

Şişelenmiş içme sularında *Helicobacter pylori* DNA'sının araştırılması: Bir ön çalışma

The investigation of *Helicobacter pylori* DNA in bottled drinking water: A preliminary study

Fatma KALAYCI-YÜKSEK¹

ÖZET

Amaç: *Helicobacter pylori* insan mide mukozasına yerleşen ve dünyadaki insanların yarısını etkilediği bilinen bir bakteridir. Peptik ülser, mide adenokarsinomu ve mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomalarında etken olarak tanımlanmaktadır. Ancak, bakterinin doğal konağı ve rezervuarı kesin olarak bilinmemektedir. Bulaşmasında fekal-oral, oral-oral, gastro-oral yolların etkili olduğu; kontamine besin ve suyun bu yollara kaynak olabileceği ileri sürülmektedir. Bakterinin virülansında önemli rol oynayan uyum kabiliyeti ve biyofilm oluşturma özelliği su ile bulaşmasına yönelik çalışmaların temelini oluşturmuştur. Bununla ilişkili olarak birçok çalışmada bakteri DNA'sı içme sularında, yüzey sularında, yeraltı sularında ve atık sularda saptanmıştır. Bu ön çalışmada içme suyu örneklerinde *H. pylori* DNA'sının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Farklı markalara ait 35 içme suyu (500 mL'lik) Mart-Haziran 2019'da İstanbul çevresinden toplanmıştır. İncelenen su örneklerinin pH aralıklarının alkali pH'ya yakın (pH:6,6 - 8,45 aralığında) olduğu görülmüştür. Su örnekleri 0,22 µM por çaplı membran filtrelerde süzülüş ardından her bir filtre içeren Beyin Kalp İnfüzyon sıvı besiyerinde (BKI)'da oda sıcaklığında

ABSTRACT

Objective: *Helicobacter pylori* is a bacterium which colonizes the human gastric mucosa and known to affect half of the world's population. *H. pylori* is defined as the aetiological agent of peptic ulcer, gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. However, the natural host and reservoir have not been clearly identified. The ability of adaptation and biofilm formation, which play an important role in the virulence of the bacterium, constituted the basis of studies about water contamination. In relation with this, bacterial DNA was detected in drinking water, surface water, groundwater and wastewater in many studies. It has been suggested that the transmission of bacterium occurs via fecal-oral, oral-oral and gastro-oral routes, additionally contaminated foods and water may be source of infection. In the present preliminary study, it was aimed to investigate the presence of *H. pylori* DNA in drinking water samples.

Methods: Thirty five different trademarked drinking water samples (each one 500 mL) were collected from March- June 2019 in all around Istanbul. It was observed that water samples have a slightly alkaline pH ranging from 6.6 to 8.45. All water samples were filtrated using 0.22 µM filter membranes which were incubated on

¹İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

İletişim / Corresponding Author : Fatma KALAYCI-YÜKSEK

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Azmi Ofloğlu Kampüsü 34010 İstanbul - Türkiye
E-posta / E-mail : fatmaklyc@gmail.com YA

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.57804

Kalaycı-Yüksek F. Şişelenmiş içme sularında *Helicobacter pylori* DNA'sının araştırılması: Bir ön çalışma.
Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(EK4: Su ve Sağlık): 71-76

30 dakika bekletilmiş ve filtrelerin bulunduğu besiyerleri soğutmali santrifüjde (+4 °C) çevrilmiştir. Daha sonra besiyerlerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Bakterinin ureC (glmM) geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmış ve ürünler %1,5'lük agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada incelenen su örneklerinde *H. pylori* DNA'sı saptanmamıştır.

Sonuç: Bu ön çalışmanın sonuçları, bu coğrafyada içme sularının *H. pylori* bulaşmasında rolü olmadığını düşündürmüştür. Ancak bu çalışmada incelenen örnek sayısının az olması ve sadece 500 mL'lik ambalajda satılan şişelerin değerlendirilmiş olmasından dolayı daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması önemlidir. Bu nedenle 19L'lik olarak şişelenmiş damacana suları, musluk suları ve çeşitli su tankları gibi su kaynaklarının incelenmesi, bakterinin bulaşmasında suyun rolünün anlaşılması için yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: İçme suyu, bulaş, *H. pylori*, PZR

Brain Heart Infusion (BHI) broth for half hour at room temperature and filter included broths were centrifuged. Then bacterial DNA was extracted. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for the detection of the ureC (glmM) gene. The PCR products were visualised in %1.5 agarose gel electrophoresis.

