

**PREVALENS *HELICOBACTER PYLORI* DALAM  
PELBAGAI KUMPULAN ETNIK DI PULAU  
PINANG DAN KAITAN GEN *H. PYLORI* DENGAN  
KEPATOGENAN**

**CHE WAN SHARIFAH ROBIAH BT MOHAMAD**

**UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

**2008**

**PREVALENS *HELICOBACTER PYLORI* DALAM PELBAGAI KUMPULAN  
ETNIK DI PULAU PINANG DAN KAITAN GEN *H. PYLORI* DENGAN  
KEPATOGENAN**

**oleh**

**CHE WAN SHARIFAH ROBIAH BT MOHAMAD**

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan bagi  
Ijazah Sarjana Sains**

**JAN 2008**

## PENGHARGAAN

Terlebih dahulu saya mengucapkan syukur pada Illahi kerana akhirnya saya berjaya menamatkan kajian ini. Saya juga mengucapkan ribuan terima kasih kepada penyelia saya, Prof Madya Dr. UYUB ABD MANAF yang telah banyak memberi bimbingan, bantuan dan tunjuk ajar yang berguna kepada saya dan juga Prof Madya Dr Tengku Sifzizul Tengku Mohamad dan Dr Yahya Mat Arip sepanjang kajian ini dijalankan. Ribuan terima kasih juga saya ucapkan kepada Pusat Pengajian Sains Kajihayat dan Universiti Sains Malaysia kerana memberi peluang saya menjalani kajian di sini. Penghargaan juga kepada Pakar Gastroenterologi Hospital Seberang Jaya Mr. Khoo, Mr. Nagarajan dan Puan Zabiah serta Puan Rokiah yang telah banyak membantu dalam penyampelan spesimen biopsi dalam kajian ini.

Tidak dilupakan yang teristimewa buat keluarga, terutamanya insan yang sentiasa memberi semangat kepada saya iaitu ibu tersayang, Che Wan Shamsimah Bt. Mohamed, kakak, abang dan adik tersayang yang sentiasa mendorong dan memberi sokongan moral dalam menjayakan perjalanan kajian ini. Disamping itu, ribuan terima kasih kepada sahabat yang banyak membantu dan memberi tunjuk ajar kepada saya, Ms. Ong Eng Keat yang sentiasa bersama-sama memberi idea sepanjang kajian ini dijalankan. Akhir kata, ucapan terima kasih kepada semua yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam menjayakan kajian ini dijalankan. Sekian, Terima kasih.

## SUSUNAN KANDUNGAN

	Muka surat
<b>PENGHARGAAN</b>	ii
<b>JADUAL KANDUNGAN</b>	iii-vii
<b>SENARAI JADUAL</b>	viii-ix
<b>SENARAI RAJAH</b>	x
<b>SENARAI LAMPIRAN</b>	xi
<b>SENARAI PENERBITAN DAN SEMINAR</b>	xi
<b>ABSTRAK</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>BAB SATU : PENGENALAN</b>	
1.0 Penemuan <i>H. pylori</i>	1
1.1 Beberapa Ciri <i>H. pylori</i>	2
1.2 Medium Pengkulturan <i>H. pylori</i>	4
1.3 Beberapa Faktor Virulens <i>H. pylori</i> dan Proses Kerosakan Dinding Perut dan Duodenum	5
1.3.1 Kemotilan	6
1.3.2 Rangsangan Hipokloridria	7
1.3.3 Aktiviti Urease	8
1.3.4 Faktor Pelekatan	8
1.3.5 Sisteina Protease	9
1.3.6 Sitotoksin dan Faktor Pengaktifan Platelet	9
1.3.7 Lipopolisakarida dan Pepsinogen	10
1.3.8 Fosfolipase	10
1.3.9 Imunoinflamasi	11
1.3.10 Gangguan Pada Hormon Gastrin	11
1.3.11 Protein cag Pulau Kapatogenan (Protein cag PAI)	12
1.4 Epidemiologi penularan <i>H. pylori</i> di seluruh dunia	13
1.4.1 Negara Maju	13
1.4.2 Negara sedang membangun	14
1.5 Mekanisma Penularan <i>H. pylori</i>	15
1.5.1 Takungan Air Ilmiah	15

1.5.2	Penyebaran Mulut ke Mulut	16
1.5.3	Penyebaran Melalui Tinja ke Mulut	17
1.5.4	Penyebaran Gastro ke Mulut	17
1.5.4	Penyebaran Dari Ibu Ke Bayi	18
1.6	Diagnosis Jangkitan <i>H. pylori</i>	20
1.6.1	Ujian Invasif	20
1.6.1.1	Ujian Mikroskopi	20
1.6.1.2	Ujian Pengkulturan	21
1.6.1.3	Ujian Urease Segera	23
1.6.1.4	Kaedah PCR	24
1.6.2	Ujian Tak Invasif	26
1.6.2.1	Ujian Pernafasan Urea	26
1.6.2.2	Ujian Immunologi	27
1.6.2.3	Ujian Perkumuhan Ammonium ( $^{15}\text{NH}_4^+$ )	28
1.6.2.4	Kaedah PCR (Sampel Saliva, Plak Gigi dan Tinja)	29
1.7	Gen-gen patogen <i>H. pylori</i>	30
1.7.1	Gen Sitotoksin Vakuol A ( <i>vac A</i> )	30
1.7.2	Gen Protein-Kaitan Sitotoksin ( <i>cag A</i> )	32
1.7.3	<i>Ice A</i>	33
1.7.4	<i>Ure A</i>	34
1.8	Objektif kajian	36

## **BAB DUA : BAHAN DAN KAEDAH**

2.0	Bahan dan Kaedah	37
2.1	Pengkulturan Biopsi dan Pengesanan Gen <i>ureA</i> di dalam spesimen Biopsi dan Saliva Pesakit Dengan Teknik PCR	37
2.1.1	Pensterilan	37
2.1.2	Pengeraman <i>H. pylori</i>	37
2.1.3	Darah dan Penyediaan Medium	37
2.1.4	Pesakit yang Menjalani Prosedur Gastroduodenoskopi	38
2.1.5	Endoskopi	38
2.1.6	Pengkulturan <i>H. pylori</i> daripada Biopsi	39
2.1.7	Penyimpanan Sampel Biopsi dan Saliva	39
2.1.8	Ujian Urease	39
2.1.9	Ujian Pewarnaan Gram	40

2.1.10	Pengawetan Pencilan <i>H. pylori</i>	40
2.1.11	Pengesanan Gen <i>ureA</i> Daripada Kultur <i>H. pylori</i> , Biopsi dan Saliva Pesakit	40
2.1.11.1	Pengekstrakan DNA <i>H. pylori</i> dari Kultur	40
2.1.11.2	Pengekstrakan DNA Daripada Saliva Pesakit	43
2.1.11.3	Pengekstrakan DNA <i>H. pylori</i> Daripada biopsi	43
2.1.12	Anggaran Kualiti DNA dan Kuantiti DNA	44
2.1.13	Amplifikasi PCR	45
2.1.14	Penyediaan Gel Agarosa	48
2.2	Perkaitan Kehadiran Gen Patogen <i>ureA</i> , <i>cagA</i> , <i>iceA</i> dan <i>vacA H. pylori</i> Dengan Kehadiran Penyakit	50
2.2.1	Sumber Biopsi	50
2.2.2	Pengesanan gen <i>ureA</i> , <i>cagA</i> , <i>iceA</i> dan <i>vacA H. pylori</i> dari Biopsi	50
2.2.3	Penghasilan Produk PCR Pelbagai Gen Patogen <i>H. pylori</i>	50
2.2.3.1	Pengesanan Gen <i>cagA</i>	52
2.2.3.2	Pengesanan Gen <i>iceA</i>	52
2.2.3.3	Pengesanan Gen <i>vacA</i>	53
2.2.4	Penyediaan Gel Agarosa	53
2.3	Pengklonan dan Penjujukan Produk PCR untuk Pengesanan Kehadiran Gen Patogen <i>H. pylori</i>	54
2.3.1	Media dan Penimbal	54
2.3.1.1	Penyediaan Stok Ampisilin	54
2.3.1.2	Penyediaan Kaldu Lurier Bertani (Kaldu LB)	54
2.3.1.3	Penyediaan Agar Lurier Bertani (Agar LB)	54
2.3.1.4	Penyediaan Penimbal untuk Pengekstrakan Vektor pGEM-T	55
2.3.1.4.1	Penimbal Natrium-EDTA-Tris (SET)	55
2.3.1.4.2	Larutan Sukrosa (50% b/i)	55
2.3.1.4.3	Larutan 0.5M Tris-HCl (pH 7.6)	55
2.3.1.4.4	Larutan 0.5M Asid Etilenadinitrilotetraasetik (EDTA) pH 8.0	56
2.3.1.4.5	Penyediaan Penimbal Natrium Asetat (NaAc) pH 4.8	56
2.3.1.4.6	Penyediaan Larutan Lisis	56
2.3.2	Pemilihan Produk PCR Tertentu bagi Setiap Gen dan Amplifikasi Semula untuk Pengklonan	56
2.3.3	Penyediaan dan Larian Produk PCR atas 2.0% Gel Agarosa untuk Penentuan Saiz	57

