163212

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELICOBACTER PYLORI İZOLATLARINDA ANTİMİKROBİYAL AJANLARA KARŞI DİRENÇ

PEREN H. BAĞLAN

TEMEL HEPATOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

2004- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temel Hepatoloji Yüksek Lisans Programı

Çerçevesinde Yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki, juri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/07/2004

Prof. Dr. A.Mithat Bozdayı
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Ali Özden
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Hülya Çetinkaya
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Kadir Bahar
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. İrfan Soykan
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vii
Tablolar	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. *Helicobacter pylori*' nin Keşfi	1
1.2. *Helicobacter pylori*'nin Morfolojisi	2
1.3. *Helicobacter pylori* 'nin Epidemiyolojisi	4
1.3.1. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Kaynağı	4
1.3.2. *Helicobacter. pylori*'nin Görülme Sıklığı	5
1.3.3. *Helicobacter pylori* Transmisyonu	6
1.3.4. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Nüksü	7
1.4. *Helicobacter pylori*'nin Gastrointestinal Sistem Hastalıkları ile İlişkisi	7
1.4.1. Cag Patojenite Adası (cag PAI), cagA, vacA ve iceA Genleri'nin Duedonal Ülser ve Mide Kanseri ile İlişkisi	8
1.4.1.1. Cag PAi ve CagA Geni	8
1.4.1.2. VacA Geni	9
1.4.1.3. IceA Geni	10
1.5 .*Helicobacter pylori* Genomu ve Çeşitlilik	12
1.5.1. *Helicobacter pylori* Genomu	12
1.5.2. *Helicobacter pylori* Çeşitliliği	13
1.6. *Helicobacter pylori* Tedavisi	15
1.7. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç	17
1.7.1. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç Mekanizmaları	18
1.7.2. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç Genlerinin Kaynağı ve Yayılımı	19
1.7.3. *Helicobacter pylori*'nin Antimikrobiyal Ajanlara Direnci	20
1.7.3.1. *Helicobacter pylori*'de Primer ve Sekonder Direnç	20
1.7.3.2. *Helicobacter pylori*'nin Klaritromisine Direnci	20
1.7.3.3. *Helicobacter pylori*'nin Direnç Gösterdiği Diğer Antibiyotikler ve Moleküler Mekanizmaları	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gereçler	28
2.1.1. Hastalar	28
2.1.2. Kimyasal Maddeler	28
2.1.3. Tampon ve Çözeltiler	29
2.1.4. Aletler	29
2.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri	30
2.2. Yöntem	30
2.2.1. Bakteri Kültürü ve Saklanması	30
2.2.1.1. Bakteri Kültürü	30
2.2.1.2. Bakteri Suşlarının Saklanması	32
2.2.2. Bakteri Genomik DNA Ekstraksiyonu	32
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	33

2.2.3.1. PZR ile 23S rRNA'nın Çoğaltılması 33
2.3.3.2. PZR ile IceA Genotiplemesi 34
2.2.3.3. PZR ile CagA Genotiplemesi 34
2.2.3.4. PZR ile VacA Geni Orta (middle) Bölgesinin m1 ve m2 35
Genotiplemesi 35
2.2.3.5. PZR ile VacA Sinyal Bölgesinin Genotiplenmesi 36
2.2.4. Restriksiyon Parçacığı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile Mutasyon 37
Tespiti
2.2.5. İstatistiksel Analizler 37

3. BULGULAR 39
3.1. Hasta Grupları 39
3.2. PZR ile 23S rRNA Geninin Çoğaltılması Sonuçları 39
3.3. 23S rRNA Geninin PZR-RFLP ile Mutasyon Analizi Sonuçları 39
3.4. IceA Genotipleme Sonuçları 41
3.5. CagA Genotipleme Sonuçları 42
3.6. VacA Genotipleme Sonuçları 42

4. TARTIŞMA 46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
ÖZET 56
SUMMARY 57
KAYNAKLAR 58
ÖZGEÇMİŞ 70

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
ATPaz	Adenin trifosfat
bç	Baz çifti
C	Sitozin
cagA	Cytotoxin associated gene (sitotoksin ilişkili gen)
cag PAI	Cytotoxin associated gene patogeneity island (sitotoksin ilişkili gen patojenite adası)
CFU	Colony forming units
dNTP	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EF-G	Elongation Factor-G
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanin
gr	Gram
H.pylori	*Helicobacter pylori*
HLA	Human Lympoid Antigen (insan lenfoid antijeni)
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL8	İnterlökin 8
IS	Insertion Sequence (İnsersiyon dizisi)
iceA	Induced by contact with epithelium
k Da	Kilodalton
kb	Kilobaz
l	Litre
M	Molar
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
mg	Miligram
MIC	Minimal inhibitor concentration
ml	Mililitre
°C	Celsius (Santigrad derece)

µ	Mikro
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NIH	**N**ational **I**nstitutes of **H**ealth
nm	Nanometre
NSAID	**N**on steroidal **A**nti-**I**nflamatory **D**rugs
OD	**O**ptical **D**ensity
ORF	**O**pen **R**eading **F**rame (Açık okuma çerçevesi)
pI	Aminoasitin elektriksel olarak nötral olduğu ph
pmol	Pikomol
PZR	**P**olimeraz **Z**incir **R**eaksiyonu
rdxA	Oksijene duyarsız NADPH redüktaz geni
RFLP	**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism (Restriksiyon Parçacığı Uzunluk Polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakika başına dönme sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
T	Timin
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris	Tris (hidroksimetil) metilamin
Tris-HCl	Trizma Hidroklorür
trna	Transfer (taşıyıcı) RNA
U	Ünite
UV	Ultraviyole
vacA	Vacuolating cytotoxin (vakuol oluşturucu sitotoksin)
VNTR	**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats (Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarlar)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: *H. pylori*'nin basil formundan tamamen kokoid forma dönüşmesi. 3

Şekil 1.2: Çeşitli ülkelerdeki *H.pylori*'nin klaritromisin direnci prevelansları. 21

Şekil 1.3: Klaritromisinin ribozomun küçük alt birimine bağlanarak protein sentezini zincir uzama basamağında engellemesi. 24

Şekil 1.4: 23S rRNA domainlerin primer ve sekonder yapısı. 25

Şekil 2.1: Ø.X174 DNA/ *Hinf*I Marker, 1.0 işaretleyicisinin bant açılımının gösterilmesi. 38

Şekil 2.2: DNA marker '1kb gene ladder' işaretleyicisinin, bantlarının açılımının gösterilmesi. 38

Şekil 3.1: 23S rRNA PZR bantlarının %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 39

Şekil 3.2: BpiI, restriksiyon enzimi kesimi bantlarının %1.5'luk agaroz jelde gösterilmesi. 40

Şekil 3.3: Bsa1, restriksiyon enzimi kesimi bantlarının %1.5'luk agaroz jelde gösterilmesi. 40

Şekil 3.4: IceA1 ve iceA2 genotiplerinin %1.5'luk agaroz jelde gösterilmesi. 41

Şekil 3.5: CagA genotiplerinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 42

Şekil 3.6: VacA m1 ve vacA m2 genotiplerinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 43

Şekil 3.7: VacA s1a genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi 44

Şekil 3.8: VacA s1b genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 44

Şekil 3.9: VacA s1c genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 44

Şekil 3.10: VacA s2 genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 45

TABLOLAR

Tablo 1.1: Çeşitli ülkelerdeki *H. pylori* izolatlarında metranidazole direnç oranları. 26

Tablo 1.2: Farklı Avrupa merkezlerinde *H. pylori*'nin amoksisiline direnç oranları. 27

Tablo 2.1: PZR'da kullanılan primer dizileri ve çoğaltılan bölgenin uzunluğu. 37

Tablo 2.2: 23S rRNA genindeki mutasyonları belirlemede kullanılan restriksiyon enzimleri. 38

Tablo 3.1: BpiI ve Bsa1 restriksiyon enzimi kesimlerinin, iceA1, iceA2, cagA, vacA m1, vacA m2 genotiplerinin hasta gruplarına göre ve toplam hasta sayısına göre dağılımları ve yüzdelerinin gösterilmesi. 43

Tablo 4.1: *H. pylori*'de cagA, vacA, iceA genler ile ilgili yapılan çalışmalardan bazı örnekler. 53

Tablo 4.2: *H.pylori*' nin klaritromisin direnci ile ilgili yapılan çalışmalar. 54

1.GİRİŞ

1.1. Helicobacter pylori' nin Keşfi

1979'da, Batı Avustralya'nın Perth şehrinde yaşayan bir patolog olan Robin Warren'ın, mide biyopsi örneklerinin histolojik çalışmaları sonucunda, sık sık midenin mukus tabakasında, kıvrımlı bakteriler dikkatini çekti. Genç bir gastroenterolog olan Barry Marshall da, Warren'ın bu gözlemleriyle ilgilendi ve iki araştırmacı mide biyopsi örneklerinden organizmayı izolasyon için çalışmalara başladı. Bu organizmalar kıvrımlı ve gram negatif oldukları için araştırmacılar, bakteriyoloji bilim dalında çalışan araştırmacılarla işbirliği yaparak Campylobacter türleri için kullanılan izolasyon yöntemlerini denediler. Buna göre biyopsi örneği, seçici besiyerine ekildi ve anaerobik ortamda kültürü yapıldı. Bir çok Campylobacter türü bu ortam koşulları altında 48 saatte üremekteydi, üreme görülmediğinde ise 3 gün içinde plaklar atılıyordu. Bu şekilde, yaklaşık 30 hastadan alınan kültürler negatif olarak sonuçlandı. Ancak şans eseri, bir kültür Paskalya tatili nedeni ile 5 gün inkübasyonda kaldı ve tatilin sonunda kolonilere rastlandı. Böylece ilk defa, 14.05.1982 tarihinde şu an *Helicobacter pylori* olarak adlandırdığımız organizma izole edilmiş oldu (Dunn ve ark., 1997). Bu buluşun yayınlanmasından sonra, çok hızlı bir şekilde dünya üzerinde birçok araştırmacı mide mukusunda bu bakterinin varlığını doğruladı ve *H. pylori* ile ilgili çalışmaların temeli atılmış oldu.

Marshall, *H. pylori*'yi izole ettikten sonra, bakteriyi kendi üzerinde denemeye karar verdi ve endoskopi ile mide mukozosının sağlıklı olduğu gözlendikten sonra, peptik ülserli hastanın lezyonundan üretilen bakteri kültüründen hazırlanan süspansiyonu içti. Marshall'da bir hafta sonra akut gastrik semptomlar görülmeye başladı. İkinci hafta sonunda ise, mideden alınan biyopsi örneğinde mide mukus tabakası altına yerleşmiş kıvrımlı bakterilere ve endoskopik inceleme sonunda ise inflamasyona rastlandı.

Marshall'ın bu deneyi sonucunda mide hastalıklarının etiolojisinde *H. pylori*'nin rolü kanıtlanmış oldu (Hopkins ve ark., 1994).

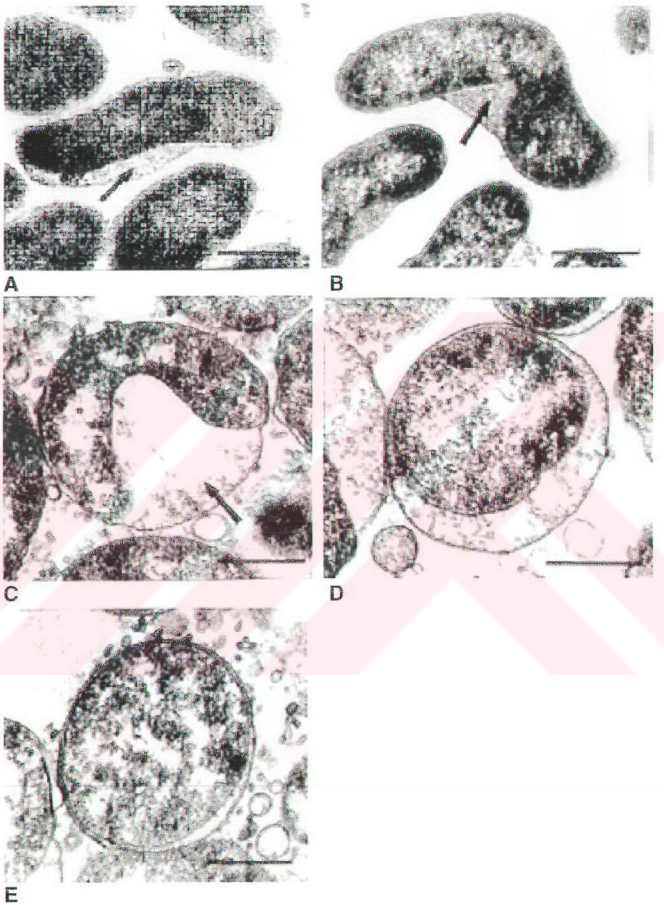
Marshall tarafından 1984'de bu bakteri ilk olarak *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırıldıktan sonra ancak 1987'de *Campylobacter pylori*, 1989'da ise 'Campylobacter' cinsinden çıkartılıp, 'Helicobacter' adlı yeni bir cinse dahil edildi ve *Helicobacter pylori* adı verildi (Goodwin ve ark. 1989).

1.2. *Helicobacter pylori*'nin Morfolojisi

H. pylori organizması spiral, mikroaerofilik, gram negatif bir bakteridir. Sıvı besiyerinde kültürü yapıldığında bakteri morfolojisi çubuk şeklindedir. Spiral şekildeki bakteriler seyrek ya da hiç yoktur. Mide biyopsi örneklerinde *H. pylori*, 2,5-5 µm uzunluğunda, 0,5-1 µm genişliğinde, 6 unipolar kılıflı flagellalıdır. Her flagella 30 µm uzunluğunda ve ortalama 2,5 nm kalınlığındadır. Flagella, ucunda flagella kılıfının uzamasının göstergesi olan, karakteristik, ampül şeklinde şişkinlikler ('terminal bulp') bulunur. Flagella kılıfı, tipik çift katlı membran yapısı gibidir. Bu kılıf Helicobacter cinsini Campylobacter'den ayıran önemli bir yapıdır (Dunn ve ark., 1997).

Helikal formdaki bakteri, besin yetersizliği, artan oksijen miktarı, alkalin pH, yüksek sıcaklık, farklı antibiyotiklere maruz kalma ve kültürde uzun süre kalma gibi nedenlerden dolayı kokoid forma döner. Bakterinin kokoid forma dönme aşamaları şekil 1.1, A, B, C, D, E'de gösterilmiştir. Elektron mikroskobu ile bakıldığında, kokoid formlar U şeklinde ve iki kolu membran yapıyla birleşmiş haldedir (Şekil 1.1-D). Kokoid formlar metabolik olarak aktiftir ancak *invitro* ortamda kültürü yapılamaz. Bazı literatürler bakterinin bu 5-20 gün kültüre edilmiş kokoid formunun *invitro* ortamda tekrar kültüre edilemeyeceğini belirtmiştir (Brenciaglia ve ark., 2000). Ancak bakterinin kokoid formu membranı ve polifosfat enerji kaynakları bulundurması bakımından canlı olarak kabul edilir (Benaissa ve ark. 1996; Sorberg ve ark., 1996; Brenciaglia ve ark., 2000). Aynı zamanda bakterinin bu formunun

enfeksiyonun transmisyonundan ve antimikrobiyal tedavi nüksünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Brenciaglia ve ark., 2000).



Şekil 1.1: *H. pylori*'nin basil formundan tamamen kokoid forma dönüşmesi. A: 2 günlük *H. pylori* kültürüdür. Basil formadan kokoid forma dönüşmeye başlamaktadır, ok işareti yoğun periplasmik materyali gösterir. B: 3 günlük *H. pylori* kültürüdür. Yoğun materyali periplasmik boşluğa toplar. C: 4 günlük *H. pylori* kültürüdür. İçeri doğru eğilmiş basil formudur. Bu form, basil ve kokoid formun tam aradaki basamağıdır. D: Protoplazmik silindir değişmeye başlar. E: 7 günlük *H. pylori* kültürüdür. Tamamen kokoid forma dönüşmüştür (Benaïssa ve ark., 1996).

1.3. *Helicobacter pylori* 'nin Epidemiyolojisi

H. pylori enfeksiyonuna bağlı gastrit dünyada en sık rastlanan gastrointestinal hastalıktır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde oldukça yaygındır. Batı'da gelişmiş ülkelerde enfeksiyon oranı düşmekte, fakat yine prevelans %25-50 civarında görülmektedir (Dunn ve ark., 1997). Yüksek görülme sıklığına karşın, *H. pylori* ile enfekte olan hastaların çoğu asemptomatiktir (Blaser ve ark., 1997). Ülkemiz de, gelişmekte olan bir ülke olup *H. pylori* hemen hemen tüm toplumu enfekte etmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 2 yaşındaki çocukların % 14'ünün, 7 yaşındakilerin %76'sinin, 22 yaşındakilerin, %72'sinin, yetişkinlerin ise %85-90'ının *H. pylori* ile enfekte olduğu görülmüştür (Özden ve ark., 1992).

1.3.1. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Kaynağı

- **Su:** *H. pylori*'nin suda saptanması için yapılan bir çok çalışma vardır (Park ve ark., 2001; Mazari-Hiriart ve ark., 2001; Horiuchi ve ark., 2001; Lu ve ark., 2002). Üç ayrı çalışmada çeşitli yöntemler kullanılarak bir ya da daha fazla su kaynağında *H. pylori* DNA'sı gösterilmiştir. Bunlar; 1) Japonya'da kuyu suyunda (Horiuchi ve ark., 2001), 2) İskoçya'daki belediyeye ait su dağıtma sisteminden alınan içme suyunda (Park ve ark., 2001), 3) Mexico-City'nin etrafını çevreleyen 3 farklı su dağıtma sisteminde yapılan çalışmalardır (Mazari-Hiriart ve ark.,2001). Ancak tek bir çalışmada sudan *H. pylori* kültürü yapılabilmiştir. Bu çalışmada Mexico'daki işlenmiş atık su kanalından uzun işlemlerden sonra *H. pylori* izole edilmiştir (Lu ve ark., 2002). Bu çalışmada, mikroskobik incelemeler, katalaz, oksidaz ve hızlı üreaz testleri sonucunda 37 farklı tip *H. pylori* izolatı tanımlanmıştır.

- **Çevresel Kaynaklar:** Poms ve ark. (2001) tarafından *H. pylori*'nin yiyeceklerde +4 °C 'de canlı kalabileceği gösterilmiştir. Ancak canlı olarak *H. pylori* hücrelerinin görüldüğü yiyeceklerde ve tekrar izolasyonu mümkün olan süt, salatalık, tavuk gibi yiyeceklerde *H. pylori*'nin artışı gözlenmemiştir.

- **Hayvanlar:** Hayvanlar ile yakın temas ve enfeksiyonun kazanımı arasındaki ilişkiyi gösteren pek çok çalışma vardır (Brown ve ark., 2001; Bazolli ve ark., 2001; Herbart ve ark., 2001). Brown ve ark.'nın Çin'de yaptığı geniş populasyonlu (n=3288) bir çalışmada, evcil hayvan beslemenin ya da hayvanlarla çalışmanın, *H. pylori* enfeksiyonunu artırmadığı gözlenmiştir (Brown ve ark., 2001). Bazolli ve ark.'nın (2001) yaptığı çalışmada da , evcil hayvanlara maruz kalmanın *H. pylori* enfeksiyonuna bir etkisi olmadığı gösterilmiş, yani ikisi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak Almanya'da evcil hemsterlarla yapılan bir çalışmada enfeksiyon riskinin arttığı gözlenmiştir. Herbart ve ark. (2001) ise, koyun ve koyun sütünün *H. pylori* transmisyonunda rol oynayabileceğini göstermiş ve sütten başarılı bir *H. pylori* izolasyonu yapmıştır.

1.3.2. *Helicobacter pylori*'nin Görülme Sıklığı

H. pylori'nin görülme sıklığı ülkeler arasında ve ülke içinde, sosyoekonomik düzey ve yaş gruplarıyla ilişkili olarak farklılık gösterir (Mitchell ve ark., 2002).

H. pylori enfeksiyonunun çocukluk döneminde kazanıldığı oldukça iyi bilinmesine karşın tam bir yaş bilinmemektedir. Malaty ve ark. (2001), 224 Amerika'lı çocukta yaptığı araştırmada, *H. pylori* prevelansı 1-3 yaşlarında %8 iken, 18-23 yaşları arasında bu oran %24.5'e çıktığını göstermiştir. Buna göre, görülme sıklığının yaşa paralel olarak arttığı düşünülmektedir.

Ülkenin sosyoekonomik durumu *H. pylori* enfeksiyonunun görülme sıklığı açısından oldukça büyük önem taşır. Gelişmiş ülkelerde sosyoekonomik düzeyin yüksek olması enfeksiyonun yeni kuşaklarda azalmasına yol açmıştır. Bir çok gelişmiş ülkede, *H. pylori* enfeksiyonu, son yıllarda belirgin bir şekilde düşmektedir. Rehnberg ve ark. 'nın (2001) Finlandiya'da yaptığı bir çalışmada, 1963-1973, 1983-1995 yılları arasında ki dönemde *H. pylori* enfeksiyonunda, %38'den % 12'ye bir düşüş gözlenmiştir .

1.3.3. *Helicobacter pylori* Transmisyonu

İnsan dışındaki canlılardan *H. pylori* izole edilememesinden dolayı en sık görülen transmisyon modelinin insandan insana geçiş olduğu düşünülmektedir. *H. pylori*'nin bir bireyin midesinden, diğer bireyin midesine geçiş yolları ile ilgili çeşitli görüşler vardır:

- **İyatrojenik transmisyon:** Dezenfekte olmamış endoskoplar ve gastrik mukozaya temas eden diğer ekipmanlar bir bireyden diğer bireye geçişe neden olur. Eldivensiz endoskopi yapanlar da yüksek oranda risk altındadır. Bu organizmaya dokunmanın risk olmadığı bilinmektedir ancak yine de laboratuarların bu konuda titizlik göstermesi gerekmektedir (Mitchell ve ark., 2002).

