeri düşük gen ifadesini, düşük Ct-değeri ise yüksek gen ifadesini gösterir (Nolan *et al.* 2006, Livak and Schmittgen 2008).

Çizelge 4.1 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için farklı aşamalardaki (Ct değeri ve ΔCt) gen ekspresyon hesaplama seviyeleri

No	16sRNA	VagA	CagA	GyrA	ΔCt VagA	ΔCt CagA	ΔCt GyrA
1	31,3	30,7	33,2	29,5	-0,6	1,9	-1,8
2	32	34,2	34,4	32,5	2,2	2,4	0,5
3	32,7	32,7	33,3	28,8	0	0,6	-3,9
4	31,5	33,2	28,5	28,6	1,7	-3,2	-2,9
5	32,6	30,4	30,8	32,1	-2,2	-1,8	-0,5
6	33,1	29,8	32,2	29,8	-3,3	-0,9	-3,3
7	31,3	29,7	32,2	32,7	-1,6	0,9	1,4
8	31,4	32,4	31,3	30,5	1	-0,1	-0,9
9	31,6	30,3	29,4	32,5	-1,3	-2,2	0,9
10	31,4	31,2	32,2	32,3	-0,2	0,8	0,9
11	31,3	31,2	29,6	31,6	-0,1	-1,7	0,3
12	32	33,4	32,1	30,5	1,4	0,1	-1,5
13	32,3	30,7	30,4	31,2	-1,6	-1,9	-1,1
14	31,6	32	29,9	31,4	0,4	-1,7	-0,2

Çizelge 4.1 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için farklı aşamalardaki (Ct değeri ve Δ Ct) gen ekspresyon hesaplama seviyeleri (Devam)

No	16sRNA	<i>VagA</i>	<i>CagA</i>	<i>GyrA</i>	Δ Ct <i>VagA</i>	Δ Ct <i>CagA</i>	Δ Ct <i>GyrA</i>
15	31	31,8	30,5	32,8	0,8	-0,7	1,8
16	32,7	32,2	33,2	24,9	-0,5	0,5	-7,8
17	31,7	28,7	32,7	25,7	-3	1	-6
18	34,2	32,8	31,7	25,3	-1,4	-2,5	-8,9
19	29,5	30,8	33,2	30,2	1,3	3,7	0,7
20	32,5	32,1	31,7	30,4	-0,4	-0,8	-2,1
21	28,8	33,2	34,2	29,1	4,4	5,4	0,3
22	28,6	29,9	28,7	24,5	1,3	0,1	-4,1
23	28,7	31,3	32,2	23,7	2,6	3,5	-5
24	32,6	32,7	26,3	30,5	0,1	-6,3	-2,1
25	30,5	29,4	30,6	26,7	-1,1	0,1	-3,8

Mide biyopsi örnekleri için *VagA*, *CagA* ve *GyrA* gen ekspresyon seviyeleri için kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) sonuçları Çizelge 4.2'de açıklanmıştır. *VagA* geni için kat değişikliği sonucu 1,9113 iken, *VagA* gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu göstermektedir. Öte yandan, *CagA* geni için kat değişimi sonucu 4,6144 olup gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu göstermektedir. Bu çalışmada, *H. pylori* *cagA* için spesifik primerlerle yapılan RT-PCR'nin *cagA*-pozitif suşlarla enfeksiyonu tanımlamak için hassas ve doğru bir teknik olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç önceki çalışmaların sonuçlarıyla tutarlıdır (Thompson *et al.* 2003). *cagA* geninin gen ekspresyon seviyesi Log-Stat anahtarında artmaya başlamış ve örneklenen tüm gelişim dönemi boyunca artmaya devam etmiştir. *CagA* proteini, tip IV sekresyon aparatını kodlayan ve *H. pylori*'deki en önemli virülans faktörlerinden biri olarak kabul edilen *cag* PAI'nin ana efektör molekülüdür (Backert *et al.* 2000, Censini *et al.* 1996). Dolayısıyla bu sonuç, bu çalışmadaki mikroarray verilerinin, *cagA* gibi *H. pylori*'nin bilinen virülans faktörlerinin çoğunun, büyümenin geç log veya durağan fazında en yüksek ifade seviyelerini sergilediğini ortaya koyan önceki çalışmalarla tutarlıdır (Thompson *et al.* 2003). Bugüne kadar, bu virülans faktörlerinin koordineli transkripsiyonel ekspresyonu ve bunun enfeksiyon ve patojenite ile nasıl ilişkili olabileceği hakkında çok az şey bilinmektedir. Peek *et al.* (1995), *H. pylori* *cagA* için spesifik primerlerle RT-qPCR'nin *cagA*-pozitif suşlarla enfeksiyonu tanımlamak için hassas ve doğru bir teknik olduğunu göstermiştir. Hayvan ve hücre kültürü modellerinde yapılan birçok yeni çalışma, *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkili insan mide kanserinde *CagA* ve EPIYA gibi *Cag*-PAI'nin olası rolünü ifade

etmektedir (Sukri *et al.* 2020). Bir *H. pylori* karsinojen-proteini olarak *CagA* proteini, gastrik epitel hücrelerinin sinyal yollarında etkileşimlere neden olarak gastrik epitel hücrelerinin çoğalmasına neden olur (Alzahrani *et al.* 2014). Genel olarak, sonuçlar *VagA*, *CagA* ve *GyrA* için gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu göstermiştir, ($P=0,618$). Sonuçlar genler arasında anlamlı bir fark olmadığını belirtmektedir. Çalışmamızda, *H. pylori* 16SrRNA için spesifik primerlerle mide biyopsi örneklerinde RT-qPCR'nin duyarlılığı hastalarda %100'dür, bu çalışmanın bu sonucu, 16SrRNA primerleri ile mide biyopsi örneklerinde RT-qPCR'nin *H. pylori*'nin tespiti için hassas bir yöntem olduğunu ilk kez gösteren Engstrand *et al.* (1992) çalışması ile tutarlıdır. Bu gözlemi doğrulamışlar ve in vitro kültürlerden 2 CFU/mL kadar az bir miktarın tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Bu yüksek hassasiyet derecesinin muhtemel açıklaması, her bir bakteri hücresinde bulunan çok sayıda 16SrRNA şablon molekülüdür (Bukanov and Berg 1994). Farklı 16SrRNA ekspresyon seviyeleri, farklı endojen 16SrRNA gen ekspresyonundan veya farklı çevresel koşullardan kaynaklanabilir. Kalaf *et al.* (2013), 16SrRNA ve *CagA* geni yüzdelерinin sırasıyla %91,17 ve %39,21 olduğunu bulmuştur. Peptik ülser hastalığı vakalarının 5/5'inde (%100) *cagA* ve *vacA* s1a alelinin varlığı, bu virölans faktörleri ile peptik ülser gelişimi arasında bir ilişki olduğunu gösteren önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumludur (Covacci *et al.* 1993, Cover *et al.* 1990, Rudi *et al.* 1998, Sugimoto *et al.* 2009, Matsunari *et al.* 2012, Khan *et al.* 2012, Watada *et al.* 2011). Hücre içi *H. pylori* de *cagA* eksprese eder ve in vitro olarak gerçekleştiği gösterilen hücresel metabolik dönüşümü in vivo olarak üretmesi muhtemeldir (Stein *et al.* 2000). Bununla birlikte, Tummuru *et al.* (1994) yakın zamanda *cagA* geninin *cagA* ekspresyonunu bozan izojenik mutasyonlarının sitotoksin ekspresyonunu etkilemediği keşfedilmiştir ve Xiang *et al.* (1995) ayrıca *CagA* ve *VagA* proteinlerinin birlikte basılmadığı klinik izolatların bazı fenotipik varyantları olduğunu bulmuştur, bu da *CagA* gen ekspresyonunun fonksiyonel sitotoksisite için gerekli olmadığını düşündürmektedir. El Khadir *et al.* (2017) Fas'ta *vacA* tespit oranını %99 olarak bulmuşlardır. Ayrıca, *GyrA* geninin kat değişimi sonucu 4,3664 iken, *GyrA* gen ekspresyon seviyesinin yukarı regülasyonunu göstermektedir. Bir rapor, *gyrA*'nın farklı deneysel koşullar altında en kararlı genler arasında tanımlandığını ve 22 saatlik bir süre boyunca alfa toksin gen ifadesinin normalizasyonu için bir dizi referans gen olarak test edildiğini göstermiştir (Williams and Ghanem 2022). Gerçek zamanlı PCR için geleneksel PCR'a göre daha iyi

hassasiyete sahip olmasına ve bu da onu kullanım için daha üstün hale getirmesine rağmen, istatistiksel anlamlılık hala sınırlıdır. Gerçek zamanlı PCR daha hızlıdır ve geleneksel PCR arasında gözlemlenen birçok avantaj sağlar. Düşük bakteri yüklerinin tespit edilmesinin yanı sıra dirençli genlerin ve klaritromisin, florokinolonlar ve diğer antimikrobiyal direnç aracı edinen spesifik nokta mutasyonlarının tanımlanmasına olanak sağlar (Atkinson and Braden 2016).

