

Peptik Ülserli ve Ülser Olmayan Dispepsili Hastaların Mide Doku Örneklerinde *Helicobacter pylori vacA* ve *cagA* Genlerinin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi

Molecular Detection of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genes in Gastric Tissue Specimens of Patients with Peptic Ulcer Disease and Non-Ulcer Dyspepsia

Meral KARAMAN¹, Hakan ABACIOĞLU², Ömer S. TOPALAK³, İlkey ŞİMŞEK³

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Multidisipliner Laboratuvarları, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Multidisciplinary Laboratories İzmir, Turkey.

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

³ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İzmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 21.07.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.11.2010

ÖZET

Helicobacter pylori, mide mukozası içinde kolonize olabilen bir mikroorganizma olup, kronik aktif gastrit, peptik ülser, gastrik adenokarsinom ve primer gastrik lenfoma gibi hastalıklar için risk faktörü olarak bildirilmektedir. Bakterinin virülans faktörleri arasında, vakuoller aktive edici sitotoksin (*vacA*) ve sitotoksin ile ilişkili gen (*cagA*) önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, klinik olarak peptik ülser hastalığı (PÜH) ve ülser olmayan dispepsi (ÜOD) tanısı almış hastaların mide doku örneklerinde, *H.pylori vacA* s ve m genotiplerinin belirlenmesi; *vacA* genotiplerinin *cagA* ile birlikteliğinin araştırılması ve bunların klinik tanı ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 19 (%65.5)'u kadın olmak üzere, birbirleriyle ailesel bağlantıları olmayan 29 hasta (yaş aralığı 18-74 yıl; yaş ortalaması: 47.8 ± 13.6) dahil edilmiştir. Klinik olarak olguların 13 (%44.8)'ü PÜH, 16 (%55.2)'si ÜOD olarak tanımlanmış olup, tümünün endoskopi ile alınan mide doku örneğinde üreaz testleri olumlu bulunmuştur. Mide doku örneklerinden *H.pylori* DNA'sı proteinaz-K, fenol-kloroform-izooamilalkol yöntemi ile elde edilmiş; *vacA* geni s, m1, m2 ve *cagA* bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile dört ayrı primer seti kullanılarak belirlenmiştir. Tüm hasta örneklerinde ayrıca, *H.pylori vacA* m bölgesi içinde korunmuş 785 baz çifti uzunluğundaki böl-

İletişim (Correspondence): Dr. Meral Karaman, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Multidisipliner Laboratuvarları, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 46 53, **E-posta (E-mail):** meral.karaman@deu.edu.tr

geye DNA dizi analizi yapılmış, elde edilen diziler Gen-Bank dizileri ile birlikte hizalanmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Çalışmamızda, *H. pylori* pozitif 29 hastada *vacA* genotip dağılımı; s1m1 (n= 16), s1m2 (n= 6) ve s2m2 (n= 7) olarak bulunmuş; olguların 19'unda ise *cagA* pozitifliği tespit edilmiştir. Genotipi s1m1 olarak saptanan 16 olgunun tümünde *cagA*'nın pozitif olduğu görülmüş ve bu olgulardan 13'ünün klinik olarak PÜH tanısı alan hastalar olduğu izlenmiştir (p= 0.008). *vacA* m bölgesinde nükleotid dizilerinin filogenetik analizi ile elde edilen genotiplendirme sonuçları, PCR sonucu elde edilen m genotipleri ile uyumlu bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada, PÜH ile *vacA* s1m1, *cagA* pozitif suşlar arasında anlamlı bir birliktelik olduğu tespit edilmiş; *H. pylori vacA* m genotiplerinin saptanmasında, nükleotid dizi analizi yerine daha ucuz ve basit bir yöntem olan PCR yönteminin güvenle kullanılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*; *vacA*; *cagA*; polimeraz zincir reaksiyonu; dizi analizi.