- **Fekal-oral transmisyon:** En önemlisi fekal-oral transmisyondur. *H. pylori* ile enfekte insanların feçesinde *H. pylori* saptanabilmektedir. Fekal yolla kontamine olan sular enfeksiyon kaynağıdır (Thomas ve ark., 1992).

Aile içi ve aileler arası transmisyon: *H. pylori*'nin aile içinde ve aileler arasında transmisyonunun olabileceğine dair pek çok çalışma vardır (Daugule ve ark.,2001; Taneike ve ark., 2001; Dore ve ark., 2001; Miyazaki ve ark., 2002). *H. pylori* enfeksiyonun aile içinde bulaşabileceği Taneike ve ark. (2001) tarafından kanıtlanmıştır. Japon ailesi ile yapılan çalışmada anne, baba ve iki çocuktan alınan biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* izolatlarıyla 'ribotyping' yapılmıştır. Birinci çocuk ve babanın aynı suşla enfekte olduğu, ikinci çocukla annenin farklı suşlarla enfekte olduğu görülmüştür. Baba ve çocuklara *H. pylori* tedavisi uygulandıktan 7 hafta sonra *H. pylori* negatifleşmiştir. 36 hafta sonra 1. çocuğun tekrar enfekte olduğu görülmüş ve buna 'ribotyping' yapıldığında anne ile aynı *H. pylori* suşuna sahip olduğu anlaşılmıştır.

- **Horizontal transmisyon:** Malaty ve ark., (2001) ve Kitagawa ve ark. (2001) emzirme ile *H. pylori* transmisyonu arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Malaty ve ark emzirmenin bulaşmada önemli rol oynadığını gösterirken, Kitagawa ve ark. (2001) emzirmenin temizlik kurallarına uygun olarak yapıldığında (el ve göğüs uçları temizlendiğinde) bulaşmanın olmayacağını

göstermiştir. Ancak horizontal transferin, temizlik kurallarına uygun olarak yapılmadığında ortaya çıktığını göstermiştir.

H. pylori'yi feçesden ve ağızdan kültüre edebilmek için yapılan pek çok çalışma olmasına karşın çok az bir kısmında başarılı olunmuştur. Allaker ve ark. (2002), 100 İngiliz çocuktan aldıkları mide suyu, oral, rektal ve dental plak örnekleri ile çalışmıştır. *H. pylori*, 3 çocukta mide sıvısından kültüre edilirken, ağızdan, feçesden ve dental plaktan alınan örneklerde kültüre edilememiştir. Ancak *H. pylori* DNA'sı 11 çocuğun mide sıvısından, 36 çocuğun dental plağından, 23 çocuğun ağzından ve 8 çocuğunda feçesinden PCR ile saptanmıştır. Dental plak ve mide sıvısında PCR ile saptanan *H. pylori* ile midedeki *H. pylori*'nin varlığı arasında ilişki bulunmuş ancak oral ve fekal örnekler için aynı ilişki bulunamamıştır. Bunun nedeninin de PCR'da kullanılan primerlerin spesifitesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Şahin ve ark. (2001) ise mide biyopsi örneklerinde *H. pylori* DNA'sı pozitif olduğu bilinen Türk hastalarında diş plağından *H. pylori* izole edememişlerdir.

1.3.4. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Nüksü

Başarılı bir *H. pylori* eradikasyonundan sonra nüks oranı gelişmiş ülkelerde düşük oranda görülürken, gelişmemiş ülkelerde durum farklıdır. Duodenal ülserli 105 Bangladeşli hastayla yapılan bir çalışmada başarılı bir eradikasyondan sonra hastalar takip edilmiş ve nüks oranına bakılmıştır. Buna göre yılda %13 oranında nükse rastlanmıştır ki bu oran da gelişmiş ülkelerden daha yüksektir (Honda ve ark., 2001).

1.4. *Helicobacter pylori*'nin Gastrointestinal Sistem Hastalıkları ile İlişkisi

H. pylori enfeksiyonunun peptik ve duodenal ülser, kronik atrofik gastrit ile birlikte mide lenfoması (MALT lenfoması= mucosa associated lymphoid tissue tumors= MALToma) ve mide kanseri ile ilişkisi bilinmektedir (Sipponen, 1991; Marshall, 1994). Duodenal ülserli ve mide lenfomalı hastaların

%95'inde *H. pylori* pozitif iken, gastrik ülserlerde bu oran %65-75, mide kanserinde ise %60-80'dır. *H. pylori* eradikasyonunun yapılmasından sonra bu komplikasyonların azalması *H. pylori*'nin bu hastalıklardaki etyolojik rolünü destekleyen en belirgin kanıttır (Namura ve ark.,1994).

1.4.1. Cag Patojenite Adası (cag PAI), CagA, VacA ve iceA Genleri'nin Duodenal Ülser ve Mide Kanseri ile İlişkisi

1.4.1.1. Cag PAI ve CagA

H. pylori'nin bazı suşlarıyla uzun süreli enfeksiyon, gastritin ve peptik ülserin temel nedenini ve gastrik kanserin risk faktörünü oluştururken, bazı *H. pylori* enfeksiyonlarında semptom görülmemektedir. (Labigne and de Reuse, 1996; Dunn ve ark., 1997). İşte bu farklılığın nedeni tam olarak bilinmese de, bununla ilgili 3 temel görüş vardır:

- Konakçı Faktörleri: Konakçıdaki HLA sistemi ve Lewis Antijen Reseptörleri.
- Çevre Faktörleri: Sigara kullanımı, yiyecekler.
- Patojen Faktörü: Enfekte suşun farklı virülans faktörleri.

H. pylori oldukça çeşitlilik gösteren bir türdür ve suşlar arasındaki genetik farklılıkların, enfeksiyonun klinik etkisini açıkladığı bilinmektedir (Atherton ve ark., 1997).

Patojeniteyle ilişkili bazı *H. pylori* genleri tanımlanmıştır (Blaser, 1997). Bunlardan en sık çalışılanları cagA, vacA ile birlikte son yıllarda sık çalışılan iceA genidir (Nicolaas ve ark., 2001).

Peptik ülserli veya mide kanserli hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarının çoğunun cagA (cytotoxin associated gene) geni taşıdığı saptanmıştır. Yani cagA'nin peptik ülser ve gastrik kanserle yakından ilişkisi olduğu bilinmektedir (Peek ve ark.,1995; Akopyants ve ark., 1998; Graham ve ark., 1998).

CagA geni, fonksiyonu bilinmeyen bir immün baskılayıcı protein kodlar. CagA, *H. pylori* için tek başına bir virulans faktörü değildir. Sitotoksine yardımcı bir toksin olarak görev yapar. Asemptomatik olarak *H. pylori* ile enfekte hastaların çoğu bu genden yoksundur. CagA geni yaklaşık 37kb'lık bir DNA segmenti olan cag PAI (cag patojenite adası)' nın sağ ucunda bulunur. Cag PAI NCTC11638 suşunda 'transposable element' girişi ile ikiye bölünür. Cag PAI gen içeriği ve düzenlenmesi bakımından suşlar arasında korunmuştur (Akopyants ve ark., 1998).

CagA pozitif suşlar, cagA negatif suşların tersi olarak, enfekte olmuş konakçının dokusundaki, potansiyel hasar verici inflamatuar cevabı tetiklediği ve proinflamatuar sitokin olan IL-8'in mide biyopsilerinde ve hücre kültürlerinde sentezini artırdığı görülmüştür (Crabtree ve ark., 1994). Ancak cagA, kendisi indükleme olayı için gerekli değildir. Kromozomda yürüme ve mutasyon deneyleri, cagA geninin geri bölgesindeki ('upstream'inde ki) genlerin, IL-8 indüksiyonu için gerekli olduğunu göstermiştir (Akopyants ve ark., 1998).

1.4.1.2. VacA Geni

VacA geni, vakolule edici sitotoksin üretiminden sorumlu gendir (Nicolaas ve ark., 2001). Her suşta bu gen bulunmasına karşın, bu suşların ancak % 50'sinin aktif toksin ürettiği saptanmıştır (Cover, 1996). Bu da, vacA geninin, sinyal (s) ya da orta (m) bölgesindeki diziye bağlıdır. VacA geninin, amino ucu sinyal bölgesi (signal-s) ve orta (middle-m) bölgesinin nükleotit dizilerine göre farklı allelik varyantları tanımlanmıştır (Nicolas ve ark., 2001). S bölgesi s1a, s2b, s1c veya s2 allellerinden birini içerirken, m bölgesi ise m1, m2a, m2b allellerinden birini içermektedir. Bu farklı s ve m allelleri, suşlar arasında rekombinasyonla bir araya gelerek s1m1, s1m2, s2m2 ve s2m1 genotiplerini oluşturur. Çalışmalar vacA s1m1 suşlarının büyük miktarlarda vakuole edici sitotoksin ürettiğini ve suşların da peptik ülser hastalığı ile ilişkisi olduğunu göstermiştir (van Doorn ve ark., 1998). Diğer taraftan s2m2 suşlarının, sitotoksini ya hiç üretmediği ya da oldukça küçük miktarlarda ürettiği

görülmüştür. Bunun da peptik ülserli hastalarda yaygın olmadığı saptanmıştır (Atherton ve ark., 1995).

VacA geni, 140 kDa'lık oligomerik yapıda bir protoksin sentezler. Bu protoksin asidik pH'da lizise uğrayarak, 37 ve 58 kDa'luk aktif parçaları oluşturur. Bu toksin sitozolde vakuoler tip ATPaz proton pompasını aktive ederek, ozmotik olarak zayıf bazların endozomlara göçünü ve endozomların da nükleus etrafında birleşerek büyük asidik, vakuoller oluşturmalarını sağlar. Aşırı miktarda hücre içine alınan toksin hücre ölümüne yol açar (Cover ve ark.,1992).

1.4.1.3. IceA Geni

H. pylori ile enfekte hastaların bazılarında vacA ve cagA genotipleri bulunmasına karşın semptom göstermemektedir. Bu da virulansda ek genlerin olduğunu düşündürmüştür. Peek ve ark. (1998), bu düşünce ile yola çıkarak başka virulans genleri aramaya başladılar. Peek ve ark. mide epiteline adheransın, bazı virulans genlerin ekspresyonunu indüklediğini düşündüler. Bu nedenle, tutunma ile indüklenen *H. pylori* genlerinin ekspresyonunu açıklamak ve genlerin peptik ülser, mukozal interlökin (IL8) düzeyi ve inflamasyonu ile ilişkisine bakmak için, mide epitel hücreleriyle maruz kalan ve kalmayan suşlardan elde edilen RNA'ların ekpresyonuna baktılar. Böylece ilk defa Peek ve ark. tarafından *H. pylori* klinik izolatlarında, mide biyopsilerindeki inflamasyon ve IL-8 ile ilişkisi olan yeni bir gen tanımlandı. IceA geni ('induced by contact with epithelium') olarak tanımlanan bu genin DNA dizisine bakıldığında iceA1 ve iceA2 olmak üzere 2 gen ailesi olduğu görüldü. Bu genlerin de peptik ülser ve mukozada artmış IL-8 konsantrasyonu ile ilişkisi anlamlı bulundu. IceA1 ve iceA2'nin *invitro* ortamda *H. pylori* tarafından eksprese edildiği görüldü. *İnvitro* ortamda ise mide epitel hücrelerine adheransın, *H. pylori*'nin iceA geninin transkripsiyonunu uyardığı görülmüştür. IceA geninin, iceA1 ve iceA2 olmak üzere 2 gen ailesi olmasına karşın, yalnız iceA1'in mide epiteli ile teması sonucu uyarıldığı gösterildi ve peptik ülserle ilişkisi bulundu. IceA2'nin ise

non-ülser dispepsi'li hastalarda daha sık görüldüğü bilinmektedir (Peek ve ark., 1998).

Peek ve ark., 1998'de iceA genini tanımladıktan sonra Figueiredo ve ark. (2000), farklı coğrafik bölgelerden alınan 19 farklı *H. pylori* suşunun iceA1 ve iceA2 geni dizi çözümlemesini yaptı. Buna göre iceA1 geni, 315-397 bç arasında değişen uzunlukta varyantlara sahiptir ve G+C içeriği ise % 36'dır. Aynı suşlarda iceA2 genine bakıldığında ise iceA1'e göre daha kompleks olduğu görüldü. IceA2'nin uzunluğu iceA1'de olduğu gibi oldukça çeşitlilik göstermekte (224-338 bç) ve farklı olarak 8bç'lik (AAAATACTC veya AAATACTT) değişken sayıdaki ardışık tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats=VNTR) içermektedir. Bu VNTR bölgelerinin 1 kopya dan 15 kopyaya kadar tekrar ettiği gözlenmiştir. IceA2'nin G+C içeriği ise %33 olarak saptanmıştır. IceA bölgesinin G+C içeriğinin *H. pylori* genomunun G+C içeriğinden daha düşük olması nedeniyle, bu genlerin horizontal transferle başka bakteri türlerinden aktarıldığı ya da nadir görülen diğer *H. pylori* suşlarından aktarıldığı düşünülmektedir (Figuerido ve ark., 2000).

IceA1 proteinin doğru biyolojik fonksiyonu net olarak bilinmemektedir. Ancak daha önceki çalışmalarda, mutant iceA1 geninin maymun modelinde midede kolonize olmazken, yaban tip iceA1 suşunun maymun midesinde uzun süreli kolonizasyonu gözlenmiştir (Dubois ve ark. 1996).

IceA genotiplerinin gastrik hastalıklarla ilişkisini araştırmak amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır (Nishiya ve ark., 2000; Ashour ve ark., 2001; Kidd ve ark., 2001; Figueiredo ve ark., 2001; Godoy ve ark., 2003, Ribeiro ve ark., 2003). Bazı araştırmacılar iceA genotiplerinin peptik ülser, gastrit, mide kanseri gibi gastrik hastalıklarla ilişkili bulurken (Kidd ve ark., 2001), bazılarıda iceA genotipleriyle hiçbir gastrik hastalık arasında ilişki bulamamıştır (Yamaoka ve ark, 1999, Nishiya ve ark. 2000, Ashour ve ark. 2001, Figueiredo ve ark., 2001, Godoy ve ark., 2003, Ribeiro ve ark., 2003).

1.5 .Helicobacter pylori Genomu ve Çeşitlilik

1.5.1. *Helicobacter pylori* Genomu

İlk defa 1997'de Tomb ve ark.'nın, *H. pylori* 26695 suşunun tüm genomunun dizi çözümlemesini yapması ile *H. pylori* biyolojisi hakkında, 1998'de Honcock ve ark. 'nın *H. pylori* J99 suşunun dizi analizini yapması ile de çeşitliliği hakkında önemli bilgiler edinilmiştir. Daha sonra da *H. pylori* çeşitliliği ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Kuipers ve ark., 2000, Blaser, 1997, Blaser ve Berg, 2001, İsrael ve ark., 2001).

İlk genom dizi çözümlemesi yapılan Hp 26695 suşu genomunun genel özelliklerine bakacak olursak; suş 1,667,867 bç'lik halkasal bir kromozoma sahiptir. G+C kompozisyonu bakımından 5 farklı bölgesi bulunur. 452-478 kb'lar arasında bulunan 1.bölge (%33 G+C) IS 605 insersiyon dizisi kopyası, 521 bç'lik bir tekrar bölgesi, 5SRNA geni ve virB4 geni içerir. virB4 geni, *Agrobacterium tumefaciens'* de T-DNA'nın transferinden sorumlu bir proteini kodlayan gendir. *H. pylori*'de IS 605 ve IS606 olmak üzere 2 farklı IS elementi vardır. IS606, IS605 ile %50'den daha az benzerlik gösterir. IS605'de 5 tane tüm uzunluklu (full length), daha sonra bulunan IS606'da ise buna ek olarak 2 tane parçalı uzunluklu kopyalar bulunur. Her ikisi de farklı transkripsiyon ürünleri olan TnpA ve TnpB transpozonlarını kodlar. 539-579 kb'lar arasında bulunan 2.bölgede (%35 G+C) peptik ülserle ilişkili gen olan cag PAI bulunur. 1,049-1,071 kb'lar arasında bulunan 3.bölge, 1.bölgeye benzer olarak IS605, 5SRNA ve 7 tekrar dizisi içerir. G+C içeriği %43 olan, 1,264-1,276 kb'lar arasında bulunan 4.bölge, RNA polimerazın alt birimi olan β ve β' alt üniteleri kodlayan rpoB ve rpoC genlerinden oluşur. FusA geni de bu bölgededir. FusA geni, translasyon uzama faktörü olan EF-G faktörünü kodlar. Son olarak 5. bölge (%33 G+C) de 2 restriksiyon-modifikasyon sistemi içermektedir. *H. pylori* DNA'da benzerliği %97 den büyük olan 8 tekrar ailesi bulunur. Bunlar gen duplikasyonlarının temsil edildiği bölgelerde veya kodlanan dizilerde bulunurlar.

Tomb ve ark. (1997), *H. pylori* 26695 suşu kromozomunun, %91'ini oluşturan 1.590 açık okuma alanı (open reading frame=ORF)

tanımlamışlardır. 26695 suşundaki %9 oranındaki kodlanmayan bölge 3 sınıfa ayrılır. Kodlanmayan bölgenin %6'sı intergenik dizi, %2.3'ü kodlanmayan tekrarlar, %0.7 stabil RNA dan oluşur. 1.590 ORF'den 1.091 'inin diğer organizmalardaki karşılığı bulunmuştur ve tahmini biyolojik rolleri anlaşılmıştır. Geriye kalan 499 ORF'nin ise veritabanında karşılığı bulunamamıştır. Bunların da *H. pylori*'ye özgül olduğu düşünülmüştür.

H. pylori'deki öncül proteinlerin izoelektrik noktasına bakıldığında, proteinlerin %70'inin, pI >7 (pI: Bir aminoasitin elektriksel olarak nötral olduğu pH'dır.) olduğu görülmektedir. Bu oran *H.influenza* ve *E.coli* ile de %40'dır. *H. pylori* proteinlerinde *H.influenza* ve *E.coli* proteinlerinin 2 kat fazlası kadar temel aminoastilerden bazik aminoasit olan arjinin ve lizin içerirler. Bunun da *H. pylori*'nin mide asiditesine adaptasyon için olduğu düşünülmektedir (Thomb ve ark., 1997).

1.5.2. *Helicobacter pylori* Çeşitliliği

H. pylori insan mide mukozasında uzun zamandır bulunan yüksek genomik çeşitliliğe sahip bir organizmadır. Ancak bu varyasyonun orijini bilinmemektedir. 300 milyon yıllık zamanda omurgalı evrimine bakıldığında midenin yüksek korunumlu olduğu ve Helicobacter benzeri organizmaların geniş bir filogenetik dağılımda bulunduğu görülmektedir. *H. pylori* yüksek prevelansına karşın çok az hastalık yapıcı bir organizmadır. Bu kanıtlara dayanarak ve insan midesi analizi çalışmalarından da anlaşıldığı kadarı ile *H. pylori* ve atalarının çok uzun zamandır (≤400 milyon yıl) omurgalı midesinde yaşadığını düşünülmektedir (Blaser, 1997; Kuipers ve ark. 2000).

H. pylori ile enfekte bireylerde, kronik gastrit, peptik ülser, lenfoma, gastrik karsinoma gibi çeşitli hastalıkların oluşması konak genetik faktörleriyle birlikte çevresel faktörlere ve tabiki patojenin özgül özelliklerine de bağlıdır. Örneğin vacA s1a ve iceA1 genlerine ve cag patojenite adasına sahip (cag+) suşla enfekte bir birey, vacA ve iceA'nın farklı allellerini ve cag patojenite adasını taşımayan bir suşla enfekte bireye göre duodenal ülser olma riski

daha fazladır (Blaser, 1998). Bu nedenle *H. pylori*'nin populasyondaki çeşitliliğini, heterojenitesini bilmek önemlidir.

H. pylori'nin genetik çeşitliliği pek çok araştırmanın odak noktası olmuştur. Suşlarda ki bu çeşitliliğin nedenleri ise şöyle sıralanabilir;

- Korunmamış genlerin varlığı (cag bölgesi) (Kuipers ve ark., 2000),
- Korunmuş bölgelerde meydana gelen nokta mutasyonları (ureC geni) (Kuipers ve ark., 2000),
- İnsersiyon elementlerin varlığı (cag PAI),
- Plazmidlerin varlığı (*H. pylori* suşlarının %35-75'i plazmide sahiptir) (Marais ve ark, 1999),
- İnsersiyon dizisinin bulunması (IS 605 ve IS606'nın *H. pylori* suşlarının 1/3'ünde bulunmaktadır) (Marais ve ark, 1999),
- Gen mozaikliği (örnek, vacA geni),
- Gen boyu heterojenikliği (*H. pylori* 26695 de genom uzunluğu 1,667,867 bç iken J99 suşu genom uzunluğu 1,643,837 bç dir) (Alm ve ark., 1999),
- Genom sırası ve kromozomal tekrar düzenlemeler (Gen haritası tekrar düzenlenmesi de denir. *E.coli* gibi bazı organizmalarda kromozomdaki gen sırası suşlar arasında sabit olmasına rağmen, *H. pylori*'de suştan suşa bu sıra oldukça çeşitlilik göstermektedir.) (Jiang ve ark., 1996),
- Doğal kompotent olması (Ortamdaki serbest DNA'yı hücre konjugasyon benzeri bir mekanizmayla hücre içine alır ve böylece transforme olabilir) (Blaser, 1997).

