

Dispeptik Yakınlı Hastalarda *Helicobacter pylori* Virulans Genleri ile Endoskopik Bulguların Karşılaştırılması §

Arzu İRVEM*, Fetiye KOLAYLI**, Saadetin HÜLAGU***

* Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü

** Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

*** Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Helicobacter pylori* gastrit, gastrik ve duodenal ülser, gastrik kanser ve MALT lenfoma ile ilişkili önemli bir patojendir. *H. pylori* suşları ile enfekte olan birçok bireyde peptik ülserin gelişmemesi ve asemptomatik kalması, peptik ülser gelişiminde başka faktörlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Enfeksiyonun gelişiminde *H. pylori*'ye ait sitotoksin ilişkili patojenite adacığında (CagPAI) yer alan sitotoksin ilişkili gen (CagA), vakuol oluşturuvcu sitotoksin geni (VacA), kan grubu antijeni bağlayan adezin (BabA), Sialil-Lewis X bağlayan (SapA) ve IceA virulans faktörleri yanında konağa ait faktörler de önemli rol oynamaktadır. Üreaz enzimi ve yüksek hareket özelliği de enfeksiyon patogenezinde önemlidir. Virulans genleri ile gastrik hastalıklar arasında ilişkinin varlığı bilinmekle birlikte, çeşitli coğrafik bölgelerde farklılıklar göstermektedir. Patojenik ve non-patojenik *H. pylori* suşları konakta bulunabilmekte ve farklı genotiplere sahip suşlar farklı klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler. Bu çalışmada, Kocaeli bölgesindeki dispeptik yakınması olan hastalarda *H. pylori* virulans genlerinin prevalansını ve virulans genleri ile endoskopik bulguların karşılaştırılmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya alınan 121 dispeptik yakınmalı hastanın endoskopik doku biyopsisinde *H. pylori* 16S rRNA genine spesifik primerler kullanılarak yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) yetmiş sekiz hastanın (40 gastritli, 20 gastrik ülserli, 9 duodenitli, 9 normal endoskopik bulgulu) biyopsi örneğinde *H. pylori* pozitif olarak belirlendi. Virulans genlerinin varlığı klasik PZR yöntemi, istatistiksel analiz için Pearson Chi-squared ve Fisher's exact test testleri kullanıldı.

Bulgular: Kocaeli bölgesinde belirlenen *H. pylori* suşlarında CagA geni %70.5, VacA s1a/m2 alleli %71.8, VacA s2/m2 alleli %16.7 oranında bulundu. CagA, VacA s1/m2 genotipi dominant olmasına rağmen, klinik bulgularla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmedi. IceA1 ve IceA2 allelleri hemen hemen eşit oranda (sırasıyla %24.4 ve 26.9) belirlenirken babA2 alleli %6.4 oranında belirlendi. IceA2 alleli ile klinik bulgular arasında negatif bir ilişki belirlendi ($p=0.011$). IceA1, babA2 allelleri istatistiksel olarak klinikle ilişkili bulunamadı.

Sonuç: Oranın bu şekilde düşük olmasının nedeni gastrik kanserli ve prekanseröz lezyonlu hasta grubunun olmaması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori*, virulans genleri

SUMMARY

Comparison of *Helicobacter pylori* Virulence Genes and Endoscopic Findings in Patients with Dyspeptic Complaints

Objective: *Helicobacter pylori* is a significant pathogen associated with gastritis, gastric and duodenal ulcer, gastric cancer, and MALT lymphoma. Since many individuals infected with *H. pylori* do not develop peptic ulcer and remain asymptomatic, it is thought that other factors could play a role in the development of peptic ulcer disease. Besides *H. pylori* associated factors such as cytotoxin associated gene (CagA), vacuole-forming cytotoxin gene (VacA), blood group antigen binding adhesion (BabA), Sialil-Lewis X binding (SapA), and IceA found on the pathogenicity island, host factors play an important role in the development of *H. pylori* disease. The urease enzyme and the motility of *H. pylori* are also important in the pathogenesis of infection. The association between the virulence genes and gastric diseases exhibit geographical difference. Pathogenic and non-pathogenic *H. pylori* strains can be found in the host, and strains with different genotypes can lead to different clinical presentations. This study was aimed to determine the virulence genes of *H. pylori* and to investigate the correlation between the type of the virulence genes and endoscopic findings in a group of patients with dyspeptic complaints in the Kocaeli area.