2.3.4	Pengekstrakan Produk PCR dari 2.0% Gel Agarosa	57
2.3.5	Kaedah Ligasi dengan Menggunakan Vektor pGEM-T	58
2.3.6	Transformasi Hasil Ligasi ke Dalam Sel Kompeten Komersial, JM109	59
2.3.7	PCR Koloni bagi Penyaringan Hasil Transformasi Ligasi	60
2.3.8	Pengkulturan Koloni Transformasi Terpilih Menggunakan Kaldu LB	62
2.3.9	Pemencilan Plasmid Sampel dengan Menggunakan Kaedah 'Mini Prep'	62
2.3.10	Penulenan Plasmid DNA dengan Menggunakan QIAEX II	64
2.3.11	Penentuan Kuantiti DNA Plasmid dengan Menggunakan Spektrofotometer	64
2.3.12	Pengesahan Selitan DNA/Gen yang Dikehendaki di dalam Plasmid	64
2.4	Ujian Statistik	64
2.5	Ringkasan Aktiviti Kerja	64

### **BAB TIGA : KEPUTUSAN**

3.0	Keputusan	66
3.1	Penyampelan Biopsi dan Saliva dari Pesakit yang Diendoskopkan di Hospital Seberang Jaya	66
3.1.1	Hasil Pengekstrakan DNA Daripada Sampel Biopsi, Saliva dan Kultur <i>H. pylori</i>	66
3.1.2	Pengesahan <i>H. pylori</i> Dengan Teknik Pengkulturan Biopsi dan Teknik PCR untuk Gen <i>ureA</i> pada Biopsi dan Saliva	68
3.1.3	Perkaitan Jangkitan <i>H. pylori</i> dan Jenis Penyakit di Kalangan Kaum	68
3.1.4	Perkaitan Jangkitan <i>H. pylori</i> Di Kalangan Kaum Mengikut Jantina dan Umur	70
3.2	Perkaitan Kehadiran Gen Patogen <i>H. pylori</i> Dengan Penyakit Yang Dihidapi Oleh Pesakit Yang Dikaji	75
3.2.1	Perkaitan Kehadiran Gen Patogen <i>H. pylori</i> Dengan Penyakit	75
3.2.2	Kehadiran Gen Patogen <i>H. pylori</i> Berdasarkan Kaum	76
3.2.3	Kehadiran Pelbagai Gen Patogen <i>H. pylori</i> Dikalangan Pesakit Ulser Peptik	78

3.2.4	Kehadiran Gen <i>vacA</i> <i>H. pylori</i> Di Kalangan Pesakit Ulser Peptik dan Tanpa Ulser Peptik yang Dijangkiti <i>H. pylori</i> Mengikut Umur	79
3.3	Penentuan Klon Tertentu Mempunyai Selitan DNA Gen Patogen <i>H. pylori</i> Dan Disahkan Dengan Keputusan Penjujukan	81
3.3.1	Pemilihan Sampel Terbaik Untuk Pengklonan Gen Patogen <i>H. pylori</i> Menggunakan Vektor pGEM-T	81
3.3.2	Pengesahan Kehadiran DNA Selitan Gen Patogen <i>H. pylori</i> Dalam Vektor pGEM-T Dengan Menggunakan Kaedah PCR	81
3.3.3	Kepekatan DNA <i>H. pylori</i> di Dalam Sampel Terpilih Untuk PCR dan Seterusnya Penjujukan	83
3.3.4	Keputusan Analisis Penjujukan Bagi Klon Gen <i>ureA</i> , <i>cagA</i> , <i>iceA</i> dan <i>vacA</i> <i>H. pylori</i>	85

#### **BAB EMPAT : PERBINCANGAN**

4.0	Perbincangan	88
4.1	Prevalens Jangkitan <i>H. pylori</i> di Kalangan Pesakit Yang Menjalani Endoskopi di Hospital Seberang Jaya	88
4.2	Gen Patogen <i>H. pylori</i> Yang Dikesan di Kalangan Pesakit Yang Mengidapi Ulser Dan Penyakit Bukan Ulser.	95
4.3	Pengesahan Klon Tertentu Mempunyai Selitan DNA Gen Patogen <i>H. pylori</i> Dengan Proses Penjujukan.	98

#### **BAB LIMA : KESIMPULAN**

5.0	Kesimpulan	100
-----	------------	-----

<b>SENARAI RUJUKAN</b>	101
------------------------	-----

<b>LAMPIRAN</b>	123
-----------------	-----

## SENARAI JADUAL

Muka surat

2.1	Keadaan PCR untuk mengesan gen <i>ureA</i> daripada kultur, biopsi dan saliva.	48
2.2	Bahan untuk tindakbalas PCR bagi mengesan gen <i>ureA</i> .	48
2.3	Primer yang digunakan dalam PCR untuk mengesan gen patogen <i>H. pylori</i> daripada biopsi.	52
2.4	Jenis dan isipadu bahan yang diperlukan dalam proses ligasi	62
2.5	Jenis dan isipadu ( $\mu$ l) bahan yang diperlukan dalam tindakbalas PCR koloni untuk mengesan selitan DNA sasaran selepas proses transformasi gen-gen tertentu.	62
2.6	Bilangan pesakit yang didapati positif <i>H. pylori</i> mengikut kaum dan jantina.	48
2.7	Perkaitan diantara umur dengan kaum dan jantina yang dipercayai dijangkiti <i>H. pylori</i> .	49
3.1	Pengekstrakan DNA genom <i>H. pylori</i> dan DNA dari biopsi dan saliva tiga orang pesakit yang sah dijangkiti <i>H. pylori</i> .	68
3.2	Kehadiran <i>H. pylori</i> berdasarkan pengkulturan biopsi dan kehadiran gen <i>ureA</i> <i>H. pylori</i> dalam biopsi dan saliva 250 orang pesakit yang diendoskopkan.	70
3.3	Bilangan pesakit yang didapati positif dengan kaedah pengkulturan dan PCR untuk gen <i>ureA</i> berdasarkan kaum dan penyakit.	70
3.4	Bilangan dan peratus pesakit secara keseluruhan yang didapati positif dengan kaedah pengkulturan dan PCR untuk gen <i>ureA</i> .	70
3.5	Bilangan pesakit yang didapati positif <i>H. pylori</i> mengikut kaum dan jantina.	73
3.6	Taburan jangkitan <i>H. pylori</i> mengikut umur di kalangan kaum Melayu dan bukan Melayu.	73
3.7	Taburan jangkitan <i>H. pylori</i> mengikut umur di kalangan lelaki dan perempuan bagi kaum Melayu dan bukan Melayu.	75
3.8	Pengesanan gen patogen <i>H. pylori</i> di kalangan pesakit ulser peptik dan bukan ulser peptik.	78
3.9	Kehadiran pelbagai gen patogen di kalangan pesakit berdasarkan kaum.	78
3.10	Kehadiran genotip <i>vacA s1m1</i> <i>H. pylori</i> di kalangan pesakit ulser peptik dan tanpa ulser peptik pada peringkat umur yang berbeza.	81

3.11	Keputusan menggunakan gel agarosa 2.0% bagi pengesanan selitan DNA gen <i>H. pylori</i> tertentu pada vektor rekombinan, pGEM-T.	85
3.12	Keputusan penentuan kepekatan DNA yang berbeza menggunakan spektrofotometer. Nombor yang bergaris bererti nombor rujukan pesakit diikuti dengan nombor klon. Misalnya 978#1 merujuk pada pesakit 978 dan klon nombor 1.	85

## SENARAI RAJAH

	Muka surat
2.1 Penanda DNA 10000 bb	50
2.2 Penanda DNA 100bp	50
2.3 Carta alir kerja penyelidikan yang dilaporkan dalam tesis ini	66
3.1 Elektroforesis 0.7% gel agarosa dengan perwarnaan etidium bromida yang menunjukkan keputusan pengekstrakan DNA genom daripada kultur <i>H. pylori</i> , biopsi dan saliva pesakit yang diendoskopkan	68
3.2 Gel agarosa 1.0% dengan perwarnaan ethidium bromida menunjukkan keputusan vektor pGEM-T dan selitan DNA gen patogenik <i>H. pylori</i> . Lorong M ialah penanda 1000 bp. Lorong 1 hingga 5 ialah plasmid yang diekstrak daripada kultur.	83
3.3 Gel agarosa 2.0% dengan perwarnaan ethidium bromida menunjukkan kehadiran selitan DNA gen patogen <i>H. pylori</i> menggunakan kaedah amplifikasi semula PCR.	83

## SENARAI LAMPIRAN

	Muka surat
7.0.0 Lampiran 1	123
7.0.1 Lampiran 2	124
7.0.1 Lampiran 3	130
7.0.1 Lampiran 4	132
7.0.2 Lampiran 5	134
7.0.2 Lampiran 6	139
7.0.6 Lampiran 7	146
7.0.3 Lampiran 8	152
7.0.3 Lampiran 9	159
7.0.3 Lampiran 10	162
7.0.3 Lampiran 11	166

## SENARAI PENERBITAN & SEMINAR

	Muka surat
1 Detection Of <i>cagA</i> And <i>iceA</i> Genes In Biopsies Of <i>Helicobacter Pylori</i> – Positif Patients. Biotechnology Symposium, Rasa Sayang Hotel, Penang, 30 <sup>th</sup> March – 2 <sup>nd</sup> April 2006	176

# PREVALENS *HELICOBACTER PYLORI* DALAM PELBAGAI KUMPULAN ETNIK DI PULAU PINANG DAN KAITAN GEN *H. PYLORI* DENGAN KEPATOGENAN

## ABSTRAK

Dengan pengkulturan biopsi hanya 19.2% (48/250) pesakit dijangkiti HP, tetapi dengan menggabung pengesanan PCR dan pengkulturan, prevalens jangkitan meningkat 3 kali ganda menjadi 59.6% (149/250) mencadangkan yang PCR terhadap biopsi dan saliva lebih sensitif mengesan *HP* dan sepatutnya digunakan dalam kajian epidemiologi. Berdasar kumpulan umur, perbezaan ketara ( $p < 0.05$ ) jangkitan *HP* didapati antara lelaki bukan-Melayu dan Melayu pada kumpulan umur 41-60 tahun sahaja. Berdasarkan kumpulan etnik, 68.1% (62/91) lelaki bukan-Melayu dijangkiti berbanding dengan 49.5% (28/58) lelaki Melayu dan perbezaan ini ketara ( $p < 0.05$ ) sementara tidak ada perbezaan antara 64.2% (34/53) perempuan bukan-Melayu dengan 51.1% (23/45) perempuan Melayu.