Results: In this study *H. pylori* DNA was not detected in any of the water samples tested.

Conclusion: This preliminary study results have suggested that, drinking waters do not have a role in transmission of *H. pylori* in this geographical area. However, it is important to carry out more extensive studies since the number of samples examined in this study was limited and only bottles sold in 500 mL packaging are included. Therefore it may be concluded that different water sources such as 19L flagon bottled drinking waters, tap waters and water samples from various tanks may be useful for clarifying the role of water for transmission route of this pathogen.

Key Words: Drinking water, contamination, *H. pylori*, PCR

GİRİŞ

Helicobacter pylori, mide mukozasına yerleşen ve dünya genelinde insanların yarısını enfekte ettiği ileri sürülen bir patojendir; gelişmekte olan ülkelerde bakterinin görülme oranı %80'den daha yüksek olarak rapor edilirken, gelişmiş ülkelerde bu oran %20'nin altında olarak bildirilmektedir (1-3). Bakterinin gastrit, peptik ülser ve mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomaları ile ilişkisi gösterilmiştir (4-6). Dünya Sağlık Örgütü de 1994 yılında *H. pylori*'yi birinci sınıf karsinogen olarak tanımlamıştır (7). Bakterinin farklı birçok tabloda etkili olmasında çeşitli virülans faktörleri rol oynamaktadır. Bakterinin virülansında etkili faktörlerden biri de uygun olmayan ortam koşullarında canlılığını sürdürecektir uyum

kabiliyetine sahip olmasıdır. Yapılan çalışmalar, *H. pylori*'nin DNA ve RNA sentezini düşük düzeyde tutarak spiral formundan metabolik olarak inaktif olarak tanımlandığı kokkoid formuna dönüşmesinin uyumunda etkili olduğunu göstermiştir (8-10). Bununla birlikte günümüzde bu patojenin doğal konağı ve rezervuarı kesin olarak bilinmemektedir. Fekal-oral, oral-oral, gastro-oral yollarla bulaştığı ileri sürülmüştür (3, 7-9). Kontamine su ve besinler bulaşmaya hizmet eden en olası kaynaklar olarak kabul edilmektedir (3, 8, 11). Bununla ilişkili olarak bazı araştırmalar kontamine suyun bakterinin kokkoid şeklinin vücuda alınmasında etkili olabileceğini göstermişlerdir (3, 8, 11, 12). Bu bulaşma yolunu

araştıran dünyanın farklı bölgelerinden birçok çalışma bakterinin içme sularında, kuyu sularında ve çeşme sularında izole edildiğini ya da DNA'sının saptandığını bildirmiştir (12-19). Bunlara ilave olarak Baker ve ark. (20) ile Lin ve ark. (21) yaptıkları çalışmalarda, *H. pylori*'nin ozonlama ve kloramaya birçok koliform bakteriden daha dayanıklı olduğunu saptamışlardır. Bu ön çalışmada, günlük hayatta insanların tüketimine sunulan şişelenmiş içme sularında *H. pylori*'nin olası varlığı DNA'sının saptanması yoluyla araştırılmıştır.