Materials and Methods: A total of 121 patients with dyspeptic complaints were included in the study. Endoscopic tissue biopsies were tested by polymerase chain reaction (PCR) using primers specific to *H. pylori* 16S rRNA. *H. pylori* was detected in seventy-eight patients (gastritis, n=40; 20 gastric ulcer, n=20; duodenitis, n=9; normal endoscopic findings, n=9). Virulence genes were determined by classical PCR method. Pearson Chi-square and Fisher's exact tests were used for statistical analysis.

Results: In the *H. pylori* strains found in the Kocaeli area CagA gene was determined in 70%, S1a/m2 VacA allele in 71.8%, VacA allele s2/m2 in 16.7% of the strains. Though the CagA, VacA s1/m2 genotypes were dominant, a statistically significant correlation was not found between the clinical findings prevalence of these genotypes. IceA1 and IceA2 alleles were found at almost equal rates (24.4% and 26.9%, respectively), while babA2 allele was determined in 6.4% of the strains. A negative correlation was determined between the IceA2 allele and the clinical findings ($p=0.011$). IceA1 and babA2 alleles were not found to be statistically associated with clinical findings.

Conclusion: The low virulence gene positivities obtained in this study was attributed to the lack of patients with gastric cancer or precancerous lesions in the study population.

Key words: *Helicobacter pylori*, virulence genes

Alındığı tarih: 18.04.2013

Kabul tarihi: 10.10.2014

Yazışma adresi: Arzu İrvem, Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul

e-posta: arzuirvem@myynet.com

§ Bu araştırma XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (07-11 Kasım 2010, Girne, KKTC) poster bildiri (PB-133) olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Helicobacter pylori dünya nüfusunun %50'sini enfekte eden en sık rastlanan kronik bakteriyel enfeksiyondur. Mide ülseri, duodenal ülser, kronik atrofik gastrit, mide lenfoması ve mide kanseri ile ilişkisi bilinmektedir. *H. pylori* kolonizasyonunu takiben oluşan ilk patolojik durum kronik aktif gastrittir. Fakat yalnızca %10-15'inde semptomatik enfeksiyon oluştururken, büyük bir kısmında ya asemptomatik ya da yalnızca kronik gastrit görülmektedir. Patojenik ve non-patojenik *H. pylori* suşları konakta bulunabilmekte ve farklı genotiplere sahip suşlar farklı klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler. Bakterinin intragastrik yayılımı, kronik inflamasyonun şiddeti kolonize olan suşun yapısı, konağın genetik yapısı, oluşan immun yanıt, diyet ve asit üretim düzeyi ile yakından ilişkilidir. *H. pylori* enfeksiyonunda ciddi mide hasarı oluşmaktadır. Enfeksiyonun gelişmesinde *H. pylori*'ye ait sitotoksin ilişkili patojenite adacığında (*CagPAI*) yer alan sitotoksin ilişkili gen (*CagA*), vakuol oluşturucu sitotoksin geni (*VacA*), kan grubu antijeni bağlayan adezin (*BabA*), Sialil-Lewis X bağlayan (*SapA*) ve *IceA* virulans faktörleri yanında konağa ait faktörler de önemli rol oynamaktadır. Üreaz enzimi ve yüksek hareket özelliği de enfeksiyon patogenezinde önemlidir⁽¹⁾.

Bu çalışmada, Kocaeli ve bölgesinde gastrointestinal sistem yakınması olan ve *H. pylori* enfeksiyonu düşünülen hastaların mide biyopsi örneklerinde moleküler yöntemler kullanılarak *H. pylori* varlığının araştırılması, pozitif olanlarda bakteriye ait virulans genlerinin belirlenmesi, bu genlerin klinik bulgu ile ilişkisinin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

2007 yılı gastroenteroloji polikliniğine dispeptik şikayetler ile gelen ve endoskopi yapılması

kararlaştırılan 66 kadın, 55 erkek olmak üzere toplam 121 hasta araştırmaya alındı. Endoskopi sonucunda çalışmaya dâhil edilmesine karar verilen hastaların antrumlarından üç adet biyopsi örneği alındı. (Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Proje No:2006/83 Etik Kurul Karar No:18/23) Her hastanın bir biyopsi örneği moleküler metod için kullanıldı. DNA izolasyonu için kullanılan kimyasallar hazırlandı. CTAB ile dokudan DNA izolasyonu yapıldı.