Hanya gen patogen *HP vacA s1m1* didapati berkaitan secara statistik ( $p < 0.05$ ) dengan PUD. Pengklonan produk PCR terpilih, penjujukan dan pepadanan dengan BLAST NCBI, menunjukkan similariti dengan *HP* 26695 (Nombor pengaksesan genbank: NC 000915.1), *HP* HPAG1 (Nombor pengaksesan genbank: NC 008086.1) dan *HP* J99 (Nombor pengaksesan genbank: NC 000921.1) dengan peratus identiti menjulat dari 91% hingga 98% untuk semua kecuali *vacA m2* yang menjulat antara 84% hingga 86%. Pencarian DNA sehomolog juga menunjukkan kesamaan jujukan dengan *Helicobacter acinonychis str. Sheeba* (Nombor pengaksesan genbank: NC 008229.1), tetapi strain ini hanya menjangkiti harimau, singa dan harimau bintang dan bukan patogen manusia. Kesamaan seperti itu dijangkakan kerana mereka dari genus yang sama. Keputusan penjujukan DNA mengesahkan kehadiran gen patogen *HP* pada produk PCR yang dikaji.

# PREVALENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* IN VARIOUS ETHNIC GROUPS IN PENANG AND ASSOCIATION OF *H. PYLORI* GENES WITH PATHOGENICITY

## ABSTRACT

By culturing of biopsies only 19.2% (48/250) of the patients were infected by *HP*, but combining PCR detection and culturing, prevalence of *HP* infection increased by three-fold at 59.6% (149/250) suggesting that PCR on biopsies and saliva was more sensitive and should be used in epidemiological studies. Based on age group, significant differences ( $p < 0.05$ ) of *HP* infection were detected among non-Malay males and Malay males at the 41-60 age group only. Based on ethnic group, 68.1% (62/91) of non-Malay males were infected compared with 49.5% (28/58) Malay males and the difference was significant ( $p < 0.05$ ), while no difference was observed between 64.2% (34/53) non-Malay and 51.1% (23/45) Malay females.

Only *HP* pathogenic genes *vacA s1m1* were found to be statistically associated ( $p < 0.05$ ) with PUD. Cloning of selected PCR products, sequencing and aligning by BLAST NCBI, revealed close similarity to *HP* 26695 (Genebank accession number: NC 000915.1), *HP* HPAG1 (Genebank accession number: NC 008086.1) and *HP* J99 (Genebank accession number: NC 000921.1) with percent identity in the range 91% to 98% for all except for *vacA m2* with percent identity ranging from 84% to 86%. DNA homology search also revealed sequence similarity with *Helicobacter acinonychis str. Sheeba* (Genebank accession number: NC 008229.1) but this strain only infects tigers, lions and leopards and not human pathogen. Such similarity is also expected as they belong to the same genus. In conclusion, DNA sequencing confirmed the presence of *HP* pathogenic genes in PCR product.

## **BAB 1.0 TINJAUAN BACAAN**

### **1.0 Penemuan *H. pylori***

Kewujudan bakteria berbentuk spiral di dalam perut manusia telah lama diketahui iaitu seawal kurun ke 19 selepas laporan pertama dikeluarkan oleh pakar mikrobiologi. Pada 14 April 1984, Marshall & Warren dari Jabatan Mikrobiologi, Royal Perth Hospital, Australia Barat telah melakukan kajian mengenai kewujudan organisma yang berbentuk spiral yang mengkolonisasi perut manusia dan berjaya mengkulturnya. Pada mulanya bakteria tersebut dinamakan *Campylobacter pyloridis*, tetapi ditukarkan kepada *Campylobacter pylori*. Selepas kajian seterusnya dilakukan pada bulan Oktober 1989, didapati *C. pylori* tidak dapat digolongkan di bawah genus *Campylobacter*, dan genus baru diperkenalkan iaitu *Helicobacter*. Seterusnya, bakteria spiral tersebut diberikan nama baru iaitu *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) untuk menggantikan *C. pylori* (Goodwin *et al.*, 1989).

Kajian terhadap *H. pylori* yang menjangkiti manusia pada mulanya adalah secara histologi dan ultrastruktur tanpa pengkulturan secara *in vitro*. Steer & Newell (1985) merupakan saintis pertama yang telah menemui bakteria berbentuk spiral wujud pada sel rembesan gastrik mukosa. Mereka gagal mengkulturnya tetapi dapat membuktikan kewujudannya pada sel epitelium gastrik dengan mikroskop elektron.

*H. pylori* merupakan bakteria yang menjangkiti dinding mukus perut dan duodenum manusia dan haiwan. Kebanyakan penyakit ulser perut dan kes gastritis adalah disebabkan oleh jangkitan *H. pylori*. Walaubagaimanapun, terdapat ramai pesakit yang telah dijangkiti tidak menunjukkan sebarang gejala penyakit. *H. pylori* juga telah diketahui sebagai bakteria yang boleh bermandiri dengan jayanya dalam kepekatan asid

perut yang tinggi. Bentuknya yang heliks memudahkannya untuk melekat dan mengkolonisasi lapisan mukus perut (Bourke *et al.*, 1996). Setelah pengkulturan secara *in vitro* berjaya dilakukan, kajian terhadap *H. pylori* terus berkembang pesat.

Pada hari ini, genom bagi keseluruhan *H. pylori* telah diumumkan. Sebanyak 1590 gen telah direkodkan (Tomb *et al.*, 1997). Hal ini dapat membantu pakar mikrobiologi untuk membandingkan genom *H. pylori* dengan genom patogen lain yang menjangkiti manusia (Schlessinger, 1995).

### **1.1 Beberapa ciri *Helicobacter pylori***

*H. pylori* merupakan organisma motil, Gram negatif yang berbentuk spiral dalam keadaan *in vivo* (Goodwin & Armstrong, 1990). Panjang bakteria ini adalah di antara 2.5 hingga 3.5  $\mu\text{m}$  dan lebarnya 0.5 hingga 1.0  $\mu\text{m}$ . Permukaan bakteria ini adalah licin dan mempunyai lapisan bak kapsul. *H. pylori* mempunyai 1 hingga 6 flagelum yang diatur secara lofotrikus iaitu satu gugusan flagelum di satu kutub sel. *H. pylori* mempunyai dua bentuk morfologi iaitu berbentuk spiral atau kelok semasa kultur muda dan dapat dikulturkan, manakala berbentuk kokoid semasa kultur tua dan tidak dapat dikulturkan. *H. pylori* juga berubah menjadi kokoid apabila didedahkan kepada oksigen secara berterusan (Bode *et al.*, 1993; Kuster *et al.*, 1997). Keadaan bakterisid juga boleh mempengaruhi perubahan bentuk *H. pylori* daripada spiral kepada kokoid. Bentuk kokoid merupakan satu fenomena dominan, di mana ia dapat mengesahkan kewujudan sesuatu bakteria tetapi tidak dapat dikulturkan, tidak hanya *H. pylori* tetapi juga kebanyakan jenis bakteria entero patogen yang lain (Wang, 2004).

Perubahan morfologi *H. pylori* daripada bentuk spiral kepada kokoid dipengaruhi oleh beberapa pembolehubah. Ini termasuklah aerobiosis, pH beralkali, suhu yang

tinggi, masa pengeraman yang dipanjangkan, atau rawatan yang menggunakan perencat pam proton atau antibiotik (Kusters *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1999; Wang, 2004). Bentuk kokoid merupakan salah satu bentuk *H.pylori* bermandiri dan beradaptasi dengan perubahan persekitaran yang dikolonisasinya. Bagi pesakit yang menjalani rawatan antibiotik dalam tempoh yang lama, *H. pylori* mengalami transformasi kepada bentuk kokoid, tetapi berubah bentuk kepada spiral apabila pesakit meninggalkan rawatan tersebut. Ini bukanlah jangkitan semula tetapi merupakan pengaktifan semula bentuk kokoid kepada spiral (Kusters *et al.*, 1997). Perubahan bentuk kokoid kepada spiral masih membolehkannya menghasilkan urease apabila persekitaran menjadi sesuai (Andersen *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 2001) dan ini menyebabkan kerosakan tisu mukosa berlaku.