Bakterilerde çeşitlilik 2 farklı düzeyde analiz edilebilir. Birincisi, kökeni farklı bireyler olan suşlar arasındaki genomik varyasyon, ikincisi ise tek bir bireydeki populasyon varyasyonları analizidir.

Başta restriksiyon endonükleaz kesimi ve restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi olmak üzere pek çok tekniklerle yapılan çalışmalarda *H. pylori* suşlarının genetik düzeyde yüksek çeşitliliğe sahip olduğu gösterilmiştir

(Blaser, 1997; Kuipers ve ark., 2000; Blaser ve Berg, 2001; İsrael ve ark., 2001). Go ve ark. (1996) yaptığı çalışmada bu gözlemleri doğruladı ve *H. pylori*'nin diğer 11 patojenden daha çeşitli olduğunu gösterdi.

Kuipers ve ark. (2000)'nın yaptığı bir çalışmada, 7-10 yıl boyunca 13 hastadaki suşların cagA, vacA, iceA, IS605 genleri analiz edilerek *H. pylori*'nin konakta uzun süreli kolonizasyonu sonucu genetik değişime uğrayabileceğini gösterildi. Konakta bulunan tek bir suş, uzun zaman süreci içinde genetik varyantlarını ("quasispecies") oluşturabilir. Böylece midenin değişen ortamına uyum sağlayabilen organizmalar oluşur. İşte bu organizmalar mide ortamında varlıklarını devam ettirmiş olurlar. Bu olayın 2 nedeni vardır. Varyasyonun gelişmesi ve seçilim yeni konağa adaptasyonu sağlar böylece başarılı bir kolonizasyon sağlanır. Varyasyonun gelişmesi, biri asit üreten korpus diğeri asit üretmeyen antrum olan midenin 2 farklı bölgesine organizmanın adaptasyonunu sağlar. Bu bölgelerdeki ortam değişebilir. Örneğin atrofik gastritten dolayı asit üretimi azalır. Genetik değişim ve konak seleksiyonu antibiyotik direncinin gelişmesinde de oldukça önemlidir. Ayrıca bu genetik değişim ve seçilim helicobacter türlerinin atalarının farklı memelilere adaptasyonunu da sağlamıştır.

1.6. *Helicobacter pylori* Tedavisi

H. pylori, aktif kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik kanser gelişmesinde önemli etiolojik rolü olan bir patojendir. *H. pylori* aynı zamanda MALT'a (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) neden olur (Sipponen, 1991; Marshall, 1994). İlk defa 1994'de IARC (International Agency for Research on Cancer) tarafından *H. pylori*, 1.sınıf karsinojen olarak açıklanmıştır. Bu nedenlerden dolayı *H. pylori* tedavisi önem taşımaktadır.

H. pylori'nin eradikasyonunun, peptik ülser nüks oranını düşürdüğü gözlenmiştir (NIH Concensus Conference, 1994). Eradikasyon tanımı ilk defa 1989'da Rauws tarafından yapıldı. Buna göre eradikasyon; tedavinin bitiminden en az 4 hafta sonra bakterinin aynı tanı yöntemleri (en az 2

yöntem ile) görülmemesidir. Klirens ise; tedavinin bitiminden hemen sonra mikroorganizmanın histolojik veya mikrobiyolojik olarak gösterilememesidir.

Bazı araştırmacılar semptomu olsun ya da olmasın, *H. pylori* ile enfekte tüm bireylerin tedavi edilmesi gerektiğini öngörmektedir. Ancak *H. pylori* ile enfekte tüm insanların sadece %20'sinde klinik semptomlara rastlanmaktadır. Bu nedenle *H. pylori* ile enfekte olan bazı bireylerin (peptik ülser hastalığı ve gastrik MALToma'sı olanlar) kesin olarak tedavisi önerilmiş, bazı bireylerin (aile öyküsünde mide kanseri olanlar uzun süreli asit baskılayıcı tedavi başlamadan önce, NSAID ilaçların uzun süreli kullanımına başlamadan önce, kronik atrofik gastritte, gastrik mukozal displazide) ise kesin olmamakla birlikte tedavisi önerilmiştir (NIH Consensus Conference, 1994).

H. pylori enfeksiyonunda, geniş spektrumlu penisilin türevleri (amoksisillin, ampisillin), nitrofuran türevleri (furazolidon, nitrofuantoin), tetrasiklinler (doksisklin, tetrasiklin), nitroimidazoller (metranidazol,tinidazol, ornidazol) makrolid ve linkosaminler (eritromisin, klaritromisin, roksitromisin) gibi pek çok antibiyotik seçeneği bulunmasına karşın en sık kullanılan antibiyotikler amoksisilin, tetrasiklin, metranidazol ve klaritromisindir. Ancak antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında eradikasyon oranları oldukça düşük olmaktadır. Bu nedenle bizmut tuzları, H_2 antagonistleri (ranitidin, ebrotidin vb.), proton pompa inhibitörleri kullanılır. Proton pompa inhibitörlerinin (omeprazol, pantoprazol, lansoprazol) *H. pylori*'ye karşı; diğer antibiyotiklerle sinerjitizm, amonyağın nötralize olmaması (ototoksite), artmış lokal antimikrobiyal konsantrasyon, pH'ın yükselmesi ile antibiyotiğin optimal etkisi, direkt antimikrobiyal etki (MIC omperazol: 50mg/l), güçlü anti-üreaz etki, konak immüniteye etki, bakteri metabolizmasının ve göçünün engellenmesi gibi etkilere sahiptir (Tygat, 1995). Bizmut tuzları (Kolloidaz Bizmut subsitrat, Bizmut Subsalisilat, Bizmut Subnitrat, Bizmut Galat, Bizmut Subkarbonat) *H. pylori*'nin epitel hücrelere adezyonunu bloke eder, bakteri membranının iç ve dış yüzeyinde birikerek bakterinin mukusdan ayrılıp lizisine neden olur, üreazı inhibe eder, mukozal proteinlere olan affinitelerinden dolayı oluşan polimer glikoprotein kompleksi, ülserli dokuyu kaplayarak asit pepsin aktivitesine karşı korur, HCO_3 sekresyonunu artırır,

prostoglandin sentezler. *H. pylori*'de en sık olarak kolloidaz bizmut subsitrat, daha az olarak bizmut subsalisilat kullanılmaktadır. Diğer bizmut tuzları *invitro* olarak etkili olmalarına rağmen, *invivo* ortamda yeterli eradikasyonu sağlayamamaktadır. Monoterapi ve ikili terapinin başarısızlığından dolayı üçlü tedavi kullanılmaktadır. Üçlü tedavide 2 antibiyotik ve anti-ülser bileşiği kullanılır. Günümüzde tüm dünya da geçerliliği olan en uygun tedavi amoksisilin, klaritromisin ve ranitidin bizmut sitrat veya proton pompa inhibitörlerinden oluşan üçlü tedavidir. Ancak FDA tarafından onaylanan ideal bir tedavi yoktur (Pounder ve ark. 1997).

Ancak bir çok antibiyotik *invitro* koşullarda bakteriyi en küçük miktarlarda (minimal inhibitor concentration=MIC) baskıladığı halde *invivo* koşullarda tam bir eradikasyon sağlanamamaktadır. Bunun nedenlerini şöyle sıralayabiliriz (Alarcon ve ark., 1999):

- Değişik pH'larda, özellikle asidik ortamda antibiyotiklerin stabilitelerinin sağlanamaması,
- Mukozada antibiyotiklerin yeterli yoğunlukta bulunamamaları ve sekrete edilmemeleri,
- Mukus tabakasının lümen ve epitel tarafındaki pH farklılıkları
- *H. pylori*'nin mukusun derin tabakalarına yerleşmesi,
- *H. pylori*'nin fiziksel ve kimyasal streslere karşı, morfoloji, metabolizma ve üreme özelliklerini değiştirerek kokoid forma dönüşmeleri.
- *H. pylori*'nin katalaz aktivitesi ve fagositozdan kurtulmasıdır.

1.7. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç

Direnç, bir mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanın öldürücü veya üremeyi engelleyici etkisinden korunabilme kapasitesidir.

1.7.1. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç Mekanizmaları

- **İlacın hedefine ulaşamaması:** Bu, ilacın hücre içine alınmasındaki azalmadan veya dışarı atılmasını çabuklaştıran aktif pompa sistemlerinden kaynaklanabilmektedir. Örneğin peptidoglikan tabaka, geniş aralıkları nedeni ile antibiyotiklerin bakteri hücresine girişine engel oluşturmaz. Ancak gram negatif bakterilerin dış zarı, antibiyotiklerin iç zara ulaşmasını engelleyebilir. Bu bakteri türlerinde antibiyotiklerin hücre içerisine girmesi dış zardaki porinler aracılığı ile gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle, dış zar yapısı tüm gram negatif bakterilerde gram pozitif olanlardan farklı bir avantaj sağlamaktadır. Bazı durumlarda, porin yapısındaki değişimler nedeni ile bunun iyice arttığı ve birden fazla antibiyotik sınıfına karşı direnç geliştiği de görülebilir. İlacın hücre içine girmemesi ile ilgili engeller çok kez doğal direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır. Buna karşın, antimikrobiyal ajana geçirgenliğin sonradan azalması genellikle membran porin proteinlerindeki değişimden kaynaklanır.

- **İlaç etkinliğini gideren enzimlerin üretimi:** Buna örnek olarak beta-laktamazlar verilebilir. Beta-laktamazlar, penisilin gibi antibiyotikleri kapsayan beta-laktam grubu ajanları hidrolize ederek direnç gelişimine yol açarlar. Ayrıca makrolid grubu ajanlara ve kloramfenikole dirence yol açan enzimler de bulunmaktadır.

- **İlacın bakteri hücresindeki hedefin değiştirilmesi:** Bu değişimlerin bazıları esas hedefte tek bir mutasyon ile, eskisinin hücresel işlevlerini sürdüren ancak, antimikrobiyal ajana bağlanma özelliği düşük bir hedefin yapılması ile ilgilidir. Buna örnek olarak *H. pylori*'nin ribozomal RNA genindeki bir nokta mutasyonu ile klaritromisine direnç kazanması verilebilir.

Hedef yapısındaki değişimler, kinolonlar, glikopeptidler, makrolidler, tetrasiklinler, rifampin ve mupirosine karşı gelişiminde de önemlidir.

- **İlacın hedefin dışında yeni bir metabolik yolun kullanımı:** Bazı bakteriler basit hedef değiştirmeden farklı olarak ilaca duyarlı hedefe gereksinimini kaldıracak yeni bir metabolik yol geliştirirler. Örneğin bakteri folatı sentez etmesi yerine ortamdan hazır alma özelliğini kazanması ile

trimetroprim ve sulfanomidler gibi folat antagonistlerine karşı direnç oluşturduğu izlenir (Ustaçelebi ve ark., 1998).

1.7.2. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç Genlerinin Kaynağı ve Yayılımı

Antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ve yayılımı ile ilgili 3 önemli faktör vardır:

- Sık rastlanan direnç genlerinde, etki spektrumlarını genişletecek mutasyonların oluşması.
- Mikroorganizmalar arasında transformasyon, transpozonlar, plazmidler ve konjugasyon aracılığı ile genetik bilgi aktarımı ve böylece direnç genlerinin yeni konaklara geçmesi: Direnç genlerinin bir kısmı bakteri kromozomunda bulunmasına karşın bir kısmı, hatta büyük çoğunluğu da bakterinin plazmidinde bulunur. Plazmidden, kromozomal DNA'ya, kromozomal DNA'dan da plazmide direnç genlerinin aktarımı söz konusudur. Transpozonlar (sıçrayıcı genler) da geniş konak özgüllükleri nedeni ile direnç genlerinin değişik türler arasında, türler içinde ve bir türün kromozomu içinde aktarımında görevlidirler. Konjugasyonda ise DNA parçasının konaktan konağa bir pilus yardımı ile aktarımı görülür. Ortamda serbest bulunan DNA'nın bakteri hücresine alınması (transformasyon) ile de direnç genleri aktarılabilmektedir.
- Hastaneler gibi dirençli mikroorganizmaların çoğalabileceği ortamlarda antibiyotik dezenfektanlarının seçici baskısı.

Direnç genlerinin kaynağına bakıldığında, direnç genlerinin doğada antimikrobiyal tedavi ile ilişkili olmaksızın bulunduğu görülmüştür. Çünkü, mikroorganizmaların kendilerini, ürettikleri antibakteriyellerden korumaları gerekmektedir. Ayrıca, antibiyotiklerin üretiminin, tıp alanına girmesinin ve örneğin hayvancılıkta sağaltım dışı kullanılmasının da direnç genleri taşıyan klonların seçilmesine neden olduğu kesindir. Yaygın antibiyotik kullanılması sonucunda dirençli bakteriler önce sağlıklı hayvanların floralarında

çoğalmakta sonra da su ve besin zinciri yolu ile insanlara aktarılmaktadır. Sağlıklı bireylerde dirençli bir bakterinin taşınması önemsiz gibi gözükmekle birlikte, infeksiyon oluştuğunda ciddi sorun yaratmaktadır (Ustaçelebi ve ar., 1998).

1.7.3. *Helicobacter pylori*'nin Antimikrobiyal Ajanlara Direnci

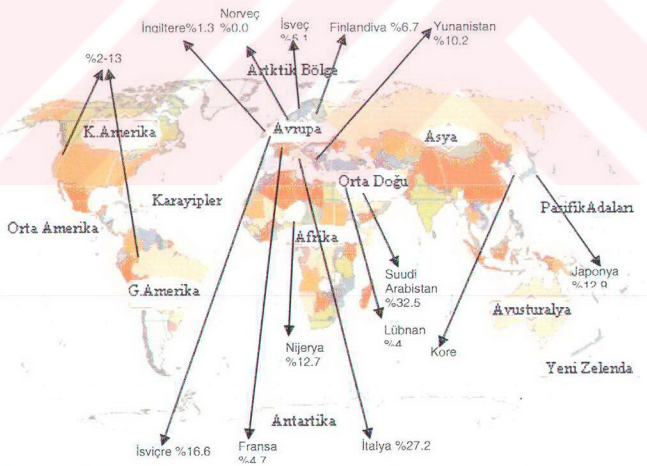
1.7.3.1.*Helicobacter pylori*'de Primer ve Sekonder Direnç

Primer yani doğal direnç, her suşun kromozomunda her zaman bulunur ve antibiyotik, hiçbir zaman bu bakteri enfeksiyonunun tedavisi için kullanılmaz. *H. pylori*, polimiksinlere, trimethoprime, sulfanomidlere ve vankomisine doğal dirençlidir. Sefsulodin ve antifugal gibi bileşiklere de bir çok *H. pylori* suşu dirençlidir. *H. pylori* suşları antimikrobiyal ajanlara duyarlı iken sonradan antibiyotikle temasa geçince dirençli hale geçebilir. Bu direnç kromozomal genlerdeki bir mutasyonla, kromozom dışı DNA kazanımı ya da transformasyonla olabilir yani, plazmidler ve transpozonlarla da yabancı DNA kazanılması olasıdır (Megraud, 1997). *H. pylori* izolatlarının % 35-75'inde plazmid bulunmasına karşın, plazmidlerin antibiyotik direnci içerdiğini kanıtlayan bir çalışma bulunmamaktadır (Wesblom ve ark., 1992). Herhangi bir antibiyotiğe dirençli *H. pylori*'nin zamanla transformasyon gibi mekanizmalarla duyarlı hale geçebileceği, duyarlı *H. pylori*'nin de dirençli hale geçebileceği öngörülmüştür (Galante ve ark., 2003).

1.7.3.2. *Helicobacter pylori*'nin Klaritromisine Direnci

Klaritromisin, *H. pylori* tedavisinde uygun farmokinetik özellikleri, düşük MIC değeri ve yüksek eradikasyon oranı nedeniyle sık kullanılan 14 karbon atomlu, makrolid grubu bir antibiyotiktir. Diğer anibiyotiklerle yapılan monoterapide eradikasyonda başarı oranı %10-15 iken, klaritromisinde monoterapide % 40-55, ikili tedavide %20-60, üçlü tedavide %90 a kadar çıkar. Klaritromisin *H. pylori* tedavisinde kullanılan en etkili antibiyotiktir (David ve ark., 1993).

- **Epidemiyolojisi:** Makrolidlere direnç sıklığı ülkeden ülkeye farklılık gösterir. Çeşitli ülkelerdeki *H. pylori*'nin klaritromisin direnci prevelansları şekil 1.2'de verilmiştir. Avrupa ülkelerinden İngiltere'de direnç oranı %1.3, İsveç'de %5.1, Finlandiya'da %6.7 iken Suudi Arabistanda %32.5, Lübnan'da %4 oranında klaritromisine direnç prevelansı gözlenmiştir. Bu farklılık, antimikrobiyal ajanın diğer enfeksiyonları tedavi için kullanımıyla ilişkilidir. Özellikle de solunum yolları enfeksiyonunda oldukça sık kullanılır. Örneğin, 1982'den beri solunum yolları enfeksiyonunda klaritromisin kullanılan bir ülke olan Fransa'da direnç prevelansı yüksekken, makrolidlerin oldukça nadir kullanıldığı Almanya'da bu oran oldukça düşüktür (Mégraud, 1997). Camau ve ark.'nın (1996), 680 izolatla yaptığı bir çalışmada, son 10 yıl boyunca (1985-1995) direnç prevelansının değişimine bakılmış, ancak belirgin bir artış saptanamamıştır. Yine benzer bir çalışma makrolidin yeni kullanılmaya başlandığı ülke olan Belçika 'da da yapılmıştır. Belçika'da direnç oranı 1992'den önce %1.7 iken, 1992'den sonra %10.5'e yükseldiği gözlenmiştir (Glupczynski ve ark., 1995).



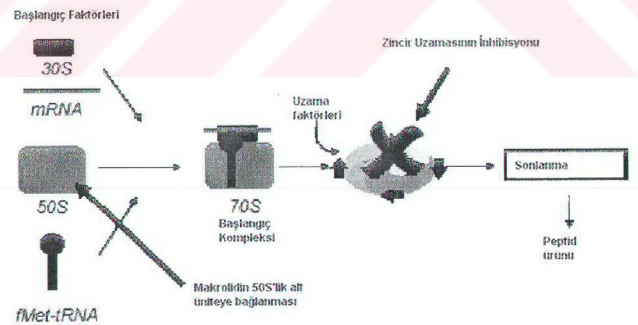
Şekil 1.2: Çeşitli ülkelerdeki *H. pylori*'nin klaritromisin direnci prevelansları.

- **Klaritromisin Direncinin Stabilliği:** Klaritromisin direnci, belli pasaj sayılarından sonra değişebilmekte yada aynen yani stabil olarak kalmaktadır. Klaritromisin direncinin stabilliği konusunda yapılan pek çok çalışma olmasına rağmen kesin bir sonuca varılamamıştır. Alarcon ve ark. (2000), tarafından yapılan bir çalışmada 10-18 pasajdan sonra direncin %10 oranında stabil olmadığını, Hulten ve ark. (1997) 50 pasajdan sonra direncin %100 stabil olduğunu, Ossenkopp ve ark. (1998), 21 pasajdan sonra direncin %10 stabil olduğunu, Xia ve ark. (1996), 2-5 pasajdan sonra direncin %45 stabil olduğunu gösterdi.

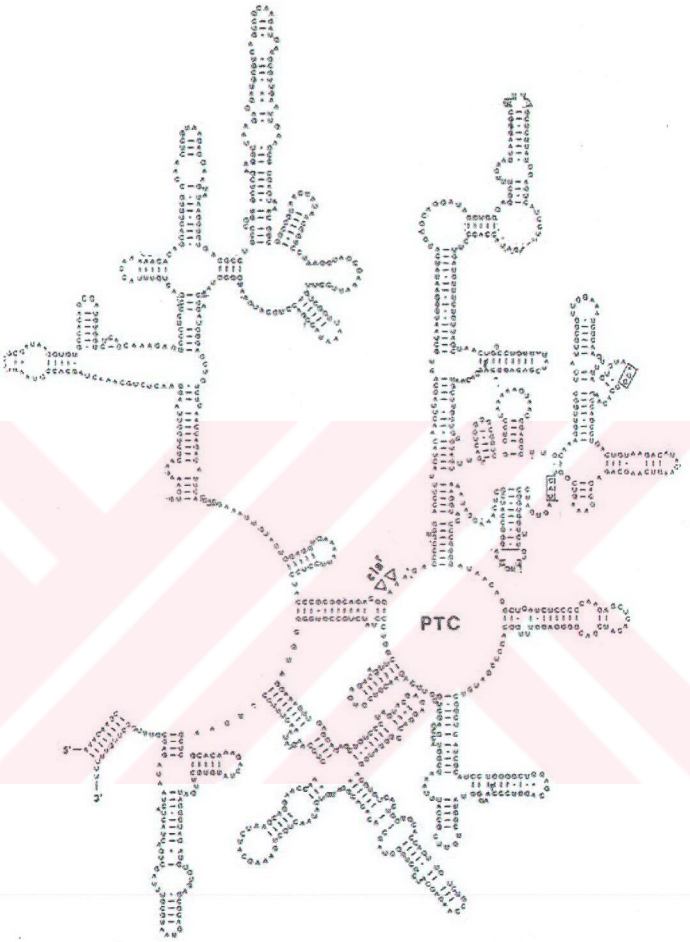
- **Klaritromisin direncinin mekanizması:** Makrolid grubu antibiyotikler bakteri ribozomuna etki ederler. 70S'lik prokaryotik ribozom; 50S'lik büyük alt birim ve 30S'lik küçük alt birimden meydana gelmiştir. 50S'lik büyük alt birim ise 23S'lik rRNA, 5S'lik rRNA ve 31 proteinden oluşmaktadır. 30S'lik küçük alt birim ise 16S'lik bir rRNA'dan ve 21 proteinden oluşur. Klaritromisin, normal koşullarda bakteri ribozomunun büyük alt birimi olan 50S'lik ribozomal RNA'ya bağlanarak protein sentezini inhibe eder (Versalovic ve ark., 1997). Bunu da protein sentezinin uzama basamağında peptidil-tRNA'nın ribozomdan ayrılmasını uyararak yapar (Şekil 1.3). Makrolidlerin hedef bölgesi olan 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesinin korunmuş bir bölgesi olan domain V'deki nokta mutasyonuyla modifikasyona uğraması sonucu bağlanma gerçekleşemez. 23S rRNA domainlerin primer ve sekonder yapısı şekil 1.3'de gösterilmiştir. Klaritromisin direncinin görüldüğü nükleotit pozisyonları 23S rRNA'nın domain V bölgesinde yer alır. İlk defa Versalovic ve ark. (1997) tarafından 23S rRNA genindeki 2143 ve 2144. pozisyondaki A→G mutasyonlarının klaritromisine dirençle ilişkili olduğu gösterilmiştir (şekil 1.4). Daha sonra bir çok çalışma 23S rRNA genindeki nokta mutasyonlarının klaritromisine dirençle ilişkisini desteklemiş ve yeni nokta mutasyonları eklemiştir (Taylor ve ark., 1997; Marais ve ark., 1999; Doorn ve ark., 1999; Garcia- Arata ve ark., 1999; Maeda ve ark., 2000; Ende ve ark., 2001; Owen ve ark. 2001; Chisholm ve ark., 2001; Kim ve ark., 2002).