Çizelge 4.2 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ evresindeki gen ekspresyon hesaplama düzeyleri

Gen	Ortalama	Sayı	Std. Sapma	Std. Ortalama Hatası
<i>VagA</i>	1,9113	25	2,39526	0,47905
<i>CagA</i>	4,6144	25	14,36732	2,87346
<i>GyrA</i>	4,3664	25	11,55503	2,31101
P değeri	0,618			

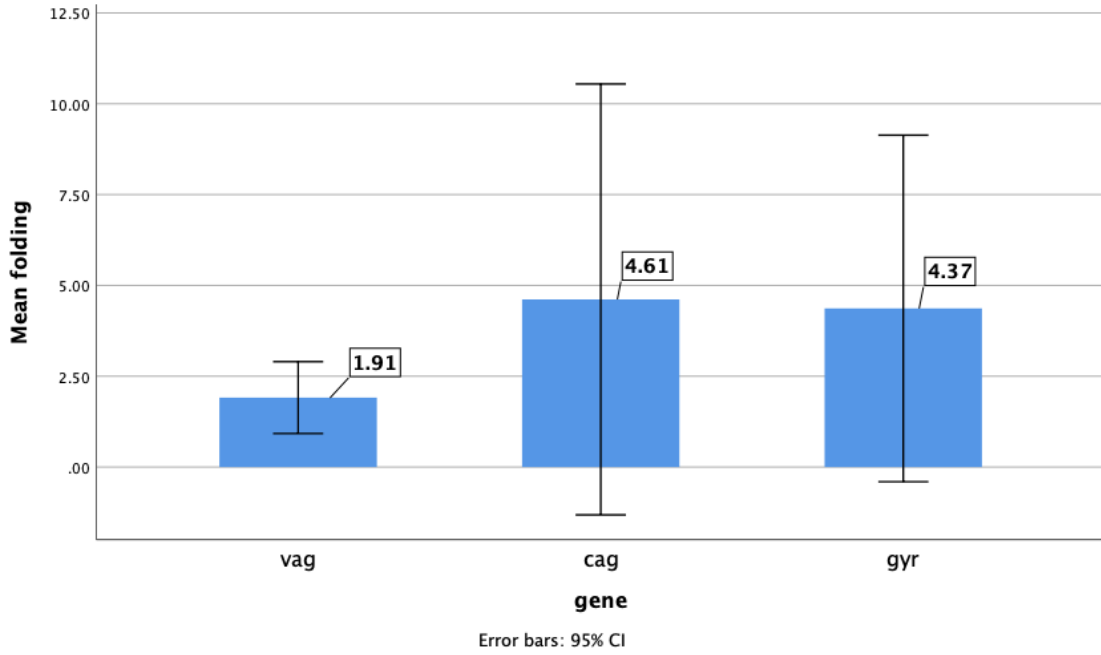
4.3 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* Genleri için Gen İfade Düzeyleri Arasındaki Fark

Bu çalışmada, *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için gen ifadesi (kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)) arasındaki farkın belirlenmesi için Tukey testini kullanılmıştır (Çizelge 4.3) (Şekil 4.5). *VagA* gen ifadesi ile *CagA* gen ifadesi arasındaki fark=0,648. Buna karşılık, *VagA* gen ifadesi ile *GyrA* gen ifadesi arasındaki fark=0,699. *CagA* gen ifadesi ile *GyrA* gen ifadesi arasındaki fark=0,996 olarak tespit edilmiştir. *H. pylori*'yi tespit etmek için yüksek hassasiyet ve özgüllük gösteren moleküler tekniklere dayalı çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Valdez-Gonzalez *et al.* 2014). Teresa *et al.* (2019), Meksika'nın Esquipulas kentindeki hastalarda diş plağında RT-qPCR kullanarak *16srRNA* genini ve *cagA* ve *vacA* virülans genlerini çoğaltarak *H. pylori*'nin varlığını ve dolaşımdaki genotipini tespit etmenin mümkün olduğunu doğrulamıştır, çünkü bu, duyarlılık, özgüllük, düşük maliyet ve kolay işleme açısından tatmin edici sonuçlar gösteren bir teknik olmuştur. Ancak daha fazla sayıda örneklerle tamamlayıcı çalışmalar daha güçlü veriler sağlayacaktır ve bazı *H. pylori* suşları, enfekte hastalarda gastrointestinal hastalığın şiddetini doğrudan etkilemektedir. *CagA*-pozitif *H. pylori* suşları ile enfekte olan bireylerde peptik ülser ve mide kanseri gelişme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Chiarini *et al.* 2009). Florokinolon dirençli *H. pylori* suşları arasında Asn87Lys kodonundaki *GyrA* mutasyonlarının yüksek

sıklığına göre belirtilen bir çalışmada (Dorafshan *et al.* 2013), bakteri kültürü ve minimum inhibitör konsantrasyon tayini olmadan bu mutasyonları tespit etmek için güvenilir bir PCR tabanlı teknik geliştirmişlerdir, Çalışmalarının sonuçları, hedeflenen mutasyonların tespitinde tasarlanan primerlerin özgüllüğünü başarıyla doğrulamıştır.

Çizelge 4.3 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için gen ifade düzeyleri arasındaki fark

Gen		İki grup arasındaki ortalama fark	Std. Hata	Önem	%95 Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst Sınır
<i>Vag</i>	<i>Cag</i>	-2,70309	3,03612	0,648	-9,9689	4,5627
	<i>Gyr</i>	-2,45508	3,03612	0,699	-9,7209	4,8107
<i>Cag</i>	<i>Vag</i>	2,70309	3,03612	0,648	-4,5627	9,9689
	<i>Gyr</i>	0,24802	3,03612	0,996	-7,0178	7,5138
<i>Gyr</i>	<i>Vag</i>	2,45508	3,03612	0,699	-4,8107	9,7209
	<i>Cag</i>	-0,24802	3,03612	0,996	-7,5138	7,0178



Şekil 4.5 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için katlanmanın diferansiyel gen ekspresyon seviyesinin dağılımı

4.4 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* Genlerine İlişkin Gen İfade Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

Bu çalışmada, *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için gen ifadesi (kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)) arasındaki çoklu parametreleri karşılaştırmak için Korelasyon Katsayısı kullanılmıştır (Çizelge 4.4). *VagA* gen ifadesinin sonucu *CagA* gen ifadesi ile negatif korelasyon göstermiştir ($r=-0,078$). Buna karşılık, *GyrA* gen ifadesi ile pozitif bir korelasyon göstermektedir ($r=+0,098$). Diğer taraftan, *CagA* gen ifadesinin sonucu *GyrA* gen ifadesi ile negatif bir korelasyon göstermektedir ($r=-0,027$).

Çizelge 4.4 *VagA*, *CagA* ve *GyrA* genleri için gen ifade düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı

Gen	Parametre	<i>VagA</i>	<i>CagA</i>	<i>GyrA</i>
<i>VagA</i>	Pearson Korelasyonu	1	-0,078	0,098
	Önem (2 kuyruklu)		0,711	0,64
	Sayı	25	25	25
<i>CagA</i>	Pearson Korelasyonu			-0,027
	Önem (2 kuyruklu)			0,899
	Sayı			25
<i>GyrA</i>	Pearson Korelasyonu			
	Önem (2 kuyruklu)			
	Sayı			

Akeel *et al.* (2019), *cagA* pozitif suşlar ile *s1a1bm2* ve *s1a1b* gibi en virülans *VagA* alt tipleri arasında korelasyon bulmuştur. Alaoui Boukhris *et al.* (2013) ise *VagA* *s1 m1* ile bağırsak metaplazisi arasında anlamlı bir ilişki bulmuştur. Ayrıca, Matsunari *et al.* (2016) *CagA* suşlarının *VagA* *s1* ile birlikteliğinin atrofik gastrit ve mide kanseri riskini artırdığını bulmuştur. Ancak, Hussein *et al.* (2009) Iraklı hastalarda *H. pylori* virülans genleri (*VagA* ve *CagA*) ile histopatolojik değişiklikler arasında bir korelasyon olmadığını ortaya koymuştur. Bukanov and Berg (1994) biyolojik bir ilişki öne sürülmesine rağmen endoskopik tanı ile *CagA*, *VacA*, *IceA* ve *BabA2* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit etmemiştir. Kübalı hastalar üzerinde yapılan önceki bir çalışmada, incelenen *H. pylori* suşlarının %61,6'sında *VacA* geni tespit edilmiş ve bunun suşların çoğunda ana virülans gen olduğu düşünülmüştür (Feliciano *et al.* 2015). Cezayir'de yapılan bir başka çalışmada hastaların %58'inde *CagA* geni tespit edilmiştir (Bachir *et al.*

2018). Diğer ülkelerdeki oranlar şu şekildedir: Pakistan'da %24,2 (Ahmad *et al.* 2009) ve Japonya'da %90 (Ito *et al.* 1997). Aradaki bu farklılıkların o ülkedeki mide kanseri prevalansının artmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. *H. pylori*'nin yüksek derecede coğrafi değişkenliği nedeniyle, bazı *H. pylori* genotipleri muhtemelen bazı ülkelerde ciddi klinik sonuçlarla ilişkilendirilirken, diğer bölgelerde daha az zararlı veya hatta zararsız varyantlar olarak ortaya çıkmaktadır. *H. pylori* virölans genlerine ilişkin farklı çalışmalarda gözlemlenen farklılıklar, tesislerdeki farklılıklara veya PCR yöntemlerinin sınırlamalarına bağlanabilir.