CTAB (*Cetyltrimethyl ammonium bromide*) ile DNA ekstraksiyon yöntemi

Biyopsi örneği, 500 µl TE tamponu içine eklendi. 30 µl %10 SDS+3 µl 20 mg/ml Proteinaz K eklenerek pipetlemeyle iyice karıştırıldı, bir gece 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 100 µl 5 M NaCl eklendi ve vortekslendi. Takiben 80 µl CTAB eklenerek vortekslendi, 65°C'de 10 dk. inkübe edildi. Üzerine 750-800 µl kloroform eklendi ve vortekslendi. Takiben 8 dakika (1600 rpm) santrifüj edildi. Süpernatant, karıştırmamaya dikkat edilerek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı, 24:1 ml kloroform/izopropanol karışımından, süpernatana eşit hacimde eklendi, (yaklaşık 600-700 µl), daha sonra vortekslendi ve 8 dakika (1600 rpm) santrifüj edildi. Süpernatantı, karıştırmamaya dikkat ederek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. İzopropanol süpernatana eşit miktarda (yaklaşık 600-700 µl) eklendi. Takiben 3 M pH:5.2 sodyum asetatın 3 µl ilave edilerek, çok nazik bir şekilde sallayarak karıştırıldı. DNA iplikçik veya hava kabarcıkları şeklinde görüldü. Santrifüj (13 dk) sonrasında santrifüj tüpünün dibinde çökelti saptandı. Pipet yardımıyla, çok nazik olarak süpernatant alınarak atıldı. Kalan çökeltinin üzerine 200 µl %70'lik etanol eklendi ve 6 dk. santrifüj edildi. Çökeltiyeye dokunmadan pipet yardımıyla etanol alındı ve atıldı. Çökeltinin kurumması için oda ısısında 2.5 saat bekletildi. Çökelti üzerine 50 µl TE eklendi. DNA hemen kullanılacaksa +4°C'de,

daha sonra kullanılacaksa -20°C’de bekletildi.

PZR protokolü: Total 25 µl olarak düzenlenen bir reaksiyonluk PZR karışımı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. dH₂O 16 µl, MgCl₂ 1.5 mM, PCR buffer (10X) 2.5 µl, dNTP mix (Fermentans) 2 mM, Primer F’ 1 mM, Primer R’ 1 mM, Taq DNA polimeraz (Fermentans) 1U, *H. pylori* DNA 200 ng ve amplifikasyon için GeneAmp PCR sistemi (Perkin Elmer) kullanıldı.

PZR reaksiyon siklusları: Predenatürasyon 94°C 5’, Denaturasyon 94°C 1’, Annealing ısı ve siklus (Tablo 1) 1’ sentez ısı 72°C 1’, son sentez ısı 72°C 7’.

İstatistiksel Analiz: Pearson Che-Square test ve Fisher’s Exact test kullanıldı

BULGULAR

Endoskopi bulgularına göre gruplandırıldığında hastaların 56’sı (%46.3) gastrit, 24’ü (%19.8)

ülser, 13’ü (%10.7) duodenit, olarak belirlendi. Yirmi sekiz (%23.1) hastada herhangi bir patoloji bulunamadı.

Alınan 121 biyopsi örneğinden izole edilen DNA’lardan *H. pylori* 16S rRNA primerleri (Tablo 2) kullanılarak yapılan PCR’da 78 (%64.4) örnekte *H. pylori* pozitif, 43 (%35.6) örnekte *H. pylori* negatif olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

H. pylori’nin patojenite genleri ile ilgili çalışmalarda, coğrafik bölgelere göre genetik çeşitlilik

Tablo 3. Endoskopi sonucuna göre hasta grupları ve *H. pylori* pozitifliği

Endoskopi sonucu	Hasta sayısı (%)	<i>H. pylori</i> + (%)
Gastrit	56 (46.3)	40 (51.3)
Ülser	24 (19.8)	20 (25.6)
Duodenit	13 (10.7)	9 (11.5)
Normal	28 (23.1)	9 (11.5)
Toplam	121 (100)	78 (100)

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler, anelling ısı, reaksiyon siklusları.

	Primer	Primer dizisi (5’- 3’)	PCR ürün uzunluğu (bazçifti)	Annealing Isısı (°C)	Reaksiyon Siklusları (sn)
<i>Cag A</i>	CAG-L	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGAA	289	52	35 (60)
	CAG-R	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT			
<i>VacA s1</i>	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259		
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC			
<i>VacA s2</i>	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	286		
	VA1-R	CTGCTT GAATGCGCCAAAC			
<i>VacA s1a</i>	SS1-Fa	GTCAGCATCACACCGCAAC	190	54	30 (30)
<i>VacA s1b</i>	SS3-Fa	AGCGCCATACCGCAAGAG	187	54	
<i>VacA s2</i>	SS2-Fa	GCTAACACGCCAAAT GATCC	199	54	30 (30)
<i>VacA m1</i>	VA3-F	GGTCAAATGCGGTCATGG	290	50	30 (30)
	VA3-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC			35(60)
<i>VacA m2</i>	VA4-F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352	54	35(60)
	VA4-R	CATAACTAGCGCCTTGCA C			
<i>IceA1</i>	IceA1-F	GTGTTTTTAACCAAAGTATC	246	49	
<i>IceA2</i>	IceA1-R	CTATAGCCAGTCTCTTTGCA	229/334		35(45)
	IceA2-F	GTTGGGTATATCACAATTTAT			
	IceA2-R	TTGCCCTATTTTCTAGTAGGT			
<i>BabA2</i>	BabA2-F	ATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA	850		
	BabA2-R	TGTTAGTGATTCGGTGTAGGACA			
<i>16S rRNA</i>	16S-F	TAAGAGATCAGCCTATGTCC	534		
	16S-R	TCCCACGCTTTAAGCGCAAT			