ABSTRACT

Helicobacter pylori can colonize the gastric mucosa and is considered as a risk factor for chronic active gastritis, peptic ulcer, gastric adenocarcinoma and primary gastric lymphoma. Among its various virulence factors, vacuolating cytotoxin encoded by *vacA* and cytotoxin-associated toxin encoded by *cagA* gene play an important role. The aims of this study were the detection of *H. pylori vacA* s and m genotypes, investigation of the association between *vacA* genotypes and *cagA* gene presence, and evaluation of the correlation between those factors and the clinical diagnosis. Gastric tissue specimens of patients who were clinically diagnosed as peptic ulcer disease (PUD) and non-ulcer dyspepsia (NUD) were included in the study. A total of 29 patients (age range: 18-74 years, mean age: 47.8 ± 13.6 years; 19 were female) without any familial relationship were evaluated. Thirteen (44.8%) of the patients were diagnosed clinically as PUD, while 16 (55.2%) as NUD. All of the patients' gastric tissue samples obtained by endoscopy were urease positive. *H. pylori* DNA was extracted from the tissue specimens by proteinase-K, phenol-chloroform-isoamyl alcohol method and *vacA* s, m1, m2 and *cagA* regions were identified by polymerase chain reaction (PCR) using four different primer sets. In addition, DNA sequencing was performed for the protected 785 base-pairs region of *vacA* m gene in all of the samples, and the sequences were aligned with Gene-Bank sequences, creating a phylogenetic tree. The distribution of *vacA* genotypes between 29 *H. pylori* positive patients were found as; s1m1 (n= 16), s1m2 (n= 6) and s2m2 (n= 7), while 19 patients yielded positive results for *cagA* gene. *CagA* positivity was detected in all of the 16 patients harboring s1m1 genotype, and 13 of those were the patients diagnosed as PUD (p= 0.008). Genotyping data achieved by phylogenetic analysis of the *vacA* m region were compatible with m genotypes identified by PCR. In conclusion, we detected a significant relationship between PUD and *vacA* s1m1 and *cagA* positivity. It was also determined that PCR would be a reliable, simpler and cheaper alternative to nucleotide sequencing for the identification of *H. pylori vacA* m genotypes.

Key words: *Helicobacter pylori*; *vacA*; *cagA*; polymerase chain reaction; sequencing.

GİRİŞ

Helicobacter pylori, gastrik mukozada kolonize olan gram-negatif, sarmal şekilli, mikroaerofilik bir bakteridir¹. Enfekte kişilerin tümünde gastroduodenal hastalık gelişmeyip, semptomsuz olgular olmakla birlikte, temelde kronik aktif gastritin en önemli etyolojik ajanıdır. *H. pylori*'nin peptik ülser, gastrik adenokarsinom ve primer gastrik lenfoma için risk faktörü olduğu bilinmektedir^{2,3}. Dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde *H. pylori* enfeksiyonu oranlarına bakıldığında; gelişmiş ülkelerde düşük, gelişmekte olan ülkelerde yük-

sek seroprevalans oranları dikkati çekmektedir⁴. *H. pylori* enfeksiyonunun temel bulaş yolu olarak, dışkı-ağız ve ağız-ağız bulaşı bildirilmektedir⁵. Enfeksiyonun aile içinde kümelendiği, enfekte annenin aile içi bulaşta anahtar rol oynadığı, ayrıca sosyal ve etnik farklılıkların enfeksiyonun kazanılmasında önemli bir faktör olduğu ifade edilmektedir^{6,7}. Aile içinde özellikle anneden çocuğa dikey aktarımın yanı sıra, kardeşler arasında yatay aktarımın önemi de vurgulanmaktadır⁸.

H. pylori'nin virülans faktörleri arasında üreaz, flajel proteinleri, süperoksit dismutaz ve vakuoller aktive edici sitotoksin (vacuolating cytotoxin; *vacA*) gibi proteinler yer almaktadır³. Kolonizasyon için gerekli flajel proteini ve üreazın aksine, *vacA* geni her zaman eksprese edilmemektedir. Kökenlerin sadece %50-65'inde 87 kDa'luk bir protein olan VacA üretilmekte ve bu sitotoksini yapan suşlar ile karşılaşan primer mide epitel hücrelerinde vakuolizasyon indüklenmektedir⁹. *vacA* geninin, amino ucu sinyal bölgesi (s) ve orta (middle-m) bölgesinin nükleotid dizilerine göre farklı allelik varyantları tanımlanmıştır. Genin s bölgesi s1a, s1b, s1c veya s2 allellerinden, m bölgesi ise m1, m2a veya m2b allellerinden birini içerir. Farklı s ve m allelleri rekombinasyonla bir araya gelerek s1/m1, s1/m2, s2/m2 ve varlığı tartışmalı olan s2/m1 genotiplerini oluşturmaktadır¹⁰⁻¹³. Bu farklı genotiplerin sitotoksik aktivite ve klinik tablolar ile yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir^{10,11}. Bakterinin bir diğer virülans faktörü, sitotoksin ile ilişkili gen (cytotoxin-associated gen; *cagA*) ürünüdür. Bu protein, tek başına bir sitotoksin olarak değil, sitotoksine yardımcı toksin olarak nitelendirilmekte ve *cag* patojenite adası (*cag* PAI) için bir belirleyici olarak kullanılmaktadır^{14,15}.