Epitelde *VacA*, *CagA* gibi bakteriyel virölans faktörlerinin varlığı, *H. pylori* kolonizasyonunu ve ilişkili hastalıklara duyarlılığı artıracaktır (Dunne *et al.* 2014). Paniagua *et al.* (2009) Meksika'da *H. pylori* pozitif (%60,1) kronik gastritli hastaların %40'ının *VacAs1m1* genotipine sahip olduğunu ve %52'sinin *CagA*+ olduğunu bildirmişlerdir. Cavalcante *et al.* (2012) kronik gastritli hastalarda s1 ve m1 allelotiplerinin sırasıyla %72,4 ve %51,3 ile en sık görüldüğünü ve %73,7'sinin *H. pylori* *CagA*+ olduğunu bulmuştur. Torres *et al.* (2009), fonksiyonel dispepsili Kübalı hastalarda *VacAs1m1* genotipi için %54,9 ve *CagA*+ genotipi için %70,6 sıklık tespit etmiştir.

4.5 DNA dizileme

Genomik DNA, *16SrRNA* teşhis genine özgü primerler için analiz edilmiştir. 20 mikrogram / mikrolitre çoğaltılmış DNA (PCR ürünü) alındıktan sonra, Amerikan Gen Bankası Biyoteknoloji Merkezi Ulusal Bilgi (NCBI) küresel web sitesinde bulunan EditSeq lasergene DNASTAR programındaki sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, evrensel sitede (NCBI) mevcut olduğu gibi % 100 *H. pylori* bakterisine bağlı olduğu tespit edilmiştir.. Bu yöntem, patojenik bakterilerin kimliğinin belirlenmesinde en yeni ve en önemli yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. *16SrRNA* geninin başlatıcısı GenBank International web sitesinde Amerikan (NCBI) OP810348 dizisi içinde kaydedilmiştir.

Bu yöntem aynı zamanda Azot geninin baz dizilerinin tanımlanması yoluyla direnç genlerinde ve diğer genlerde Genetik mutasyonların oluşumunu da tespit etmektedir (Srinivasan *et al.* 2015).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

16SrRNA primerleri kullanılarak mide biyopsisi örnekleri üzerinde RT-qPCR testi, *Helicobacter pylori*'nin tespitinde önemli yöntemdir. *H. pylori* CagA'ya, VagA'ya ve GyrA'ya özgü primerlerle RT-qPCR, artan gen ekspresyonu nedeniyle cagA pozitif suşlarla, VagA pozitif suşlarla ve GyrA pozitif suşlarla enfeksiyonu belirlemek için kullanılabilecek doğruluğu yüksek bir tekniktir. Elde edilen sonuçlar genler arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p \leq 0,05$).

VagA gen ifadesi ile CagA gen ifadesi arasındaki fark=0,648. Buna karşılık VagA gen ifadesi ile GyrA gen ifadesi arasındaki fark=0,699. Öte yandan CagA gen ifadesi ile GyrA gen ifadesi arasındaki fark=0,996 olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca VagA gen ekspresyonu sonucu CagA gen ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterirken ($r=-0,078$), GyrA gen ekspresyonu ile pozitif korelasyon ($r=+0,098$) göstermiştir. Bunlara ek olarak CagA gen ekspresyonu sonucu ile GyrA gen ekspresyonu arasında negatif korelasyon belirlenmiştir ($r=-0,027$).

Bu bilgiler doğrultusunda, Adhesinler, Flagella ve Fosfolipaz gibi diğer virülans faktörleri üzerine kapsamlı bir çalışma yapılması, Antibiyotiğe direnç genleri belirlenerek, antibiyotiklerin gastrointestinal enfeksiyonlarından izole edilen *Helicobacter pylori*'nin artan direncinin nedenlerini keşfetmeye yönelik çeşitli çalışmaların yapılması, Tedaviye dirençli bakteri türlerinin oluşumunu durdurmak için reçetesiz antibiyotik kullanmanın tehlikeleri konusunda halkın eğitilmesi, RFLP-PCR teknolojisi kullanılarak *Helicobacter pylori*'ye ilişkin ileri genotipleme çalışmalarının yürütülmesi, Bakterilerin yayılmasını önlemek için bitki özleri veya nanopartiküllerin kullanılması ve yerel araştırmaların bulunmaması nedeniyle çocuklarda *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun ergenlik döneminde neden olduğu mide ve bağırsak hastalıklarının ortaya çıkmasını önlemek için çocukluk döneminde bu bakteri ile enfeksiyonun tedavi edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, T., Sohail, K., Rizwan, M., Mukhtar, M., Bilal, R. and Khanum, A. 2009. Prevalence of *Helicobacter pylori* pathogenicity-associated *cagA* and *vacA* genotypes among Pakistani dyspeptic patients. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55(1): 34-38.
- Akeel, M., Shehata, A., Elhafey, A., Elmakki, E., Aboshouk, T., Ageely, H. and Mahfouz, M. 2019. *Helicobacter pylori vacA, cagA and iceA* genotypes in dyspeptic patients from southwestern region, Saudi Arabia: distribution and association with clinical outcomes and histopathological changes. *BMC Gastroenterology*, 19(1): 1-11.
- Alaoui Boukhris, S., Amarti, A., El Rhazi, K., El Khadir, M., Benajah, D. A., Ibrahimi, S. A. and Bennani, B. 2013. *Helicobacter pylori* genotypes associated with gastric histo-pathological damages in a Moroccan population. *PLoS One*, 8(12): 82646.
- Allaker, R. P., Young, K. A., Hardie, J. M., Domizio, P. and Meadows, N. J. 2002. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *Journal of Medical Microbiology*, 51(4): 312-317.
- Al-Segar, R. K. 2007. Pathogenic and molecular study on *Helicobacter pylori* isolated from patients of gastric and duodenal ulcers. PhD. Thesis, Al-Mustansiriyah University, 139 page, Baghdad.
- Alzahrani, S., Lina, T. T., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E. J. and Reyes, V. E. 2014. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology*, 20(36): 12767.
- Amundsen, S. K., Fero, J., Hansen, L. M., Cromie, G. A., Solnick, J. V., Smith, G. R. and Salama, N. R. 2008. *Helicobacter pylori* AddAB helicase-nuclease and RecA promote recombination-related DNA repair and survival during stomach colonization. *Molecular Microbiology*, 69(4): 994-1007.
- Argent, R. H., Kidd, M., Owen, R. J., Thomas, R. J., Limb, M. C. and Atherton, J. C. 2004. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 127(2): 514-523.
- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Tummuru, M. K., Blaser, M. J. and Cover, T. L. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*:

- association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30): 17771-17777.
- Atkinson, N. S. and Braden, B. 2016. *Helicobacter pylori* infection: diagnostic strategies in primary diagnosis and after therapy. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(7): 19-24.
- Bachir, M., Allem, R., Tifrit, A., Medjekane, M., Drici, A. E. M., Diaf, M. and Doudi, K. T. 2018. Primary antibiotic resistance and its relationship with *cagA* and *vacA* genes in *Helicobacter pylori* isolates from Algerian patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2): 544-551.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P. R. and Meyer, T. F. 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cellular Microbiology*, 2(2): 155-164.
- Baldwin, D. N., Shepherd, B., Kraemer, P., Hall, M. K., Sycuro, L. K., Pinto-Santini, D. M. and Salama, N. R. 2007. Identification of *Helicobacter pylori* genes that contribute to stomach colonization. *Infection and Immunity*, 75(2): 1005-1016.
- Bamford, J. T., Tilden, R. L., Blankush, J. L. and Gangeness, D. E. 1999. Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on rosacea. *Archives of Dermatology*, 135(6): 659-663.
- Björkholm, B., Lundin, A., Sillén, A., Guillemin, K., Salama, N., Rubio, C. and Engstrand, L. 2001b. Comparison of genetic divergence and fitness between two subclones of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 69(12): 7832-7838.
- Björkholm, B., Sjölund, M., Falk, P. G., Berg, O. G., Engstrand, L. and Andersson, D. I. 2001a. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25): 14607-14612.
- Blaser, M. J. 1998. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ*, 316(7143): 1507-1510.
- Blaser, M. J. 1999. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(6): 1523-1530.
- Blaser, M. J. 2006. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases. *EMBO Reports*, 7(10): 956-960.