Tablo 3. Endoskopi sonucu ile virulans genlerin dağılımı.

	Gastrit	Peptik ulcus	Duodenit	Normal	Toplam
<i>CagA</i>	31	14	4	6	55
<i>Vac s1a</i>	31	14	6	5	56
<i>Vac s1b</i>	0	0	0	0	0
<i>Vac s2</i>	7	2	1	3	13
<i>Vac m1</i>	0	0	0	1	1
<i>Vac m2</i>	38	20	9	9	68
<i>Ice A1</i>	14	3	1	1	19
<i>Ice A2</i>	8	4	3	6	21
<i>Bab A2</i>	2	2	1	0	5
<i>S1a/m1</i>	0	0	0	1	1
<i>S1a/m2</i>	31	13	6	5	42
<i>S2/m2</i>	7	2	1	3	5

gösterdiği bilinmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da *H. pylori* izolatlarının %60'ında *CagA* geni pozitif olarak belirlenirken Kore, Japonya gibi Asya ülkelerinde *H. pylori* suşlarında %90'ın üzerinde *CagA* geni pozitifliği bildirilmiştir⁽²⁻⁶⁾. Avrupa ülkelerinde peptik ülser hastalığı (PÜH) ile *CagA* pozitifliği arasında sıkı bir ilişki bildirilirken, Asya ülkelerinde böyle bir ilişkinin varlığı bildirilmemektedir. Yapılan bu çalışmada *H. pylori* pozitif olarak belirlenen biyopsi örneklerinin %70.5'te *CagA* geni pozitif olarak belirlenmiştir. Hasta grupları dikkate alındığında; gastritte %77.5, ülserde %70.4, duodenitte %44.4 ve herhangi bir patolojik endoskopi bulgusu olmayanlarda %66.7 oranında *CagA* geni pozitif olarak belirlenmiştir. *CagA* pozitifliği gastrit ve ülserli hasta gruplarında yüksek oranda görülmektedir. Fakat *CagA* geni pozitifliği ile gastrik hastalıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ($p>0.05$). Ülkemizde *CagA* gen prevalansı %59-78 arasında değiştiği bilinmektedir⁽⁷⁾. Sarıbaş ve ark.⁽⁸⁾ yaptığı çalışmada, %58.6 oranında tespit edilmiştir.

H. pylori suşlarının tamamında toksini kodlayan *VacA* geni bulunmasına rağmen, genomdaki farklılıklar nedeniyle %50'si toksin üretebilmektedir. Fakat *VacA* gen dizisi olmayan bazı suşların varlığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır⁽⁹⁾. Çalışmamızda da *H. pylori* pozitif 9 biyopsi örneğinde *VacA* geni belirlene-