Ülkemizde *H. pylori*'nin seroprevalansı ile ilgili çalışmalar olmasına karşın, genotipleri ve bunların hastalık patogenezi ile ilişkisi konusunda bilgilerimiz sınırlıdır. Bu çalışmada; klinik olarak peptik ülser hastalığı ve ülser olmayan dispepsi tanısı almış hastaların mide doku örneklerinde, *H. pylori vacA* s ve m genotiplerinin belirlenmesi, *vacA* genotiplerinin *cagA* ile birlikteliğinin araştırılması ve bunların klinik tanı ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Gastroenteroloji Bilim Dalında peptik ülser hastalığı (PÜH) ve ülser olmayan dispepsi (ÜOD) tanısı almış hastalardan, endoskopi ile alınan mide doku örneğinde üreaz testi olumlu bulunan 29 hasta dahil edildi. Örneklerde *H. pylori vacA* s ve m genotipleri ve *cagA* varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı.

Mide doku örnekleri, gastroenteroloji uzmanları tarafından, uygun şekilde dezenfeksiyonu yapılmış forseps ve endoskop yardımı ile pilordan 3-5 cm uzaklıktaki antrum bölgesinden ve en az iki farklı alandan alındı. Doku örnekleri 100 µl steril distile su içeren ependorf tüplere alınarak DNA izolasyonu basamağına kadar -70°C'de saklandı.

Mide doku örneğinden *H. pylori* DNA'sının eldesi için proteinaz-K, fenol-kloroform-izomilalkol yöntemi kullanıldı. Her bir örnek için *vacA* s, m1, m2 ve *cagA* bölgelerine özgül dört ayrı primer seti ile (Tablo I), Perkin Elmer GenAmp 9600 cihazında (Roche, Al-

Tablo I. *H.pylori vacA* Allellerinin Tiplendirilmesinde, *cagA* Varlığının Saptanmasında ve *vacA* m Bölgesi Dizilemesinde Kullanılan Oligonükleotid Öncüller

Primer	Dizi	Bölge	PCR ürün bölgesi ve uzunluğu
VA 1-F	5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3'	<i>vacA</i> s1*	259 bç (797-1055)
VA 1-R	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'		
VA 1-F	5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3'	<i>vacA</i> s2*	286 bç (284-569)
VA 1-R	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'		
VA 3-F	5' GGTCAAAATGCGGTCATGG 3'	<i>vacA</i> m1*	290 bç (2741-3030)
VA 3-R	5' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'		
VA 4-F	5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3'	<i>vacA</i> m2*	352 bç (976-1327)
VA 4-R	5' CATAACTAGCGCCTTGACAC 3'		
CAG -F	5' TGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA 3'	<i>cagA</i> *	289 bç (2294-2584)
CAG -R	5' AATAATCAACAAACATCACGCCAT 3'		
VA 6F	5' TCAATATCAACAAGCTC 3'	<i>vacA</i> m**	785 bç (1881-2666)
VA 6R	5' CCGCATGCTTTAATGTC 3'		

* 10 no'lu kaynaktan alınmıştır.
** Dizileme bölgesine ait primerler 16 no'lu kaynaktan alınmıştır.
bç: Baz çift, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

manya) 94°C'de 1 dakika ön denatürasyon; 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika (5 döngü); 94°C'de 1 dakika, 53°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika (5 döngü); 94°C'de 1 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika (20 döngü) ve 72°C'de 10 dakika son uzatma ile PCR gerçekleştirildi¹⁰. Kontrol olarak *vacA* s1m1 ve *cagA* pozitif NCTC 11637 suşu kullanıldı.

H.pylori vacA m bölgesinin nükleotid dizilimini saptamak için, bu bölgenin 785 baz çiftlik (bç) kısmı VA6-F ve VA6-R primerleri kullanılarak amplifiye edildi¹⁶ (Tablo I). Amplifiye edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek 785 bç'lik ürün uzunluğu ile uyumlu bant büyüklükleri olumlu olarak değerlendirildi. Bu örnekler etanol ile saflaştırıldı. Dizileme reaksiyonları, Sequitherm Excel II DNA Sequencing Kits-LC (Epicentre Biotechnologies, SE9202LC, ABD) kullanılarak LI-COR "DNA sequencer" aygıtında gerçekleştirildi. İşlemler üreticilerin önerileri doğrultusunda uygulandı.