- Broutet, N., Marais, A., Lamouliatte, H., De Mascarel, A., Samoyeau, R., Salamon, R. and Mégraud, F. 2001. *cagA* Status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4): 1319-1322.
- Brown, L. M., Thomas, T. L., Ma, J. L., Chang, Y. S., You, W. C., Liu, W. D. and Gail, M. H. 2001. *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 33(9): 686-691.
- Brown, L. M., Thomas, T. L., Ma, J. L., Chang, Y. S., You, W. C., Liu, W. D. and Gail, M. H. 2002. *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *International Journal of Epidemiology*, 31(3): 638-645.
- Bukanov, N. O. and Berg, D. E. 1994. Ordered cosmid library and high-resolution physical—genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Molecular Microbiology*, 11(3): 509-523.
- Bush, N. G., Evans-Roberts, K. and Maxwell, A. 2015. DNA topoisomerases. *EcoSal Plus*, 6(2): 10-1128.
- Cabral, J. H. M., Jackson, A. P., Smith, C. V., Shikotra, N., Maxwell, A. and Liddington, R. C. 1997. Crystal structure of the breakage–reunion domain of DNA gyrase. *Nature*, 388(6645): 903-906.
- Calam, J. 1999. *Helicobacter pylori* modulation of gastric acid. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 72(3): 195.
- Cavalcante, M. Q. D. F., Silva, C. I. S., Braga-Neto, M. B., Fialho, A. B. C., Nunes Fialho, A., Barbosa, A. M. C. and Braga, L. L. B. C. 2012. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5): 561-563.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M. and Covacci, A. 1996. *Cag* a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25): 14648-14653.
- Chiarini, A., Calà, C., Bonura, C., Gullo, A., Giuliana, G., Peralta, S. and Giammanco, A. 2009. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy.

- European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 28(1): 437-446.
- Chisholm, S. A., Teare, E. L., Patel, B. and Owen, R. J. 2002. Determination of *Helicobacter pylori* vacA allelic types by single-step multiplex PCR. Letters in Applied Microbiology, 35(1): 42-46.
- Christie, P. J. and Vogel, J. P. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends in Microbiology, 8(8): 354-360.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrone, D., Macchia, G. and Figura, N. 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(12): 5791-5795.
- Cover, T. L., Dooley, C. and Blaser, M. J. 1990. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infection and Immunity, 58(3): 603-610.
- Cover, T. L., Tummuru, M. K., Cao, P., Thompson, S. A. and Blaser, M. J. 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. Journal of Biological Chemistry, 269(14): 10566-10573.
- Crabtree, J. E., Taylor, J. D., Heatley, R. V., Shallcross, T. M., Rathbone, B. J., Wyatt, J. I. and Tompkins, D. S. 1991. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. The Lancet, 338(8763): 332-335.
- Dar, A., Prusty, D., Mondal, N. and Dhar, S. K. 2009. A unique 45-amino-acid region in the toprim domain of *Plasmodium falciparum* gyrase B is essential for its activity. Eukaryotic Cell, 8(11): 1759-1769.
- De Bortoli, N., Leonardi, G., Ciancia, E., Merlo, A., Bellini, M., Costa, F. and Marchi, S. 2007. *Helicobacter pylori* eradication: A randomized prospective study of triple therapy: Versus: Triple therapy plus lactoferrin and probiotics. Official Journal of the American College of Gastroenterology, 102(5): 951-956.
- De Mascarel, A., Ruskone-Fourmestraux, A., Lavergne-Slove, A., Megraud, F., Dubus, P. and Merlio, J. P. 2005. Clinical, histological and molecular follow-up of 60

- patients with gastric marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Virchows Archiv*, 446(39): 219-224.
- Delaney, B., Ford, A. C., Forman, D., Moayyedi, P. and Qume, M. 2005. Initial management strategies for dyspepsia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4)1: 19-61.
- Dixon, M. F., Genta, R. M., Yardley, J. H. and Correa, P. 1999. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. *The American Journal of Surgical Pathology*, 20(1): 1161-1181.
- Dorafshan, S., Alebouyeh, M., Shokrzadeh, L., Mirzaei, T., Mojarad, E. N., Behzad, C. and Zali, M. R. 2013. Allele-specific polymerase chain reaction for detection of main *gyrA* allelic variants in *Helicobacter pylori* strains. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 8(4): 198.
- Dore, M. P., Sepulveda, A. R., El-Zimaity, H., Yamaoka, Y., Osato, M. S., Mototsugu, K. and Graham, D. Y. 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep—implications for transmission to humans. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 96(5): 1396-1401.
- Dorer, M. S., Fero, J. and Salama, N. R. 2010. DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathogens*, 6(7): 1001026.
- Dorer, M. S., Sessler, T. H. and Salama, N. R. 2011. Recombination and DNA repair in *Helicobacter pylori*. *Annual Review of Microbiology*, 65(1): 329-348.
- Dorer, M. S., Talarico, S. and Salama, N. R. 2009. *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathogens*, 5(10): 1000544.
- Dunne, C., Dolan, B. and Clyne, M. 2014. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19): 5610.
- Egan, B. J., Katicic, M., O'connor, H. J. and O'Morain, C. A. 2007. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 12(1): 31-37.
- Eidt, S., Stolte, M. and Fischer, R. 1994. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Clinical Pathology*, 47(5): 436-439.
- El Khadir, M., Alaoui Boukhris, S., Benajah, D. A., El Rhazi, K., Ibrahim, S. A., El Abkari, M. and Bennani, B. 2017. *VacA* and *CagA* status as biomarker of two

- opposite end outcomes of *Helicobacter pylori* infection (gastric Cancer and duodenal ulcer) in a Moroccan population. *PloS One*, 12(1): 0170616.
- Elitsur, Y. and Yahav, J. 2005. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter*, 10(2): 47-53.
- El-Omar, E. M. 2001. The importance of interleukin 1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut*, 48(6): 743-747.
- El-Omar, E. M., Carrington, M., Chow, W. H., McColl, K. E., Bream, J. H., Young, H. A. and Rabkin, C. S. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 404(6776): 398-402.
- El-Omar, E. M., Rabkin, C. S., Gammon, M. D., Vaughan, T. L., Risch, H. A., Schoenberg, J. B. and Chow, W. H. 2003. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 124(5): 1193-1201.
- Engstrand, L., Nguyen, A. M., Graham, D. Y. and El-Zaatari, F. A. 1992. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9): 2295-2301.
- Enroth, H. and Engstrand, L. 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8): 2162-2165.
- Enroth, H., Wreiber, K., Rigo, R., Risberg, D., Uribe, A. and Engstrand, L. 1999. In vitro aging of *Helicobacter pylori*: Changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter*, 4(1): 7-16.
- Ernst, P. B. and Gold, B. D. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1): 615-640.
- Evans-Roberts, K. M., Mitchenall, L. A., Wall, M. K., Leroux, J., Mylne, J. S. and Maxwell, A. 2016. DNA gyrase is the target for the quinolone drug ciprofloxacin in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7): 3136-3144.
- Fallone, C. A., Barkun, A. N., Göttke, M. U., Best, L. M., Loo, V. G., Van Zanten, S. V. and Beech, R. 2000. Association of *Helicobacter Pylori* Genotype With Gastroesophageal Reflux Disease and Other Upper Gastrointestinal Diseases. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 95(3): 659-669.