Dimakmal ini, *H. pylori* dikultur pada agar yang mengandungi darah, dalam inkubator mikroaerofili yang mengandungi kelembapan 100% dan udara bercampur 10% CO<sub>2</sub> berdasarkan Goodwin & Armstrong (1990) dan Tompkins (1992). Fungsi darah di dalam medium pertumbuhan *H. pylori* adalah untuk menyerap bahan-bahan toksik seperti radikal oksigen bebas yang toksik (Tompkins, 1992). Kelembapan medium penting bagi memastikan bakteria ini tumbuh dengan baik kerana penginkubatan yang agak lama dan medium yang kering akan menghalang pertumbuhan *H. pylori* (Goodwin *et al.*, 1997). *H. pylori* tumbuh dengan perlahan dan koloninya akan kelihatan selepas empat hingga tujuh hari. Selain dapat hidup dalam persekitaran yang kurang oksigen, *H. pylori* tumbuh didalam perut kerana memiliki enzim hidrogenase dan mengoksidaan molekul hidrogen (H<sub>2</sub>) yang dihasilkan oleh bakteria intestin yang lain untuk mendapat tenaga (Jonathan & Robert, 2002). Koloni *H. pylori* berdiameter di antara satu hingga dua millimeter dan lutsinar serta menyebabkan hemolisis pada agar yang mengandungi darah.

Selepas tujuh hari, bakteria ini akan membentuk kokoid dan tidak dapat dikulturkan secara *in vitro* (Catrenich & Makin, 1991). Perubahan bentuk ini diaruh oleh penghasilan ammonia dan diikuti oleh perubahan pH di dalam medium pengeraman yang lama (Catrenich & Makin, 1991). Bakteria ini akan mati jika didedahkan kepada oksigen secara berterusan (Tompkin, 1992). Bagi memastikan kultur sentiasa hidup, pengkulturan perlu dilakukan selepas tiga atau empat hari pada medium pertumbuhan yang segar (Tompkin, 1992).

Pengecaman *H. pylori* dapat dilakukan dengan menguji kehadiran enzim seperti urease, oksidase, katalase, alkaline fosfatase, glutamil transferase, DNAase dan pelbagai esterase (C<sub>4</sub> – C<sub>12</sub>) (Megraud *et al.*, 1985). *H. pylori* merupakan bakteria yang mengeluarkan urease dengan banyaknya jika dibandingkan dengan *Ureaplasma urealyticum*. Urease juga merupakan enzim pertama yang dapat dihablurkan dan juga mengandungi nikel (Dixon *et al.*, 1975). Peningkatan keasidan pada dinding sel mukosa manusia merupakan mekanisma yang penting dalam proses kolonisasi *H. pylori*. Urease (Urea amidohidrolase, EC 3.5.1.5) memangkinkan tindakbalas hidrolisis urea untuk menghasilkan ammonia dan karbamat. Kemudian karbamat akan mengalami hidrolisis spontan untuk menghasilkan ion ammonia dan asid karbonik. Seterusnya ammonia akan bertindakbalas dengan molekul air untuk membentuk ammonium hidroksida yang menyebabkan peningkatan dalam nilai pH.

## **1.2 Medium Pengkulturan *H. pylori***

Perubahan morfologi *H. pylori* daripada spiral kepada kokoid menyebabkan kaedah pengawetan dan pengkulturannya menjadi sangat penting. Bagi memastikan kultur sentiasa segar dan berbentuk spiral, pensubkulturannya pada medium pertumbuhan segar dan pengawetannya dititik beratkan.

*H. pylori* dapat dikulturkan dalam pelbagai medium pepejal komersial seperti agar eugon, agar Muller Hinton, agar emulsi yolka telur, agar Skirrow, agar Dent, agar Thayer-Martin, agar tripkase soya dan agar brusela (Hartzen *et al.*, 1997; Piccolomini *et al.*, 1997). *H. pylori* juga dapat dikulturkan di dalam kaldu seperti kaldu eugon, kaldu soya tripkase, kaldu brusela, kaldu Columbia dan kaldu Mueller-Hinton (Shahamat *et al.*, 1991). Darah perlu ditambah kedalam medium tersebut pada takat 10% kepekatan muktamad.

Diagnosis *H. pylori* dilakukan dengan pengkulturan sampel biopsi pesakit pada medium pertumbuhan. Oleh sebab itu, penggunaan medium pengangkutan dan medium pertumbuhan memainkan peranan yang penting di dalam mendiagnosis jangkitan *H. pylori* dengan menggunakan kaedah pengkulturan (van der Hulst *et al.*, 1996). Pemilihan medium pengangkutan yang tidak efektif akan menggagalkan pengkulturan *H. pylori* dan memberikan keputusan negatif palsu (van der Hulst *et al.*, 1996). Sensitiviti mengesan *H. pylori* bergantung pada tempat penyampelan biopsi antrum atau korpus pesakit. Ini kerana biopsi mesti diambil pada kawasan yang berhampiran dengan kawasan jangkitan *H. pylori* bagi memastikan biopsi mengandungi patogen tersebut (Morris *et al.*, 1989).

### **1.3 Beberapa faktor Virulens *H. pylori* dan Proses Kerosakan Dinding**

#### **Perut dan Duodenum**

Virulens merupakan ukuran kepatogenan bagi sesuatu mikroorganisma patogen. Faktor virulens ialah faktor yang meningkatkan kemampuan sesuatu mikroorganisma untuk menjangkiti perumah iaitu untuk melekat pada perumah, mengembangbiak dan memperluaskan serangannya di dalam tisu perumah serta membentuk bahan-bahan yang boleh menyebabkan kecederaan pada tisu perumah. Bagi *H. pylori*, terdapat beberapa faktor virulens yang menyebabkan kerosakan pada tisu perumah. *H. pylori*

didapati dapat hidup dengan jayanya pada antrum dan korpus perut dan juga pada bahagian duodenum dan fundus. Penyesuaian yang tersendiri membolehkan *H. pylori* dapat hidup berterusan di dalam perut manusia yang mempunyai persekitaran yang berasid.

Perut manusia mempunyai jus gastrik yang terdiri daripada enzim-enzim pencernaan dan asid hidroklorik yang kuat iaitu sekitar pH 2. Fungsi jus gastrik adalah untuk memastikan perut manusia berada dalam keadaan steril dan bebas daripada mikroorganisma patogen. Menurut Lee *et al.* (1986), ketebalan lapisan mukosa perut adalah sekitar  $1.62 \pm 0.45 \mu\text{m}$  dan ini memastikan wujud kecerunan pH supaya pH yang neutral wujud pada kawasan epithelium dinding sel perut. Lapisan mukosa dipercayai memberikan persekitaran yang unik untuk *H. pylori* bermandiri kerana ia dapat melindungi *H. pylori* daripada jus gastrik melalui aktiviti enzim ureasenya yang memangkinkan tindakbalas hidrolisis urea kepada ammonia dan bikarbonat yang dapat meneutralkan asid di sekeliling sel bakteria ini.

Bagi menyesuaikan keadaan pada permukaan sel mukosa perut, *H. pylori* juga merembeskan eksotoksin seperti sitotoksin, protease, katalase, fosfolipase A2, faktor pengaktif platelet (PAF) dan urease yang menghasilkan ammonia (Wyle *et al.*, 1993) yang menyebabkan kerosakkan pada sel epithelium mukosa.

### **1.3.1 Kemotilan.**

Flagelum merupakan faktor virulens yang sangat penting bagi *H. pylori* kerana ia menggerakkan sel untuk memulakan kolonisasi pada gastrik mukosa secara berterusan (Eaton *et al.*, 1996). Gen yang bertanggung jawab di dalam pengepressan flagelum adalah *fibA* (Vandenplas, 2000). *H. pylori* biasanya mempunyai dua hingga enam

flagelum pada satu kutub yang bersambungan dengan membran luar di mana komposisinya adalah menyamai lipopolisakarida, fosfolipid dan protein (Geis *et al.*, 1993). Flagelum terbahagi kepada dua jenis subunit, iaitu yang dikodkan oleh gen *flaA* dan *flaB* (Josenhans *et al.*, 1995).

Fungsi flagelum pada *H. pylori* membolehkannya berenang dan bergerak di dalam lumen perut perumah sebelum melekat pada sel-sel epitelium dan lapisan mukosa perut (Eaton *et al.*, 1992). Pergerakan yang terhasil daripada flagelum ini membolehkan *H. pylori* masuk ke dalam lapisan perut yang neutral seperti kawasan lapisan epitelium dan di bawah lapisan mukosa bagi mengelakkan kawasan permukaan epitelium yang berasid. Josenhans *et al.* (1995) juga melaporkan bahawa mutasi yang dilakukan di bahagian kedua-dua gen ini menunjukkan bahawa ia berfungsi sebagai organel pergerakan dan membantu kolonisasi pada anak khinzir gnotobiotik (Eaton *et al.*, 1996).