Elde edilen *H.pylori* dizileri Gen-Bank'tan alınan 35 referans dizi ile birlikte (AF049631 nt: 1925-2595) Clustal X versiyon 1.81 programı kullanılarak hizalandı¹⁷. Hizalanmış dizilerden MEGA versiyon 2.1 yazılımında "Neighbour-Joining" yöntemi ve "Kimura-2 parametre" düzeltmesi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu¹⁸. Ağacın güvenilirliği "bootstrap" analizi ile (1000 set) test edildi.

Hastalara ait klinik ve tanımlayıcı bilgiler, deneyler sonucunda elde edilen verilerle birlikte SPSS 8.0 programına aktarıldı. İstatistiksel değerlendirmede "Fisher's exact test" kullanıldı ve dağılımların p değeri için 0.05 düzeyinde farklı olup olmadıkları araştırıldı.

Tablo II. Çalışmaya Alınan Olgulara Ait *H.pylori* Suşlarında *vacA* s ve m Genotipleri ile *cagA* Birlikteliği

<i>vacA</i> genotipi	Peptik ülser hastalığı		Ülser olmayan dispepsi		Toplam
	<i>cagA</i> (+)	<i>cagA</i> (-)	<i>cagA</i> (+)	<i>cagA</i> (-)	
s1m1	11	-	5	-	16
s1m2	1	-	-	5	6
s2m1	-	-	-	-	-
s2m2	-	1	2	4	7
Toplam	12	1	7	9	29