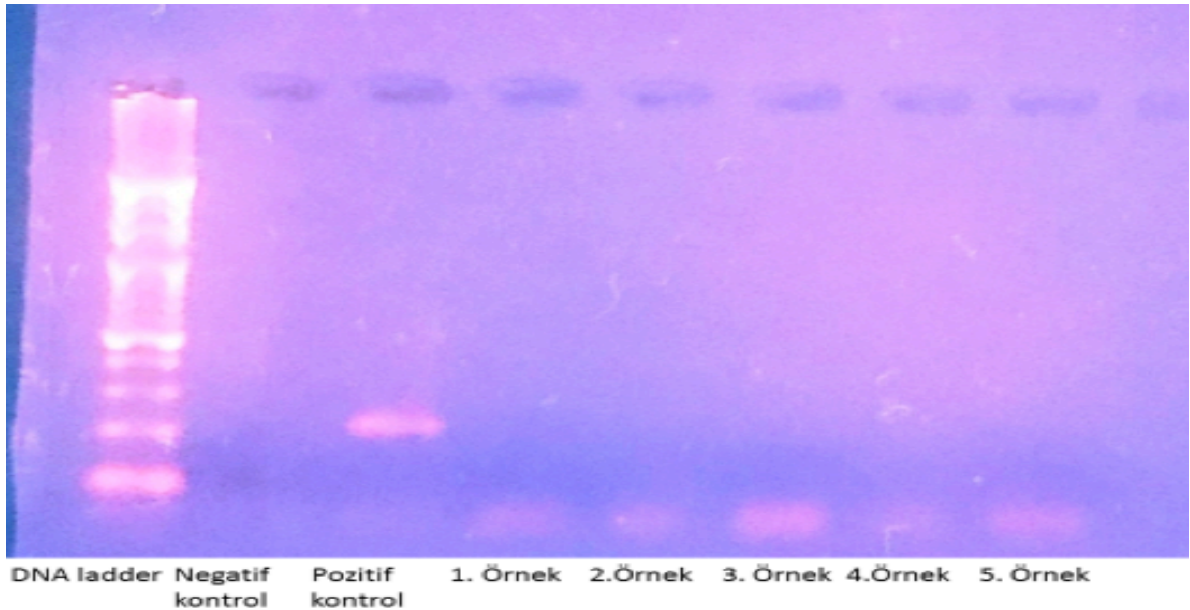
GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 35 farklı ticari su markasının etiketi bulunan 500 mL'lik su örnekleri incelenmiştir. Su örnekleri 2019 yılı Mart-Haziran ayları içerisinde insanların günlük yaşamlarında alışveriş yaptıkları marketler, büfeler, benzin istasyonları gibi alanlardan satın alınmıştır. İncelenen su örneklerinin pH aralıklarının alkali pH'ya yakın (pH:6,6 - 8,45 aralığında) olduğu görülmüştür. Su örneklerinin analizi için 500 mL'lik şişelerdeki su örnekleri 0,22 µm'lik membran filtrelerden süzümüştür.

Daha sonra membran filtreler Beyin Kalp İnfüzyon (BKİ) sıvı besiyerinde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bu süreçte filtrelerdeki bakterilerin besiyerine geçmesi amaçlanmıştır. Ardından filtrelerin bulunduğu besiyerleri soğutmalı santrifüjde +4°C'de çevrilmiştir ve üzerlerine fosfat tamponlu tuz çözeltisi eklenmiştir. Bakteri DNA'sının izolasyonu için ticari bir kit kullanılmış (GeneMark, Taiwan) ve üretici firmanın talimatlarına uyulmuştur. Bakteri DNA'sını çoğaltmak üzere ureC genine uygun primerler kullanılmıştır (Hp-ureC-F: CAT CGC CAT CAAAAG CAAAG; Hp-ureC-R: CAG AGT TTA AGG ATC GTG TTA G) (22). Bu genin seçilme nedeni bakterinin çoğalmasında gerekli bir gen olarak tanımlanmasıdır (23). Reaksiyon koşulları için Abiri ve ark. (24)'nın koşulları dikkate alınmıştır. Daha sonra %1,5 'luk agaroz jel hazırlanmış ve çoğaltılan DNA'lar jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 1).

BULGULAR

İncelenen 35 farklı ticari markanın 500 mL'lik su örneklerinin hiçbirinde *H. pylori* DNA'sı saptanmamıştır.



Şekil 1. Agaroz jelde yürütülen örneklerin görüntülenmesi (1.-5. Örnekler)

TARTIŞMA

Dünya nüfusunun yarısında kolonize olduğu bilinen *H. pylori*'nin bulaşmasında suyun rolü üzerine yapılan çalışmaların diğer bulaşma yolları ile ilgili yapılan çalışmalara göre daha az sayıda olduğu dikkat çekmektedir. Su ile bulaşmanın değerlendirildiği çalışmaların temelinde birkaç farklı görüşün yattığını söylemek mümkündür (3, 8, 9, 11-19). Bunların başında sulara biyofilm oluşturan suşların özellikle dezenfeksiyon uygulamalarına daha dayanıklı bir yaşam ortamı bulabileceği fikri gelmektedir (3, 25-28). Özellikle su dağıtım sistemlerinde mikroorganizmaların biyofilm oluşturan formlarının bulunmaları da bu düşünceyi desteklemiştir (26, 29-31). Ayrıca Winiecka-Krusnell ve ark. (32) *H. pylori*'nin, *Acanthamoeba castellanii* içinde 8 hafta kadar yaşayabildiğini ve çoğalabildiğini göstermiştir. Bilindiği gibi farklı *Acanthamoebae* türleri içme sularındaki biyofilmlerin ana bileşenlerindedir ve bakterileri hem dezenfektanlara karşı korunma hem de onlara çoğalma imkanı sağlamaları bakımından önemlidirler (33). Diğer bir görüş alt yapı yetersizliği nedeniyle sosyoekonomik koşullara bağlı olarak atık suların içme ve kullanma suyu sistemlerine karışması, farklı coğrafi bölgelerde içme ve kullanma suyu olarak özellikle yeraltı sularının tüketimi ile fekal-oral bulaşmanın gerçekleşebileceği ile ilgilidir (3, 8, 11-19). Bakterinin bulaşma yolunun su olabileceğine dair yapılan çalışmalarda, bakteri DNA'sı içme, yüzey, yeraltı sularında ve atık sulara araştırılmıştır (15, 18, 34-36). Bu çalışmalarda, içme ve kullanma sularının bir kaynak rolü olabileceği fikrinin ortaya çıkışında etkili olan görüşlerden bir diğeri de *H. pylori*'nin ozonlama ve klorlama uygulamalarına *E. coli*'den dirençli bulunması ile ilişkilidir (20). Baker ve ark (20) klor ile yapılan dezenfeksiyon uygulamalarının bakterinin yok edilmesinde yetersiz kaldığını ileri sürmüşlerdir. Bakterinin 0,05- 6 mg/L'lık klor konsantrasyonlarında canlılığını sürdürmesi sularla bulaşmada rolü olabileceğini desteklemiştir. Daha düşük konsantrasyonlarla (0,05-0,2 mg/L)