23S rRNA'da tanımlanan başlıca mutasyonlar şunlardır:

- A2115G (Doorn ve ark., 1999; Ende ve ark., 2001; Doorn ve ark., 2001),
- G2141A (Doorn ve ark., 1999; Ende ve ark., 2001; Doorn ve ark., 2001),
- A2142G (Taylor ve ark., 1997; Doorn ve ark 1999; Garcia-Arata ve ark., 1999; Ende ve ark., 2001; Doorn ve ark., 2001; Owen ve ark., 2002)
- A2142C (Doorn ve ark., 1999; Ende ve ark., 2001; Doorn ve ark., 2001)
- A2143G (Versalovic ve ark., 1996; Taylor ve ark., 1997; Doorn ve ark., 1999; Garcia- Arata ve ark., 1999; Marais ve ark., 1999; Maeda ve ark., 2000; Ende ve ark., 2001; Chisholm ve ark., 2001; Owen ve ark., 2001;)
- A2143T (Doorn ve ark., 1999)
- A2143C (Ende ve ark., 2001; Chisholm ve ark., 2001; Doorn ve ark., 2001)
- A2144G (Versalovic ve ark.,1996; Occhialinni ve ark., 1997; Marais ve ark., 1999; Maeda ve ark., 2000; Matsumura ve ark., 2001; Kato ve ark., 2002; Ribeiro ve ark., 2003)
- T2182C (Wang ve ark., 1998; Kim ve ark., 2002;)
- T2717C (Fontana ve ark., 2002)
- T2245C (Ribeiro ve ark., 2003)



Şekil 1.3: Klaritromisinin ribozomun küçük alt birimine bağlanarak protein sentezini zincir uzama basamağında engellemesi.



Şekil 1.4: 23S rRNA domainlerin primer ve sekonder yapısı. Klaritromisin direncinin görüldüğü nükleotit pozisyonları 23S rRNA'nın domain V bölgesinde yer alır, cla^R ile gösterilmiştir. (PTC: peptidil transferaz merkezi) (Monstein ve ark., 2001).

1.7.3.3. *Helicobacter pylori*'nin Direnç Gösterdiği Diğer Antibiyotikler ve Moleküler Mekanizmaları

H. pylori eradikasyonunda sık kullanılan ve direnç gelişen diğer önemli antibiyotikler metranidazol, amoksisilin ve tetrasiklindir.

Metranidazole primer direnç bir çok ülkede yüksek olmasına karşın prevelans %11-70 arasında değişir (Owen, 2002). Bu oran gelişmekte olan ülkelerde ve göçmen popülasyonlarda daha yüksektir (Owen, 2002). Çeşitli ülkelerdeki metronidazole direnç oranları tablo 1.1'de verilmiştir. Bir nitroimidazol türevi olan metranidazolün aktif olabilmesi için bakteriye penetrasyonu gerekir. Penetrasyondan sonra imidazol halkasının nitro grubu hidroksilamin türevine indirgenir. İndirgenmiş ürün bakteride DNA hasarına neden olur ve organizma ölür. Metranidazol mikroorganizma için mutajenik olmakla birlikte insan hücrelerinde DNA ipliğini parçalamasına dair bir kanıt bulunamamıştır (Jenks ve Edwards, 2002).

Nitroimidazole direnç mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak dirençten sorumlu olan bazı genlerin varlığı bilinmektedir. Bu genlerden biri rdxA (oksijene duyarsız NADPH redüktaz geni) dır. RdxA geninde meydana gelen, çerçeve mutasyonları, yanlış anlamlı mutasyonlar, nükleotit delesyonları ve insersiyonlarının dirence neden olduğu görülmüştür (Goodwin ve ark., 1998). RdxA geninde meydana gelen çeşitli mutasyonlar sonucu inaktif rdxA oluşur ve genin okunması erken sonlanır. Ancak bir çalışmada suşların birinde rdxA geni değişmediği halde RdxA proteininin üretiminin engellendiği görülmüş, bu da mutasyonun rdxA geninin promotor bölgesinde olduğunu düşündürmüştür. Ancak suşların büyük çoğunluğunda rdxA geninde mutasyon saptanmış, bu da diğer mekanizmaların daha az rol oynadığını göstermiştir. RdxA geni mutasyonu içermeyen dirençli suşlara da rastlanmıştır. Bu nedenle, frxA, fdxB gibi diğer redüktaz genleri de çalışılmıştır (Latham ve ark., 2001).

Sonuç olarak, yapılan araştırmalar sonucu sabit bir nokta mutasyonu ya da aminoasit eklenmesinin metranidazol ile ilişkisi saptanamamış, başka yardımcı bir genin de kanıtı bulunamamıştır. Metranidazole dirence bakmak

için tek bir genotipe bakmanın yeterli olmayacağından, moleküler bir testle saptanması mümkün değildir (Solcà ve ark, 2000).

Tablo 1.1: Çeşitli ülkelerdeki *H. pylori* izolatlarında metronidazole direnç oranları (Alarcon ve ark., 1999)

Ülke	Direnç Sıklığı (%)
Avrupa	7-49
İspanya	12.5
Portekiz	11.8
İtalya	12
Fransa	26
Hollanda	6.4
Belçika	27
Finlandiya	26
İngiltere	37-90
Almanya	21
Peru	61
Amerika	20-50
Burkina Faso	80-90
Avustralya	17
Malezya	10.8
Çin	32-80

Nadir olmakla birlikte *H. pylori* tetrasikline ve amoksisiline de direnç gösterir. Tetrasiklin, ribozomun 16S rRNA'sına bağlanarak protein sentezini inhibe eden bir ajandır. Dirençli suşlarda 16S rRNA geninde görülen mutasyonlar sonucu tetrasiklin ribozoma bağlanamaz ve protein sentezi devam eder. 16S rRNA'da görülen bazı mutasyonlar; 4 nükleotit insersiyonu, 3'lü nükleotit mutasyonu (AGA965-967TTC, AGA926-928TTC), 1 nükleotit delesyonu (G942), transisyon mutasyonudur (C990T) (Trieber ve Taylor, 2002).

H. pylori suşlarının büyük çoğunluğu amoksisiline duyarlıdır. Klaritromisinle birlikte amoksisilin *H. pylori* eradikasyonunda önemli bir yer tutar. Bir çok çalışmada amoksisiline dirençli suşa ya hiç rastlanamamakta ya da nadir rastlanmaktadır. Farklı Avrupa merkezlerinde *H. pylori*'nin amoksisiline direnç oranları tablo 1.2'de gösterilmiştir (Glupczynski ve ark., 2001). Amoksisiline dirençli suşun beta-laktam direnci, *E.coli*'de ki penisilin bağlayıcı protein olan pbp1A'ya karşılık gelen HP0597 proteininde bir

aminoasit eklenmesiyle meydana gelir. Bu genin dizi çözümlemesi yapılmış ve bir kaç amino asit eklenmesine rastlanmıştır (Gerrits ve ark., 2002).

Tablo 1.2: Farklı Avrupa merkezlerinde *H. pylori*'nin amoksisiline direnç oranları. (Glupczynski ve ark., 2001)

Ülke	Direnç Sıklığı (%)
Hollanda	0.0
Yunanistan	1.7
Almanya	0.0
Fransa	0.0
Belçika	0.0
İtalya	8.2
Danimarka	4.0
İrlanda	0.0
Almanya	0.9
Norveç	0.0
İngiltere	1.2
Finlandiya	0.0
İsviçre	0.0
Portekiz	0.0
İsveç	0.0
İspanya	0.0
Fransa	0.0
Belçika	0.0
Avusturya	0.0
Polonya	0.0

Çalışmamızın amacı, ülkemizdeki *Helicobacter pylori* klinik izolatlarının klaritromisine direnç oranını saptamak ve bununla birlikte gastrik hastalıklarla ilişkisi olduğu düşünülen iceA, vacA ve cagA genlerinin varlığı ile direnç arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Hastalar

Bu çalışmaya gastrik yakınmalar nedeniyle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci ve İbn-i Sina Hastanelerine başvuran ve endoskopi ünitesinde endoskopik incelemeleri yapılan 87 hastadan alınan, gastrik biyopsi örneklerinden üretilen *H. pylori* suşları dahil edildi. Bu 87 hastanın 65'i fonksiyonel dispepsi (non-ulcer dyspepsi), 22'si ise duodenum ülseri tanısı alan hastalardır. Fonksiyonel dispepsi grubuna; endoskopide normal, gastroduedonit, gastrit ve bulbutis tanısı alan hastalar dahil edilmiştir.

2.1.2. Kimyasal Maddeler

Agaroz	Sigma, Almanya
Brucella Broth	Sigma, Almanya
Borik asit	Merck, Frankfurt, Almanya
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Quantum, Amerika
Etidium Bromide	Sigma, Almanya
Gas Generating Kit	Oxoid Ltd, İngiltere
Gliserol	Sigma, Almanya
Kloroform	Applicem, Almanya
Lizozim	Boehringer, Almanya
Mutlak etanol	Kimetsan, Türkiye
Proteinaz K	Sigma, Almanya
SDS	Sigma, Almanya

Sodyum Asetat	Sigma, Almanya
Tris HCl	Sigma, Almanya
Üre broth base	Oxoid, İngiltere
ΦX174 DNA/Hinfl marker	MBI Fermentas, Litvanya

2.1.3. Tampon ve Çözeltiler

Tris-borik asit-EDTA tamponu (TBE) (10 X) (1L)

108 g Tris HCl

55 g borik asit

20 ml 0.5 M EDTA

1000 ml ddH_2O ile tamamlanır.

Agaroz jel yükleme tamponu (6X)

%15 fikol

% 0.05 bromofenol mavi

% 0.05 ksilen siyanol

TE tamponu

100mM TrisHCl

1 mM EDTA

pH=8 'e ayarlanır.

2.1.4. Aletler

Soğutmalı Santrifüj (Hawk 15/05 Sanyo Refrigerated, İngiltere),

Thermal Cycler PCR cihazı (Eppendorf Mastercycler Personel, Almanya),

PH metre (Metler Toledo MP 220 pH meter, İsviçre),

Hassas terazi (Sartorius, Türkiye),

Su banyosu (Heto HWT100, Danimarka),

Kuru blok (Techne DRI-BLOCK, İngiltere),

Etüv (Nüve EN500, Türkiye),

Jel görüntüleme sistemi ve kamerası (UVP Jel Dökümantasyon Sistemleri, Olympus 40X kamerası, Japonya).

2.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri

Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas, Litvanya),

10X Tampon (750 mM Tris- HCl (25°C'de pH 8.8), 200 mM (NH4)2SO4, % 0.1 Tween20, 250 mM MgCl2) (MBI Fermantas, Litvanya),

dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (QBiogene, Almanya),

0.2 ml'lik PZR tüpleri (Greiner Bioone, Avusturya).

2.2. Yöntem

2.2.1. Bakteri Kültürü ve Saklanması

2.2.1.1. Bakteri Kültürü

Endoskopi ünitesinde alınan mide biyopsi örnekleri, steril serum fizyolojik içinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra en geç dört saat içinde kültürünün yapılması için işleme alındı. Bakterinin mukus tabakasından serbestleşmesini sağlamak için 0.5-1 ml kadar steril serum fizyolojik bulunan cam havanda ezildi. Ardından, steril öze ile % 7 oranında taze, defibrine at kanı ve beyin-kalp infüzyon agar (brain- heart infusion agar) içeren plaklara ekim yapıldı. Beyin-kalp infüzyon agar ise üretici firmanın önerisi doğrultusunda 500 ml distile suya 26 gram eklenerek önce kaynar su banyosunda 30 dakika eritildi ve daha sonra da otoklavlanarak hazırlandı. Agar 45-50°C'ye kadar

soğuması beklendikten sonra, daha önceden hazırlanan 5mg/l 'lik Ampfoterisin B ve 10 mg/l 'lik Vankomisin çözeltilerinden 1'er mg pozitif mikroorganizmalar ve fungusların üremesini önlemek amacıyla besiyerine kondu. Daha sonra hızla, taze defibrine at kanından 35 ml karışıma eklendi, karıştırıldı ve plaklara 20'şer ml dağıtıldı. Dağıtıldıktan sonra besiyerindeki hava kabarcıklarını patlatmak ve kontaminasyonu engellemek amacıyla plakların üzerinde bek alevi gezdirildi. Besiyerinin donması için oda sıcaklığında beklendikten sonra plaklar +4°C'ye kaldırıldı. Daha sonra *H. pylori*'nin üremesi için uygun atmosfer ortamını (%5 O_2, %10 CO_2, %85 N_2) sağlamak amacıyla anaerob kavanoza 'Gas Generating Kit' (Oxoid, İngiltere) ve nemli ortam sağlamak için de nemli bez kondu. Üremenin olması için 37°C 'lik etüvde 72 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda plaklar açılıp, saydam, 0.5-1 mm çapında konveks koloniler, gram boyası ile boyamak ve oksidaz, katalaz, üreaz testleri yapılmak üzere alındı.

Gram boyaması: Besiyerinden öze yardımı ile alınan koloni, serum fizyolojik ile süspanse edildi. Daha sonra bu süspansiyondan öze yardımı ile koloniler alınıp steril lama yayıldı ve gram boyama yapıldı. 100X büyütmeli ışık mikroskobunda spiral, S ya da martı kanadı şeklindeki mor-mavi renkli bakteriler pozitif olarak değerlendirildi.

Oksidaz testi: Besiyerinden öze yardımı ile alınan koloni kurutma kağıdına yayıldıktan sonra üzerine %1'lik tetrametil parafenilendiamin dihidroklorid solüsyonu damlatıldı. Koloni etrafında pembe-mor renk oluşması sonucunda test pozitif olarak değerlendirildi.

Katalaz testi: Besiyerinden öze yardımı ile alınan koloni lam üzerine bir çizgi halinde yayıldıktan sonra üzerine 1-2 damla %3'lük Hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatıldı. Gaz kabarcıklarının oluşması sonucunda test pozitif olarak değerlendirildi.

Üreaz testi: Besiyerinden öze yardımı ile alınan koloni, 'üre broth base' içeren besiyerine ekildi. 2 saat 37°C 'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kırmızı renk oluşması halinde test pozitif olarak değerlendirildi.

Her üç testte (üreaz, katalaz, oksidaz) ve sitolojik değerlendirme sonucu pozitif olarak sonuçlanan koloniler *Helicobacter pylori* olarak değerlendirildi ve bir kısmı genomik DNA ekstraksiyonu yapılmak üzere, bir kısmı ise daha sonra kullanılmak üzere saklama solüsyonuna aktarılıp -80°C'de saklandı.

2.2.1.2. Bakteri Suşlarının Saklanması

Suşlar, %15 gliserol içeren Brucella Broth ile hazırlanan saklama solüsyonunda saklandı. Saklama solüsyonu, üretici firmanın önerisi doğrultusunda 2.81 gr brucella broth tartılıp, 100 ml distile suda kaynar su banyosunda eritildikten sonra, otoklavlanarak hazırlandı. Agarın 45- 50°C 'ye soğuması beklendikten sonra 75 ml brucella broth'a 15 ml gliserol eklenerek, %15 gliserol içeren brucella broth saklama solüsyonunu hazırlanmış oldu. Üreyen koloniler öze yardımıyla bu karışımdan 1ml içeren 'cryo-vial' lere hızla aktarıldıktan sonra, vakit kaybetmeden -80°C'lik derin dondurucuiara kondu.

2.2.2. Bakteri Genomik DNA Ekstraksiyonu

Üreyen koloniler McFarland 6'ya göre 1.8x 10^9 CFU/ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra, 750 µl TE tamponu içeren ependorf tüplere steril öze ile aktarıldı. Bakteri pelletinin çökmesi için 2.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda bakteri pelleti, 400 µl TE tamponu ile yıkandı ve bakteri duvarını parçalamak amacıyla 100µl, 10 mg/ml' lik lizozim eklendi ve 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyonu yapıldı. Süre bitiminde hücre zarını parçalamak için, % 10'luk SDS'den 50 µl eklenerek yine 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyonu yapıldı. Daha sonra, proteinleri parçalamak amacıyla, 10mg/ml 'lik proteinaz K'dan 5 µl eklenerek 56°C'lik su banyosunda 1 saat inkübasyonu yapıldı. İnkübasyon sonunda, tüpteki karışıma eşit hacimde fenol eklenip 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda DNA içeren üst faz temiz tüpe aktarılarak bir kez daha eşit hacimde fenol eklendi ve 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz temiz tüpe alınarak karışımın hacmiyle eşit hacimde kloroform eklendi ve

10.000 rpm'de santrifüj yapılır. Üst faz temiz tüpe alındı ve DNA'yı çöktürmek amacıyla, 20 µl 3M'lık sodyum asetat ve karışımla eşit hacimde mutlak alkol eklenerek –20°C'de bir gece bekletildi. Böylece etanolün DNA'yı çöktürmesi sağlandı. Bir gece sonra –20°C'den alınıp 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda üst faz döküldükten sonra, 1ml, %70'lik etanolle pellet yıkandı ve tekrar 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz pipet yardımıyla alınarak pellet oda sıcaklığında 10 dakika kurumaya bırakıldı. Son olarak da 100 µl distile su ile pellet çözülüp 56°C'ye ayarlanmış ısıtıcıda 2 dakika beklendi. DNA konsantrasyonu 260 nm'de spektrofotometrede ölçüldü (OD 1 = 50 µg/ml). Distile su ile, 0.2 µg/ml 'lik DNA solusyonu hazırlandı. Elde edilen DNA solüsyonu daha sonra kullanılmak üzere –20°C'de saklandı (Lee ve Megraud, 1996).

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

2.2.3.1. PZR ile 23S rRNA'nın Çoğaltılması

H. pylori DNA'sının klaritromisine dirençle ilişkisi olduğu bilinen 23S rRNA geninin 310 bç'lik bölgesini PZR ile çoğaltmak amacıyla, 23S rRNA genindeki direnç mutasyonlarının en sık görüldüğü bölgeyi kapsayacak şeklide DP1 ve ZGE23 primerleri seçildi (Taylor ve ark. 1997). Primer dizileri ve pozisyonları tablo 2.1 de verilmiştir. PZR, ana karışıma 20 pmol/ml DP1 ve ZGE23 primerleri ile birlikte 2 mM dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve ekstraksiyonu sonucu elde edilen *H. pylori* DNA'dan 5µl konarak 95°C' de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 1 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72°C'de 7dakika olmak üzere yapıldı. PZR'den sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 310 bç'lik bantlar görüldü. PZR tüpleri daha sonra RFLP yapılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

2.3.3.2. PZR ile IceA Genotiplemesi

IceA genotipleri olan iceA1 ve iceA2 allellerini saptamak için 2 ayrı PZR yapıldı. IceA1 allelini saptamak için tablo 2.1'de gösterildiği gibi iceA1F ve iceA1R, iceA2 allelini saptamak için iceA2F ve iceA2R primerleri kullanıldı (Yamaoka ve ark., 1999). PZR ana karışımına, 20 pmol/ml iceA1F ve iceA1R primerleri ile birlikte 2 mM'lık dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve *H. pylori* DNA'sından 5 µl konarak, 95°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 1 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika toplam 35 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72 °C'de 7 dakika olmak üzere yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1.5'luk agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 247 bç'lik bantlar gözlendi. IceA2 allellerini saptamak için ise yine aynı konsantrasyonlarda PZR karışımı hazırlandıktan sonra, 95°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 1 dakika, 52°C'de 1dk, 72°C'de 2 dakika toplam 35 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72°C'de 7 dakika olmak üzere yapıldı. PZR ürünü yine %1.5'luk etidyum bromür içeren agaroz jelde yürütüldükten sonra 229 ve 334 bç'lik bantlar gözlendi.

2.2.3.3. PZR ile CagA Geni Pozitifliğinin Saptanması

CagA geni pozitifliğini saptamak için tablo 2.1 de gösterilen CAG L, CAG R primerleri kullanıldı (Strobel ve ark., 1998). PZR ana karışımına, 25 pmol/ml CAG L ve CAG R primerleri ile birlikte 2 mM'lık dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve 100 ng'lık *H. pylori* DNA'sından 5 µl konarak, 95°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 94° C'de 1 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72°C'de 7 dakika olmak üzere PZR'ı yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1.5'luk agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 289 bç'lik bantlar gözlendi.