memiştir. Bu hastaların 8'i *CagA* geni taşıyor olup gastrit ve ülser belirlenen hastalardır. Dolayısıyla *VacA* geninin tek başına patogeneze sorumlu olup olmadığı tartışma konusudur. *VacA* geni sinyal dizisi (s bölgesi) *s1a*, *s1b*, *lc*, *s2* ve orta bölge (m bölgesi) *m1* ve *m2* olmak üzere en az iki değişken gen bölgesine sahiptir. *s1a/m1* sitotoksik etkisinin *s1a/m2*'den daha fazla olduğu ve *s2/m2* bulunanlarda sitotoksositeye hemen hemen rastlanmadığını bildirmektedirler. Kuzey ve Doğu Avrupa'da *VacA s1a* allelinin, İspanya ve Portekiz'de *s1b* allelinin baskın olduğu, Fransa, İtalya ve Kuzey Amerika'da ise *s1a* ve *s1b* allellerinin eşit oranda görüldüğü bildirilmiştir. Yine Avrupa ve Amerika'da *VacA* geni *m1* ve *m2* allelleri eşit oranda görülürken İran ve birçok Asya ülkesinde *m2* allelinin daha yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir⁽⁶⁾. Almanyada yapılan bir çalışmada *VacA s1a*'nın güçlü bir şekilde PÜH ile bağlantılı olduğu, *Vac s2*'nin NÜD ile bağlantılı olduğu görülmüş, çok ender olarak ülserli hastalardan izole edildiği gösterilmiş, *m1* ve *m2*'nin klinik ile ilişkisi görülmemiştir⁽¹⁰⁾. Türkiye'den yapılan bir çalışmada %76.6 *VacA* pozitifliği görülmüş, *VacA* pozitifliği ülserli hastalarda NÜD'li hastalardan daha yüksek olmasına rağmen, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış, *CagA* ile DÜ ve GÜ arasında önemli derecede pozitif bir ilişki varlığına rağmen, *VacA* geni DÜ, GÜ ve NÜD'de önceden hastalığın belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır⁽⁷⁾. Çalışmamızda *s1a* ve *s2* allellerinin pozitiflikleri sırasıyla %71.8 ve %16.7 olarak belirlenmiş olup *s1b* alleli belirlenmemiştir. *s1a* pozitifliği gastritli hastalarda %77.5, ülserli hastalarda %70, duodenitli hastalarda %66.7, normal hastalarda ise %55.6 olarak belirlenmiştir (Tablo 3) Gastritli hasta grubunda *s1a* pozitifliği belirgin bir şekilde yüksek görülmektedir. Bu sonuç yapılan diğer çalışmalarla uyum göstermektedir. Karaman ve ark.⁽¹¹⁾ yaptığı çalışmada da peptik ülser ile *vacA s1/m1*, *cagA* pozitif suşlarda

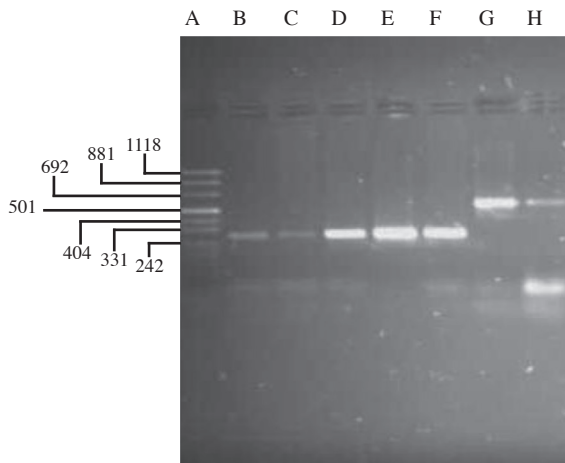
Tablo 4. Cag geni ile diğer virulans genlerinin karşılaştırılması.

	Cag A pozitif	Cag A negatif
<i>S1a/m1</i>	1	0
<i>S1a/m2</i>	42	14
<i>S2/m2</i>	5	8
<i>Ice A1</i>	16	3
<i>Ice A2</i>	10	11
<i>Bab A2</i>	4	1

anlamli ilişki olduğu görülmüştür.

VacA genotipinin allelik birlikteliğine bakıldığında; Çin'de⁽⁴⁾ yapılan bir çalışmada *s1a/m2* genotipinin, Japonya'da⁽¹²⁾ yapılan bir çalışmada *s1a/m1* genotipinin, Meksika'da yapılan bir çalışmada ise *s1b/m1* genotipinin dominant olduğu bildirilmiştir. Avrupa'da *s1/m1* ve *s1/m2* mozaikliği eşit oranda görülüp, *s2/m2* daha düşük oranda görülmektedir. Amerika'da *s1/m1* ve *s2/m2* en sık ve eşit oranda görülen mozaiklidir⁽¹³⁾. Almanya ve İngiltere'de ise *s1/m1* ve *s1/m2* en sık genotip olduğu tespit edilmiştir^(14,15). Çalışmamızda da en sık rastlanan mozaiklik *s1a/m2* olup, Avrupa ülkeleri ile benzerlik göstermektedir. Fakat gastrik hastalıklarla ilişkisi değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir.

