

ADENOİD VE TONSİL DOKULARINDA *Helicobacter pylori* DNA'SININ PZR İLE BELİRLENMESİ AMACIYLA FARKLI PRİMER ÇİFTLERİNİN KİYASLANMASI

Yasemin BULUT¹ Ahmet AĞAÇAYAK¹ Erol KELEŞ² Adnan SEYREK¹
Zülal AŞÇI TORAMAN¹

¹ Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ- TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Elazığ- TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 04.04.2006 Kabul Tarihi: 01.05.2006

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; adenoid ve tonsil dokularında *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmesinde beş farklı primer çiftlerinin etkinliğini (16S rRNA, random kromozom sekansı, SSA geni, *ureA* ve *glmM*) kıyaslamaktır. Bu çalışmaya, 26 hastaya ait 65 doku örneği dahil edildi. Klinik örneklerden elde edilen DNA ile beş farklı gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak PZR işlemleri gerçekleştirildi. PZR metodu sonucunda, 65 örneğin 16S rRNA primeriyle 16'sında (% 24.61), *glmM* primeriyle 15'inde (% 23.07), SSA primeriyle 14'ünde (% 21.53), random kromozom dizilimi primeriyle 10'unda (% 15.38) ve *ureA* primeriyle 7'sinde (% 10.76) *H. pylori* DNA'nın varlığı belirlendi. Çalışmanın verilerine göre, adenoid ve tonsil dokularında *H. pylori* DNA'sının PZR ile belirlenmesi için 16S rRNA ve *glmM* primerlerinin kullanılmasını önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: PZR, *H. pylori*, Adenoid ve tonsil dokular.

ABSTRACT

The Comparison of Different Primer Pairs For The Detection of *Helicobacter pylori* Dna in Adenoid and Tonsil Tissues By PCR

Purpose of this study was to compare the five different primer pairs (16S rRNA, random chromosome sequence, SSA gene, *ureA* and *glmM*) for detection of the *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) DNA in adenoid and tonsil tissues by polymerase chain reaction (PCR). Sixtyfive tissue samples from 26 patients were analyzed in this study. PCR was performed by using the DNAs obtained from clinical samples and the primers specific to five different gene regions. In the result of PCR method, the presence of *H. pylori* DNA was detected in 16 (24.61%), 15 (23.07%), 14 (21.53%), 10 (15.38%) and 7 (10.76%) of the 65 samples using 16S rRNA, *glmM*, SSA gene, random chromosome sequence and *ureA* primers, respectively. According to the data, we recommend use of 16S rRNA and *glmM* primers in the PCR method for detection of *H. pylori* in adenoid and tonsil tissues.

Key Words: PCR, *H. pylori*, Adenoid and tonsil tissues.

GİRİŞ

Helicobacter pylori (*H. pylori*); spiral şekilli, gram negatif ve üreaz üretebilen mikroaerofilik bir bakteridir. Daimi *H. pylori* enfeksiyonları, kronik gastrit, peptik ülser, gastrik karsinomlar ve mukozayla alakalı lenfoid doku lenfomalarına sebep olmaktadır (1, 2).

H. pylori, insanlarda en yaygın bakteriyel patojenlerden birisidir ve tüm dünya nüfusunun yarısından fazlasında mevcut olan bir bakteri olmasına rağmen bulaş yolları tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bu bakterinin, oral-oral, gastrik-oral ve fekal-oral olmak üzere üç bulaş yolundan birisiyle yayındığı tahmin edilmektedir (3, 4). Oral salgılarda bu bakterinin varlığı dikkate alınarak, oral-oral bulaş yolunun bu bakterinin toplumda saçılmasında önemli olduğu

düşünüle bilinir (5, 6). Buna rağmen, bu bakterinin oral dokularda daimi varlığı veya bu dokularda kolonizasyonu ile ilişkili çok farklı veriler elde edilmesi nedeniyle, oral-oral bulaş yolunun bakterinin epidemisindeki rolü netlik kazanmamıştır (7-10). Oral-oral saçılmayı savunan bilim adamları arasında, adenoid ve tonsile yerleşen ve daimi olarak üreyen bakterinin oral salgılara karışmasının yol açtığı kanaati hakimdir (7, 8). Özellikle akut gastritlerde kusmadan sonra adenoid ve tonsil dokulara gelen bu bakterinin bu dokularda kolonize olduğu ve oral salgılarla uzun süre saçıldığı düşünülmektedir.