2.2.3.4. PZR ile VacA Geni Orta (middle) Bölgesinin Genotiplemesi

VacA orta (middle) bölgesinin genotiplerini saptamak amacıyla tablo 2.1'de gösterilen VAG1-F ve VAG1-R primerleri kullanıldı. PZR ana karışımına, 0.5mM VAG1-F ve VAG1-R primerleri ile birlikte 2 mM'lık dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve 100 ng'lık *H. pylori* DNA'sından 5 µl konarak, 95°C'de 1.30 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 30 saniye, 56°C'de 1dakika, 72°C'de 1.30 dakika toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72 °C'de 5 dakika olmak PZR'ı yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 567 bç'lik bantlar vacA m1, 642 bç'lik bantlar vacA m2 olarak değerlendirildi.

2.2.3.5. PZR ile VacA Sinyal Bölgesinin Genotiplenmesi

VacA sinyal bölgesinin s1a genotipini saptamak amacıyla tablo 2.1'de gösterilen SS1-F ve VA1-R primerleri kullanıldı. PZR ana karışımına, 50 pmol SS1-F ve VA1-R primerleri ile birlikte 2 mM'lık dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve 100 ng'lık *H. pylori* DNA'sından 5 µl konarak, 94°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 30 saniye, 52°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72 °C'de 5 dakika olmak PZR'ı yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 190 bç'lik bantlar vacA s1a olarak değerlendirildi.

VacA sinyal bölgesinin s1b genotipini saptamak amacıyla tablo 2.1'de gösterilen SS3-F ve VA1-R primerleri kullanıldı. PZR ana karışımına, 50 pmol SS3-F ve VA1-R primerleri ile birlikte 2 mM'lık dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve 100 ng'lık *H. pylori* DNA'sından 5 µl konarak, 95°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72 °C'de 7 dakika olmak PZR'ı yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum

bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 187 bç'lik bantlar vacA s1b olarak değerlendirildi.

VacA sinyal bölgesinin s1c genotipini saptamak amacıyla tablo 2.1'de gösterilen S1C-F ve VA1-R primerleri kullanıldı. PZR ana karışımına, 50 pmol S1C-F ve VA1-R primerleri ile birlikte 2 mM'lık dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve 100 ng'lık *H. pylori* DNA'sından 5 µl konarak, 95°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 1 dakika, 51°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72 °C'de 7 dakika olmak PZR'ı yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 213 bç'lik bantlar vacA s1c olarak değerlendirildi.

VacA sinyal bölgesinin s2 genotipini saptamak amacıyla tablo 2.1'de gösterilen SS2-F ve VA1-R primerleri kullanıldı. PZR ana karışımına, 50 pmol SS2-F ve VA1-R primerleri ile birlikte 2 mM'lık dNTP, 10X tampon, 1 U Taq polimeraz ve 100 ng'lık *H. pylori* DNA'sından 5 µl konarak, 95°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72 °C'de 7 dakika olmak PZR'ı yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 199 bç'lik bantlar vacA s2 olarak değerlendirildi.

2.2.4. Restriksiyon Parçacığı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile Mutasyon Saptanması

PZR ürünlerinden mutasyon saptanması için mutasyonlu bölgeye özel restriksiyon endonükleazlar kullanıldı (Tablo 2.2). 23S rRNA'da rastlanan, transisyon mutasyonu olan A2144G saptanması için BsaI ve A2143G transisyon mutasyonu saptanması için ise BpiI restriksiyon endonükleazlar kullanıldı. 15 µl PZR ürünü, 5U BpiI veya BsaI ile karışım hazırlandıktan sonra BpiI içeren tüp 37°C'lik etüvde 16 saat, BsaI içeren tüp ise 56 °C'de 4

saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda restriksiyon enzimi kesim ürünü etidyum bromürlü % 1.5'luk agaroz jelde UV ışını altında bakıldı.

2.2.5. İstatistiksel Analizler

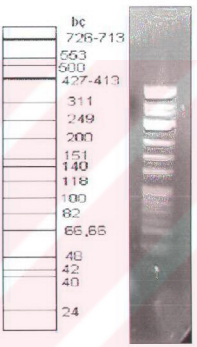
Çalışmada tüm analizlerde, Fisher exact testi kullanılmıştır. p değeri 0.05'den küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 2.1: PZR'da kullanılan primer dizileri ve çoğaltılan bölgenin uzunluğu.

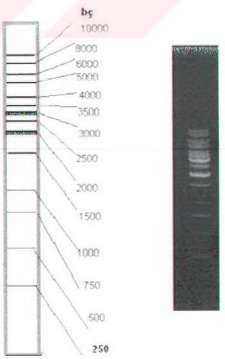
Bölge	Primer	Nükleotit Dizisi (5'→3' yönünde)	bç	Kaynak
23S rRNA	DP1 ZGE23	ACGGCGGCCGTAACTATA ACAGGCCAGTTAGCTA	310	Taylor ve ark., 1997
iceA1	iceA1R iceA1F	CTATAGCCACTCTCTTTGCA GTGTTTTTAACCAAAGTATC	247	Yamaoka ve ark., 1999
iceA2	iceA2R iceA2F	TTACCCTATTTTCTAGTAGGT GTTGGGTATATCACAATTTAT	229 veya 334	Yamaoka ve ark., 1999
cagA	CAG L CAG R	TGCTAAATTAGACAACTTGAGCGA AATAATCAACAAACATCACGCCAT	289	Strobel ve ark., 1998.
vacA m1	VAG1-F VAG1-R	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG GCGTCTAAATAATTCCAAGG	570	Yamaoka ve ark., 1999
vacA m2	VAG1-F VAG1-R	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	645	Yamaoka ve ark., 1999
vacA s1a	SS1-F VA1-R	GTCAGCATCACACCGCAAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	190	Strobel ve ark., 1998.
vacA s1b	SS3-F VA1-R	AGCGCCATACCGCAAGAG CTGCTTGAATGCGCCAAAC	187	Strobel ve ark., 1998.
vacA s1c	S1C-F VA1-R	CTYGCTTTAGTRGGGYTA CTGCTTGAATGCGCCAAAC	213	Yamaoka ve ark., 1999
vacA s2	SS2-F VA1-R	GCTAACACGCCAAATGATCC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	199	Strobel ve ark., 1998.

Tablo 2.2: 23S rRNA genindeki mutasyonları belirlemede kullanılan restriksiyon enzimleri.

Enzim	Kesim Bölgesi	Kaynak
BpiI	5'...GAAGAC(N)2▼...3' 3'...CTTCTG(N)6 ▲...5'	Sevin ve ark., 1998
BsaI	5'...GGTCTC(N)1▼...3' 3'...CCAGAG(N)5▲...5'	Sevin ve ark., 1998



Şekil 2.1: Ø.X174 DNA/ *Hinf*I Marker, 1.0 işaretleyicisinin bant açılımının gösterilmesi.



Şekil 2.2: DNA marker ' 1kb gene ladder' işaretleyicisinin, bantlarının açılımının gösterilmesi.

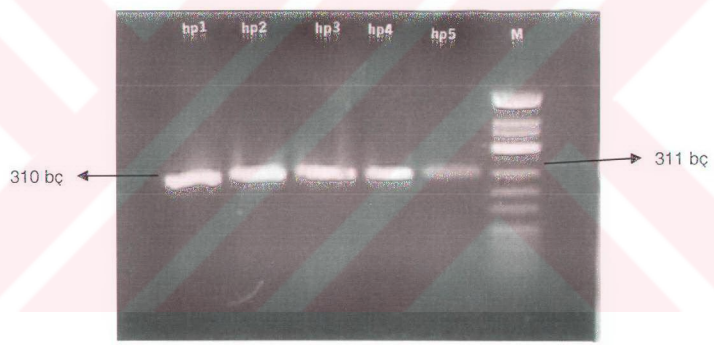
3. BULGULAR

3.1. Hasta Grupları

Çalışma kapsamına gastrik yakınmalar nedeni ile kliniğimize başvuran, yaşları 23 ile 72 arasında değişen (yaş ortalaması: 44±13), 51 kadın, 36 erkek olmak üzere, toplam 87 hasta dahil edildi. Bu 87 hastanın 65'i fonksiyonel dispepsili, 22'si duodenal ülserlidir.

3.2. PZR ile 23S rRNA Geninin Çoğaltılması Sonuçları

Mide biyopsi örneğinden izole edilen *Helicobacter pylori* DNA'sının özgül primerlerle (DP1, ZGE23) 23S rRNA geni PZR'ı yapıldı. PZR sonucunda %1'lik agaroz jelde 310 bç'lik bantlar gözlendi (Şekil 3.1).

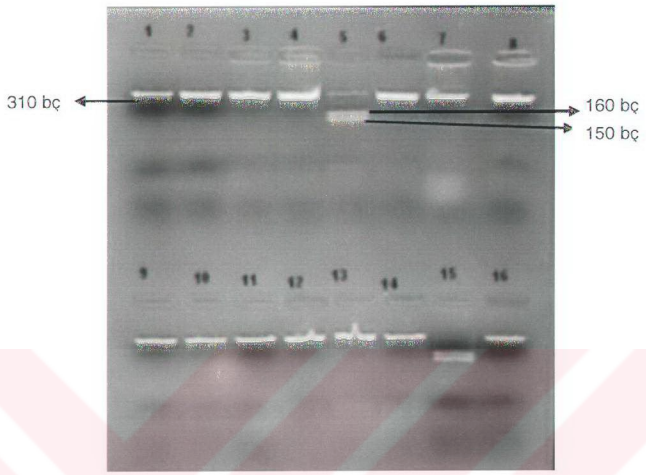


Şekil 3.1: 23S rRNA PZR bantlarının %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. hp1, hp2, hp3, hp4 no'lu kuyucuklarda 310 bç'lik 23S rRNA bantları gözlenmektedir. M: *Hinf*1 Marker.

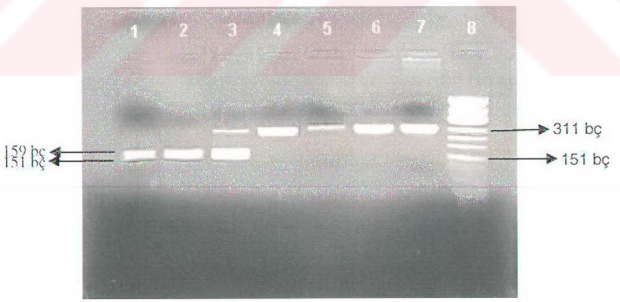
3.3. 23S rRNA Geninin PZR-RFLP ile Mutasyon Analizi Sonuçları

H. pylori pozitif olduğu bilinen 87 hastanın özgül primerlerle 23S rRNA geni PZR'ı yapıldıktan sonra, RPLP yöntemi uygulandı. 23S rRNA PZR ürünleri A2144G mutasyonunu saptamak amacıyla BpiI enzimi ile kesimi sonucu 160 ve 150 bç'lik bantlar mutasyonlu olarak değerlendirildi. Çalışılan 87 hastanın

15'inde 160 ve 150 bç'lik bantlara rastlanırken 72 hastada, 310 bç'lik bantlar gözlendi.



Şekil 3.2: BpiI, restriksiyon enzimi kesimi bantlarının %1.5'luk agaroz jelde gösterilmesi. 1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,12,13,15 no'lu kuyularda BpiI enzimi ile kesilmeyen yani mutasyon görülmeyen örnek gözlenmektedir. Kuyu no 5'de hem yaban tipe ait 310 bç'lik bant, hem de mutant tipe ait 150 ve 160 bç'lik bantlar gözlenmektedir. Kuyu no 14'de ise sadece mutant tipe ait bant gözlenmektedir.

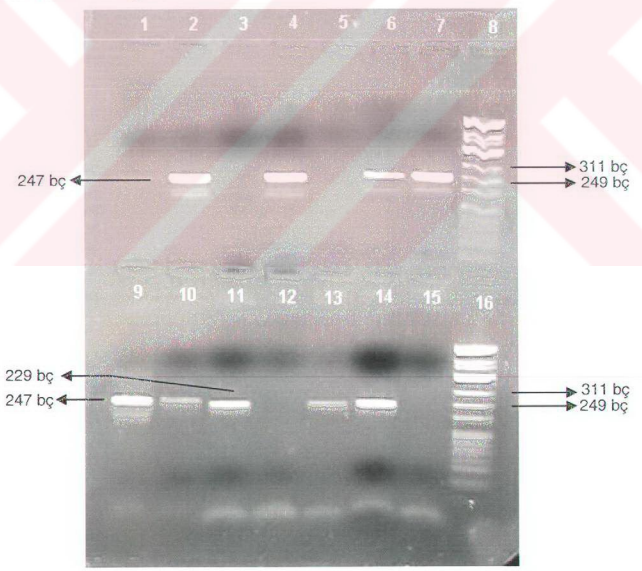


Şekil 3.3: Bsa1, restriksiyon enzimi kesimi bantlarının %1.5'luk agaroz jelde gösterilmesi. 11 ve 2 no'lu kuyuda Bsa1 enzimi ile kesim sonucu oluşan 151 ve 159 bç'lik bantlar gözlenmektedir. Kuyu no 3'de ise mutant ve yaban tipe ait olan 151, 159 ve 310 bç'lik bantlar gözlenmektedir. Kuyu no 4, 5, 6 ve 7'de 310 bç'lik yaban tipe ait bantlar gözlenmektedir. 8 no'lu kuyuda ise *Hinf*I marker vardır.

Mutasyona rastlanan 15 hastanın 10'unda ise hem 310 bç'lik hem de 150 ve 160 bç'lik bantlara rastlandı (Şekil 3.3). Bsa1 enzimi ile muamele sonucu ise, 87 hastanın 9'unda 159 ve 151 bç'lik bantlar gözlendi ve bu hastalar mutasyonlu olarak değerlendirildi. Bsa1 ile kesilen 9 hastanın 3'ünde ise yine tamamlanmayan kesimler görüldü (Şekil 3.4).

3.4. IceA Genotipleme Sonuçları

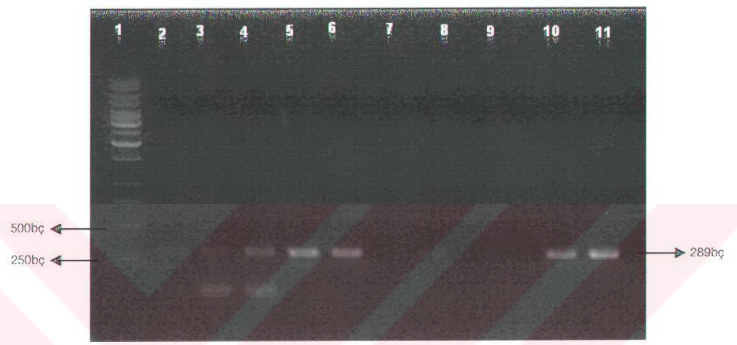
IceA1 genotipine özgün primerlerle (iceA1R, iceA1F) yapılan PZR sonunda, ürünler %1.5'luk jelde UV altında bakıldı. Çalışılan 87 *H. pylori* suşundan 50'sinde 247 bç'lik bantlara rastlandı ve iceA1 pozitif olarak değerlendirildi. IceA2 genotipine özgün primerlerle (iceA2R, iceA2F) yapılan PZR sonunda yine %1.5'luk agaroz jelde UV altında, 87 *H. pylori* suşunun 34'ünde 229 bç'lik bantlara rastlandı. Tüm hastaların 37'sinde ise 229 veya 247 bç'lik bantlar birlikte görüldü.



Şekil 3.4: IceA1 ve iceA2 genotiplerinin %1.5'luk agaroz jelde gösterilmesi. 1, 2, 4, 6,7, 9, 10 no'lu kuyularda iceA1 genotipine ait 247 bç'lik bantlar gözlenmektedir. 11, 13 ve 14 no'lu kuyucuklarda iceA2 genotipine ait 229 bç'lik bantlar gözlenmektedir. Kuyu no 8 ve 16'ya ise Hinf1 markeri yüklenmiştir.

3.5. CagA Genotipleme Sonuçları

CagA genotipine özgün primerlerle (CAG L, CAG R) yapılan PZR sonunda, ürünler %1'lik jelde UV altında bakıldı. Çalışılan 87 *H. pylori* suşundan 40'ında 289 bç'lik bantlara rastlandı ve cagA pozitif olarak değerlendirildi. Suşların 47'sinde ise cagA negatif olarak saptandı (şekil 3.5).



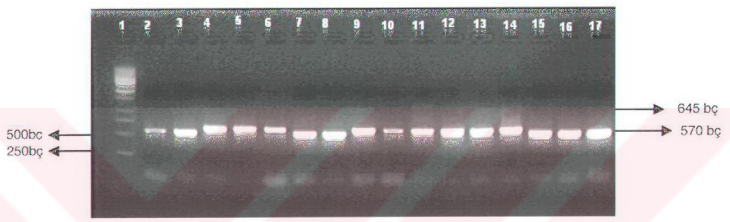
Şekil 3.5: CagA genotiplerinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 1 no'lu kuyuda DNA marker '1kb gene ladder' yüklenmiştir. 2 no'lu kuyuda negatif kontrol, 3, 4, 5, 6,10 ve 11 no'lu kuyuda ise 289 bç'lik cagA bantları gözleniyor.

3.6. VacA Genotipleme Sonuçları

VacA m ('middle') bölgesine özgül primerlerle (VAG1-F, VAG1-R) yapılan PZR sonunda, ürünler %1'lik jelde UV altında bakıldı. Çalışılan 87 *H. pylori* suşundan 16'sında 570 bç'lik bantlara rastlandı ve vacA m1 olarak değerlendirildi, 50'sinde ise 645 bç'lik bantlara rastlandı ve vacA m2 olarak değerlendirildi (Şekil 3.6). Hastaların 21'inde ise vacA m1 ya da vacA m2 allelerinden herhangi biri görülmedi.

VacA s1a, s1b, s1c, s2 bölgelerine özgül primerlerle yapılan PZR sonucunda ürünler, %1'lik agaroz jelde UV altında bakıldı (Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10) İzolatların %28.7'sinde (25/87) s1a , %12.6'sında (11/87) s1b, %4.6'sında (4/87) s1c, %40.2'sinde (35/87) s2 genotipi gözlenirken, %14.9'unda (13/87) s genotipi gözlenmemiştir.

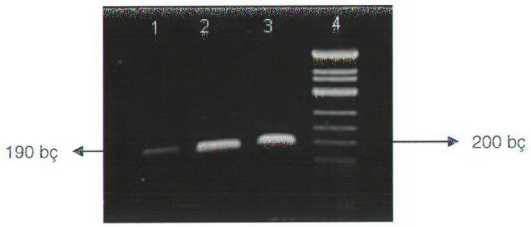
VacA s ve m genotiplerine birlikte bakıldığında; s1am1, s1bm1, s2m2, s1am2, s1bm2, s1cm2 ve s2m2 genotipleri gözlenirken, s1cm1 genotipi gözlenmemiştir. Ayrıca bu genotiperin dışında çoklu suşla infeksiyonu düşündüren s1a+s2-m2, s1b-m1+m2, s1c+s2-m2 genotipleride gözlenmiştir. İzolatların %5.7'sinde (5/87) s1am1, %5.7'sinde (5/87) s1bm2, %3.5'inde (3/87) s1cm2, %23'ünde (20/87) s2m2, %2.3'ünde (2/87) s1a+s2-m2, %1.1'inde (1/87) s1c+s2-m2, %1.1'inde (1/87) s1a+s1b, %3.5'inde (3/87) s1a+s2 gözlenmiştir.



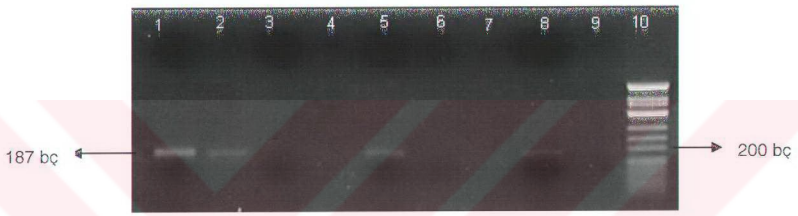
Şekil 3.6: VacA m1 ve vacA m2 genotiplerinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. 1 no'lu kuyuda DNA marker '1kb gene ladder' yüklenmiştir. Kuyu no 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13 ve 14'de 645 bç'lik vacA m2 genotipine ait bantar, kuyu no 7, 8, 15, 16 ve 17'de ise 570 bç'lik vacA m1 genotipine ait bantlar gözleniyor.

Tablo3.1: BpiI ve Bsa1 restriksiyon enzimi kesimlerinin sonuçları (A2144G ve A2143G mutasyonları), iceA1, iceA2, cagA, vacA m1, vacA m2, vacA s1a, vacA s1b, vacA s1c, vacA s2 genotiplerinin hasta gruplarına göre ve toplam hasta sayısına göre dağılımları ve yüzdelerinin gösterilmesi. FD: Fonksiyonel Dispepsili hastalar grubu, DÜ: Duodenum ülserli grubu göstermektedir. Parantez içindeki sayılar yüzdeyi belirtmektedir.