### **1.3.2 Rangsangan Hipokloridria**

Hipokloridria merupakan keadaan dimana kepekatan asid hidroklorik di dalam perut menjadi terlalu rendah. Pada kali pertama *H. pylori* menjangkiti seseorang manusia, ia akan menghalang perembesan asid hidroklorik di dalam perut sehingga ia sampai ke lapisan yang selamat. Keadaan ini akan berlanjutan sehingga beberapa bulan (Cave, 1997). Faktor penghalang seperti interleukin-1(IL-1) (Sapear *et al.*, 1990) berfungsi menghalang pengeluaran asid hidroklorik daripada sel-sel parietal (Cave, 1997). Kesan pH yang terlalu rendah di dalam perut manusia sekitar pH 2 akan memudaratkan *H. pylori*. Ini merupakan salah satu cara *H. pylori* menyesuaikan kemandiriannya di dalam perut perumah, terutamanya manusia.

### 1.3.3 Aktiviti Urease

Enzim yang dihasilkan oleh *H. pylori* kebanyakannya adalah jenis metabolik, antioksidan dan toksik (Nilius & Malfertheiner, 1996). Urease ialah faktor virulens yang penting bagi *H. pylori* untuk memulakan sesuatu jangkitan dan ia sentiasa didapati di dalam dan di luar sel *H. pylori* (Eaton *et al.*, 1996). Enzim ini merupakan sejenis metaloenzim yang mengandungi nikel, dan hadir dalam bentuk dua subunit iaitu UreA dan UreB (Graham & Klein, 1991). Urease merupakan sejenis enzim sitoplasma (Phadnies *et al.*, 1996), yang dapat menhidrolisiskan urea kepada bikarbonat dan ammonia, dimana boleh menyebabkan peningkatan nilai pH persekitaran. Ammonia adalah sumber nutrien bagi bakteria dan boleh menyebabkan luka atau kecederaan pada tisu epitelium gastrik (Figura, 1997). Aktiviti urease *H. pylori* menghasilkan bes yang kuat seperti ammonia dan bikarbonat yang boleh meneutralkan persekitarannya yang berasid. Dengan cara ini, *H. pylori* terselamat daripada asid perut sebelum melekat pada lapisan epitelium perut manusia (Eaton *et al.*, 1991). Pada permukaan luar lapisan mukosa terdapat kumpulan sulfidril yang berfungsi sebagai pelindung endogen. Tetapi ammonia yang terhasil daripada tindakbalas urease boleh mengurangkan kandungan sulfidril seperti glutanin dengan cepat (Nagy *et al.*, 1990). Ini menggalakkan lagi kerosakkan tisu mukosa perut.

### 1.3.4 Faktor pelekatan

Mekanisme pelekatan *H. pylori* pada sel epitelium gastrik adalah faktor terpenting untuk kolonisasi *H. pylori* pada perut manusia. Pelekatan mikroorganisma ini pada sel epitelium memerlukan tapak pelekatan dan tapak penerimaan (Dubreuil *et al.*, 2002). Tapak pelekatan pada bakteria adalah sama ada protein bakteria, glikokonjugat atau pun lipid bakteria yang merupakan tapak permulaan kolonisasi antara bakteria sementara reseptor pada permukaan sel epitelium iaitu lipid, protein, glikolipid atau

glikoprotein (Castillo-Rojas *et al.*, 2004). Cara pelekatan *H. pylori* pada sel epitelium masih tidak dapat difahami secara mendalam tetapi difahami bahawa *H. pylori* menghasilkan bahan pelekatan yang membolehkan ia melekat pada membran berkaitan-lipid dan karbohidrat. Bahan ini membantu supaya pelekatan *H. pylori* pada lapisan mukosa epitelium menjadi kuat dan sukar dibasuh keluar. Selain itu terdapat pelbagai tapak pelekat pada sel *H. pylori* yang terlibat dalam proses pelekatan dengan reseptor pada permukaan sel epitelium untuk membolehkan kolonisasi bakteria ini berlaku (Wadstrom *et al.*, 1993). *H. pylori* dapat mengkolonisasi di beberapa lokasi iaitu dalam mukosa, melekat pada sel epitelium dan dalam lohong dalam sel epitelium (Marshall *et al.*, 2002).

#### **1.3.5. Sisteina protease**

Selain daripada itu, sisteina protease yang merupakan enzim proteolisis juga dapat meningkatkan kecederaan sel dan tisu perut. Kehadiran ammonia yang terbentuk daripada aktiviti *H. pylori* boleh merangsang pengeluaran enzim sisteina protease ke dalam perut (Szabo *et al.*, 1992). Disebabkan sisteina atau tiol protease (contohnya katepsin B, H dan L) terlibat di dalam pemangkinan pencernaan intrasel dan diluar sel dan ia boleh menyebabkan kemusnahan dan merosakkan mukosa gastrik (Szabo *et al.*, 1992).

#### **1.3.6. Sitotoksin dan faktor pengaktifan platelet**

Pada penemuan awal *H. pylori*, didapati bakteria ini mengeluarkan sitotoksin yang menyebabkan pembentukan lohong atau lompong pada sel eukariot. Pencilan *H. pylori* daripada pesakit ulser menunjukkan keadaan ini dan ini mencadangkan bahawa sitotoksin boleh bertindak balas di dalam pembentukan ulser peptik (Figura *et al.*, 1989).

Dalam kajian Denizot *et al.* (1990), *H. pylori* terbukti dapat mensintesis faktor pengaktif platelet (PAF) apabila dikulturkan di atas medium pertumbuhan yang mengandung darah tetapi gagal di dalam kaldu pertumbuhan jika tidak dibekalkan dengan liso-PAF dan asetil KoA. PAF merupakan bahan yang menyebabkan inflamasi pada tisu manusia dan biasanya dihasilkan oleh makrofaj, neutrofil, sel endotelium dan platelet. PAF dapat memberikan kesan kemotaksis kepada leukosit dan dapat menyebabkan perubahan pada ketelapan vaskular.

### **1.3.7. Lipopolisakarida dan pepsinogen**

*H. pylori* merupakan bakteria Gram-negatif dan ia mempunyai komponen lipopolisakarida (LPS) pada lapisan membran luar yang bertindak sebagai antigen dan endotoksin. LPS juga boleh menyebabkan integriti sel-sel perut menjadi lemah (Slomiany *et. al.*, 1991; Trust *et. al.*, 1991). *H. pylori* juga dapat merangsang pengeluaran pepsinogen iaitu bahan yang diperlukan dalam pengeluaran pepsin di dalam perut manusia. Pepsin merupakan suatu enzim proteolisis yang dapat merosakkan sel-sel mukosa dan berpotensi bertindak sebagai faktor agresif dalam perkembangan ulser duodenum. Ini dapat menerangkan bagaimana *H. pylori* boleh menyebabkan ulser duodenum terhadap pesakit yang dijangkiti.

### **1.3.8. Fosfolipase**

*H. pylori* juga menghasilkan fosfolipase dan bahan ini dapat melemahkan struktur membran sel dan boleh menyebabkan kerosakan pada membran sel. Disebabkan *H. pylori* mengkolonisasi mukosa perut, hanya sedikit sahaja fosfolipase sudah cukup untuk menyebabkan kerosakan yang teruk pada membran sel mukosa. Fosfolipase bertindak secara langsung dengan lesitin untuk menghasilkan lisolesitin yang bertindak sebagai sitotoksin. Kajian yang dilakukan oleh Rhodes *et al.* (1996)

membuktikan bahwa pesakit yang mempunyai ulser mengandungi kandungan lisolesitin yang tinggi di dalam jus gastrik berbanding individu normal. *H. pylori* juga boleh menghasilkan fosfolipase A dan C (Daw *et al.*, 1990). Fosfolipase juga boleh menyebabkan penghasilan substrat ulser (Langton & Cesareo, 1992).

### **1.3.9. Imunoinflammasi**

Walaupun mekanisma untuk menerangkan bagaimana imunoinflammasi berlaku adalah kurang tetapi terdapat hipotesis yang mengaitkan gastritis dengan pengeluaran faktor kemotaksis leukosit oleh *H. pylori*. Hipotesis ini juga telah dibuktikan dengan penemuan yang menunjukkan bahawa *H. pylori* yang dikultur pada medium pertumbuhan mengeluarkan faktor kemotaksis yang menarik minat monosit dan neutrofil untuk pergi ke arah sel *H. pylori* (Craig *et al.*, 1992). Wallace *et al.* (1990) menyatakan bahawa faktor ini menelap masuk ke dalam lapisan mukosa untuk mengaktifkan sistem imun dan leukosit. Pada masa yang sama, sel-sel endotelium pada perut pula mengeluarkan interleukin-8 atau IL-8 (Strieter *et al.*, 1992) yang merupakan suatu faktor kemotaksis yang kuat. Kedua-dua faktor ini memberikan kesan tarikan kimia terhadap sel polimorfonukleus seperti leukosit dan neutrofil. Neutrofil dan leukosit ini mengeluarkan radikal oksigen dan enzim proteolisis yang boleh menyebabkan kerosakan pada sel. Bahan-bahan ini tidak dapat melalui lapisan mukosa maka *H. pylori* terselamat daripada tindakan bahan-bahan ini tetapi pada masa yang sama, pengeluaran bahan-bahan ini akan berterusan sehingga gastritis kronik dan ulser berlaku.