Almanya'da yapılan çalışmalarda patojenite belirteci olarak bilinen *CagA* geni ile *VacA s1a*

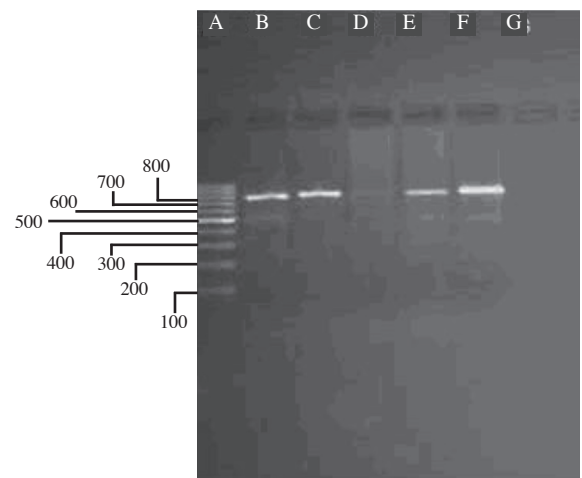


Şekil 1. *CagA* geninin (289 bp) ve *H. pylori* 16S rRNA geninin (534 bp) agaroz jeldeki görüntüsü. A; marker, B, C, D, E, F; *CagA*+. G, H; *H. pylori* +.

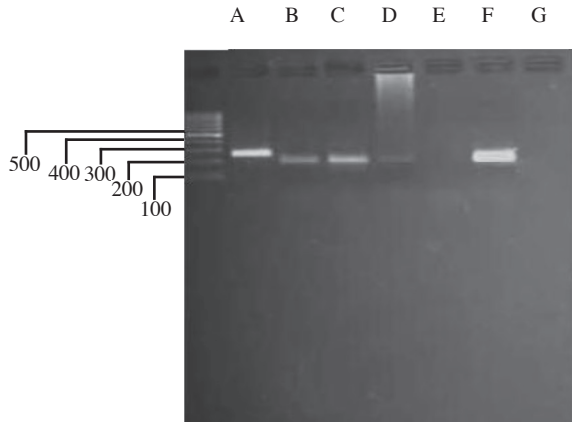
sinyal sekansın yüksek oranda korele olduğu görülmüş; ancak *CagA* ile *s2* ve *m2* arasında korelasyon görülmemiş, çok ender olarak ülserli hastalardan izole edildiği gösterilmiştir. Hatta *CagA* negatifliği ile *s2/m2* genotipi arasında belirgin bir ilişkili olduğu gösterilmiştir^(10,15). Çalışmamızda da *CagA* negatifliği ve *s2/m2* genotipi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür ($p=0.016$). *s2/m2* genotipinin görüldüğü hastalarda *CagA* geninin negatif olması bu suşların hastalıktan sorumlu olmaktan çok kolonizan suş olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çalışmada en sık olarak görülen *s1a/m2* mozaikliğinin *CagA* geni ile birlikteliğinin gastrit, peptik ülser ve duodenitli hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlenmemiştir.

Türkiye'den yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda; bir çalışmada *CagA* geninin varlığı %78 olup, *VacA s1a* ile birlikteliğine PÜH olanlarda daha sık rastlanmıştır. Başka bir çalışmada ise *H. pylori* izolatlarının özellikle *CagA*, *VacA s1a/m1* veya *s1a/m2* genotiplerinin baskın olduğu görülmüştür⁽⁹⁾. Bu sonuçlar çalışmamız ile uyum göstermektedir.

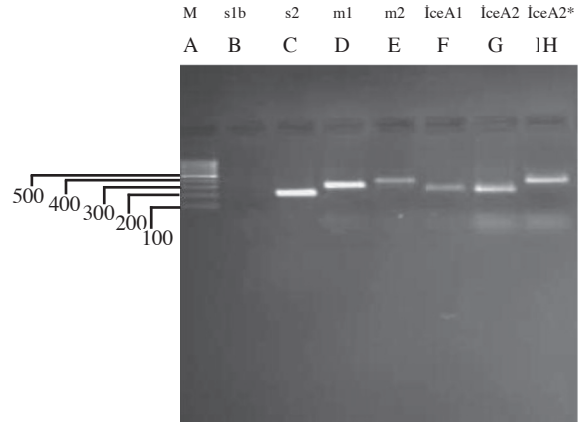
IceA geni, *H. pylori* epitel hücrelerle karşılaştığında indüklenmekte ve bakterinin epitel hücre



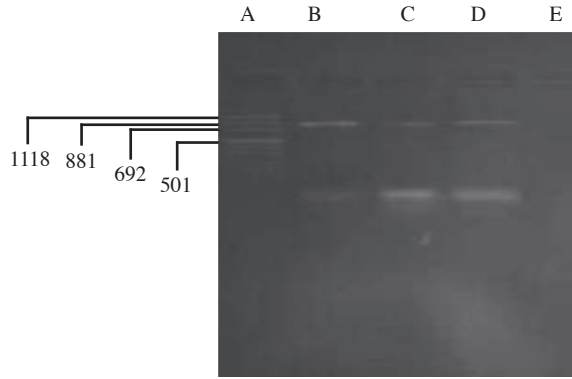
Şekil 2. *VacA* geninin agaroz jeldeki görüntüsü. A; marker, B, C, E, F; *VacA* +, D, G; *VacA* -.