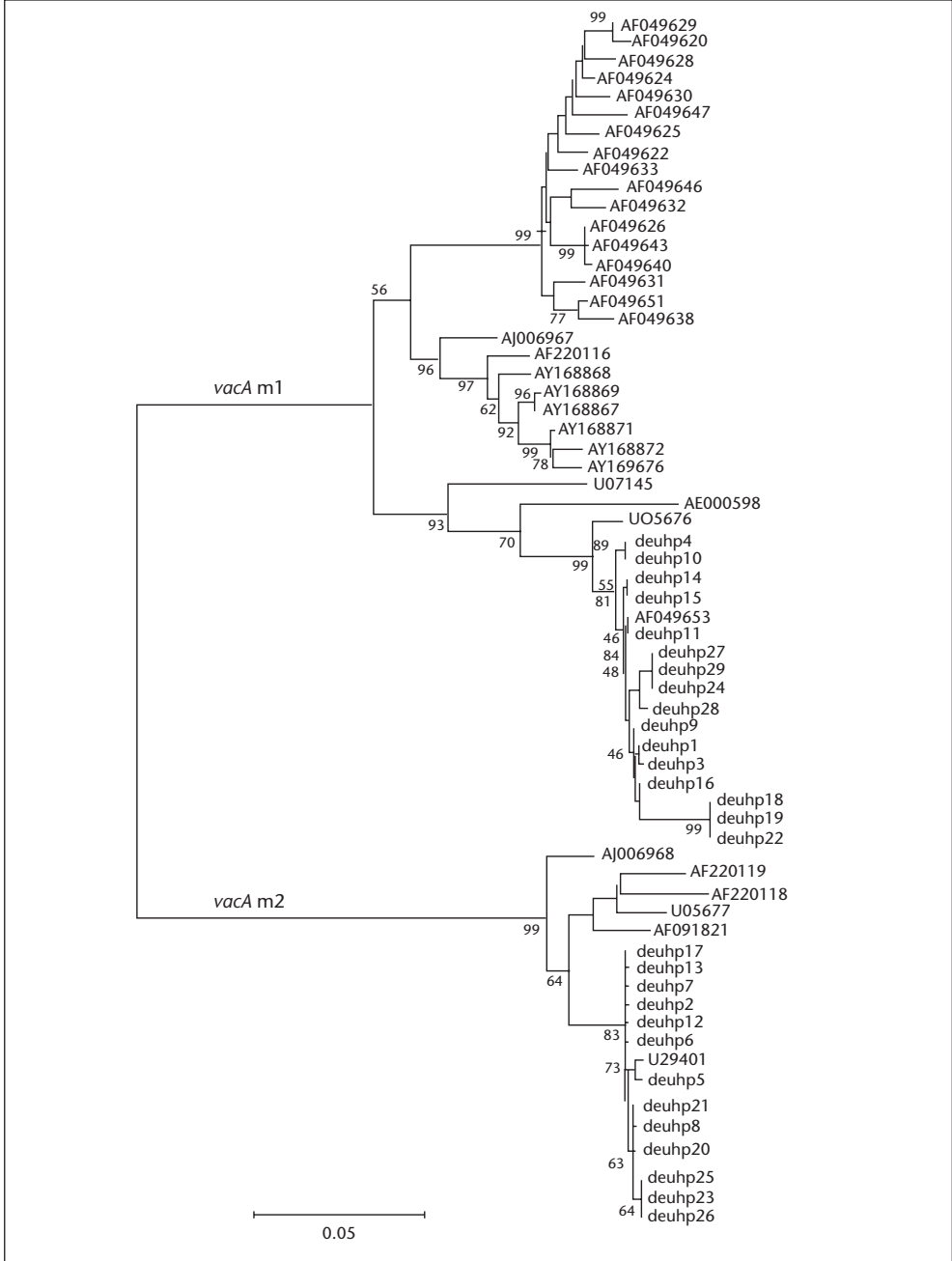
BULGULAR

Çalışmada, mide doku örnekleri alınan 29 hastanın 19 (%65.5)'u kadın, 10 (%34.5)'u erkek olup, yaşları 18-74 (ortalama 47.8 ± 13.6) yıl arasında değişmektedir. Klinik olarak, olguların 13 (%44.8)'ü PÜH, 16 (%55.2)'si ÜOD tanısı almıştır. Hastaların birbirleriyle ailesel bağlantıları yoktur.

Peptik ülserli olguların 12'sinde s1, birinde s2 genotipi saptanırken; dispepsili olguların 10'u s1, altısı ise s2 genotipi olarak bulunmuştur. PÜH olan olguların 11'i m1, ikisi m2; ÜOD'li olguların ise beşi m1, 11'i m2 genotipinde tespit edilmiştir.

Yirmi dokuz olgunun 19'u *cagA* pozitif, 10'u *cagA* negatif olarak saptanmıştır. Genotipi s1 olan 17 olguda *cagA* pozitif bulunurken, genotipi s2 olan iki olguda pozitif olması, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.002$). Benzer olarak, m1 genotipli olguların tümü *cagA* pozitif olarak değerlendirilirken, m2 genotipli üç olgunun pozitif olması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$). PÜH olan 13 olgudan 12'si *cagA* pozitif, biri *cagA* negatif ($p=0.008$) ve ÜOD'li 16 olgudan yedisi *cagA* pozitif, dokuzu *cagA* negatif olarak saptanmıştır (Tablo II).

Tüm hasta ($n=29$) örneklerine nükleotid dizi analizi uygulanmış; bu analiz sırasında *H.pylori vacA* m bölge dizisi içinde korunmuş 785 bp uzunluğundaki DNA dizilerinden, teknik şartlar nedeniyle 670 nükleotidlik diziler elde edilmiştir. Bu dizilerin hizalanması ve daha sonra filogenetik ağacın oluşturulması basamağında güvenilir veriler elde edebilmek amacıyla, Atherton ve arkadaşlarının¹⁹ önerdiği şekilde 670 nükleotidlik dizinin 3' ucundaki açıklıklardan zengin 113 nükleotidlik bölge analiz dışı bırakılmıştır. GenBank'tan sağlanan genotipleri belirli *H.pylori* dizileri ve bu çalışmada elde edilen hizalanmış diziler ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde, 29 örneğin 16'sının *vacA* m1, 13'ünün *vacA* m2 genotipi olarak yer aldığı izlenmiştir (Şekil 1). Dizileme sonucunda elde edilen genotipleme verileri ile PCR sonucu elde edilen genotiplemenin uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 1. *H. pylori vacA m* bölgesine ait 567 nükleotidlik dizilerin, Neighbour-Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesi uygulanarak elde edilen filogenetik ağacı (Ağaçtaki sayılar 45 ve üzerindeki "bootstrap" değerlerini göstermektedir). Referans diziler Gen-Bank erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen diziler ise "deuhp" ön eki ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Gelişmekte olan ülkelerde *H.pylori* enfeksiyonları genç yaşlarda ve sıklıkla da çocukluk döneminde kazanılmaktadır²⁰. Ülkemiz de, enfeksiyonun dağılımı açısından gelişmekte olan ülkeler arasında yer almaktadır^{21,22}. Bu çalışmada, üç aydan uzun süreli dispeptik yakınmaları olan, klinik olarak PÜH ve ÜOD tanısı konulan ve mide doku örneklerinde üreaz testi pozitif bulunan seçilmiş bir grup hastada, *H.pylori* virülans faktörlerinden *vacA* genotipleri ve *cagA*'nın varlığı araştırılmıştır. *H.pylori* enfeksiyonlarının tanısında invazif olan (kültür, histopatoloji, hızlı üreaz testi, PCR) ve olmayan (serolojik testler, üre solunum testi) yöntemler kullanılmakta, bu yöntemlerin çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır²³. Biyopsi örneklerinden kültür sonrası PCR ve genotiplendirme yapılabilmeyle birlikte, bakterinin zor üretilmesi ve kültür için özel koşullara gereksinim duyulması sorun oluşturmaktadır. Çalışmamızda kültür yapılmaksızın, doğrudan mide doku örneklerinden DNA elde edilmiş, ardından PCR ve nükleotid dizi analizi yapılmıştır.