Zor üretilebilmesi nedeniyle, *H. pylori*'nin kültür ile belirlenmesi oldukça zordur. Polimeraz zincir reaksiyon (PZR) kültür ortamında zor

üretilen bu etkenin klinik örneklerde kısa sürede belirlenmesine imkan tanıyan, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir metottur (11-13). Bu metodun duyarlılığı ve özgüllüğünü etkileyen faktörlerin birisi PZR'de çoğaltılması istenen gen bölgesini hedef alan primerlerin seçimidir (13).

Bu çalışmanın amacı; adenoid ve tonsil dokularında *H. pylori* DNA'sının PZR ile belirlenmesinde beş farklı gen bölgesine özgül primer çiftlerinin etkinliğini (16S rRNA, random kromozom sekansı, SSA gen, *ureA* ve *glmM*) kıyaslamaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnekler: Bu çalışmaya, yaşları 6-31 arasında değişen, 3'ünde adenoidektomi, 7'sinde tonsillektomi ve 16'sında ise adenotoksillektomi yapılan, toplam 26 hastaya ait 65 doku örneği dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların 12'si erkek, 14'ü ise bayan idi. Örnekler genel veya lokal anestezi altında alındı. Çalışmadan önce hastalarda mide problemleri olup, olmadığı

anemnezde soruldu. Ayrıca, çalışmaya ilgili Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunda gerekli izin alındı ve hasta veya hasta sahiplerine çalışma ile ilgili bilgi verildi.

DNA özütleme: *Helicobacter pylori* DNA'ları, ticari bir DNA izolasyon kiti kullanılarak (Wizard Genomic DNA Purification kiti, Promega) adenoid ve tonsil dokularının her birinden özütlendi. Elde edilen DNA'lar PZR'da kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı.

PZR: Elde edilen DNA'lar ile beş farklı gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak PZR işlemleri gerçekleştirildi (8). Her örnek DNA'sından 5 µl ve her birinden 20 pmol/µl primer çifti (tablo 1) için; 5 µl 10X PZR buffer, 25 mM MgCl₂, her biri 100 mM olan dNTP'ler, 1U *Taq* DNA polimeraz (Promega/ABD) enzimi ve 23.5 µl dH₂O içeren toplam 50 µl karışım hazırlandı. Daha sonra, karışımlar ısı döngü cihazına bırakıldı ve gen ürünleri tablo-1'de belirtilen döngülerde çoğaltıldı.

Tablo 1. Adenoid ve tonsil dokularında *H. pylori* DNA'larının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen PZR'da kullanılan primer çiftleri ve koşulları.

Hedef bölge	Primer dizilimleri ve koşulları
16S rRNA	Primer 1; 5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3' Primer 2; 5'-AGGATCAAGGTTTAAGGATT-3' Koşul; 95°C'de 30 sn, 50°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn (30 siklus)
<i>glmM</i>	Primer 1; 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' Primer 2; 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAAACGC-3' Koşul; 93°C'de 1 dak, 55°C'de 1 dak, 72°C'de 1 dak (35 siklus)
Random	Primer 1; 5'-TAACAAACCGATAATGGCGC-3' Primer 2; 5'-CATCTTGTTAGAGGGATTGG-3' Koşul; 95°C'de 1 dak, 42°C'de 1 dak, 72°C'de 1 dak (40 siklus)
SSA geni	Primer 1; 5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3' Primer 2; 5'-CCTGCTGGGCATACTCACCAG-3' Koşul; 98°C'de 10 dak (1 siklus), 92°C'de 30 sn, 68°C'de 1 dak (37 siklus), 92°C'de 30 sn, 68°C'de 1 dak, 72°C'de 2 dak (6 siklus)
<i>ureA</i>	Primer 1; 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3' Primer 2; 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3' Koşul; 94°C'de 1 dak, 45°C'de 1 dak, 72°C'de 1 dak (35 siklus)

Elde edilen PZR ürünleri 0.5 µg/ml. etidyum bromit içeren % 2'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Örnekler, elektroforez sonrası, jeller görüntüleme sisteminde ultraviyole ışınları ile incelendi.