### **1.3.10. Gangguan Pada Hormon Gastrin**

Hipergastrinemia adalah peningkatan jumlah hormon gastrin dan asid hidroklorik dalam perut (Levi *et al.*, 1989; Graham & Borch, 1990; McColl *et al.*, 1991; Beardshall *et*

*al.*, 1992; Chittalajju *et al.*, 1992) yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori*. Ini dijelaskan oleh Levi *et al.* (1989) bahawa penghasilan ammonia daripada aktiviti *H. pylori* boleh meningkatkan nilai pH perut. Apabila pH perut meningkat, hormon gastrin dari sel G perut akan mengeluarkan asid hidroklorik untuk membentuk persekitaran perut yang normal iaitu keadaan berasid. Di samping itu, pengeluaran hormon gastrin pula dikawal oleh hormon somatostatin yang dirembeskan oleh sel D. Fungsi hormon somatostatin pula adalah menghalang rembesan hormon gastrin sel-sel G pada antrum. Jangkitan *H. pylori* menyebabkan kerosakkan tisu perut dan seterusnya membawa kerosakkan pada sel-sel D tisu perut. Ini mengakibatkan jumlah hormon somatostatin menjadi rendah dan boleh meningkatkan pengeluaran hormon gastrin daripada sel-sel G (Graham *et al.*, 1992). Ini menyebabkan jumlah asid hidroklorik di dalam perut meningkat dan seterusnya menyebabkan kerosakan pada tisu perut.

#### **1.3.11. Protein *cag* pulau kepatogenan (Protein *cag* PAI).**

Protein *cag* PAI merupakan faktor virulens yang penting dalam jangkitan *H. pylori*, di mana ia dikenalpasti sebagai antigen imun yang dominan, dan berada pada permukaan sel bakteria. Gen ini hanya hadir dalam 50-60% strain *H. pylori* (Tummuru *et al.*, 1993; Solca *et al.*, 2000). Protein *cag* PAI adalah antigen kriptik (128 kDa) yang imunodominan dihasilkan oleh *H. pylori*. Penghasilan protein *cag* PAI oleh strain *H. pylori* mempunyai kaitan yang tinggi dengan penyakit ulser peptik dan juga banyak lagi penyakit gastrik yang lain (Tummuru *et al.*, 1993; Censini *et al.*, 1996). Protein *cag* PAI mempunyai kesan patogenik yang tinggi pada manusia dan mempengaruhi penghasilan interleukin-8 dan menarik sel inflamasi untuk bertumpu ke kawasan jangkitan *H. pylori* (Covacci *et al.*, 1993).

#### **1.4. Epidemiologi Penularan *H. pylori***

Kajian beberapa dekad lalu menunjukkan bahawa jangkitan *H. pylori* adalah sekitar 50% daripada populasi dunia dan 80% adalah daripada negara-negara dunia ketiga. *H. pylori* boleh menyebabkan pelbagai penyakit peptik ulser dan merupakan faktor risiko karsinogenesis, tetapi terdapat faktor lain yang meningkatkan kadar jangkitan *H. pylori* di kalangan manusia iaitu faktor persekitaran, sosioekonomi, cara hidup dan tradisi serta tingkah laku manusia itu sendiri.

##### **1.4.1 Epidemiologi di Negara Maju**

Terdapat pelbagai kajian yang telah dilaporkan mengenai jangkitan *H. pylori* didalam sesuatu populasi dan kumpulan tertentu di dunia. Secara keseluruhan, prevalens *H. pylori* di kalangan kanak-kanak di negara maju adalah 10% sementara prevalens meningkat sebanyak 30%-40% pada kumpulan kanak-kanak yang berada di kawasan sosioekonomi yang rendah (Rowland *et al.*, 1997).

Di negara maju, didapati perolehan jangkitan *H. pylori* di kalangan orang dewasa dan kanak-kanak adalah kira-kira 1% hingga 3% per dekad (Kuipers *et al.*, 1993; Kumagai *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 1998) tetapi jangkitan *H. pylori* dijangka menurun di sesetengah bahagian dunia pada dekad yang akan datang. Sebagai contoh, di The Netherlands, sebanyak 40% populasi penduduk yang berusia 60-69 tahun adalah seropositif (Kuipers *et al.*, 1993) tetapi prevalens di kalangan orang dewasa adalah di bawah 10% sahaja (Blecker *et al.*, 1993). Penurunan prevalens jangkitan *H. pylori* dikalangan kedua-dua kumpulan ini dapat dikaitkan dengan perkembangan dan peningkatan taraf sosio-ekonomi dan kesihatan di The Netherlands. Dengan kajian yang telah dijalankan, dapat dikatakan bahawa seropositif bagi kohort ini berkemungkinan tidak lebih daripada 25% apabila populasi ini meningkat usia 70 tahun.

#### 1.4.2. Epidemiologi di Negara Sedang Membangun

Peningkatan prevalens *H. pylori* adalah semakin tinggi di negara-negara yang sedang membangun iaitu sebanyak 80%-100% (Rowland *et al.*, 1998). Seperti jangkitan bakteria lain pada kanak-kanak, *H. pylori* juga mudah menjangkiti kanak-kanak pra-sekolah dan berkait rapat dengan saiz keluarga, kelompok di dalam keluarga, status sosioekonomi dan pelajaran yang rendah serta risiko yang berkaitan dengan kepelbagaian jantina (Parsonnet, 1995; Rehnberg-Laiho *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 1998). Perubahan sosial ekonomi dan taraf hidup pada masa kini juga berkemungkinan dapat mengubah kadar jangkitan di kalangan kanak-kanak (Malaty *et al.*, 1996), di mana tahap kesihatan dan keadaan sosio-ekonomi semakin meningkat dan ini penting untuk sebarang perbandingan yang berkaitan dengan kesan kohort.

Di negara sedang membangun, prevalens jangkitan *H. pylori* adalah meningkat berkadar terus dengan peningkatan usia sesebuah populasi. Sebagai contohnya, di Gambia dimana prevalens dikalangan bayi yang berumur 3 bulan dan positif bagi ujian penafasan adalah sebanyak 19% dan meningkat sebanyak 84% apabila berusia 30 bulan (Thomas *et al.*, 1999). Tetapi terdapat data daripada kajian epidemiologi terdahulu yang menunjukkan bahawa ujian serologi kurang diberi perhatian untuk kanak-kanak kerana masalah untuk mendapatkan spesimen darah dimana kanak-kanak takut kepada jarum suntikan (Casswall *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999) dan juga terdapat kemungkinan bahawa antibodi bagi jangkitan *H. pylori* di kalangan orang dewasa tetap dapat dikesan walaupun bakteria tersebut telah dimansuh dengan rawatan antibiotik dalam jangkamasa yang panjang.

## **1.5. Mekanisme Penularan *H. pylori***

### **1.5.1. Takungan Air Ilmiah**

Terdapat kajian yang menunjukkan bahawa air memainkan peranan yang penting sebagai sumber kontaminasi bagi *H. pylori*. Dalam kes pengaktifan semula jangkitan, kokoid *H. pylori* yang kembali kepada bentuk spiral boleh menyebabkan kecederaan sel epitelium perumah yang hampir sama berbanding dengan yang disebabkan oleh spiral (Segal *et al.*, 1996). Sumber air merupakan takungan jangkitan *H. pylori* secara langsung kepada manusia (Wadstrom *et al.*, 1997).

Kajian yang dilakukan terhadap sumber air luaran di Peru dengan menggunakan kaedah PCR membuktikan bahawa terdapat beberapa sumber air utama boleh meningkatkan 12 kali risiko jangkitan *H. pylori* kepada populasi penduduk (Hulten *et al.*, 1996). Selain daripada itu, terdapat kajian lain dengan menggunakan teknik ujian pernafasan urea <sup>13</sup>C menunjukkan kaitan diantara sistem bekalan air minuman dan jangkitan *H. pylori* di kalangan kanak-kanak di Peru (Klein *et al.*, 1991).

Selain daripada itu, jangkitan *H. pylori* didapati tinggi di negara-negara mundur dan yang sedang membangun berbanding negara maju. Ini disebabkan oleh sistem pengairan yang tidak teratur dan tersusun, serta terdapat juga sumber air mentah yang telah dikontaminasi oleh *H. pylori*. Kadar bilangan pesakit peptik ulser boleh dikurangkan jika mereka memastikan air yang diminum dididihkan terlebih dahulu atau memastikan bekalan air harian bersih dan dari sumber yang terjamin (Klein *et al.*, 1991).

Kajian yang dijalankan di Peru dan Chile yang mencadangkan bahawa sumber air mentah adalah punca utama penyebaran jangkitan *H. pylori* kepada populasi

manusia tetapi ia tidak dapat dibuktikan dengan kajian yang telah dijalankan di Korea (Malaty *et al.*, 1996) yang tidak dapat menyokong hipotesis bahawa air dapat bertindak sebagai sumber penyebaran jangkitan *H. pylori* pada manusia.

### **1.5.2. Penyebaran Mulut Ke Mulut**

Kehadiran *H. pylori* di dalam mulut manusia telah dibuktikan oleh para penyelidik melalui kajian yang telah dijalankan. Kim *et al.* (2000) melaporkan bahawa *H. pylori* hadir pada plak gigi manusia. Manakala Li *et al.* (1996) dan Song *et al.* (2000) pula melaporkan prevalens jangkitan *H. pylori* yang tinggi dalam air liur dan plak gigi manusia. Semua laporan ini mencadangkan kehadiran *H. pylori* di dalam mulut manusia dan pemindahannya berlaku semasa makan dari bekas yang dicemari *H. pylori*, ciuman dan sebagainya.