- Falush, D., Kraft, C., Taylor, N. S., Correa, P., Fox, J. G., Achtman, M. and Suerbaum, S. 2001. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26): 15056-15061.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M. and Suerbaum, S. 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299(5612): 1582-1585.
- Feliciano, O., Gutierrez, O., Valdés, L., Fragoso, T., Calderin, A. M., Valdes, A. E. and Llanes, R. 2015. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes in Cuban patients with upper gastrointestinal diseases. *BioMed Research International*, 15(3): 6-15.
- Ferguson, D. A., Jiang, C., Chi, D. S., Laffan, J. J., Li, C. and Thomas, E. 1999. Evaluation of two string tests for obtaining gastric juice for culture, nested-PCR detection, and combined single-and double-stranded conformational polymorphism discrimination of *Helicobacter pylori*. *Digestive Diseases and Sciences*, 44(3): 2056-2062.
- Ferguson, D. A., Li, C., Patel, N. R., Mayberry, W. R., Chi, D. S. and Thomas, E. 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(10): 2802-2804.
- Fiedorek, S. C., Malaty, H. M., Evans, D. L., Pumphrey, C. L., Casteel, H. B., Evans, D. J. and Graham, D. Y. 1991. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics*, 88(3): 578-582.
- Figueiredo, C., Machado, J. C., Pharoah, P., Seruca, R., Sousa, S., Carvalho, R. and Sobrinho-Simoes, M. 2002. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(22): 1680-1687.
- Fischbach, L. A., Van Zanten, S. V. and Dickason, J. 2004b. Meta-analysis: the efficacy, adverse events, and adherence related to first-line anti-*Helicobacter pylori* quadruple therapies. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 20(10): 1071-1082.
- Fischbach, W., Goebeler-Kolve, M. E., Dragosics, B., Greiner, A. and Stolte, M. 2004a. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of

- mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut*, 53(1): 34-37.
- Fischer, W., Püls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. and Haas, R. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology*, 42(5): 1337-1348.
- Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R. and Haas, R. 2010. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Research*, 38(18): 6089-6101.
- Forman, D., Sitas, F., Newell, D. G., Stacey, A. R., Boreham, J., Peto, R. and Chen, J. 1990. Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *International Journal of Cancer*, 46(4): 608-611.
- Fox, J. G. 1995. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 9(8): 93-103.
- Fox, J. G. 2002. The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*, 50(2): 273-283.
- Fujii, R., Morihara, F., Fukushima, K., Oku, T., Hifumi, E. and Uda, T. 2004. Recombinant antigen from *Helicobacter pylori* urease as vaccine against H. pylori-associated disease. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(7): 737-746.
- Furuta, T., El-Omar, E. M., Xiao, F., Shirai, N., Takashima, M. and Sugimura, H. 2002. Interleukin 1 β polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*, 123(1): 92-105.
- Furuta, T., Shirai, N., Xiao, F., El-Omar, E. M., Rabkin, C. S., Sugimura, H., and Ohashi, K. 2004. Polymorphism of interleukin-1 β affects the eradication rates of *Helicobacter pylori* by triple therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2(1): 22-30.

- Fürész, J., Lakatos, S., Németh, K., Fritz, P., Simon, L. and Kacsérka, K. 2004. The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infections among young recruits during service in the Hungarian Army. *Helicobacter*, 9(1): 77-80.
- García-Ortíz, M. V., Marsin, S., Arana, M. E., Gasparutto, D., Guerois, R., Kunkel, T. A. and Radicella, J. P. 2011. Unexpected role for *Helicobacter pylori* DNA polymerase I as a source of genetic variability. *PLoS Genetics*, 7(6): 1002152.
- Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 2013. *Biochemistry*. Brooks/Cole Cengage Learning, 38(1169): 48.
- Gasbarrini, A. and Franceschi, F. 2005. Does *H. Pylori* infection play a role in idiopathic thrombocytopenic purpura and in other autoimmune diseases?. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 100(6): 1271-1273.
- Gasbarrini, A., Carloni, E., Gasbarrini, G. and Chisholm, S. A. 2004. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases—other *Helicobacters*. *Helicobacter*, 9(1): 57-66.
- Genta, R. M. 2002. After gastritis—an imaginary journey into a *Helicobacter*-free world. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16(8): 89-94.
- Gerrits, M. M., Van Vliet, A. H., Kuipers, E. J. and Kusters, J. G. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(11): 699-709.
- Gerstenecker, B., Eschweiler, B., Vögele, H., Koch, H. K., Hellerich, U. and Kist, M. 1992. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections with an enzyme immunoassay using the chromatographically purified 120 kilodalton protein. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11(1): 595-601.
- Glocker, E., Berning, M., Gerrits, M. M., Kusters, J. G. and Kist, M. 2005. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8): 3166-3170.
- Glupczynski, Y., Megraud, F., Lopez-Brea, M. and Andersen, L. 2001. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20(1): 820-823.
- Goodman, K. J. and Correa, P. 2000. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *The Lancet*, 355(9201): 358-362.

- Gressmann, H., Linz, B., Ghai, R., Pleissner, K. P., Schlapbach, R., Yamaoka, Y. and Achtman, M. 2005. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genetics*, 1(4): 43.
- Gustavsson, A., Unemo, M., Blomberg, B. and Danielsson, D. 2005. Genotypic and phenotypic stability of *Helicobacter pylori* markers in a nine-year follow-up study of patients with noneradicated infection. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(2): 375-380.
- Gyrase, D. N. A. 2007. Molecular cloning of Apicoplast-targeted. *Eukaryotic Cell*, 6(3): 398.
- Hamajima, N., Katsuda, N., Matsuo, K., Saito, T., Hirose, K., Inoue, M. and Tominaga, S. 2003. High Anti-*Helicobacter pylori* Antibody Seropositivity Associated with the Combination of IL-8-251TT and IL-10-819TT Genotypes. *Helicobacter*, 8(2): 105-110.
- Hatakeyama, M. 2004. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews Cancer*, 4(9): 688-694.
- Hegarty, J. P., Dowd, M. T. and Baker, K. H. 1999. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *Journal of Applied Microbiology*, 87(5): 697-701.
- Hellmig, S., Hampe, J., Fölsch, U. R. and Schreiber, S. 2005. Role of IL-10 promoter haplotypes in *Helicobacter pylori* associated gastric inflammation. *Gut*, 54(6): 888-889.
- Hentschel, E., Brandstatter, G., Dragosics, B., Hirschl, A. M., Nemec, H., Schutze, K. and Wurzer, H. 1993. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *New England Journal of Medicine*, 328(5): 308-312.
- Herbarth, O., Krumbiegel, P., Fritz, G. J., Richter, M., Schlink, U., Müller, D. M. and Richter, T. 2001. *Helicobacter pylori* prevalences and risk factors among school beginners in a German urban center and its rural county. *Environmental Health Perspectives*, 109(6): 573-577.
- Herrmann, J. E. 2006. DNA vaccines against enteric infections. *Vaccine*, 24(18): 3705-3708.

- Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T. and Hatakeyama, M. 2002a. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22): 14428-14433.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M. 2002b. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 295(5555): 683-686.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S. and Haas, R. 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, 41(2): 379-391.
- Humbert, O., Dorer, M. S. and Salama, N. R. 2011. Characterization of *Helicobacter pylori* factors that control transformation frequency and integration length during inter-strain DNA recombination. *Molecular Microbiology*, 79(2): 387-401.
- Hussein, N. R., Napaki, S. M. and Atherton, J. C. 2009. A study of *Helicobacter pylori*-associated gastritis patterns in Iraq and their association with strain virulence. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 15(2): 125-127.
- Hwang, I. R., Kodama, T., Kikuchi, S., Sakai, K., Peterson, L. E., Graham, D. Y. and Yamaoka, Y. 2002. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 β production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 123(6): 1793-1803.
- Iarc, L. 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 61(2): 1-241.
- Inagaki, H., Nakamura, T., Li, C., Sugiyama, T., Asaka, M., Kodaira, J. and Nakamura, S. 2004. Gastric MALT lymphomas are divided into three groups based on responsiveness to *Helicobacter pylori* eradication and detection of API2-MALT1 fusion. *The American Journal of Surgical Pathology*, 28(12): 1560-1567.
- Ito, Y., Azuma, T., Ito, S., Miyaji, H., Hirai, M., Yamazaki, Y. and Kuriyama, M. 1997. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7): 1710-1714.
- Jackson, S., Beck, P. L., Pineo, G. F. and Poon, M. C. 2005. *Helicobacter pylori* eradication: novel therapy for immune thrombocytopenic purpura? A review of the literature. *American Journal of Hematology*, 78(2): 142-150.