Çalışma boyunca, DNA özütleme ve PZR aşamalarında pozitif kontrol olarak *H. pylori*'nin

referans suşu (ATCC 43504) ve negative kontrol olarak ise dH₂O kullanıldı. Beş farklı primer çiftinin her biri için PZR'ın deteksiyon limiti referans suşun önce 10-kat ve daha sonra 2 kat seri sulandırılmalarında elde edilen DNA'ların PZR'a koşullarıyla elde edildi.

BULGULAR

H. pylori'nin referans suşunun seri sulandırılmaları ve farklı primer çiftleriyle gerçekleştirilen PZR'ların deteksiyon limitleri; 16S rRNA ve *glmM* gen bölgesine ait primerler kullanıldığında 7 bakteri, SSA gen bölgesine uygun primerler kullanıldığında 10 bakteri, random kromozom dizilimine özgül primerler kullanıldığında 15 bakteri ve *ureA* gen bölgesine özgül primerler kullanıldığında ise 20 bakteri olarak tespit edildi.

Altmış beş klinik örneklerden elde edilen DNA'larla gerçekleştirilen PZR sonucunda; 16S rRNA gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak 16 (% 24.61), *glmM* gen bölgesine ait primerler kullanılarak 15 (% 23.07), SSA gen bölgesine uygun primerler kullanılarak 14 (% 21.53), random kromozom dizilimine özgül primerler kullanılarak 10 (% 15.38) ve ureaz A (*ureA*) gen bölgesine özgül primerler kullanılarak ise 7 (% 10.76) örnekte *H. pylori* DNA'sı pozitif olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Farklı primer çiftleri ve klinik örneklerden elde edilen DNA ile gerçekleştirilen PZR sonuçları.

Primer çiftleri	PZR pozitif Doku örnekleri		
	Adenoid (n:19)	Tonsil (n:46)	Toplam (n:65)
16S rRNA	3	13	16 (% 24.61)
<i>glmM</i>	3	12	15 (% 23.07)
SSA gene	2	12	14 (% 21.53)
Random	1	9	10 (% 15.38)
<i>ureA</i>	1	6	7 (% 10.76)

TARTIŞMA

H. pylori toplumda en yaygın enfeksiyöz etkenlerden birisidir. Özellikle son yıllarda halk sağlığı problemi olarak kabul edilmeye başlayan mide hastalıklarının pek çoğunda *H. pylori* primer etken olarak tespit edilmiştir. *H. pylori*'nin toplumda yüksek sıklıkta görülmesinde ve yaygınlığında önemli bir faktör olarak kabul edilen oral-oral bulaşmayla ilgili mevcut soru bu bakterinin oral lokalizasyonunun ve kolonizasyonunun gerçekleştiği dokulardır (1, 2, 13).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarının bulguları ışığında, adenoid ve tonsil dokularının bu bakteri için önemli bir kolonizasyon dokusu olabileceği kanaati güç kazanmıştır (7, 8). Ancak, yine yapılan bazı çalışmalarda ise adenoid ve tonsil dokularda *H. pylori* belirlenmemiştir ve bu nedenle de bu dokuların *H. pylori* için bir

kolonizasyon ve kaynak bölgesi olamayacağı sonucu çıkarılmıştır (9, 10). Mevcut çalışmada, PZR sonuçlarına göre adenoid ve tonsil dokularda yüksek oranda *H. pylori* DNA'sı tespit edilmiştir. Mevcut çalışmanın verileri adenoid ve tonsil dokuların *H. pylori* için önemli bir kaynak olduğunu destekler niteliktedir. Ancak, iki farklı zamanda bu dokuların hastada alınması söz konusu olamayacağından, çalışmanın verilerine göre kolonizasyonla ilgili bir kanaat edinilememiştir. Ayrıca, bu çalışmada örneklenen hastalarda mide problemleriyle ilgili sorular sorulmuş olmasına rağmen, hastaların midelerinde *H. pylori*'nin varlığı ve hastalarda gastroözefagial refleksle (GER) ile ilgili kesin bir bilgiye sahip değiliz. Bu husus da çalışmada belirlenen bakteri genomunun hastaların midelerinde GER ile bu dokulara gelen ve örnekleme sürecinde geçici olarak bu dokularda bulunana bakteriden kaynaklanabileceği ile ilgili spekülasyonlarını aklı getirebilmektedir.