Penyebaran dari mulut ke mulut juga berlaku pada kumpulan pekerja tertentu. Mereka yang terlibat dengan proses pembersihan gigi pesakit seperti jururawat pergigian mempunyai prevalens *H. pylori* yang lebih tinggi berbanding doktor gigi di klinik pergigian (Hazell *et al.*, 1987). Prevalens yang sama berlaku pada sesetengah pakar gastroenterologi dimana mungkin sesetengahnya tidak menitik berat mengenai kebersihan selepas melakukan proses endoskopi pada pesakit. Selain daripada itu, terdapat kemungkinan juga semasa proses endoskopi dilakukan, ada masa tertentu lubang pada endoskopi yang digunakan untuk mengambil sampel biopsi terlalu hampir dengan mulut pakar gastroenterologi. Ini secara tidak langsung meningkatkan jangkitan *H. pylori* di kalangan pakar gastroenterologi.

Tabiat makan beramai-ramai menggunakan penyepit bagi kaum Cina juga merupakan salah satu cara penyebaran *H. pylori* melalui mulut ke mulut (Leung *et al.*,

1999). Kajian oleh Chow *et al.* (1995) membuktikan bahawa prevalens jangkitan *H. pylori* di kalangan orang Cina yang menggunakan penyepit semasa makan adalah tinggi berbanding mereka yang tidak mengamalkannya.

### **1.5.3. Penyebaran Tinja Ke Mulut**

Thomas *et al.* (1993) berjaya memencilkan *H. pylori* daripada sembilan sampel tinja dari dua puluh orang kanak-kanak yang berumur kurang dua tahun. Ini membuktikan tinja boleh menjadi sumber jangkitan *H. pylori*.

Kajian di Chile membuktikan bahawa mereka yang tidak membasuh atau memasak sayuran dengan sempurna mudah dijangkiti oleh *H. pylori*. Ini disebabkan oleh para petani yang menggunakan sumber air yang tercemar dengan *H. pylori* untuk menyiram sayur-sayuran mereka (Hopkins *et al.*, 1993). Tetapi terdapat juga laporan yang melaporkan bahawa dengan mengambil buah-buahan, sayur-sayuran serta vitamin C dengan banyak dapat menghindari jangkitan daripada *H. pylori* (Brown *et al.*, 2001). Oleh sebab itu, untuk mengurangkan prevalens jangkitan *H. pylori*, kita sepatutnya sentiasa memastikan makanan yang diambil mesti dibasuh dan dimasak dengan sempurna.

### **1.5.4. Penyebaran Gastro Ke Mulut**

Terdapat laporan yang melaporkan bahawa kekerapan jangkitan di kalangan pekerja kesihatan adalah diantara 35% sehingga 83% bergantung kepada kategori-kategori tertentu contohnya seperti pakar endoskopi, doktor, jururawat, pembantu perubatan dan sebagainya (Pius *et al.*, 2000; Triantafillidis *et al.*, 2002; Mastromarino, 2005; 2006). Kajian oleh Rudi *et al.* (1997) di Jerman menyatakan bahawa tiada perkaitan secara langsung diantara kumpulan pekerja kesihatan dengan prevalens

jangkitan *H. pylori* di hospital dan disokong oleh kajian-kajian di negara lain (Mitchell *et al.*, 1989; Braden *et al.*, 1997). Penyebaran jangkitan *H. pylori* berkaitan dengan kajian epidemiologi dimana pesakit yang di jangkiti *H. pylori* boleh menularkan bakteria ini kepada pakar endoskopi melalui saliva atau jus gastrik semasa rawatan endoskopi (Pius *et al.*, 2000). Terdapat laporan yang menyatakan bahawa kecuaiian pakar dalam menjaga kebersihan tangan dengan tidak memakai sarung tangan semasa proses endoskopi telah menyebabkan jangkitan berlaku secara tidak sengaja (Sasidharan, 2002).

Selain daripada itu, pemakaian sarung tangan khusus juga tidak dapat melindungi pakar endoskopi daripada mendapat jangkitan kerana titisan jus gastrik pada peralatan endoskop mungkin memudahkan penyebaran berlaku. Bagi mengurangkan kemungkinan ini, pakar endoskopi hendaklah memakai sarung tangan dan penutup mulut semasa menjalankan proses endoskopi selain memastikan kebersihan peralatan sebelum dan selepas digunakan bagi mengurangkan kadar jangkitan *H. pylori* kepada pakar endoskopi (Pius *et al.*, 2000). Selain daripada itu, kajian di Greece menyatakan bahawa kumpulan jururawat merupakan kumpulan yang mempunyai prevalens jangkitan *H. pylori* lebih tinggi berbanding dengan kumpulan-kumpulan lain. Jururawat dipercayai mempunyai peningkatan yang tinggi dalam perubahan serologi berbanding dengan pekerja dibahagian pentadbiran dan pekerja teknikal selepas pemerhatian dilakukan selama 5 tahun (Mastromarino, 2006).

#### **1.5.5. Penyebaran Ibu Kepada Bayi**

Kajian juga ada dijalankan bagi memastikan jangkitan *H. pylori* berlaku secara langsung daripada seorang ibu kepada bayi semasa mengandung atau bersalin. Faktor risiko yang berkaitan dengan jangkitan *H. pylori* pada bayi dan kanak-kanak adalah

seperti tinggal di kawasan yang mempunyai sosioekonomi yang rendah, keadaan penduduk yang padat dan berkongsi katil dengan ahli keluarga yang lain (Vandenplas, 2000). Laktoferrin manusia dapat membantu pertumbuhan *H. pylori* secara *in vivo* dan kaitan antara *H. pylori* dengan laktoferrin juga sudah dikenalpasti melalui kajian yang telah dijalankan.

Bayi yang dilahirkan berkemungkinan adalah seropositif secara pasif apabila ibunya mempunyai antibodi IgG anti-*H. pylori* (Gold *et al.*, 1997; Rotherbacher *et al.*, 1999). Semasa di dalam kandungan, anti-*H. pylori* IgG dipindah dari ibu kepada bayi dalam tiga bulan pertama bayi kandungan. Kandungan antibodi tersebut menurun sedikit demi sedikit apabila mencecah usia kandungan enam bulan (Gold *et al.*, 1997). Antibodi IgA daripada ibu juga dipindahkan kepada bayi melalui susu ibu dan ini melindungi bayi dari jangkitan *H. pylori* (Thomas *et al.*, 1993). Walau bagaimanapun, sama ada penyusuan susu ibu dapat menyumbang kepada rendah atau tingginya prevalens jangkitan *H. pylori* pada bayi masih tidak dapat dipastikan (Best *et al.*, 1994; Stromqvist *et al.*, 1995; Gold *et al.*, 1997).

Terdapat kajian yang melaporkan bahawa pada umur 14 bulan, sebanyak 7.5% bayi di kalangan 62% populasi orang dewasa yang seropositif mempunyai jangkitan *H. pylori* dan mempunyai peningkatan antibodi IgM dan IgG tetapi akan hilang dengan cepat apabila usia meningkat (Crabtree *et al.*, 1991; Bleker *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1997). Di Belgium pula, terdapat kurang daripada 1% bayi yang seropositif apabila mencecah usia 1 tahun tetapi peratusan seropositif di kalangan dewasa muda adalah sebanyak 30% (Blecker *et al.*, 1994) manakala di Finland pula, 4% kanak-kanak di bawah usia kurang daripada 7 tahun adalah seropositif (Rehnberg-Laiho *et al.*, 1998). Terdapat bukti di sesetengah negara, kanak-kanak yang berumur kurang daripada dua

tahun mempunyai satu atau campuran strain *H. pylori* yang disyaki dipindahkan oleh ibu kepada bayi.

## **1.6. Diagnosis Jangkitan *H. pylori***

Diagnosis jangkitan *H. pylori* boleh dijalankan secara invasif atau tidak invasif.

### **1.6.1. Ujian invasif**

#### **1.6.1.1 Ujian Mikroskopi**

*H. pylori* merupakan bakteria yang berbentuk spiral, dan oleh sebab itu pengecaman mudah dilakukan menggunakan mikroskop berdasarkan morfologi itu. Kaedah ini memerlukan sampel biopsi yang diambil pada bahagian antrum atau korpus perut pesakit semasa menjalani endoskopi. Pengesanan *H. pylori* boleh dilakukan dengan menggunakan mikroskop beza fasa, mikroskop cahaya dan mikroskop pendarflour berdasarkan teknik pewarnaan yang dilakukan. Pengesanan *H. pylori* juga dapat dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Gram, sitologi sentuhan dan Histopatologi.

Kaedah pewarnaan Gram merupakan kaedah yang paling digemari oleh penyelidik kerana ia mudah, cepat dan sensitif berbanding dengan kedua-dua kaedah lain seperti disebut diatas. Kaedah ini menggunakan coretan kering bakteria pada sisipan kaca dan diwarnakan mengikut kaedah pewarnaan Gram, serta dilihat dibawah mikroskop cahaya. Kehadiran *H. pylori* dapat dikesan kerana selnya Gram-negatif dan berbentuk spiral. Jika lebih daripada satu biopsi digunakan sensitiviti melebihi 90% untuk mengesan kehadiran *H. pylori* dapat dicapai (Parsonnet *et al.*, 1988).