yapılan değerlendirmelerde de klorun bakteriye zarar vermediği ancak belirli genlerinin ekspresyonunu baskıladığı ileri sürülmüştür (21). Ozonlama işlemi ile ilgili yapılan çalışmalarda da bakterinin koloni oluşturan birim cinsinden sayısında azalma olduğu gösterilmiş ve ozonlama uygulamasının klorlamadan daha etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir (20, 21, 37). Bu bulgular, geleneksel olarak su kirliliğinin gösterilmesinde kullanılan mikroorganizmaların yok edilmesine yönelik uygulamaların bakteriye maruziyeti önlemede yetersiz kalabileceği fikrini doğurmuştur.

Birçok epidemiyolojik çalışmada su örneklerinde *H. pylori* DNA'sı saptanmış ya da bakteri izole edilmiştir (2, 12- 15, 18, 34, 35); bu çalışmada ise içme sularında *H. pylori* DNA'sı saptanamamıştır. Dünyanın farklı coğrafyalarından bildirilen sonuçlara göre bakterinin su örneklerinde saptanma oranları değişkenlik göstermektedir. Buna göre İsviçre'de yapılan incelemede, bakterinin saptanma oranı %20 olarak rapor edilirken, İngiltere'de bu oran %26, Peru'da %50 olarak bildirilmiştir (12, 13, 38). Orta Doğu ülkelerinde yürütülen çalışmalarda ise bakterinin su örneklerinde saptanma oranının %4-40 aralığında olduğunu söylemek mümkündür (2, 14, 15, 34). Bununla birlikte bu çalışma sonuçları ile uyumlu şekilde yapılan bazı araştırmacılar da inceledikleri su örneklerinde bakteriyi saptayamadıklarını belirtmişlerdir (17, 36, 39).