PZR metodu özellikle kültürü zor mikro-organizmaların belirlenmesinde en çok kullanılan, standardize edildiği takdirde ise oldukça duyarlı ve özgül olan bir metottur (4, 14, 15). Bu metodun duyarlılığını ve özgüllüğünü belirleyen en önemli parametrelerden birisi metotta kullanılan seçilmiş primer çiftleridir (13, 15). *H. pylori*'nin farklı klinik örneklerde belirlenmesi amacıyla, mevcut çalışmada kullanılan primer çiftlerinin bireysel olarak kullanıldığı çalışmalar bildirilmiştir (7, 16-19). Ancak, mevcut bilgilerimize göre, bu primerlerin birlikte kullanıldığı ve primer duyarlılığına bakıldığı bir çalışmaya rastlanmıştır (13). Belirtilen bu çalışmada ise mide dokularında *H. pylori*'nin belirlenmesi amaçlanmış ve çalışma sonucunda üç primer çiftinin (*glmM*, SSA ve 16S rRNA) yüksek duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *glmM* haricinde yüksek duyarlılığa sahip diğer SSA ve 16S rRNA primerlerinin özgüllüğü düşük bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada da 16S rRNA ve *glmM* primerleriyle adenoid ve tonsil dokularında yüksek oranda *H. pylori* DNA'sını belirlenmiştir. Ayrıca, deteksiyon limiti çalışma-larında bu 2 primerin yüksek deteksiyon limitine sahip oldukları tespit edilmiştir. Ancak, mevcut çalışmada kültür çalışması yapılmadığı için PZR sonuçları için duyarlılık ve özgüllük kıyaslaması yapmak söz konusu olmamıştır.

Mevcut çalışmanın verilerine göre, adenoid ve tonsil dokuların *H. pylori* için önemli bir

rezervuar dokusu olabileceği düşünmekteyiz ve bu dokularda *H. pylori*'nin PZR ile belirlenmesi amacıyla 16S rRNA ve *glmM* primerlerinin kullanılmasını önermekteyiz. Ancak, bu çalışma

öncü bir çalışmadır ve daha spesifik sonuçlar için ileriki çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Wu YY, Tsai HF, Lin WC, et al. *Helicobacter pylori* enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. World J Gastroenterol 2004; 10: 2334-2339.
2. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, et al. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. World J Gastroenterol 2004; 10: 1958-1960.
3. Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, Nichols G. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. J Appl Microbiol 2004; 97: 690-698.
4. Benson JA, Fode-Vaughan KA, Collins ML. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. Lett Appl Microbiol 2004; 39: 221-225.
5. Gebara EC, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol 2004; 19: 277-280.
6. Bonamico M, Strappini PM, Bonci E, Ferri M, et al. Evaluation of stool antigen test, PCR on oral samples and serology for the noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in children. Helicobacter 2004; 9: 69-76.
7. Cirak MY, Ozdek A, Yilmaz D, Bayiz U, Samim E, Turet S. Detection of *Helicobacter pylori* and its *CagA* gene in tonsil and adenoid tissues by PCR. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003; 129: 1225-1229.
8. Unver S, Kubilay U, Sezen OS, Coskuner T. Investigation of *Helicobacter pylori* colonization in adenotonsillectomy specimens by means of the CLO test. Laryngoscope 2001; 111: 2183-2186.
9. di Bonaventura G, Neri M, Neri G, Catamo G, Piccolomini R. Do tonsils represent an extragastric reservoir for *Helicobacter pylori* infection. J Infect 2001; 42: 221-222.
10. Yilmaz M, Kara CO, Kaleli I, Demir M, Tumkaya F, Buke AS, Topuz B. Are tonsils a reservoir for *Helicobacter pylori* infection in children? Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2004; 68: 307-310.
11. Shahamat M, Alavi M, Watts JE, Gonzalez JM, Sowers KR, Maeder DW, Robb FT. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2004; 42: 3613-3619.
12. Makristathis A, Hirschl AM, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2004; 9: 7-14.
13. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, Lee CH. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol 1999; 37: 772-774.
14. Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. J Clin Pathol 1993; 40: 540-543.
15. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 2752-2756.
16. Vinette KM, Gibney KM, Proujansky R, Fawcett PT. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. BMC Microbiol 2004; 4: 5.
17. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the *urease C* gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. J Med Microbiol 1993; 39: 338-44.
18. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. J Clin Microbiol 1991; 29: 2543-2549.
19. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 192-200.