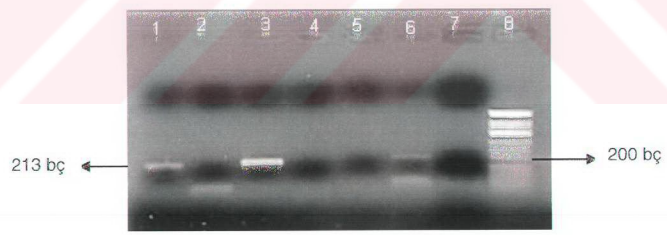
hasta grubu	hasta sayısı	A2144G	A2143G	A2144G+A2144G	iceA1	iceA2	iceA1+iceA2	cagA	vacAm1	vacAm2	vacAs1a	vacAs1b	vacAs1c	vacAs2	vacAs1m1	vacAs2m1	vacAs1m2	vacAs2m2
FD	65	10(15)	5(8)	15(23)	40(62)	28(43)	18(28)	30(46)	12(19)	37(57)	21(32)	7(11)	3(5)	28(43)	5(8)	2(3)	16(25)	13(20)
DÜ	22	5(23)	4(18)	9(40)	10(46)	6(27)	3(22)	10(46)	4(18)	13(59)	4(18)	4(18)	1(5)	7(32)	2(9)	0(0)	5(23)	7(32)
Tüm	87	15(17)	9(10)	24(28)	50(58)	34(39)	21(24)	40(46)	16(18)	50(58)	25(29)	11(13)	4(5)	35(40)	7(8)	2(2)	21(24)	20(23)



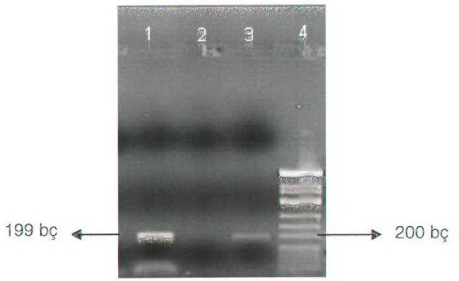
Şekil 3.7: VacA s1a genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu no 1, 2, 3'de, 190 bç'lik s1a genotipi gözlenmektedir. Kuyu no 4'e ise Hinf1 marker yüklenmiştir.



Şekil 3.8: VacA s1b genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu no 1, 2, 5, 8 'de vacA s1b genotipin ait 187 bç'lik bantlar gözlenmektedir. Kuyu no 3, 4, 6, 7, 9'da vacA s1b genotipine ait bant gözlenmemektedir. Kuyu no 10'a ise Hinf1 marker yüklenmiştir.



Şekil 3.9: VacAs1c genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu no 1, 3, 6'da 213 bç'lik vacA s1c genotipi gözlenmektedir. Kuyu no 2, 4, 5, 7'da ise vacA s1c genotipi gözlenmemektedir. Kuyu no 8'e Hinf1 marker yüklenmiştir.



Şekil 3.10: VacA s2 genotipinin %1'lik agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu no 1 ve 3'de vacA s2 genotipine ait 199 bç'lik bantlar gözlenmektedir. Kuyu no 2'de vacA s2 genotipi gözlenmemiştir. Kuyu no 4'e Hinf1 marker yüklenmiştir.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda 87 hastadan alınan biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarının, dirençle ilişkili olduğu bilinen, 23S rRNA genindeki A2143G ve A2144G mutasyonları araştırıldı. 87 hastadan 24'ünde yani % 27.5 oranında bu mutasyonlardan en az biri görüldü. Hastaların %17.2'sinde (15/87) A2144G, %10.3' ünde (9/87) A2143G mutasyonu saptandı ve bu *H. pylori* suşları klaritromisine dirençli olarak nitelendirildi. BpiI enzimi ile kesilen ve A2144G mutasyonlu olarak belirtilen 15 hastanın 10'unda hem yaban tipe ait hem de mutant tipe ait bantlar gözlendi. Bsa1 ile kesilen 9 hastanın 3'ünde de hem yaban tipe ait hem de mutant tipe ait bantlar gözlendi. Bu sonuçlar bize bir hastanın hem mutant hem yaban tip olmak üzere, farklı genotipli heterojen suşlarla infekte olabileceğini düşündürdü. Ama bunu kesin olarak söyleyebilmemiz için kültürdeki farklı kolonilerin alınıp dizi çözümlenmesi yapılmalıdır. Bir çalışmada yine A2144G mutasyonu saptamakta kullanılan Alw26I enzimi ile tamamlanmayan kesimlemelere rastlanmıştır. Alw26I ile kesilen 4 örnekten 2'sinde tamamlanmayan kesimlemeler olmuştur. Bu örneklerin ayrı ayrı kolonilerden elde edilen *H. pylori* izolatları dizi çözümlemesi yapılmış ve her hastanın farklı genotipli heterojen suşlarla enfekte olduğu gösterilmiştir (Matsuoka ve ark., 1999).

Bu sonuçlar bize A2144G mutasyonunun direnç belirlemede A2143G mutasyonuna göre daha önemli rol oynadığını düşündürdü. Eun ve ark. (2003), klaritromisine dirençli olguların çoğunda (%66.6) bu mutasyonu (A2144G) bildirmişlerdir. Yang ve ark.'da (2001), A2144G mutasyonunun dominant mutasyon olduğunu göstermiştir. Ancak Matsuoka ve ark. (1999), %1 oranında A2144G mutasyonu, %5 oranında A2143G mutasyonu saptamışlar. Van Doorn ve ark., da Japonya'da 299 *H. pylori* suşunda yaptığı bir çalışmada, klaritromisine dirençli suşların çoğunda (%43.5) A2143G mutasyonunu gözlemiş. Owen'de (2001) A2143G mutasyonunun diğer mutasyonlara oranla yaygın olduğunu göstermiştir. Meksika'da yapılan bir çalışmada Torres ve ark. (2001), %24 oranında direnç bulmuşlardır (MIC>2mg/l). Japonya'da yapılan bir çalışmada ise direnç oranı %12.9 olarak bulunmuş ve 1996 dan 1999'a kadar direnç oranının 2 katına (%9.1'den

%18.7'ye) çıktığını göstermişlerdir (MIC>1mg/L) (Kato ve ark., 2000). Yine Japonya'da çocuklarda yapılan bir çalışmada direnç oranı PZR-RFLP yöntemi ile %18 olarak belirlenmiştir (Yang ve ark., 2001). Farklı Avrupa merkezlerinde yapılan bir çalışmada %43.5 oranında direnç MIC değeri ile saptanmıştır (Doorn ve ark., 2001). *H.pylori*'nin klaritromisine direnci ile ilgili yapılan çalışmalardan bazıları tablo 4.2'de gösterilmiştir. Direnç oranı klaritromisinin diğer enfeksiyonlarda da kullanılmasına bağlı olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde değişkenlikler göstermektedir.

Çalışmamızda klaritromisine direnç oranı %27.5 (24/87) olarak saptanmasına karşın, ülkemizde, Palabıyıkoğlu ve ark.'nın 1997 yılında yaptığı çalışmada disk diffüzyon yöntemi ile klaritromisin direnç oranını %14, yine ülkemizde Büke ve ark.'nın aynı yılda yaptığı çalışmada yine disk diffüzyon yöntemi ile klaritromisine direnç oranı %0 bulmuştur. Bu oranların bizim çalışmamıza oranla düşük olmasının nedeni farklı bir yöntemle yapılmış olması ve çalışmamızdan 7 yıl önce yapılmasından dolayı da direnç prevelansının ülkemizde klaritromisinin sık kullanımından dolayı artabileceği yönünde olmuştur. Ancak, Şahin ve ark. (1994), %21 oranında disk diffüzyon yöntemi ile klaritromisine direnç oranı saptamıştır. Bu oran, farklı yöntem ve 10 yıl önceki bir çalışma olmasına karşın çalışmamızdaki oranla benzerlik göstermektedir. Ülkemizde PZR-RFLP yöntemi ile direnç saptanması yapılmış son yıllara ait epidemiyolojik bir çalışma olmadığından, farklı sonuçların ortaya çıkabilmesi olağan karşılanmıştır. Ayrıca direnç saptanması için sadece 2 mutasyona bakılarak değil, agar dilüsyon, E-test ya da disk diffüzyon gibi mikrobiyolojik yöntemlerden biriyle ya da moleküler yöntem olarak DNA dizi analizi ile birlikte karşılaştırmalı olarak yapıldığında dirençli diyebilmemiz daha kesinleşmektedir. Ancak bir çok çalışmada bu iki mutasyonun direnç ile kesin ve anlamlı ilişkisi bulunmuştur (Versalovic ve ark., 1996, Ossenkopp ve ark., 1998, Yang ve ark., 2001). Ayrıca bir çalışmada klaritromisin dirençli *H. pylori* suşlarının A2143G ve A2144G mutasyonlarının PZR-RFLP yöntemi ile saptanmasının duyarlılığı %92, özgünlüğü ise %100 olarak belirlenmiştir (Yang ve ark., 2001).

Klaritromisin dirençli *H. pylori*'nin varlığı, eradikasyonu olumsuz etkileyebilmektedir. Bu yüzden bakteri direncinin önceden bilinmesi ve en uygun duyarlılık yönteminin saptanması oldukça büyük önem taşır. İleriki zamanlarda tüm dünyada direnç oranı daha da artacak ve etkili tedavinin seçimi zorlaşacak ve antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi artacaktır. Yüksek primer direnç gösteren bölgelerde her coğrafik bölgeye özgü direnç oranları bilinirse klinisyenler, bu oranlara göz önünde bulundurarak uygun tedavi stratejileri belirleyebilir. Ayrıca bireysel olarak da tedavi öncesi antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması antibiyotiğin yan etkilerinden bireyleri koruyacaktır.

Makrolidlerin solunum yolları enfeksiyonlarında da kullanılması *H. pylori*'ye karşı direnci artırmaktadır. Fransa'da 1982'den beri makrolidlerin solunum yolları enfeksiyonlarında sık tüketildiği bilinmektedir. 1985'den beri de stabil olarak direnç oranlarının Fransa'da %10 oranında olduğu bilinmektedir (Mégraud ve ark., 1996).

Çalışmamızda 65'i fonksiyonel dispepsili, 22'si duodenal ülserli olmak üzere toplam 87 hastanın peptik ülser, gastrit, gastrik kanser gibi gastrik hastalıklarla ilişkisi olduğu bilinen iceA1, iceA2, vacA m1, vacA m2, cagA genlerine de bakıldı.

Çalışmamızda iceA1 genotipi %57.5 (fonksiyonel dispepsili hastalarda %61.5, duodenal ülserli hastalarda %45.5), iceA2 genotipi ise %39 (fonksiyonel dispepsili hastalarda %43.1, duodenal ülserli hastalarda %27.3) oranında gözlenmiştir. Hastaların % 24.1'inde iceA1 ve iceA2 genotipleri bir arada görüldü. %3.4'ünde ise ne iceA1 ne de iceA2 genotipleri saptanmadı. IceA genotiplerinin gastrik hastalıklarla ilişkisi görülmedi. IceA1 genotipi iceA2 ye göre daha yaygın görüldü.

Ülkemizde iceA genotipleri ilk defa bu çalışılmada ele alındı, ancak diğer ülkelerde iceA genotipleriyle yapılan çalışmalar çok olmamakla birlikte mevcuttur. IceA, vacA, cagA genleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalardan örnekler tablo 4.1'de verilmiştir.

Kidd ve ark. (2001), 86 hastanın %68'inde iceA1, %80'inde iceA2, %40'ında ise hem iceA1, hem iceA2 geni saptamışlardır. IceA1 ile gastrik kanser arasında, iceA2'nin farklı varyantlarıyla peptik ülser ve gastrit arasında ilişki bulunmuştur.

Ashour ve ark. 'nın (2001), Brezilya'da yaptığı bir çalışmada gastrit, duodenal ülser ya da gastrik adenokarsinomalı 142 hastadan 118'inde (%90.1) iceA2 alleli saptanmıştır. Ancak iceA geninin, *H. pylori* enfeksiyonunun klinik semptomları olarak güvenilir bir göstergesi olmadığı sonucuna vardılar.

Figueiredo ve ark. 'nın (2001), Portekiz'de yaptığı bir çalışmada gastrik hastalığı olan 319 hastanın iceA, vacA ve cagA genleri çalışıldı. Suşların %27.3'ünde iceA1, %32'sinde iceA2, %36.7'sında hem iceA1, hem iceA2 görüldü. Klinik hastalıkların hiçbiriyle iceA ilişkisi saptanamadı.

Nishiya ve ark.'nın (2000), Japonya'da yaptığı bir çalışmada, iceA1 geninin gastrit ya da gastrik kanser ile ilişkisine bakılmıştır. 46 gastrik kanserli hasta ve 51 kontrol alınarak toplam 97 hasta çalışılmıştır. IceA1 geni kanserli hastaların %61'inde, kontrol hastalarının ise %53'ünde görülmüştür. IceA1'in gastrik kanserle ilişkisi bulunamamış ancak aktif gastrik inflamasyonu artırdığı görülmüştür.

Ito ve ark. (2000), iceA1 genotipini DNA dizi analizini yaptı ve peptik ülserle bir ilişkisini bulamadı.

Nicolas ve ark. (2001), hastaların % 44'ünde (peptik ülserlilerin % 60'ı, gastritlilerin %47'si, reflülülerin %29'u) iceA1, %54.3'ünde (peptik ülserlilerin % 18.6'sı, gastritlilerin %34.6'sı, reflülülerin %46.6'sı) iceA2 genotipi saptamıştır. Hastaların %4'ünde iceA1 ya da iceA2 genotipi gözlenmemiş, %24'ünde ise hem iceA1 hem iceA2 gözlenmiştir. Peptik ülserlilerde, reflülülere göre anlamlı olarak yüksek oranda iceA1 genotipi gözlenmiş, diğer genotip ve hastalıklar arasında ilişki saptanamamıştır.

Ribiero ve ark. 'nın (2003) yaptığı çalışmada, %16 oranında iceA1, %73.7 oranında iceA2, %10.2 oranında ne iceA1 ne de iceA2, %9.7'sinde

hem iceA1 hemde iceA2 genotipi gözlenmiştir. IceA genotiplerinin hiçbiriyle gastrik hastalıklar arasında ilişki bulunamamıştır.

Yamaoka ve ark.'nın (1999) yaptığı çalışmada, %48.8 oranında iceA1, %33.3 oranında iceA2, %17.2 oranında hem iceA1 hem iceA2, %0.7 oranında ne iceA1 ne de iceA2 gözlenmiştir. IceA genotiplerinin hiçbiriyle gastrik hastalıklar arasında ilişki bulunamamıştır.

Godoy ve ark. 'nın (2003) yaptığı çalışmada, %15 oranında iceA1, % 74 oranında iceA2, %11 oranında ne iceA1 ne de iceA2 gözlenmiştir. IceA genotiplerinin hiçbiriyle gastrik hastalıklar arasında ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda yer verdiğimiz diğer 2 gen bölgesi olan vacA ve cagA sonuçlarına bakıldığında, *H. pylori* izolatlarında cagA geni pozitifliği %46 (fonksiyonel dispepsili hastalarda %46, duodenal ülserli hastalarda %46'sında) olarak gözlendi. VacA orta bölge (middle region) genotipleri olan m1 ve m2'ye bakıldığında ise, %18.4 (fonksiyonel dispepsili hastaların %18.5 'inde, duodenal ülserli hastaların %18.2'sinde) vacA m1, %58 (fonksiyonel dispepsili hastaların %56.9'unda, duodenal ülserli hastaların %59.1'inde) vacA m2 genotipleri gözlenmiştir. *H. pylori* izolatlarında baskın genotip olarak vacA m2 genotipi gözlendi. Hastaların %24.5'inde ise vacA m1 ya da m2 genotiplerinden herhangi birine rastlanmazken, %3.4'ünde ise hem m1 hem de m2 genotipi bir arada görüldü. VacA sinyal bölgesi genotipleri olan s1a, s1b, s1c ve s2 sonuçlarına bakıldığında ise, tüm hastalarda s2 genotipi yaygın (%40, 35/87) olarak gözlenmiştir. S ve m genotiplerine birlikte bakıldığında, tüm hastalarda vacA s1m2 (%24, 21/87) ve s2m2 (%23, 20/87) yaygın gözlenmiştir. Fonksiyonel dispepsili hastalarda s1m2 yaygın görülürken (%24 16/25) duodenal ülserli hastalarda s2m2 yaygın (%32 7/22) görülmüştür. Klaritromisine duyarlı hastalarda ise s2m2 genotipi %21 (13/62) oranında en yaygın görülürken, klaritromisine dirençli hastalarda %25 oranında (6/24) yine s2m2 genotipi en yaygın olarak gözlenmiştir. VacA ve cagA genotiplerinin duodenal ülser ve fonksiyonel dispepsi ile anlamlı ilişkisi bulunamadı.

Kim ve ark. 'da (2004), duodenal ülserli gastrik kanserli ve hem gastrik kanserli hem duodenal ülserli Kore'li hastalarında yaptığı çalışmada cagA ve vacA genotiplerinin hastalıklarla ilişkisini bulamamışlardır. Zhou ve ark. (2004), Doğu Asya'da, Japonya ve Çin'de ki merkezlerde yaptığı çalışmada, vacA ve cagA genlerinin klinik hastalıklarla ilişkisini bulamadılar. Japonya'da yaygın vacA genotipi s1c/m1b , Çin'de ise s1c/m2 genotipi gözlenmiştir. Yine Çin'de Perng ve ark. 'nın (2004), yaptığı bir çalışmada, çalışmamızdaki orana yakın olarak %50 oranında cagA pozitifliği bulunmuştur.

Asya ülkelerinde vacA ve cagA virülans faktörleriyle hastalıklar arasında ilişki bulunamazken batı ülkelerinde durum farklıdır. Brezilya'da, 61 (21 duodenal ülserli, 40 gastritli) hasta ile yapılan çalışmada, duodenal ülserlilerin %90.5'i cagA pozitifken, gastritli olguların %60'ı cagA pozitif bulundu ve cagA pozitifliliğin duodenal ülser ile anlamlı ilişkisi saptandı (Brito ve ark., 2003). Almanya'da 106 duodenal ülserli, 52 nonülser dispepsili toplam 158 hasta çalışılmış ve hastaların %81.5'inde vacA m1 ve m2 saptanmıştır. Hastaların %18.5'inde ise hiçbir m genotipi saptanamamıştır. VacA genotipleriyle duodenal ülser arasında ilişki saptanamamıştır. Ryan ve ark. (2001), gastritli, ülserli ,reflülü ve non-ülser dispepsili İrlanda'lı hastalarıyla yaptığı bir çalışmada, %26 oranında vacA m1, %58 oranında vacA m2, %2 oranında ise hem vacA m1 hem de vacA m2 genotipleri pozitif olguya rastlamışlardır. Bu oranlar çalışmamızla oldukça benzerlik göstermektedir

Ülkemizde ise vacA ve cagA genleri ile ilişkili sayılı çalışma vardır. Kantarçeken ve ark. (2003), gastrik ve duodenal ülserli ve non-ülser dispepsili hastalardan oluşan toplam 107 olguda vacA ve cagA geni çalışmışlardır. Çalışma sonucunda hastaların %61.7'si cagA pozitif, %76.6'sı vacA pozitif bulunmuştur. CagA geninin duodenal ülser ve gastrik ülserle anlamlı ilişkisi bulunurken, non-ülser dispepsi ile ilişkisi anlamsız bulunmuştur. VacA geninin ise hiçbir hastalıkla ilişkisi bulunamamıştır. Yine ülkemizde yapılan bir çalışmada Sarıbaşak ve ark. (2004), vacA s1a/m1a ve vacA m2a genotiplerinin Türkiye'de yaygın olduğunu saptamışlardır. Hastaların %69.4'ünde cagA pozitifliği saptamışlar. CagA'nın gastrik ülser ve

gastrik kanserle ilişkisini anlamlı bulmuşlardır. Saltık ve ark.'nın (2003) yaptığı çalışmada olguların %56'sında cagA geni pozitif olarak bulunmuş ve cagA'nın gastrik hastalıklarla ilişkisi anlamsız bulunmuştur. Karaman ve ark. (2004) ise 29 *H. pylori* izolatı ile yaptığı çalışmada, peptik ülserle vacA s1m1 ve cagA pozitif genotipleri arasında anlamlı ilişki bulmuştur.

Çalışmamızda virülans faktörleri olan cagA vacA ve iceA ile gastrik hastalıklar arasında ilişkinin bulunmaması, fonksiyonel dispepsi grubunun duodenal ülserli grubun aksine heterojen olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür, çünkü fonksiyonel dispepsi grubu gastrit, gastroduedonit bulbutis ve normal tanısı alan hastalardan oluşmaktadır. Ayrıca fonksiyonel dispepsi grubundaki hastalar şu ana kadar ülser olmamış olsalar da ileride ülser meydana gelebilecek hastalar olabilir.

Çalışmamızda, iceA2 geni ile direnç arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (p=0,031). IceA2, hastaların %39'unda gözlenmiş ancak duodenal ülserle ilişkisi bulunamamıştır. Virülans faktörleriyle antibiyotik direnci karşılaştırması yapan oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda virülans faktörleri ile direnç arasında ilişki bulunamamıştır. Bunlardan biri Estonya'da yapılan bir çalışmadır (Loivukene ve ark., 2000). 56 hastada vacA subtipleri ve metronidazol direncine bakılmış, vacA subtipler ile hastalıklar arasında bir ilişki bulunamadığı gibi, farklı vacA subtipleri ile metronidazol direnci arasında da ilişki bulunamamıştır. Madrid'de yapılan bir çalışmada, 145 *H. pylori* izolatının klaritromisin, amoksilin, metronidazol ve tetrasiklin dirençlerine agar dilüsyon yöntemi ile, iceA, vacA ve cagA genleri ise PZR ile çalışılmıştır. CagA, vacA s1 ve iceA pozitif hastalarda negatif hastalara göre antibiyotik direnç oranı daha düşük bulunmuştur (Damaso ve ark., 1999). Brezilya'da yapılan bir çalışmada, klaritromisin, metronidazol, amoksilin, tetrasiklin, furazolidon antibiyotiklerine direnç ile vacA, cagA, iceA, cagE virülans genleri arasında ilişki bulunmamıştır (Godoy ve ark., 2003).