Son yıllarda *H.pylori* ile enfekte bireylerin bazılarında kronik atrofik gastritin yanı sıra gastrik adenokarsinom ve MALT lenfoma gelişirken bazılarında gelişmemesi, bu bakteriye özgü virülans faktörlerini gündeme getirmiştir. Bu faktörlerden biri olan *vacA* geninin s (s1a, s1b, s1c, s2) ve m (m1, m2a, m2b) bölgeleri için farklı allelik varyantları tanımlanmıştır¹¹. *H.pylori*'nin *vacA* genotipinin saptanmasının, suşun ülserojenik özelliğinin belirlenmesinde, in vitro sitotoksin üretiminin gösterilmesinden daha önemli olduğu vurgulanmaktadır¹⁰. Ülkemizde, bakterinin virülans faktörleri ile ilgili serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu faktörlerin klinik seyir üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmalara gereksinim olduğu vurgulanmıştır²⁴⁻²⁷. Kantarçeken ve arkadaşları²⁴, histolojik olarak duodenal ülser, gastrik ülser ve ÜOD tanısı almış 107 olguda *vacA* ve *cagA*'nın varlığını tipe özgül primerler ile araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, *cagA* pozitifliği ile duodenal ve gastrik ülser arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik saptarken, bu gruplarda ÜOD grubuna göre daha yüksek oranda *vacA* pozitifliği bildirmişlerdir²⁴. Çalışmamızda ise PÜH olan 13 olgunun 12'si s1, biri s2 genotipi; ÜOD'li 16 olgunun 10'u s1, altısı s2 genotipi olarak tanımlanmıştır. Suşların *vacA* s genotipleri ile birlikte m genotiplerinin de saptanması, genotiplerin klinik tanı ile birlikteliğinin incelenmesi ve PCR sonuçları ile nükleotid dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması, çalışmamızı farklı kılmıştır. Eldeki veriler ülkemizde *vacA* s1 genotipin baskın olduğunu ve PÜH ile ilişkili olduğunu göstermekle birlikte, gerek coğrafik, gerekse ekonomik ve sosyokültürel açıdan karışık bir toplum olmamız nedeniyle *H.pylori* genotiplerinin dağılımı açısından bölgeler arasında farklılıklar olabilir. Bu nedenle daha fazla veriye gerek vardır.

H.pylori'de rekombinasyonun ilk kanıtları *vacA*'da mozaik yapının saptanmasıyla ortaya konmuştur¹⁰. Bu mozaik yapı nedeniyle *vacA* s ve m genotiplerinin s1m1, s1m2 ve s2m2 olmak üzere farklı kombinasyonları bulunmuştur. Çalışmamızda, *H.pylori* pozitif 29 olgudan 16'sı s1m1, altısı s1m2 ve yedisi s2m2 olarak saptanmıştır (Tablo II). Genotipi s1m1 olan 16 olgunun tamamında *cagA* pozitifliği gözlenmiş ve bu olguların 11'inin klinik olarak PÜH tanısı aldığı izlenmiştir. Erzin ve arkadaşları²⁸, *H.pylori* genotipleri ile klinik bulguların ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, *H.pylori* pozitif 91 olgudan