- Kabir, S. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter*, 9(2): 115-123.
- Kalaf, E. A., Al-Khafaji, Z. M., Yassen, N. Y., Al-Abbudi, F. A. and Sadwen, S. N. 2013. Study of the Cytotoxin. Associated Gene A (CagA Gene) in *Helicobacter pylori* Using Gastric Biopsies of Iraqi Patients. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 19(2): 69-74.
- Kao, C. Y., Sheu, B. S. and Wu, J. J. 2016. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*, 39(1): 14-23.
- Kennemann, L., Didelot, X., Aebischer, T., Kuhn, S., Drescher, B., Droege, M. and Suerbaum, S. 2011. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12): 5033-5038.
- Kersulyte, D., Chalkauskas, H. and Berg, D. E. 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Molecular Microbiology*, 31(1): 31-43.
- Khan, A., Farooqui, A., Manzoor, H., Akhtar, S. S., Quraishy, M. S. and Kazmi, S. U. 2012. Antibiotic resistance and *cagA* gene correlation: a looming crisis of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 18(18): 2245.
- Kivi, M., Tindberg, Y., Sörberg, M., Casswall, T. H., Befrits, R., Hellström, P. M. and Granström, M. 2003. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12): 5604-5608.
- Konno, M., Fujii, N., Yokota, S. I., Sato, K., Takahashi, M., Sato, K. and Sugiyama, T. 2005. Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5): 2246-2250.
- Kosunen, T. U., Aromaa, A., Knekt, P., Salomaa, A., Rautelin, H., Lohi, P. and Heinonen, O. P. 1997. *Helicobacter* antibodies in 1973 and 1994 in the adult population of Vammala, Finland. *Epidemiology and Infection*, 119(1): 29-34.
- Kosunen, T. U., Seppälä, K., Sarna, S. and Sipponen, P. 1992. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet*, 339(8798): 893-895.
- Kuipers, E. J. 1998. Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12(2): 25-36.

- Kuipers, E. J. 1999. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 13(1): 3-11.
- Kuipers, E. J., Israel, D. A., Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Weel, J., Van Der Ende, A. and Blaser, M. J. 2000. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1): 273-282.
- Kuipers, E. J., Lundell, L., Klinkenberg-Knol, E. C., Havu, N., Festen, H. P., Liedman, B. and Meuwissen, S. G. 1996. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *New England Journal of Medicine*, 334(16): 1018-1022.
- Kuipers, E. J., Nelis, G. F., Klinkenberg-Knol, E. C., Snel, P., Goldfain, D., Kolkman, J. J. and Walan, A. 2004. Cure of *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux oesophagitis treated with long term omeprazole reverses gastritis without exacerbation of reflux disease: results of a randomised controlled trial. *Gut*, 53(1): 12-20.
- Kuipers, E. J., Pena, A. S., Pels, N. F. M., Kurz-Pohlmann, E., Meuwissen, S. G. M., Van Kamp, G. and Pals, G. 1993. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *The Lancet*, 342(8867): 328-331.
- Kuipers, E. J., Thijs, J. C. and Festen, H. P. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 9(3): 59-69.
- Kulick, S., Moccia, C., Didelot, X., Falush, D., Kraft, C. and Suerbaum, S. 2008. Mosaic DNA imports with interspersions of recipient sequence after natural transformation of *Helicobacter pylori*. *PloS One*, 3(11): 3797.
- Kurosawa, M., Kikuchi, S., Inaba, Y., Ishibashi, T. and Kobayashi, F. 2000. *Helicobacter pylori* infection among Japanese children. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(12): 1382-1385.
- Kusters, J. G. and Kuipers, E. J. 1999. *Helicobacter* and atherosclerosis. *American Heart Journal*, 138(5): 523-527.
- Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Van Strijp, J. A. and Vandenbroucke-Grauls, C. M. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infection and Immunity*, 65(9): 3672-3679.

- Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Van Strijp, J. A. and Vandenbroucke-Grauls, C. M. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infection and Immunity*, 65(9): 3672-3679.
- Kyriazanos, I. D., Ilias, I., Gizaris, V., Hountis, P., Georgaklis, V., Dafnopoulou, A. and Datsakis, K. 2001. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Hellenic Navy recruits. *European Journal of Epidemiology*, 17(3): 501-504.
- Labenz, J., Blum, A. L., Bayerdorffer, E., Meining, A., Stolte, M. and Borsch, G. 1997. Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology*, 112(5): 1442-1447.
- Laporte, R., Pernes, P., Pronnier, P., Gottrand, F. and Vincent, P. 2004. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection after outbreaks of gastroenteritis: prospective cohort survey in institutionalised young people. *BMJ*, 329(7459): 204-205.
- Lara-Ramírez, E. E., Segura-Cabrera, A., Guo, X., Yu, G., García-Pérez, C. A. and Rodríguez-Pérez, M. A. 2011. New implications on genomic adaptation derived from the *Helicobacter pylori* genome comparison. *PloS One*, 6(2): 17300.
- Lehours, P., Ruskone-Fourmestreaux, A., Lavergne, A., Cantet, F., Mégraud, F. and Des Lymphomes Digestifs, G. D. E. 2003. Which Test To Use To Detect *Helicobacter Pylori* Infection in Patients With Low-Grade Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma?. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 98(2): 291-295.
- Leontiadis, G. I., Sharma, V. K. and Howden, C. W. 1999. Non-Gastrointestinal Tract Associations of *Helicobacter pylori* Infection: What Is the Evidence?. *Archives of Internal Medicine*, 159(9): 925-940.
- Leung, W. K., Lin, S. R., Ching, J. Y. L., To, K. F., Ng, E. K. W., Chan, F. K. L. and Sung, J. J. Y. 2004. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut*, 53(9): 1244-1249.
- Leung, W. K., Siu, K. L., Kwok, C. K., Chan, S. Y., Sung, R. and Sung, J. J. 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *The American Journal of Gastroenterology*, 94(10): 2881-2884.

- Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G. and Morgan, D. R. 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 26(2): 93-99.
- Ley, C., Mohar, A., Guarner, J., Herrera-Goepfert, R., Figueroa, L. S., Halperin, D. and Parsonnet, J. 2004. *Helicobacter pylori* eradication and gastric preneoplastic conditions: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 13(1): 4-10.
- Li, C., Xia, B., Yang, Y., Li, J. and Xia, H. H. X. 2005. TNF gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 100(2): 290-294.
- Lin, E. A., Zhang, X. S., Levine, S. M., Gill, S. R., Falush, D. and Blaser, M. J. 2009. Natural transformation of *Helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragments interrupted by gaps of variable size. *PLoS Pathogens*, 5(3), 1000337.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P. and Achtman, M. 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 445(7130): 915-918.
- Liu, H., Ye, H., Ruskone-Fourmestraux, A., De Jong, D., Pileri, S., Thiede, C. and Du, M. Q. 2002. T (11; 18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology*, 122(5): 1286-1294.
- Lu, W., Pan, K., Zhang, L., Lin, D., Miao, X. and You, W. 2005. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor α and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*, 26(3): 631-636.
- Lu, Y., Redlinger, T. E., Avitia, R., Galindo, A. and Goodman, K. 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1436-1439.
- Macarthur, M., Hold, G. L. and El-Omar, E. M. 2004. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(4): 515-520.
- Machado, J. C., Figueiredo, C., Canedo, P., Pharoah, P., Carvalho, R., Nabais, S. and Sobrinho-Simões, M. 2003. A proinflammatory genetic profile increases the risk

- for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 125(2): 364-371.
- Malaty, H. M. and Graham, D. Y. 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 35(6): 742-745.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'morain, C., Hungin, A. P. S., Jones, R., Axon, A. and European *Helicobacter Pylori* Study Group (EHPHG). 2002. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16(2): 167-180.
- Matsunari, O., Miftahussurur, M., Shiota, S., Suzuki, R., Vilaichone, R. K., Uchida, T. and Yamaoka, Y. 2016. Rare *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Bhutan. *Scientific Reports*, 6(1): 22584.
- Matsunari, O., Shiota, S., Suzuki, R., Watada, M., Kinjo, N., Murakami, K. and Yamaoka, Y. 2012. Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3): 876-883.
- McNulty, C. M. and Wise, R. 1985. Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. *CABI*, 85(1): 1443-1444.
- Megraud, F. 1995. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 9(7): 85-91.
- Megraud, F. 2007. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut*, 56(11): 1502-1502.
- Moayyedi, P., Soo, S., Deeks, J., Delaney, B., Harris, A., Innes, M. and Shelly, S. 2005. Eradication of *Helicobacter pylori* for non-ulcer dyspepsia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5(2): 3-7.
- Montecucco, C. and Rappuoli, R. 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(6): 457-466.
- Monteiro, L., Gras, N. and Megraud, F. 2001. Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10): 3778-3780.
- Morelli, G., Didelot, X., Kusecek, B., Schwarz, S., Bahlawane, C., Falush, D. and Achtman, M. 2010. Microevolution of *Helicobacter pylori* during prolonged infection of single hosts and within families. *PLoS Genetics*, 6(7): 1001036.