Şekil 3. A: *VI* pozitifliği, (B, C, D) *s1a* pozitifliği, E *s1b* negatif, F *s2* pozitif.



Şekil 4. M; markır, B: *s1b*, C: *s2*, D: *m1*, E: *m2*, F: *IceA1*, G: *IceA2* (229bp), H: *IceA2* (334bp).



Şekil 5. *BabA2* (850bp) geninin agaroz jeldeki görüntüsü. B, C, D; *BabA2+*

yüzeyinde kolonizasyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir. *IceA* geni *IceA1* ve *IceA2* olmak üzere iki varyantı bulunmaktadır. *IceA1* genotipi Japonya, Kore ve Çin'de, *IceA2* genotipi ise Amerika'da dominant olarak görülmekte ve klinikle anlamlı bir ilişkisi bulunmamaktadır. Japonya ve Kore'de *CagA+*, *VacA s1m1*, *IceA1* genotipinin, USA'da ise *CagA+*, *Vac s1b/m1*, *IceA2* genotipinin dominant olduğunu belirtmişler, ancak her iki bölgede klinik hastalıkla virulans genleri arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir⁽¹⁶⁻²¹⁾. *IceA2* genotipi olan izolatlar çoğunlukla asemptomatik veya gastrit ve NÜD hastalarda bulunmaktadır. Bir çalışmada, *IceA1* pozitif izolatlarda, negatif olanlara göre daha fazla proinflatuvar sitokin IL-8 salınımının olduğu ve bunun da peptik ülser gelişimine

neden olduğu ileri sürülmüştür⁽¹⁸⁾. Çalışmamızda hastaların %24.4'te *IceA1*, %26.9'da *IceA2* pozitif olup birbirine yakın oranda bulunmuştur. *IceA1* genotipi ile gastrik hastalıklar arasında herhangi bir ilişki görülmezken, *IceA2* ile klinik bulgular arasında istatistiksel olarak negatif bir ilişki gözlenmiştir ($p=0.031$). PÜH, gastrit ve duodenitli hastalardaki *H. pylori* suşlarının *IceA2* gen taşımadıkları, dolayısıyla bu genotipin virulansla ilişkili olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. *CagA*, *IceA* ve *VacA*'nın universal virulans belirleyicileri olmadığı ve klinik bulguların ortaya çıkmasında konak-patojen etkileşiminin önemli olduğu sonucuna varılmıştır⁽²²⁾. Çiftçi ve ark.⁽²³⁾ yaptığı çalışmada *IceA1* %58 oranında, *IceA2* %24 oranında rastlanmış ve *IceA* geninin *H. pylori* için klinik tabloyu ve virulansı belirlemekten ziyade coğrafi farklılıkları yansıtmakta olduğu fikrini desteklemektedir.

BabA adezyon proteininin ülser hastalığı ve gastrik adenokarsinoma ile güçlü ilişkisi nedeniyle *H. pylori*'nin virulansında önemli bir rol oynadığı düşünülmekle beraber bu konu hâlâ tartışmalıdır. Avrupa toplumunda *BabA2* %38 oranında pozitif olup, klinik bulgularla anlamlı ilişki bulunmakta iken, Japonya'da yapılan çalışmalarda *BabA2* daha yüksek oranda (%66-72) görülmekle birlikte, klinik ile bağlantısı saptanmamıştır⁽²⁴⁾. *BabA2* *VacA* *s1a* *CagA* üçlü