37'sinde *vacA* s1m1, 44'ünde s1m2 ve dokuzunda s2m2 genotipi saptamışlar; *vacA* s1a, *cagA* ve *cagE* pozitif suşların duodenal ülser ve gastrik kanser ile, *vacA* s2m2 genotipinin ise ÜOD ile birlikteliğini anlamlı bulmuşlardır. Ülkemizde yapılan bazı genotiplendirme çalışmalarında²⁹ olduğu gibi çalışmamızda da s2m1 genotipi saptanmazken; Erzincan ve arkadaşları²⁸ gastrik kanserli bir olguda s2m1 genotipinin varlığını bildirmişlerdir. Bazı uluslararası çalışmalarda da *vacA* s2m1 genotipinin varlığına ilişkin veriler bildirilmiştir^{12,13}. Bu genotipin etnik ya da coğrafik bir dağılım eğiliminde olabileceği düşünülmekle birlikte henüz bu konuda yeterli veri yoktur. Daha önceki veriler¹¹ ve çalışmamızın sonuçları, *vacA* s1m1/*cagA* pozitif *H.pylori* suşlarının PÜH ile yakından ilişkili olduğu yönündedir.

CagA, *H.pylori* için tek başına bir virülans faktörü olarak değil, daha ziyade sitotoksine yardımcı bir toksin olarak fonksiyon görmek ve *cag* patojenite adası (*cagPAI*) için bir belirleyici olarak kullanılmaktadır^{14,15}. *CagA* varlığının, yüksek virülans, PÜH ve gastrik kanser ile yakından ilişkili olduğu vurgulanmaktadır³⁰. Yapılan araştırmalarda, PÜH olan hastaların hemen hemen tamamının *vacA* pozitif *H.pylori* suşları ile enfekte olduğu, bunların da %90-95'inin *cagA* pozitif olduğu belirtilmektedir³¹. Yine *vacA*'nın farklı genotiplerine bakıldığında, *vacA* s1m1 genotipinin *cagA* pozitif suşlar ile birlikteliği bildirilmektedir¹¹. Son yıllarda *cagA*'daki allelik varyasyonlar konusu da yoğun olarak araştırılmış ve tıpkı *vacA*'da olduğu gibi *cagA*'nın da coğrafi farklılıkları tanımlanmıştır³². Ayrıca, *cag* genotiplerindeki heterojenitenin *H.pylori* ile ilişkili klinik hastalık tipini etkileyebileceği belirtilmiştir³⁰. Çalışmamızda, *cagA* bölgesi varlığının araştırılması amacıyla kullandığımız primerlerin nitelikleri nedeniyle *cagA* genotip farklılıklarının saptanması mümkün olamamıştır. Bulgularımız, olguların 19 (%65.5)'unda *cagA* geni varlığını göstermiş ve bu oran, Sarıbaş ve arkadaşlarının²⁷ çocuk ve yetişkin hastaların endoskopik biyopsi örneklerinden izole edilen *H.pylori* suşlarında PCR ile saptadıkları *cagA* pozitiflik oranı (116/198; %58.6) ile uyumlu bulunmuştur. PÜH olan hastalar incelendiğinde, 13 hastanın 12'sinde *cagA* pozitifliğinin olduğu görülmüştür. *CagA* negatif bulunan bir PÜH olgusunun ise, klinik olarak endoskopi sırasında formu bozulmuş bulbus ve eritematöz gastrit bulguları gösteren bir hasta olduğu, fizik tedavi ve rehabilitasyon anabilim dalında gonartroz tanısı ile izlendiği ve yoğun nonsteroid antiinflamatuar (NSAI) ilaç tedavisi aldığı belirlenmiştir. Dolayısıyla söz konusu olguda peptik ülserin ortaya çıkmasında, kullanılan NSAI ilaçların da rolü olabilir.