Sonuç olarak bu ön çalışmanın verileri dikkate alındığında, incelenen şişelenmiş içme sularının *H. pylori* DNA'sı içermediği görülmüştür. Ancak bu çalışmada incelenen örnek sayısının az olması ve sadece 500 mL'lik ambalajda satılan şişelerin değerlendirilmiş olmasından dolayı daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması önemlidir. Bu nedenle de su kaynaklarının *H. pylori*'nin bulaşmasındaki rolünün aydınlatılmasında insanların sıklıkla temas ettikleri farklı su örneklerinin özellikle birçok farklı ticari markanın 19L'lik damacana sularının, musluk sularının, depolama tanklarının ve kuyu sularının incelenmesinin yararlı olacağını ileri sürmek mümkündür.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Defne Gümüş, Taha Yüksek ve Prof.Dr. Mine Küçüker'e ve deneyler için pozitif kontrol temin eden Dr. Claudia Scotti'ye teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Hooi JK, Lai WY, Ng WK, Suen MM, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterol*, 2017; 153(2): 420-429.
2. Amirhooshang A, Ramin A, Ehsan A, Mansour R & Shahram B. High frequency of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Kermanshah, Iran, during June-November 2012. *J Water Health*, 2014; 12(3): 504-512.
3. Vale FF, Vítor JMB. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? *Int J Food Microbiol*, 2010;138(1-2): 1-12.
4. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 2006; 19: 449-90
5. Backert S, Neddermann M, Maubach G, Naumann M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2016; 21 (S1): 19-25.
6. Farinha P, Gascoyne RD. *Helicobacter pylori* and MALT Lymphoma. *Gastroenterol*, 2005; 128,1579-605.
7. International Agency for Research on Cancer (IARC), 1994. Working Group IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori* 61 Lyon, France.
8. She FF, Lin JY, Liu JY, Huang C, Su DH. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World J Gastroenterol*, 2003; 9: 516-520.
9. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, Vieira MJ. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl Environ Microbiol*, 2007;73: 3423-7.
10. Saito N, Konishi K, Sato F, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, et al. Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *J Infect*, 2003;46: 49-55.
11. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J Advan res*, 2015; 6(4): 539-547.
12. Hultén K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterol*, 1996;110:1031-5.
13. Hultén K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *J Appl Microbiol*, 1998;85: 282-6.
14. Khan A, Farooqui A, Kazmi SU. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan. *J Infect Dev Ctries*, 2012;6: 251-5.
15. Bahrami AR, Rahimi E, Ghasemian Safaei H. Detection of *Helicobacter pylori* in city water, dental units' water, and bottled mineral water in Isfahan, Iran. *Sci World J*, 2013;280510.
16. Moreno Y, Ferrus MA. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter*, 2012;17: 327-32.
17. Horiuchi T, Ohkusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol Immunol*, 2001;45: 515-9.
18. Al-Sulami AA, Al-Tae AM, Juma'a MG. Isolation and identification of *Helicobacter pylori* from drinking water in Basra governorate, Iraq. *East Mediterr Health J*, 2011; 16: 920-5.
19. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal physiology working group. *Lancet*, 1991;337:1503-6.

20. Baker K, Hegarty J, Redmond B, Reed N, Herson D. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, 2002;68: 981-4.
21. Lin W, Li S, Zhang S, Yu X. Reduction in horizontal transfer of conjugative plasmid by UV irradiation and low-level chlorination. *Water Res*, 2016;91: 331-8.
22. Pajavand H, Alvandi A, Mohajeri P, Bakhtyari S, Bashiri H, Kalali B et al.. High frequency of *vacA s1m2* genotypes among *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastroduodenal disorders in Kermanshah, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 2015; 8: e25425.
23. De Reuse HILDE, Labigne A, Mengin-Lecreux D. The *Helicobacter pylori ureC* gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol*, 1997; 179(11): 3488-93.
24. Abiri R, Bagherabadi S, Kashef M, Hasanvand B, Pajavand H, Gholipour A et al. Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Jundishapur J Microbiol*, 2017; 10(4).
25. Gíao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2008; 74: 5898-904.
26. Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms. *Water Sci Tech*, 2003; 47, 155-60.
27. Azevedo NF, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ. A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Crit Rev Microbiol*, 2007; 33, 157-69.
28. Percival SL, Thomas JG. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. *J Water Health*, 2009;7: 469-77.
29. Mackay WG, Gribbon LT, Barer MR, Reid DC. Biofilms in drinking water systems: a possible reservoir for *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol*, 1999;85: 52-9.
30. Mackay WG, Bunn JE, Thomas JE, Reid DC & Weaver LT. Molecular evidence of *Helicobacter pylori* in biofilms of containers used for storing water. *Arch Dis Child*, 2001; 84: 24-7.
31. Park SR, Mackay WG, Reid DC. *Helicobacter sp.* recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res*, 2001; 35: 1624-6.
32. Winięcka-Krusnell J, Wreiber K, von Euler A, Engstrand L & Linder E. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis*, 2002; 34: 253-6.
33. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17: 413-33.
34. Ebaa ES & Hossam ES. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in some Egyptian water systems and its incidence of transmission to individuals. *Iran J Pub health*, 2015; 44(2): 203.
35. McDaniels AE, Wymer L, Rankin C, Haugland R. Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. *Water Res*, 2005;39(19): 4808-16.
36. Yanez MA, Barbera VM, Soria E, Catalán V. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*. *J Appl Microbiol*, 2009; 107(2): 416-24.
37. Orta de Velásquez MT, Yáñez Noguez I, Casasola Rodríguez B, Román Román PI. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environ Tech*, 2017;38(6):744-53.
38. Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, et al. 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: 690-98.
39. Janzon A, Sjöling Å, Lothigius Å, Ahmed D, Qadri F, Svennerholm AM. Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol*, 2009; 75(10): 3039- 44.