- Nakamura, S., Matsumoto, T., Suekane, H., Nakamura, S., Matsumoto, H., Esaki, M. and Iida, M. 2005. Long-term clinical outcome of *Helicobacter pylori* eradication for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with a reference to second-line treatment. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(3): 532-540.
- Nilsson, C., Sillén, A., Eriksson, L., Strand, M. L., Enroth, H., Normark, S. and Engstrand, L. 2003. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infection and Immunity*, 71(11): 6573-6581.
- Nolan, T., Hands, R. E. and Bustin, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3): 1559-1582.
- Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P. H., Perez-Perez, G. I. and Blaser, M. J. 1994. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Annals of Internal Medicine*, 120(12): 977-981.
- Nozawa, Y., Nishihara, K., Peek Jr, R. M., Nakano, M., Uji, T., Ajioka, H. and Miyake, H. 2002. Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 64(1): 21-30.
- Oh, J. D., Kling-Bäckhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R. S., Fulton, L. A. and Gordon, J. I. 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26): 9999-10004.
- Ohya, I., Ohmiya, N., Niwa, Y., Shirai, K., Taguchi, A., Itoh, A. and Goto, H. 2004. The association between tumour necrosis factor- α gene polymorphism and the susceptibility to rugal hyperplastic gastritis and gastric carcinoma. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16(7): 693-700.
- Oleastro, M., Matos, R., Cabral, J., Barros, R., Lopes, A. I., Ramalho, P. and Monteiro, L. 2002. Evaluation of a Western blot test, Helico Blot 2.1, in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a pediatric population. *Helicobacter*, 7(3): 210-215.
- Oleastro, M., Ménard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthélémy, P. and Mégraud, F. 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point

- mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1): 397-402.
- Paniagua, G. L., Monroy, E., Rodríguez, R., Arroniz, S., Rodríguez, C., Cortés, J. L. and Vaca, S. 2009. Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(3): 1-6.
- Parkin, D. M. 2001. Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet Oncology*, 2(9): 533-543.
- Parsonnet, J. 1995. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 9(2): 45-51.
- Parsonnet, J. and Isaacson, P. G. 2004. Bacterial infection and MALT lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 350(7): 213-215.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N. and Vogelmann, H. 1997. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40(3): 297-301.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelmann, J. H., Orentreich, N. and Sibley, R. K. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 325(16): 1127-1131.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A. B., Warnke, R. A., Jellum, E. and Friedman, G. D. 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 330(18): 1267-1271.
- Parsonnet, J., Shmueli, H. and Haggerty, T. 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*, 282(23): 2240-2245.
- Paul, W. O., Lane, M. C. and Porwollik, S. 2000. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*, 2(10): 1207-1214.
- Peek, R. M., Miller, G. G., Tham, K. T., Pérez-Pérez, G. I., Cover, T. L., Atherton, J. C. and Blaser, M. J. 1995. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1): 28-32.
- Perez-Perez, G. I., Olivares, A. Z., Foo, F. Y., Foo, S., Neusy, A. J., Ng, C. and Blaser, M. J. 2005. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in New York City populations originating in East Asia. *Journal of Urban Health*, 82(2): 510-516.

- Perez-Perez, G. I., Rothenbacher, D. and Brenner, H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 9(7): 1-6.
- Phadnis, S. H., Ilver, D., Janzon, L., Normark, S. and Westblom, T. U. 1994. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 62(5): 1557-1565.
- Poms, R. E. and Tatini, S. R. 2001. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4 C. *International Journal of Food Microbiology*, 63(3): 281-286.
- Pounder, R. E. and Ng, D. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 9(2): 33-39.
- Queiroz, D. M. M., Guerra, J. B., Rocha, G. A., Rocha, A. M. C., Santos, A., De Oliveira, A. G. and De Oliveira, C. A. 2004. IL1B and IL1RN polymorphic genes and *Helicobacter pylori* cagA strains decrease the risk of reflux esophagitis. *Gastroenterology*, 127(1): 73-79.
- Queralt, N., Bartolome, R. and Araujo, R. 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4): 889-895.
- Rad, R., Dossumbekova, A., Neu, B., Lang, R., Bauer, S., Saur, D. and Prinz, C. 2004. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 53(8): 1082-1089.
- Rad, R., Prinz, C., Neu, B., Neuhofer, M., Zeitner, M., Volland, P. and Gerhard, M. 2003. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(2): 272-281.
- Radcliff, F. J., Hazell, S. L., Kolesnikow, T., Doidge, C. and Lee, A. 1997. Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination. *Infection and Immunity*, 65(11): 4668-4674.
- Raderer, M., Streubel, B., Woehrer, S., Puespoek, A., Jaeger, U., Formanek, M. and Chott, A. 2005. High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up. *Clinical Cancer Research*, 11(9): 3349-3352.

- Rasheed, Q. A. and Jebur, M. S. 2018. Prevalence and some epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in Baghdad Medical City Hospitals. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(7): 1701-1706.
- Rautelin, H., Lehours, P. and Mégraud, F. 2003. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 8(1): 13-20.
- Rauws, E. A. J. and Tytgat, G. N. J. 1990. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet*, 335(8700): 1233-1235.
- Raymond, J., Thiberge, J. M., Chevalier, C., Kalach, N., Bergeret, M., Labigne, A. and Dauga, C. 2004. Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerging Infectious Diseases*, 10(10): 1816.
- Rehnberg-Laiho, L., Rautelin, H., Koskela, P., Sarna, S., Pukkala, E., Aromaa, A. and Kosunen, T. U. 2001. Decreasing prevalence of *Helicobacter* antibodies in Finland, with reference to the decreasing incidence of gastric cancer. *Epidemiology and Infection*, 126(1): 37-42.
- Reyrat, J. M., Pelicic, V., Papini, E., Montecucco, C., Rappuoli, R. and Telford, J. L. 1999. Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Molecular Microbiology*, 34(2): 197-204.
- Ribeiro, M. L., Gerrits, M. M., Benvengo, Y. H., Berning, M., Godoy, A. P., Kuipers, E. J. and Kusters, J. G. 2004. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40(1): 57-61.
- Ricci, C., Holton, J. and Vaira, D. 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 21(2): 299-313.
- Roosendaal, R., Kuipers, E. J., Buitenwerf, J., Van Uffelen, C., Meuwissen, S. G., Van Kamp, G. J. and Vandenhroucke-Grauls, C. M. 1997. *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. *American Journal of Gastroenterology*, 92(9): 1-8.
- Rossi, G., Ruggiero, P., Peppoloni, S., Pancotto, L., Fortuna, D., Lauretti, L. and Del Giudice, G. 2004. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infection and Immunity*, 72(6): 3252-3259.

- Rowland, M., Daly, L., Vaughan, M., Higgins, A., Bourke, B. and Drumm, B. 2006. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 130(1): 65-72.
- Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M., Kuck, D., Sieg, A., Galle, P. R. and Stremmel, W. 1998. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4): 944-948.
- Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y. and Hatakeyama, M. 2007. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, 447(7142): 330-333.
- Salama, N. R., Gonzalez-Valencia, G., Deatherage, B., Aviles-Jimenez, F., Atherton, J. C., Graham, D. Y. and Torres, J. 2007. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* strain populations colonizing the stomach at different times postinfection. *Journal of Bacteriology*, 189(10): 3834-3845.
- Schenk, B. E., Kuipers, E. J., Nelis, G. F., Bloemena, E., Thijs, J. C., Snel, P. and Meuwissen, S. G. M. 2000. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on chronic gastritis during omeprazole therapy. *Gut*, 46(5): 615-621.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101-1108.
- Schwizer, W., Thumshirn, M., Dent, J., Guldenschuh, I., Menne, D., Cathomas, G. and Fried, M. 2001. *Helicobacter pylori* and symptomatic relapse of gastro-oesophageal reflux disease: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 357(9270): 1738-1742.
- Sinha, S. K., Martin, B., Gold, B. D., Song, Q., Sargent, M. and Bernstein, C. N. 2004. The incidence of *Helicobacter pylori* acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parent-to-child transmission. *Helicobacter*, 9(1): 59-68.
- Sipponen, P., Kekki, M., Haapakoski, J., Ihämäki, T. and Siurala, M. 1985. Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *International Journal of Cancer*, 35(2): 173-177.
- Sipponen, P., Varis, K., Fräki, O., Korri, U. M., Seppälä, K. and Siurala, M. 1990. Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis: a clinical follow-up study of 454 outpatients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 25(10): 966-973.