Çalışmamızda, üreaz testi ile *H.pylori* pozitif saptanan olguların tümüne *vacA* m bölgesi analizleri uygulanmış; bu amaçla hem bu bölgeye özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi, hem de nükleotid dizi analizi yöntemi gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda, çalışmaya alınan 29 olgunun 16'sı *vacA* m1, 13'ü m2 olarak saptanmış ve bu sonuçlar PCR verileri ile uyumlu bulunmuştur. Genotiplendirmelerde nükleotid dizilerinin filogenetik analizi altın standart bir yöntem olmasına karşın, uygulaması oldukça zor, zaman alıcı ve pahalıdır. Tipe özgül primerler kullanarak PCR ile elde ettiğimiz verilerin dizi analizi sonuçları ile uyumlu oluşu, *H.pylori vacA* m bölgesine ait genotiplendirmenin uygun primerler ile yapılabileceği kanısını uyandırmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1(8390): 1311-5.
2. Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000; 6(1): 20-31.
3. Correa P, Piazuelo MB. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 2008; 40(7): 490-6.
4. Bruce MG, Maaros HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2008; 13(Suppl 1): 1-6.
5. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992; 340(8829): 1194-5.
6. Owen RJ, Xerry J. Tracing clonality of *Helicobacter pylori* infecting family members from analysis of DNA sequences of three housekeeping genes (*ureI*, *atpA* and *ahpC*), deduced amino acid sequences, and pathogenicity-associated markers (*cagA* and *vacA*). *J Med Microbiol* 2003; 52(6): 515-24.
7. Fujimoto Y, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H, Sawayama Y, Hayashi J. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* among the population of endemic areas in Japan. *Helicobacter* 2007; 12(2): 170-6.
8. Brenner H, Rothenbacher D, Bode G, Adler G. Parental history of gastric or duodenal ulcer and prevalence of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: population based study. *BMJ* 1998; 316(7132): 665.
9. Leunk RD, Jonson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26(2): 93-9.
10. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; 270(30): 17771-7.
11. Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9): 2597-603.
12. Martinez A, Gonzales C, Kawaguchi F, et al. *Helicobacter pylori*: *cagA* analysis and *vacA* genotyping in Chile. Detection of a s2/m1 strain. *Rev Med Chil* 2001; 129(10): 1147-53.
13. Letley DP, Lastovica A, Louw JA, Hawkey CJ, Atherton JC. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *vacA* s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 1203-5.
14. Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25): 14648-53.
15. Slater E, Owen RJ, Williams M, Pounder R. Conservation of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*: associations with vacuolating cytotoxin allele and IS605 diversity. *Gastroenterology* 1999; 117(6): 1308-15.
16. 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(5): 1285-9.
17. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(24): 4876-82.
18. Kumar S, Tamura K, Jacobsen I, Nei M. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001; 17(12): 1244-5.
19. Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, et al. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types m1 and m2 and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol* 1999; 39(4): 211-8.
20. Bardhan PK. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin Infect Dis* 1997; 25(5): 973-8.
21. Us D, Hascelik G. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in an asymptomatic Turkish population. *J Infect* 1998; 37(2):148-50.
22. Seyda T, Derya C, Fusun A, Meliha K. The relationship of *Helicobacter pylori* positivity with age, sex, and ABO/Rhesus blood groups in patients with gastrointestinal complaints in Turkey. *Helicobacter* 2007; 12(3): 244-50.

23. Yılmaz YA. *Helicobacter pylori*. Mikrobiyolojik tanı yöntemleri. Hacettepe Tıp Derg 2004; 35(4): 182-6.
24. Kantarceken B, Aladag 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(7): 1580-3.
25. Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, et al. Analysis of serum antibody profile against *H.pylori* VacA and CagA antigens in Turkish patients with duodenal ulcer. World J Gastroenterol 2006; 12(42): 6869-73.
26. Guducuoglu H, Berktaş M, Bozkurt H, et al. Evaluation of western blot method for the detection of antibodies to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric carcinoma and cases with epigastric complaints. Mikrobiyol Bul 2010; 44(1): 21-8.
27. Saribas Z, Demir H, Saltik Temizel IN, Simsek H, Ozen H, Akyon Y. Detection of cagA prevalence in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Mikrobiyol Bul 2010; 44(3): 461-5.
28. Erzin Y, Koksul V, Altun S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. Helicobacter 2006; 11(6): 574-80.
29. 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(4): 1648-51.
30. Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, Tedeschi R, Basaglia G, De Paoli P. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. J Clin Microbiol 2003; 41(3): 976-80.
31. Salih BA. The role of the putative virulence markers (cagA and vacA) of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Saudi Med J 2004; 25(7): 830-6.
32. Valmaseda Pérez T, Gisbert JP, Pajares García JM. Geographic differences and the role of cagA gene in gastroduodenal diseases associated with *Helicobacter pylori* infection. Rev Esp Enferm Dig 2001; 93(7): 471-80.