Teknik mikroskopi tidak boleh digunakan sebagai piawai emas di dalam pengesanan kehadiran *H. pylori* tetapi ia dapat digunakan apabila disertai oleh kaedah

lain seperti ujian urease atau pengkulturan (Weiss *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1997; Monteiro *et al.*, 1997; Wesblom & Bhatt, 1999).

Selain daripada itu, ujian histotogi Giemsa atau pewarnaan Warthin-Starry yang merupakan ujian pewarnaan spesimen biopsi gastrik juga digunakan tetapi kadang kala ujian ini hanya dijalankan untuk mendiagnosis penyakit sahaja, sama ada pesakit menghadapi gastritis atau tidak.

### **1.6.1.2 Ujian Pengkulturan**

Pengkulturan *H. pylori* juga mempunyai nilai spesifisiti diagnosis yang tinggi sehingga 100% (Uyub *et al.*, 1994) dan sering digunakan sebagai piawai emas (Harries *et al.*, 1992; van der Hulst *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1999) untuk mengesan kehadiran *H. pylori*. Dengan menggunakan pengkulturan, sensitiviti untuk mengesan *H. pylori* adalah lebih daripada 95% dan hampir sama dengan kaedah pewarnaan (Sasidharan, 2002).

Selepas biopsi diambil daripada pesakit, ia dimasukkan ke dalam medium pengangkutan Stuart (Oxoid, UK) untuk memastikan bakteria ini hidup dan dapat dikulturkan di makmal untuk kajian seterusnya. Terdapat pelbagai jenis agar yang digunakan sebagai medium pengkulturan *H. pylori* seperti agar eugon yang ditambah 5 - 10% (i/i) darah manusia (Morshed *et al.*, 1994). Sampel biopsi ini biasanya dicoretkan pada permukaan agar pertumbuhan tertentu (Piccolomini *et al.*, 1997). Medium ini kemudiannya dieramkan pada suhu 37°C dalam keadaan atmosfera udara + 10% CO<sub>2</sub> dan 100% kelembapan. Selepas empat hingga tujuh hari pengeraman, kehadiran *H. pylori* dapat dikesan dengan kemunculan koloni-koloni kecil yang lutsinar. Bagi

pengesanan kehadiran *H. pylori*, ujian pewarnaan Gram dan ujian urease perlu dijalankan.

van Zwet *et al.* (1993) melaporkan bahawa kaedah pengkulturan merupakan kaedah yang sensitif dalam mengesan kehadiran *H. pylori*. Selain daripada itu, mereka juga menyatakan bahawa kedudukan makmal yang berhampiran dengan jabatan endoskopi membolehkan spesimen biopsi dapat dikulturkan kurang daripada 10 minit selepas prosedur endoskopi dijalankan. Tetapi terdapat kajian yang dijalankan oleh Clayton *et al.* (1992) melaporkan bahawa tiada yang mengesahkan perkaitan diantara masa endoskopi dan pengkulturan *H. pylori* dilakukan. Kedua-dua kajian ini melaporkan bahawa pengkulturan spesimen biopsi lebih berkesan jika tiada penangguhan dilakukan semasa pemindahan sampel dan pengkulturan menjadi sensitif seperti kaedah PCR dalam pengesanan *H. pylori* (van Zwet *et al.*, 1993).

Pengkulturan *H. pylori* adalah sukar dilakukan dan memerlukan kemahiran tertentu selain memerlukan biopsi yang diperolehi dari bahagian antrum perut pesakit (Goodwin *et al.*, 1985; Goosen *et al.*, 2002) dan juga memerlukan ujian lain untuk pengesanan kehadirannya. Pengkulturan membolehkan kita memencilkan *H. pylori* daripada biopsi pesakit tetapi ia boleh memberikan keputusan negatif palsu. Kolonisasi *H. pylori* pada kawasan jangkitan adalah secara rawak dan ini menyebabkan pakar gastroenterologi secara tidak sengaja mengambil biopsi dari kawasan bukan jangkitan. Walaupun begitu, kaedah pengkulturan didapati mengambil tempoh pengeraman yang panjang dan bilangan koloni *H. pylori* yang diperolehi tidak dapat dijangkakan (Bickley *et al.*, 1993). Selain itu keputusan negatif palsu juga mungkin disebabkan oleh pertumbuhan *H. pylori* yang sangat perlahan iaitu melebihi masa maksimum iaitu tujuh hari (van der Hulst *et al.*, 1996).

### 1.6.1.3 Ujian Urease Segera

Vandenplas (2000) melaporkan bahawa biopsi gastrik yang mengandungi *H. pylori* menyebabkan perubahan warna kaldu urea daripada oren kepada merah jambu. Perubahan ini terhasil kerana terdapatnya penunjuk fenol merah didalam medium dan ia berkaitan dengan peningkatan nilai pH yang disebabkan oleh hidrolisis urea oleh enzim urease. Terdapat empat jenis ujian urease segera yang boleh didapatkan secara komersial iaitu ujian-CLO (Delta West Ltd, Bentley, Australia), Jatrox (RÖHM Pharma GMBH, Weiterstadt, Germany), Hpfast (GI Supply, Philadelphia, USA) dan PyloriTek (Serin Research Corporation, Elkhart, USA). Disamping ujian komersial, terdapat banyak hospital menyediakan ujian urease sendiri kerana ia amat menjimatkan kos.

Semua ujian urease komersial mempunyai nilai spesifisiti dan sensitiviti yang tinggi untuk mengesan *H. pylori* tetapi nilai tersebut berbeza mengikut jenis ujian (Laine *et al.*, 1996). Labenz *et al.* (1996) melaporkan bahawa biopsi yang diambil di bahagian perut yang berbeza seperti di bahagian antrum dan korpus juga memberikan nilai yang pelbagai, tetapi kombinasi daripada kedua-dua sampel boleh meningkatkan sensitiviti sebanyak 4.3%. Kaedah ini merupakan kaedah yang sesuai untuk mengesan jangkitan *H. pylori* di kalangan pesakit dewasa kerana ia dapat memberikan nilai sensitiviti yang tinggi tetapi memberikan keputusan negatif palsu apabila diuji pada kanak-kanak. Keputusan negatif palsu ini mungkin disebabkan oleh bilangan sel bakteria yang sedikit ( $<10^4$ ) (Drumm *et al.*, 1987).

*H. pylori* merupakan bakteria yang mempunyai aktiviti enzim urease paling tinggi berbanding bakteria penghasil enzim urease yang lain (Neiterant *et al.*, 1991). Makmal penyelidikan biasanya menggunakan kaldu urea Christensen (BBL, USA) untuk menjalankan ujian urease segera. Ini kerana kaldu ini dapat memberikan spesifisiti

100% dan nilai sensitiviti 85% jika dibandingkan dengan kaedah pewarnaan Gram, ujian histologi dan ujian pengkulturan (McNulty *et al.*, 1989). Ujian urease segera ini mudah, murah serta dapat memberikan keputusan dengan cepat kerana hanya memasukkan sampel biopsi ke dalam kaldu urea Christensen dan tunggu sehingga perubahan warna berlaku. Tempoh masa bagi perubahan warna berlaku bergantung pada bilangan sel *H. pylori* yang hadir pada tisu biopsi tersebut. Keputusan positif dapat dikesan seawal-awalnya kurang daripada satu minit dan sehingga setengah jam. Di dalam ujian urease segera ini, keputusan ujian tidak terganggu dengan kehadiran bakteria lain yang urease positif (Alpert *et al.*, 1989). Ini kerana *H. pylori* merupakan bakteria mikroaerofili yang mempunyai keupayaan yang tinggi untuk menghidrolisis kaldu urea kepada karbonat dan ammonia dengan kehadiran urease padanya.

#### **1.6.1.4 Kaedah PCR (sampel biopsi)**

Kaedah biologi molekul menggunakan PCR dapat mengesahkan kehadiran jujukan DNA yang spesifik (capjari genom) untuk *H. pylori* dalam biopsi dan sampel lain (Wesblom, 1997; Oksanen *et al.*, 1999). Teknik PCR juga boleh menentukan bilangan sel bakteria di dalam biopsi (Furuta *et al.*, 1996; Oksanen *et al.*, 1999). Kaedah PCR mengesan kehadiran *H. pylori* di dalam biopsi dengan menggunakan primer untuk gen yang spesifik bagi *H. pylori* seperti gen yang mengkodkan enzim urease dan gen 16S rRNA (Valentine *et al.*, 1991; Hammer *et al.*, 1992; Engstrand *et al.*, 1992). Kaedah PCR mempunyai sensitiviti 94% dan spesifisiti 100% untuk mengesan *H. pylori* (Weiss *et al.*, 1994). Kaedah ini juga cepat di dalam mengesan kehadiran *H. pylori* tanpa perlu melakukan pengkulturan. Pengkulturan menjadi rumit jika *H. pylori* mati semasa di dalam medium pemindahan atau sel berubah morfologi menjadi kokoid menyebabkan keputusan negatif-palsu serta memakan masa yang lama. *H. pylori* yang tidak dapat dikesan dengan pengkulturan juga dapat dikesan dengan menggunakan kaedah PCR.