- Solnick, J. V. and Schauer, D. B. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1): 59-97.
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S. and Lynch, S. V. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PloS One*, 10(2): e0117617.
- Stein, M., Rappuoli, R. and Covacci, A. 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3): 1263-1268.
- Suerbaum, S. and Achtman, M. 2004. *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(3): 133-139.
- Suerbaum, S., Smith, J. M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N. H., Kunstmann, E. and Achtman, M. 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21): 12619-12624.
- Sugimoto, M., Zali, M. R. and Yamaoka, Y. 2009. The association of *vacA* genotypes and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases in the Middle East. *European journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(7): 1227-1236.
- Sukri, A., Hanafiah, A., Mohamad Zin, N. and Kosai, N. R. 2020. Epidemiology and role of *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric cancer carcinogenesis. *Apmis*, 128(2): 150-161.
- Sutormin, D., Rubanova, N., Logacheva, M., Ghilarov, D. and Severinov, K. 2019. Single-nucleotide-resolution mapping of DNA gyrase cleavage sites across the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Research*, 47(3): 1373-1388.
- Suzuki, T., Grand, E., Bowman, C., Merchant, J. L., Todisco, A., Wang, L. and Del Valle, J. 2001. TNF- α and interleukin 1 activate gastrin gene expression via MAPK-and PKC-dependent mechanisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(6): 1405-1412.
- Suzuki, T., Matsushima, M., Masui, A., Watanabe, K. I., Takagi, A., Ogawa, Y. and Mine, T. 2005. Effect of *Helicobacter pylori* eradication in patients with chronic idiopathic

- thrombocytopenic purpura—a randomized controlled trial. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 100(6): 1265-1270.
- Tadesse, E., Daka, D., Yemane, D. and Shimelis, T. 2014. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection and its related risk factors in symptomatic patients in southern Ethiopia. *BMC Research Notes*, 7(2): 1-5.
- Talley, N. J. and Hunt, R. H. 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(6): 67-77.
- Talley, N. J., Newell, D. G., Ormand, J. E., Carpenter, H. A., Wilson, W. R., Zinsmeister, A. R. and Blaser, M. J. 1991. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori*: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(8): 1635-1639.
- Taneike, I., Tamura, Y., Shimizu, T., Yamashiro, Y. and Yamamoto, T. 2001. *Helicobacter pylori* intrafamilial infections: change in source of infection of a child from father to mother after eradication therapy. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(4): 731-739.
- Telford, J. L., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M. and Xiang, Z. 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(5): 1653-1658.
- Teresa, F., Serra, N., Capra, G., Mascarella, C., Gagliardi, C., Di Carlo, P. and Giammanco, A. 2019. *Helicobacter pylori* and epstein–barr virus infection in gastric diseases: correlation with IL-10 and IL1RN polymorphism. *Journal of Oncology*, 19(7): 1-9.
- Thompson, L. J., Merrell, D. S., Neilan, B. A., Mitchell, H., Lee, A. and Falkow, S. 2003. Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 71(5): 2643-2655.
- Thompson, S. A. and Blaser, M. J. 1995. Isolation of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. *Infection and Immunity*, 63(6): 2185-2193.
- Toledo, H. and López-Solís, R. 2010. Tetracycline resistance in Chilean clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3): 470-473.

- Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D. and Venter, J. C. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642): 539-547.
- Torres, L. E., Melián, K., Moreno, A., Alonso, J., Sabatier, C. A., Hernández, M. and Rodríguez, B. L. 2009. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World Journal of Gastroenterology*, 15(2): 204.
- Treiber, G. and Lambert, J. R. 1998. The impact of *Helicobacter pylori* eradication on peptic ulcer healing. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(7): 1080-1084.
- Tummuru, M. K., Cover, T. L. and Blaser, M. J. 1994. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 62(6): 2609-2613.
- Uc, A. and Chong, S. K. 2002. Treatment of *Helicobacter pylori* gastritis improves dyspeptic symptoms in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 34(3): 281-285.
- Vaira, D., Holton, J., Menegatti, M., Ricci, C., Landi, F., Gatta, L. and Miglioli, M. 1999. New immunological assays for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 45(1): I23-I27.
- Vakil, N., Hahn, B. and McSorley, D. 2000. Recurrent symptoms and gastro-oesophageal reflux disease in patients with duodenal ulcer treated for *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14(1): 45-51.
- Valdez-Gonzalez, J. A., Mares-Moreno, P. C., Kowolik, M. J., Vargas-Villarreal, J., Gonzalez-Salazar, F. and De la Garza-Ramos, M. A. 2014. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque of Mexican children by real-time PCR. *Health*, 6(4): 5.
- Van Der Ende, A., Rauws, E. A., Feller, M., Mulder, C. J., Tytgat, G. N. and Dankert, J. 1996. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology*, 111(3): 638-647.
- Van Der Hulst, R. W., Rauws, E. A., Köycü, B., Keller, J. J., ten Kate, F. J., Dankert, J. and van der Ende, A. 1997. *Helicobacter pylori* reinfection is virtually absent after successful eradication. *Journal of Infectious Diseases*, 176(1): 196-200.
- Van Doorn, O. J., Bosman, D. K., Van't Hoff, B. W., Taminiau, J. A., Ten Kate, F. J. and Van Der Ende, A. 2001. *Helicobacter pylori* stool antigen test: a reliable non-

- invasive test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13(9): 1061-1065.
- Van Zanten, S. J. V., Dixon, M. F. and Lee, A. 1999. The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *helicobacter* ecology. *Gastroenterology*, 116(5): 1217-1229.
- Vanden Broeck, A., Lotz, C., Ortiz, J. and Lamour, V. 2019. Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex. *Nature Communications*, 10(1): 4935.
- Vincent, P., Gottrand, F., Pernes, P., Husson, M. O., Lecomte-Houcke, M., Turck, D. and Leclerc, H. 1994. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. Epidemiology of a cluster, with special emphasis on molecular typing. *Gut*, 35(3): 313-316.
- Wang, L. H., Cheng, H., Hu, F. L. and Li, J. 2010. Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18): 2272.
- Warren, J. R. and Marshall, B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*, 321(8336): 1273-1275.
- Watada, M., Shiota, S., Matsunari, O., Suzuki, R., Murakami, K., Fujioka, T. and Yamaoka, Y. 2011. Association between *Helicobacter pylori* *cagA*-related genes and clinical outcomes in Colombia and Japan. *BMC Gastroenterology*, 11(1): 1-8.
- Wen, S. and Moss, S. F. 2009. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*, 282(1): 1-8.
- Werdmuller, B. F. M. and Loffeld, R. J. L. F. 1997. *Helicobacter pylori* infection has no role in the pathogenesis of reflux esophagitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(6): 103-105.
- Wigley, D. B., Davies, G. J., Dodson, E. J., Maxwell, A. and Dodson, G. 1991. Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature*, 351(6328): 624-629.
- Williams, M. L. and Ghanem, M. 2022. Evaluation of candidate reference genes stability for gene expression analysis by reverse transcription qPCR in *Clostridium perfringens*. *Scientific Reports*, 12(1): 19434.

- Wolle, K. and Malfertheiner, P. 2007. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 21(2): 315-324.
- Wu, M. S., Wu, C. Y., Chen, C. J., Lin, M. T., Shun, C. T. and Lin, J. T. 2003. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *International Journal of Cancer*, 104(5): 617-623.
- Wundisch, T., Thiede, C., Morgner, A., Dempfle, A., Günther, A., Liu, H. and Neubauer, A. 2005. Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31): 8018-24.
- Xiang, Z., Bugnoli, M., Rappuoli, R., Ponzetto, A. and Crabtree, J. 1993. *Helicobacter pylori*: host responses in peptic ulceration. *The Lancet*, 341(8849): 900-901.
- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R. and Covacci, A. 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infection and Immunity*, 63(1): 94-98.
- Yahara, K., Kawai, M., Furuta, Y., Takahashi, N., Handa, N., Tsuru, T. and Kobayashi, I. 2012. Genome-wide survey of mutual homologous recombination in a highly sexual bacterial species. *Genome Biology and Evolution*, 4(5): 628-640.
- Yea, S. S., Yang, Y. I., Jang, W. H., Lee, Y. J., Bae, H. S. and Paik, K. H. 2001. Association between TNF- α promoter polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA subtype infection. *Journal of Clinical Pathology*, 54(9): 703-706.
- Zambon, C. F., Basso, D., Navaglia, F., Belluco, C., Falda, A., Fogar, P. and Plebani, M. 2005. Pro-and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine*, 29(4): 141-152.
- Zambon, C. F., Basso, D., Navaglia, F., Germano, G., Gallo, N., Milazzo, M. and Plebani, M. 2002. *Helicobacter pylori* virulence genes and host IL-1RN and IL-1 β genes interplay in favouring the development of peptic ulcer and intestinal metaplasia. *Cytokine*, 18(5): 242-251.
- Zullo, A., Perna, F., Hassan, C., Ricci, C., Saracino, I. L. A. R. I. A., Morini, S. and Vaira, D. 2007. Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated in northern and central Italy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 25(12): 1429-1434.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Nibras Sarhan Khudhair KHUDHAIR

Eğitim

Doktora	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-2024
Yüksek Lisans	Tikrit Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013-2017
Lisans	Tikrit Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010-2013