pozitifliğinde DÜ, gastrik adenokarsinom prevalansında artış görülmüş. *BabA2* ve *VacA s1* arasında korelasyon görülmemiş, az sayıda PÜ ve adenokarsinomu olan hastada ise *BabA*, *CagA*, *VacA s1a* negatif genotip görülmüştür. Çeşitli çalışmalarda *BabA2*, *CagA*, *Vac s1a* üçlü pozitifliğinin DÜ, gastrik adenokarsinom ve gastrik prekanseröz lezyonla önemli ölçüde bağlantılı olduğu rapor edilmiştir⁽²⁵⁻²⁷⁾. Çalışmamızda yalnızca %6.4 örnekte *BabA2* pozitifliği görülmüştür ve klinikle ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Oranın bu şekilde düşük olmasının nedeni gastrik kanserli ve prekanseröz lezyonlu hasta grubunun olmaması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, *H. pylori* suşlarında *CagA* geni %70.5, *VacA s1a/m2* alleli %71.8, *VacA s2/m2* alleli %16.7 oranında bulundu. *CagA*, *VacA s1/m2* genotipi dominant olmasına rağmen, klinik bulgularla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenemedi. *IceA1* ve *IceA2* genotipi hemen hemen eşit oranda (sırasıyla %24.4–26.9) belirlenirken, *babA2* genotipi %6.4 oranında belirlendi. *IceA2* genotipi ile klinik bulgular arasında negatif bir ilişki belirlendi ($p=0.011$). *IceA1*, *BabA2* genotiplerinin istatistiksel olarak klinikle ilişkili bulunmadı. Virulans genlerinin coğrafik bölgelere göre genetik çeşitlilik gösterdiği *CagA*, *VacA*, *IceA*, *BabA*'nın universal virülans belirleyicileri olmadığı ve klinik bulguların ortaya çıkmasında konak-patojen etkileşiminin önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:449-90. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
2. Blaser MJ, Crabtree JE. *CagA* and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:565-7.
3. Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284:1328-33. <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5418.1328>
4. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, et al. Analysis of expression of *CagA* and *VacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *CagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63:94-8.
5. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, et al. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44:151-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsim.2004.10.010>
6. Chen XJ, Yan J, Shen YF. Dominant *cagA/vacA* genotypes and coinfection frequency of *H. pylori* in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang Province and correlations among different genotypes, coinfection and severity of the diseases. *Clin Med J (Engl)* 2005; 118:460-7.
7. Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1648-51. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.4.1648-1651.2004>
8. Saribaş Z, Demir H, Saltık Temizel İN, Şimşek H, Özen H, Akyön Y. *Helicobacter pylori* klinik izolatlarında *cagA* prevalansının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:461-5.
9. Kantarçeken B, Aladağ M, Atik E, et al. Association of *cagA* and *vacA* presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1580-3.
10. Strobel S, Bereswill S, Balig P, Allgaier P, Sonntag HG, Kist M. Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1285-9.
11. Karaman M, Abacıoğlu H, Topalak ÖS, Şimşek İ. Peptik ülserli ve ülser olmayan dispepsili hastaların mide doku örneklerinde *Helicobacter pylori vacA* ve *cagA* genlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:11-20.
12. Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1710-4.
13. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270:17771-7. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.30.17771>
14. Kausar F, Hussain MA, Ahmed I, et al. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol* 2005;5:32. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-5-32>
15. Atherton JC, MR Peek, KT Tham, et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112:92-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70223-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70223-3)
16. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269:10566-73.
17. Han YH, Liu WZ, Zhu HY, Xiao SD. Clinical rele-

- vance of *iceA* and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in a Shanghai population. *Chin J Dig Dis* 2004; 4:181-5.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1443-9573.2004.00175.x>
18. **Xu Q, Blaser MJ.** Promoter of the CATG-specific methyltransferase gene *hpyIM* differ between *iceA1* and *iceA2* *Helicobacter pylori* strains *J Bacteriol* 2001; 183:3875-84.
<http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.13.3875-3884.2001>
 19. **Carvalho AS, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Penna FJ.** Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of symptomatic children. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24:163-6.
 20. **Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, et al.** *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1746-50.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.5.1746-1750.2001>
 21. **Kim SY, Woo CW, Lee YM, et al.** Genotyping *cagA*, *vacA* subtype, *iceA 1*, and *babA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci* 2001; 16:579-84.
<http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2001.16.5.579>
 22. **Zheng PY, Hua J, Yeoh KG, Ho B.** Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. *Gut* 2000; 47:18-22.
<http://dx.doi.org/10.1136/gut.47.1.18>
 23. **Çiftçi İH, Uslan İ, Dilek FH, Aşık G, Özgür MA, Dilek ON.** Kronik gastrit ve gastrik kanserli hastalarda *Helicobacter pylori* *IceA1* ve *IceA2* genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:228-33.
 24. **Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al.** Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12778-83.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.22.12778>
 25. **Yu J, Leung WK, Go MY, et al.** Relationship between *Helicobacter pylori* *babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalign gastric lesions. *Gut* 2002; 51:480-4.
<http://dx.doi.org/10.1136/gut.51.4.480>
 26. **Oliveira AG, Santos A, Guerra JB, et al.** *babA2*- and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3964-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.8.3964-3966.2003>
 27. **Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M.** *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2003; 56:287-91.
<http://dx.doi.org/10.1136/jcp.56.4.287>