Tablo 4.1: *H. pylori*'de cagA, vacA, iceA genler ile ilgili yapılan çalışmalardan bazı örnekler.

Çalışılan Bölgeler	Hasta Grupları	Sonuç	Kaynak
iceA	51 kontrol, 46 gastrik kanserli hasta olmak üzere toplam 97 hasta çalışılmıştır.	Gastrik kanserlilerin %60'inde, kontrollerin %53'ü iceA1 görülmüş. IceA1 gastrik kanserle ilişkisiz ancak aktif gastritte inflamasyonu artırdığı görülmüş	Nishiya ve ark., 2000
iceA2	Gastrit, duodenal ülser, gastrik adenokarsinomalı 142 hasta çalışılmıştır.	%90.1'inde iceA2 gözlenmiş. IceA2 klinik hastalıklarla ilişkisiz görülmüş.	Ashaur ve ark., 2001
iceA **vacA** **cagA**	Dudedonal ülser, gastrik ülser, gastrik karsinoması olan 319 hasta çalışılmıştır.	VacA s1 ve cagA+ *H. pylori* suşlarının duodenal ülser, gastrik ülser ve gastrik karsinomayla ilişkisi bulunmuş. IceA'nın klinik hastalıklarla ilişkisi bulunamamış.	Figueirodo ve ark., 2001
iceA **vacA** **cagA**	Peptik ülserli, gastroözofofajitli, normal endoskopili 183 hasta çalışılmıştır.	%44'ünde iceA1, %54.3'ünde iceA2, %24'ünde iceA1 ve iceA2, %4'ünde ne iceA1, ne de iceA2 görülmüş. VacAs1 ve cagA+ *H. pylori* suşlarının peptik ülserle ilişkisi bulundu.	Nicolaas ve ark., 2001
iceA **vacA** **cagA**	30 fonksiyonel dispepsili, 93 peptik ülserli, 31 gastrik ülserli, 62 duodenal ülserli, 18 eroziv gastritli ve 24 gastroözofegal refiülü, 165 hasta çalışılmıştır.	%16'sında iceA1, %73.7'sinde iceA2, %10.2'sinde ne iceA1, ne de iceA2, %9.7'sinde hem iceA1, hem de iceA2 görülmüştür. VacA m1 %35, vacA m2 %65, cagA+ %67.1 oranında gözlenmiştir. IceA genotiplerinin hiçbiriyle gastrik hastalıklar arasında ilişki bulunamamıştır. VacA s1 ve cagA pozitifliğiyle peptik ülser hastalığı arasında ilişki bulunmuştur.	Ribiero ve ark., 2003
iceA **vacA** **cagA**	Farklı ülkelerden alınan, gastrik kanserli, duodenal ülserli, gastritli, toplam 424 hasta çalışılmıştır.	%48.8'inde iceA1, %33.3'ünde iceA2, %17.2'sinde hem iceA1 hem iceA2, %0.7 oranında ne iceA1, ne de iceA2 gözlenmiştir. VacA s1c-m1 Japonya ve Kore'de, vacA s1b-m1 Amerikada, vacA s1a-m1 Kolombia'da yaygın genotip olarak saptanmıştır. CagA pozitifliği ise her ülkede baskın olarak saptanmıştır. IceA vacA, cagA genlerinin hiç biriyle gastrik hastalıklar arasında ilişki bulunamamıştır.	Yamaoka ve ark., 1999

Tablo 4.2: *H.pylori*'nin klaritromisin direnci ile ilgili yapılan çalışmalar. %: klaritromisin direnci yüzdesi.

Kaynak	Ülke	%	Yöntem
Torres ve ark., 2001	Meksika	%24	MIC
Kato ve ark., 2000	Japonya	%12.9	MIC
Yang ve ark., 2001	Japonya	%18	PZR-RFLP
Doorn ve ark., 2001	Avrupa merkezleri	%43.5	MIC
Megraud, 1996	Fransa	%10	MIC
Palabıyıkoğlu ve ark.,1997	Türkiye	%14	MIC
Büke ve ark.,1997	Türkiye	%0	MIC
Şahin ve ark., 1994	Türkiye	%21	MIC

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 87 *H. pylori* pozitif olgunun 23S rRNA genindeki A2143G ve A2144G direnç mutasyonları ve gastrik hastalıklarla ilişkisi olduğu düşünülen vacA s1a, s1b, s1c, s2, m1, m2, iceA1, iceA2 ve cagA genlerine bakıldı.

Çalışmamızda %27.5 oranında, A2143G veya A2144G mutasyonlardan en az birini taşıyan ve klaritromisine dirençli olarak nitelendirilen suşa rastlanmıştır. Hastaların %17.2'sinde A2144G, %10.3'ünde A2143G mutasyonu saptanmıştır. Bu oran, ülkemizdeki çalışmalarla kıyaslandığında direnç oranının ülkemizde yükselmekte olduğunu düşündürdü. Yükselmesinin nedeni de, klaritromisinin üst solunum enfeksiyonları gibi diğer bazı hastalıklarda da sık kullanılmasına bağlı olabilir.

Ayrıca çalışmamızda farklı olarak iceA2 virülans geni alleli ile direnç mutasyonları arasında daha önce gösterilmemiş olan bir ilişki bulunmuştur. Bununla birlikte virülans genleri olarak bilinen ancak yine de bir çok literatürde de virülanslık ile ilişkisi reddedilen vacA, cagA ve iceA'nın klinik hastalıklarla ilişkisi saptanamamıştır.

Ülkemiz sosyokültürel, coğrafik ve sosyoekonomik açıdan oldukça karışık bir toplum olmasından dolayı *H. pylori* genotipleri ve dağılımları açısından bölgeden bölgeye çok değişiklik gösterebilir. Bu nedenle bu ilişkiyi açıklamak için, büyük sayılarda ve çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır.

ÖZET

Helicobacter pylori İzolatlarında Antimikrobiyal Ajanlara Karşı Direnç

Gastroduodenal hastalıkların gelişmesinde önemli patojenik rolü olan *H. pylori*, tüm dünya da yaygın, gelişmiş ülkelerde %25, gelişmekte olan ülkelerde %80'den daha fazla oranda görülen enfekte edici bir ajandır. Bu nedenlerden dolayı *H. pylori*'nin eradikasyonu ve eradikasyonda kullanılan klaritromisin antimikrobiyal ajanına karşı oluşan direnç önem taşımaktadır. Ayrıca bu direncin, gastrik hastalıklarla ilişkisi olduğu düşünülen iceA, vacA, cagA genleri ile ilişkisinin araştırılması bizi hastalığın gidişi hakkında daha detaylı olarak aydınlatacaktır.

Çalışmamızın amacı, ülkemizdeki *Helicobacter pylori* klinik izolatlarının klaritromisine direnç oranını saptamak ve bununla birlikte gastrik hastalıklarla ilişkisi olduğu düşünülen iceA vacA ve cagA genlerinin varlığı ile direnç arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Çalışmamıza, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalına gastrik yakınmalar nedeniyle başvuran, 65'i fonksiyonel dispepsi, 22'si ise duodenum ülseri tanısı alan 87 hastanın gastrik biyopsi örneklerinden kültürü yapılan *H. pylori* suşları alındı. Fonksiyonel dispepsi grubuna; normal, gastroduedonit, gastrit ve bulbutisli hastalar dahil edildi. 87 hastanın klaritromisin direnci ile ilişkisi olduğu bilinen 23S rRNA genindeki A2143G ve A2144G mutasyonları polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parçacığı uzunluk polimorfizmi yöntemi ile saptandı. CagA, vacA, iceA genotipleri saptanmasında da allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanıldı. Sonuçlar ise agaroz jelde değerlendirmeye alındı.

Hastaların %27.5'inde klaritromisine direnç saptandı. Hastaların %17.2'si A2144G, %10.3' ü A2143G mutasyonuna sahipti. IceA1 genotipi %57.5 (fonksiyonel dispepsili hastalarda %61.5, duodenal ülserli hastalarda %45.5), iceA2 genotipi ise %42.5 (fonksiyonel dispepsili hastalarda %43.1, duodenal ülserli hastalarda %27.3) oranında gözlendi. Hastaların % 24.1'inde iceA1 ve iceA2 genotipleri bir arada görüldü. %3.4'ünde ise ne iceA1 ne de iceA2 genotipleri saptanmadı. *H. pylori* izolatlarında cagA geni pozitifliği %45.9 (fonksiyonel dispesili hastalarda %46.2, duodenal ülserli hastalarda %45.5'inde) olarak saptandı. VacA orta bölge (middle region) genotipleri olan m1 ve m2'ye bakıldığında ise, %18.4 oranında (fonksiyonel dispepsili hastaların %18.5 'inde, duodenal ülserli hastaların %18.2'sinde) vacA m1, %58 (fonksiyonel dispepsili hastaların %56.9'unda, duodenal ülserli hastaların %59.1'inde) vacA m2 genotipleri saptandı. *H. pylori* izolatlarında baskın genotip olarak vacA m2 genotipi gözlendi. Hastaların %24.5'inde ise vacA m1 ya da m2 genotiplerinden herhangi birine rastlanmazken, %3.4'ünde ise hem m1 hem de m2 genotipi bir arada görüldü. VacA s bölgesine bakıldığında, s2 genotipi yaygın, m ve s genotiplerine birlikte bakıldığında ise s2m2 ve s1m2 yaygın olarak (%23, %24) görüldü.

Sonuç olarak, ülkemizde klaritromisine direnç oranı oldukça yüksek görüldü ve iceA2 geninin klaritromisin direnci ile ilişkisi bulundu. IceA, vacA ve cagA genotiplerinin gastrik hastalıklarla ilişkisi görülmedi.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, klaritromisin, direnç, 23S rRNA, vacA, cagA, iceA.

SUMMARY

Resistance to Antimicrobial Agents in Isolates of *Helicobacter pylori*

H. pylori is an infectious agent, which has an important role in gastroduodenal diseases. It is widespread all over the world, 25% in developed countries and more than 80% in developing countries. For this reason *H. pylori* eradication and resistance to clarithromycin which is used in eradication, is important. Furthermore, searching the relationship between cagA, vacA and iceA genotypes that has been suggested to be related with gastric diseases, may give some information about progress of the disease.

The aim of our study is to determine the clarithromycin resistance prevelance in our country and to search if there is a relationship between the resistance and suggested virulance factors iceA, vacA and cagA.

In our study, 87 patients (22 patients with duodenal ulcer, 65 patients with functional dyspepsia) which has been applied to Ankara University Faculty of Medicine Gastroenterology Department with gastric problems included. Diagnosed with bulbutis, gastroduedonitis, gastritis and normal patients added to functional dyspepsia group. For claritromycin resistance, polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism techniques were performed. To determine the cagA, vacA, iceA genotpyes, allele specific polymerase chain reaction technique was performed. Results were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Twenty seven point five percent of the patients were determined as clarithromycin resistant. Seventeen point two percent of them have A2144G, 10.3% of them have A2143G mutation. Fifty seven point five percent of the patients (in functional dyspepsia group 61.5%, in duodenal ulcer group 45,5%), have iceA1 genotype. Fourty two point five percent of the patients (in functional dyspepsia group 43.1% , in duodenal ulcer group 27.3%) have iceA2 genotype. Twenty five point three percent of the patients have both iceA1 and iceA2 genotypes. Three point four percent of the patients neither have iceA1 nor iceA2 genotypes. Fourty two point five percent of the patients were cagA gene positive (in functional dyspepsia group 46,2%, in duodenal ulcer group 45.5%). VacA middle region genotype m1 were positive in 18.4% of all patients (in functional dyspepsia group 18.5%, in duodenal ulcer group 18.2%) and 54% of the all patients (in functional dyspepsia group 56.9%, in duodenal ulcer group 59.1%) have vacA m2 genotpye. VacA m2 is the dominant genotype in *H. pylori* isolates. Twenty four point five percent of all patients have neither vacA m1, nor vacA m2 genotype. When we looked at vacA genotypes s2, and both s and m genotypes; s2m2 and s1m2 genotpes were the dominant (23%, 24%).

As a result, in our country clarithromycin resistance is too high and there is a relationship between iceA2 and resistance to clarithromycin.but there is no significant association between iceA, vacA, cagA and iceA genotypes and gastric diseases.

Key words: *H. pylori*, resistance, clarithromycin, 23S rRNA, cagA, vacA, iceA.

KAYNAKLAR

AKOPYANTS, N. S., CLIFTON, S. W., KERSULTYE, D., CRABTREE, J. E., YOUREE, B. E., REECE, C. A., BUKANOV, N. O., DRAZEK, E. S., ROE, B. A., BERG, D. E. (1998). Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, **28:**37-53.

ALARCON, T., DOMINGO D., PRIETO, N., LOPEZ-BREA, M. (2000). Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: influence of the MIC and type of mutation in the 23S rRNA. *J Antimicrob Agents Chemother*, **46:**613-616.

ALARCON, T., DOMINGO, D. LOPEZ-BREA, M. (1999). Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agent*, **12:** 19-26.

ALLAKER, R. P., YOUNG, K. A., HARDIE, J. M., DOMIZIO, P., MEADOWS, N. J. (2002). Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol*, **51:**312–317.

ALM, R. A., LING, L.-S. L., MOIR, D. T., KING, B. L., BROWN, E. D., DOIG, P. C., SMITH, D. R., NOONAN, B., GUILD, B. C., JONGE, B. L., CARMEL G., TUMMINO, P. J., CARUSO, A., URIA-NICKELSEN, M. MILLS, D. M., IVES, C., GIBSON, R., MERBERG, S., MILLS, S.D., JIANG, Q., TAYLOR, D.E., VOVIS, G. F., TRUST, T. J. (1999). Genomic sequence comparision of two unrelated isolates of human gastric patogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397:** 176-180.

ASHOUR, A. A., COLLARES, G. B., MENDES, E. N., GUSMAO, V. R., QUEIROZ, D. M., MAGALHAES, P. P., DE CARVALHO, A. S., DE OLIVEIRA, C. A., NOGUEİRA, A.M., ROCHA, G. A., ROCHA, A. M. (2001). IceA genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol*, **39:**1746-1750.

ATHERTTON, J. C., CAO, P., PEEK, R. M. JR. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleis of *Helicobacter pylori*. Association of spesific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, **270:**17771-17777.

ATHERTON, J. .C, COVER, T. L., TWELLS, R. J., MORALES, M. R., HAWKEY, C. J., BLASER, M. J. (1999). Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **37:**2879-2982.

AZUMA, T., YAMAKAWA, A., YAMAZAKI, S., FUKUTA, K., OHTANI, M., ITO ,Y., DOJO, M., YAMAZAKI, Y., KURIYAMA, M. (2002). Correlation between variation of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis*, **186:**1621-1630.

BAZZOLLİ, F., PALLI D., ZAGARI,R. M. (2001). The Loiano-Monghidoro population-based study of *Helicobacter pylori* infection: Prevalence by 13C-urea breath test and associated factors. *Aliment Pharmacol Ther*, **15:**1001–1007.

BENAI¨SSA, M., BABIN, P., QUELLARD, H., PEZENNEC, L., CENATİEMPO, Y., FAUCHÈRE, J. L. (1996). Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect Immun*, **64:**2331-2335.

BLASER, M. J. (1997). Heterogeneity of *Helicobacter pylori. Eur j Gastroenterol Hepatol*, **9(Suppl 1):** S3-7.

BLASER, M. J. (1997). Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: Should all be eliminated? *Lancet*, **349:** 1020-1022.

BLASER, M. J. (1998) *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Clin Rev,* **316:** 1507-1510.

BLASER, M. J., (1997). The versatility of *Helicobacter pylori* in the adaptation to the human stomach. *Journal of Physiology and Pharmacology*,**48:** 307-314.

BLASER, M.J. BERG, D. E. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human diease. *The Journal of Clinical Investigaiton*, 104**(7):** 767-773.

BOYANOVA, L., MENTIS, A., GUBINA, M., ROZYNEK, E., GOSCINIAK, G., KALENIC, S., GÖRAL, V., GUPCİNSKAS, L., KANTARÇEKEN, B., AYDIN, A., ARCHIMANDRITIS, A., DZIERZANOWSKA, D., VEEV, A., IVANOVA, K., MARINA, M., MITOV, İ., ÖZDEN A., POPOVA, M. (2002). The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. *Clin Microbiol Infect*, **8:**388-396.

BRENCIAGLIA, M. I., FORNARA, A. M., SCALTRITO, M. M., DUBINI, F. (2000). *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. *International Journal of Antimicrobial Agents,* **13:**237-231.

BRITO, C. A., SILVA, L. M., JUCA, N., LEAL, N. C., DE SOUZA, W., QUERİOZ, D., CORDEIRO, F., SILVA, N. L. (2003). Prevelance of cagA and vacA genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori* –associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, *Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz*, **98:**817-821.

BROWN, M., THOMAS, T. L., MA, J. L., (2001). *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand J Infect Dis,* **33:**686–691.

BÜKE, A. Ç., AYDİN, A., TÜNGER, A., GÜNŞAR, F., ERSÖZ, G., SAYDAM., C., GÜNHAN, C. (1997). *Helicobacter pylori*'nin amoksisilin, klaritromisin ve metronidazol'e karşı duyarlılığının disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, **11:**267-269.

CAMAU, C., ANCELLA, J., LAMOVLIATTE, H., MÈGRAUD, F. (1996). Evolutions of the resistance of *Helicobacter pylori* to macrolids. The Third International Conference on the Macrolids Azalides and Streptogramins. Lisbon 50.

CHISHOLM, S. A.,OWEN, R. J., TEARE, E. L., SAVERYMUTTU, S. (2001). PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *J Clin Microbiol*, **39:**6, 1217-1220.

COVER, T. L. (1996). The vacuolating cytoxin of *Helicobacter pylori. Mol Mİcrobiol*, **20:**241-246.

COVER, T. L., BALSER, M. J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori. J Biol Chem*, **267:**10570-10576.

CRABTREE, J. E., FARMERY, S. M., LINDLEY, I. J., FIGURA, N., PEICHL, P., TOMPKINS, D. S. (1994). CagA cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and IL-8 in gastric epithelial cell lines. *J Clin Pathol*, **47:** 945-950.

DAMASO, D. ALARCON, T. PRIETO, N., LOPEZ-BREA, M. (1999). Relationship between antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Rev Esp Quimioter*, **12:**340-345.

DAUGLE, I., RUMBA, I., LINDVIST, P., BERGSTROM, M., EIDERHAMN, J. (2001). A relatively low prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a healthy pediatric population in Riga, Latvia: a cross-sectional study. *Acta Paed,* **90:**1199–1201.

DAVID, Y., GRAHAM, M. D., ANTONE, R., OPEKON, D. A., KLEIN, P. D. (1993). Clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori. J Clin Gastroenterol*, **16:**4, 292-294.

DEBETS-OSSENKOPP, Y. J. D., BRINKMAN, A. B., KUIPERS, E. J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E., KUSTERS, J. G. (1998). Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother*, **42:** 2749-2751.DORE, M. P., SEPULVEDA, A. R., EL-ZIMAITY, H. (2001). Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep –implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol,* **96:**1396–401.

DUNN, B. E., COHEN, H., BLASER, M. J. (1997). *Helicobacter pylori. Clinical Microbiology Reviews*, **10:** 720-741.

DUBOIS, A., BERG, D. E., INCECIK, E. T., FIALA, N., HEMAN, A. L., PEREZ, P. G., BLASER, M. J. (1996). Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect Immun*, **64:**2885-2891.

ENDE, A., DOORN, L.-J., ROOIJAKKERS, S., FELLER, M., TYTGAT, G. N. J., DANKERT, J. (2001). Clarithromycin- susceptible and –resistant *Helicobacter pylori* isolates with identical randomly amplified polymorphic DNA-PCR genotypes cultured from single gastic biopsy specimens prior to antibiotic therapy. *J Clin Microbiol*, **39:**7, 2648-2651.

EUN, C. S., HAN, D. S., PARK, J. Y., JEON, Y. C., HAHM, J. S., KIM, K. S., KANG, J. O. (2003). Changing pattern of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korean patients with peptic ulcer diseases. *J Gastroenterol*, **38:**436-441.

FIGUEIREDO, C., QUINT, W. G. V., SANNA, R., SABLON, E., DONAHUE, J. P., XU, Q., MILLER, G. .G, PEEK JR, R. M., BLASER, M. J., VAN DOORN, L. J. (2000). Genetic organisation and heterogeneity of the iceA locus of *Helicobacter pylori*. *Gene*, **246:** 59-68.

FIGUEIREDO, C., VAN DOORN, L. J., NOGUEIRA, C., SOARES, J .M., PINHO C., FIGUEIRA, P., QUINT, W. G., CARNEIRO, F. (2001). *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevelance of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol*, **36:**128-135.

FONTANA, C., FAVARO, M., MINELLI, S., CRISCUOLO, A. A., PEITROIUSTI, A., GALANTE, A., FAVALLI, C. (2002) New site of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46:** 3765-3769.

GARCIA-ARATA , M. I., BAQUERO, F., RAFAEL, L., MARTIN DE ARGILA, C., GISBERT, J. P., BERMEJO, F., BOIXEDA, D., CANTON, R. (1999). Mutations in 23S rRNA in *Helicobacter pylori* confering resistance to erythromycin do not always confer resitance to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **43:**2, 374-376.

GERRITS, M. M., SCHUIJFFEL, D., VAN ZWET, A. A., KUIPERS, E. J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., KUSTERS, J. G. (2002). Alterations in penicilin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, Jul; **46:** 2229-2233

GLUPCZYNSKI, Y., GOUTHERS, VAN DEN BORRE C., BUTZLER, J. P., BURETTE, A. (1995). Surveillance of *Helicobacter pylori* resistance to antimicrobial agents in Belgium from 1989-1994. *Gut*, **37:** A56.

GLUPCZYNSKI, Y., MÈGRAUD, F., LOPEZ-BREA, M. (2001). European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **28:** 820-823.

GO, M. F., KAPUR, V., GRAHAM, D. Y., MUSSER J. M. (1996). Population genetics analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol*, **178:** 3934-3938.

GODOY, A. P. O., RIBEIRO, M. L., BENVENGO, Y. H. B., VITIELLO, L., MIRANDA, M. C. B., MENDONÇA, S., PEDRAZOLLI JR, J. (2003). Analysis of antimicrobial susceptiblity and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterology*, **3:**20-26.

GOLDMAN, R.C., ZAKULA, D., FLAMM, R., BEYER, J., CAPOBIANCO, J. (1994). Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hidroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother*, **38:** 1496-1500.

GOODWIN, A., KERSULYTE, D., SISSON, G. (1998). Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH reductase. *Mol Microbiol*, **28:** 383-393.

GOODWİN, C. D., ARMSTRONG, J. A., CHILVERS, T., PETERS, M., COLLİNS, M. D.,SLY, L., McCONNELL, W., HARPER, W. E. S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to Helicobacter gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov., respectively. *Int j Syst :Bacteriol*, **39:** 397-405.

GRAHAM, D. Y., YAMAOKA, Y. (1998). *Helicobacter pylori* and cagA: Relationship with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. *Helicobacter*, **3:**145-151.

HERBARTH, O., KRUMBIEGEL, P., FRITZ G. J. (2001). *Helicobacter pylori* prevalences and risk factors among school beginners in a German urbancenter and its rural county. *Environ Health Perspect*, **109:**573–577.

HONCOCK, R. E. W., BINA R. A. J. .B., TRUST, T. (1998) *Helicobacter pylori:* a suprisingly conserved bacterium. *Nat. Biotechnol.* **16:** 216-217.

HONDA,K., OHKUSA, T., TAKASIMIZU, I., WATANABE, M., Amagasa M. (2001). High risk of *Helicobacter pylori* infection in young Japanese dentists. *J Gastroenterol Hepatol*, **16:**862–865.

HOPKİNS, J. R., MORRIS, G. (1994) *Helicobacter pylori*: The missing link inperspective. *The American Journal of Medicine*, **97:** 265-277.

HORIUCHI, T., OHKUSA, T., WATANABE, M., KOBAYASHI, D., MIWA, H., EISHI, Y. (2001). *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol Immunol*, **45:**515–519.

HULTEN, K., GiBREEL, A., SKÖLD, O., ENGSTRAND, L. (1997). Macrolide resitance in *Helicobacter pylori*: Mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob Agents Chemother*, **41:** 2250-2253.

ISRAEL, D. A., SALAMA, N., KRISHNA, A., RIEGER, U. M., ATHERTON, J. C., FALKOW, S. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *PNAS*, **98:** 14625-14630.

JENKS, P. J., EDWARDS, D. I. (2002). Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **19:**1-7.

JENKS, P. J., FERRERO, R. L., LABIGNE, A. (1999) The role of the rdx A gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*, **43:** 753-758.

JIANG, Q., HIRATSUKA, K., TAYLOR, D. E., (1996) Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*, **20:** 833-842.

KANTARÇEKEN, B., ALADAĞ, M., ATİK, E., KÖKSAL, F., HARPUTOĞLU, M., HARPUTOĞLU, H., KARINCAOĞLU, M., ATEŞ, M., YILDIRİM, B., HİLMİOĞLU, F. (2003). Association of cagA and vacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol*, **9:**1580-1583.

KARAMAN, M., ABACIOĞLU, H., TOPALAK, Ö., ŞİMŞEK, İ. (2004). Peptik ülser hastalığı ve ülser olmayan dispepsili hastalardan soyutlanan *Helicobacter pylori* kökenlerinin vacA ve cagA genlerinin moleküler analizi. *Moleküler Tanı Dergisi,* **1**:1-8.

KATO, M., YAMAOKA, Y., KIM, J. J., REDDY, R., ASAKA, M., KASHIMA, K., OSATO, M. S., EL-ZATARI, F. A. K., GRAHAM, D. Y., KWON, D. H. (2000). Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, **44:**2214-2216.

KATO, S., FUJIMURA, S., UDAGAWA, H., SHIMIZU, T., MAISAWA, S., OZAWA, K., IINUMA, K. (2002). Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children. *J Clin Microbiol*, **40:** 649-653.

KIDD, M., PEEK, R. M., LASTOVİCA, A. J., ISRAEL, D. A., KUMMER, A. F., LOUW J. A. (2001). Analysis of iceA genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinally significant disease. *Gut*, **49:**629-635.

KIM, K. S., KANG, J. O., EUN, S. C., HAN, S. D., CHOI, T. Y. (2002). Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci*, **17:** 509-603.

KIM, J. W., KIM, J. G., CHAS, S. L., CHA, Y. J., PARK, S. M. (2004). High prevelance of multible strain colonization of *Helicobacter pylori* in Korean patients; DNA diversity among clinical isolates from the gastric corpus, antrum and duodenum. *Korean J Intern Med*, **19:**1-9.

KIM, J. J., REDDY, R., LEE, M., KIM, J. G., EL-ZAATARI, F. A. K., OSATO, M. S., GRAHAM, D. Y., KWON, D. H. (2001). Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isoaltes from Korea. *J Antimicrob Agents Chemother*, **47:**459-461.

KITAGAWA, M., NATORI, M., KATOH, M. (2001). Maternal transmission of *Helicobacter pylori* in the perinatal period. *J Obst Gynaecol Res*, **27:**225–230.

KUIPERS, E. J., ISRAEL, D. A., KUSTERS, J. G., GERRITS, M. M., WEEL, J., ENDE, A., HULST, R. W. M., WIRTH, H. P., HÖÖK-NIKANNE, J., THOMPSON, S. A., 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:** 273-282.

LABIGNE, A., AND DE REUSE, H. (1996). Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicty. *Infect Agents Dis*, **5:**191-202.

LATHAM, S. R., OWEN, R. J., ELVİSS, N. C., LABIGNE, A.,JENKS, P. J. (2001). Differentiation of metronidazole-sensitive and –resistant strains of *Helicobacter pylori* by immunoblotting with antisera to the RdxA protein. *J Clin Microbiol*, **39:**3052-3055.

LEE, A., MEGRAUD, F. (1996). *Helicobacter pylori:* Techniques for Clinical Diognosis & Basic Resarch, 2nd Ed. p.:122-123.

LU, Y. Z., REDLINGER, T. E, AVITIA, R., GALINDO, A., GOODMAN, K. (2002). Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol*, **68:**1436–1439.

LOIVUKENE, K., KOLK, H., MAAROOS, H. I., KASENOMM, P., USTAV, M., MIKELSAAR, M. (2000). Metronidazole and clarithromycin is susceptibility and the subtypes of vacA of *Helicobacter pylori* isolates in Estonia. *Scand J Infect Dis*, **32:**59-62.

MAEDA, S., YOSHIDA,H., MATSUNAGA, H., OGURA, K., KAWAMATA, O., SHIRATORI, Y., OMATA, M. (2000). Detection of Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains by a preferential homoduplex formation assay. *J Clin Microbiol*, **38:**1, 210-214.

MALATY, H. M., LOGAN, N. D., GRAHAM, D. Y., RAMCHATESHiNGH, J. E. (2001). *Helicobacter pylori* infection in preschool and school-aged minority children. Effect of socioeconomic indicators and breast-feeding practices. *Clin Infect Dis,* **32:**1387–1392.

MARAIS, A., MENDZ, G. L., HAZELL, S. L., MEGRAUD, F. (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63:**642-674.

MARAIS, A., MONTEIRO, L., OCCHIALINI, A., PINA, M., LAMOULIATTE, H., MÈGRAUD, F. (1999). Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolids by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut*, **44:**463-467.

MARSHALL, B. J. (1994). *Helicobacter pylori. Am J Gastroenterol*, **89:** 116-118.

MATSUMURA, M., HIKIBA, Y., OGURA, K., TOGO, G., TSUKUDA, I., USHIKAWA, K., SHIRATORI, Y., OMATA, M. (2001). Rapid detection of mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* that confers resistance to clarithromycin treatment to the bacterium. *J Clin Microbiol*, **39**:691-695.

MATSUOKA, M., YOSHIDA, Y., HAYAKAWA, K., FUKUCHI, K., SUGANO, K. (1999). Simultaneous colonisation of *Helicobacter pylori* with and without mutations in the 23S rRNA gene in patients with no history of clarithromycin exposure. *Gut*, **45:**503-507.

MAZARI-HIRIART, M., LOPEZ-VIDAL, Y., CASTILLO-ROJAS, G., de LEON, S. P., CRAVIOTO, A. (2001). *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. *Arch Med Res*, **32:**458–467.

MÈGRAUD, F. (1997). Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther*, **11(Suppi. 1):** 43-53.

MÈGRAUD, F., CAMOU-JUNCAS, C., OCCHIALINI, A., BIRAC, C. (1996). *Helicobacter pylori* resistance levels to clarithromycin remain stable. Gastroenterology, **100:**A192.

MITCHELL, H., MÈGRAUD, F. (2002). Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **7(Suppl 1):** 8-16.

MONSTEIN, H .J., COUR, C. D., JONASSON, J. (2001). Probing 23S ribosomal RNA cleavage sites in coccoid *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **6:**100-109.

NAMURA, A., STEMMERMAN, G. N., CHOYOU, P. H. (1994). *Helicobacter pylori* infection increasing the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med*, **120:**977-981.

NICOLAAS, L., ARENTS, A., VAN ZWET, A. A., THİJS, J. C., KOOISTRA-SMID, A., VAN SLOCHTEREN, K. R., DEGENER, J. E., KLEIBEUKER, J. H., VAN DOORN, L. J. (2001). The importance of vacA, cagA, and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *The American Journal of Gastroenterology*, **96:**2603-2608.

NIH Consensus Conference (1994), *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *J Am Med Assoc*, **272**:65-69.

NISHIYA, D., SHIMOYAMA, T., FUKUDA, S., YOSHIMURA, T., TANAKA, M., MUNAKATA, A. (2000). Evaluation of the clinical relevance of the iceA1 gene in patients with *Helicobacter pylori* infecition in Japan. *Scand J Gastroenterol*, **35:**36-39.

OCCHIALINI, A., URDACI, M., DOUCET-POPULAIRE, F., BEBEAR, C. M., LAMOULIATTE, H. MÈGRAUD, F. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: Rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother*, **41:**12, 2724-2728.

OWEN, R. J. (2002). Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut*, **50:** 285-289.

ÖZDEN, A., DUMLU, Ş., DÖNDERİCİ, Ö., ÇETİNKAYA, H., SOYLU, K., ÖZKAM, H., BALCI, M., SARIOĞLU, M., UZUNALİMOĞLU, Ö. (1992). *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun ülkemizde seroepidemiyolojisi. *Gasroeneroloji*, **3:**664-668.

PALABIYIKOĞLU, M., ŞAHİN, F., ÖZDEN, A., UZUNALİMOĞLU, Ö. (1997). Disk diffüzyon yöntemi ile *Helicobacter pylori* klinik izolatlarında amoksisiline ve klaritromisine karşı primer duyarlılığın araştırılması ve tedavi sonrası muhtemel duyarlılık değişikliğin incelenmesi. *Turk J Gastroenterol*, **8:**309-312.

PARK, S. R., MACKAY, W. G., REID, D. C. (2001). *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res*, **35:**1624–1626.

PARSONNET, J. E. (1995). The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Phar Ther*, **9(Suppl 2):**45-52.

PEEK, R. M. JR, MILLER, G. G., THAM, K.T., PEREZ-PEREZ, G. I., COVER, T. L., ATHERTON, J. C., DUNN, G. D., BLASER, M. J. (1995). Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J Clin Microbiol*, **33:**28-32.

PEEK, R. M. JR, THOMPSON, S. A., DONAHUE, J. P., THAM, K. T., ATHERTON, J. C. BLASER, M. J. *MILLER, G. G.* (1998). *Adherance to gastric epithelial cells induces expression of a Helicobacter pylori* gene, iceA, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians*, **110:**531-544.

PERNG, C. L., LIN H. J., LO, W. C., TSENG, G. Y., SUN, I. C., OU, Y. H. (2004). Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *World J Gastroenterol*, **10:**602-605.

POMS, R. E., TATINI, S. R., (2001). Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4°C. *Int J Food Microbiol*, **63:**281–286.

POUNDER, R. E. (1997). New developments in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Scand J Gastroenterol*, **32(Suppl 223):** 43-45.

POUNDER, R. E. (1995). The prevalance of *Helicobacter pylori* in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*, **9(Suppl 2):** 33-40.

RAUWS, E. A. J. (1989). Therapeutic effects at eradication of *Helicobacter pylori. Eur J Gastroenterol Hepatol*, **1:** 34-41.

RIBEIRO, M. L., VITIELLO, L., MIRANDA, M. C. B., BENVENGO, Y. H. B., GODOY, A. P. O., MENDONCA, S., PEDRAZOLLI Jr, J. (2003). Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **2:**1-15.

RYAN, K. A., VAN DOORN, L. J., MORAN, A. P., GLENNON, SMITH, T., MAHER, M. (2001). Evalution of clarithromycin resistance and cagA and vacA genotyping of *Helicobacter pylori* strains from the west of Ireland using line probe assyas. *J Clin Microbiol*, **39:**1978-1980.

SALTIK, I. N., DEMİR, H., ENGİN, D., ERTUNÇ, O. D., AKYON, Y., KOÇAK, N. (2003). The cagA status of *Helicobacter pylori* isolates from dyspeptic children in Turkey. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **36:**147-149.

SARIBAŞAK, H., SALİH, B. A., YAMAOKA, Y., SANDER, E. (2004). Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol*, **43:**1648-1651.

SEVİN, E., LAMARQUE D., DELCHİER, J. C., SOUSSY, C. J., TANKOVIC, J. (1998). Co-detection of *Helicobacter pylori* and of its resistance to clarithromycin by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, **165:** 369-372.

SHARARA, A. I., CHEDID, M., ARAJ, G. F., BARADA, K. A., MOURAD, F. H. (2002). Prevelance of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxycillin and tetracycline in Lebnon. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **19:** 155-158.

SIPPONEN, P. (1991). *Helicobacter pylori* and chronic gastritis: an increased risk of peptic ulcer? *Scand J Gastroenterol*, **26**:6-10.

SOLCÁ, N. M., BERNASCONI, M. V., PİFFARETTI, J. C. (2000). Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori:* comparision of the rdxA gene sequences in 30 strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **44:**2207-2210.

SORBERG, M., NILSSON, M., HANBERGER, H., NILSON, L. E. (1996). Morphologic conversation of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. *Eur J Clin Microb Infect Dis*, **15:**216-219.

STROBEL, S., BERESWILL, S., BALIG, P., ALLGAIER, P., SONNTAG, H., KIST, M. (1998). Identification and analysis of a new vacA genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol*, **36:**1285-1289.

ŞAHİN, F., ÖZDEN, A., ÜNVER, E., ÖZENCİ, H., UZUNALİMOĞLU, Ö., ATALAY, G., KOÇ, Ö. (1994). Agar dilüsyon yöntemi ile *Helicobacter pylori* için metronidazol dirençlilik testi ve disk diffüzyon yöntemi ile amoksiline ve klaritromisinin *H. pylori*'ye etkisi. *Gastroenteroloji*, **5:**203-206.

ŞAHİN, F.I., TINAZ, A.C., ŞİMŞEK, I.S., MENEVŞE, S., GÖRGÜL, A. (2001). Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsy samples of Turkish patients by PCR-RFLP. *Acta Gastro Enterol Belg*, **64:**150–152

TAYLOR, D. E., ZHONGMING G. E., PURYCH, D., TONY, L. O., HIRATSUKA, K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41:** 2621–2628.

THOMAS, J. E., GIBSON G. R., DARBOE, M. K., DALLE, A., WEAVER, L. T. (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet*, **340:**1194-1195.

TOMB, J-F., WHİTE, O., KERLAVAGE, A. R., CLAYTON, R. A., SUTTON, G. G., FLEİSCHMANN, R. D., KETCHUM, K. A., KLENK, H. P., GILL, S., DOUGHERTY, B. A., NELSON, K., QUACKENBUSH, J., ZHOU, L., KİRKNESS, E. F., PETERSON, S., LOFTUS, B., RİCHARDSON, D., DODSAN, R., KHALAK, H. G., GLODEK, A., MCKENNEY, K., FİTZEGERALD, L. M., LEE, N., ADAMS, M. D., HİCKEY, E. K., BERG, D. E., GOCAYNE, J.D., UTTERBACK, T. R., PETERSON, J. D., KELLEY, J. M., COTTON, M. D., WEİDMAN, J. M., FUJI, C., BOWMAN, C., WATTHEY, L., WALLIN, E., HAYES, W. S., BORODOVSKY, M., KARP, P. D., SMİTH, H. O., FRASER, C. M., VENTER, J.C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori. Nature*, **388: 539-547.**

TRIEBER, C. A., TAYLOR, D. E. (2002). Mutations in the 16S rRNA genes of the *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol*, **184:**2131-2140.

TYGAT, G. J. N. (1995). No *Helicobacter pylori* associated peptic ulser disease. *Aliment Phar Ther*, **89:**42-47.

USTAÇELEBİ, Ş., MUTLU, G., CENGİZ, T., TÜMBAY, E., İMİR, T., METE, Ö. (1998). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji,* Konu 9.

VAN DOORN, L. J., FIGUEIREDO, C., SANNA, R. (1998). Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*, **115:**58-66.

VAN DOORN, L. J., DEBETS-OSSENKOPP, Y. J., MARAIS, A., SANNA, R., MÈGRAUD, F. KUSTERS, J. G., QUINT, W. G. V. (1999). Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **43:**7, 1779-1782.

VAN DOORN, L. J., GLUPCZYNASKI, Y., KUSTERS, J. G., MÈGRAUD, F. MIDOLO, P., MAGGI-SOLCA, N., QUEIROZ, D. M. M., NOUHAN, N., STET, E., QUINT, W., G. V. (2001). Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR-Line Prob Assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**:5, 1500-1503.

VERSALOVIC, J., SHORTRIDGE, D., KIBLER, K., GRIFFY, M. V., BEYER, J., FLAMM, R. K., TANAKA, S. K., GRAHAM, D. Y., GO, M. F. (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **40:**2, 477-480.

TORRES, J., CAMARLINGA-PONCE, M., PEREZ-PEREZ, G., MADRAZO-DE LA GARZA, A., DEHESA, M., GONZALEZ-VALENCIA, G., MUNOZ, O. (2001). Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol*, **39:** 2677-2680.

WANG, G. E., JIANG, G., TAYLOR, D. E. (1998). Genotypic characterization of clarithromycin-resistant and susceptible *Helicobacter pylori* stains from the same patient demonstrates existance of two unrelated isolates. *J Clin Microbiol*, **36**:9, 2730-2731.

WESBLOM, T.V., UNGE, P. (1992). Drug resistance of *Helicobacter pylori*: memorandum from a meeting at the sixth international work-shop on campylobacter, Helicobacter and related organisms. *J Infect Dis*, **139:**2485-2493.

World Health Organization: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human, Geneva: World Health Organization (1994). **61:**177-240.

YANG, Y. Y., YANG, Y., JENG, Y., CHANG, M., NI, Y. (2001). Prevalance and rapid identification of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolates in children. *Pediatr Infect Dis*, **20:**662-666.

YAMAOKA, Y., KODAMA, T., GUITRREZ, O., KIM, J. G., KASHIMA, K., GRAHAM, D. Y. (1999). Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, vacA status and clinical outcome: Studies in four different countries. *J Clin Microbiol*, **37:**2274-2279.

ZHOU, W., YAMAZAKI, S., YAMAKAWA, A., OHTANI, M., ITO, Y., KEIDA, Y., HIGASHI, H., HATAKEYAMA, M., SI, J., AZUMA, T. (2004). The diversity of vacA and cagA genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **40**:81-87.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı	Peren H.
Soyadı	Bağlan
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara, 20.08.1979
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	Bekar
İletişim adresi	Dikmen Cad. Mimar Sok. 19/1 Ankara
Telefonu	0312 3623030/6017
E-posta	perenbaglan@yahoo.com

II- Eğitimi

09.2001-07.2004, Yüksek Lisans
Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, ANKARA.

09.1997-06.2001, Lisans
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, ANKARA

09.1994-06.1997, Lise
Çankaya Lisesi, ANKARA.

III-Ünvanları

22.06.2001, Biyolog.

20.07.2004, Uzman Biyolog.

IV-Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

- *'Helicobacter pylori* 'nin Antibiyotiklere Direnci'
  Peren H. Bağlan, Ali Özden.
  Güncel Gastroenteroloji, Eylül 2003, Sayı 7/3.

- Bakteri ve Yapısı.
  Peren H. Bağlan.
  Güncel Gastroenteroloji, Eylül 2003, Sayı 7/3

- Keşvin Yolları; Kloniama.
  Peren H. Bağlan.

Science, 2000:288, Çeviri.
Güncel Gastroenteroloji, Aralık, 2001.

V-Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Bilimsel Toplantılar

- HEPATOLOJİ 2004, 25.06.2004, Bilkent Oteli/ Ankara
- IX. İnternasyonel Antiviral Sempozyum ve Workshop, 9-11.Kasım-2003, Antalya.
- HEPATOLOJİ 2003, 20.06.2003, Bilkent Oteli/ Ankara.