

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

40861

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ÇOCUKLARDA HELICOBACTER PYLORI'YE KARŞI OLUŞAN
IgG ANTİKORLARININ SEROLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meral TELATAR

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 03.06.1994

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 07.07.1994

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Recep BİNGÖL

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Murat ERTÜRK

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Ahmet AKGÜN

Enstitü Müdürü : Prof.Dr.Etem ALHAN

Recep Bingöl
Murat Ertürk
Ahmet Akgün
Etem Alhan

HAZİRAN - 1994

TRABZON

Ö N S Ö Z

Yüksek Lisansım boyunca bana yol gösteren Sayın Hocam Prof.Dr.Recep BİNGÖL'e, öğretmenlik mesleğimle birlikte bilimsel çalışmalarımı sürdürmemde bana her an destek olan eşim Yüksek Mühendis H.Kadir TELATAR'a, aileme, Anabilim Dalında uyum içinde çalıştığım arkadaşlara teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sıra No:

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sistematik	4
2.3. Mikrobiyoloji	5
2.4. Teşhis	6
2.4.1. Boyama Teknikleri	6
2.4.2. Kültür Ortamları	7
2.4.3. Hızlı Üreaz Testleri	8
2.4.4. Seroloji	9
2.5. Helicobacter Pylori'nin Doğal Rezer- vuarı ve Yerleşimi	11
2.6. Helicobacter Pylori'ye Bağlı Enfeksi- yonlarda Patogenez	11
2.6.1. Gastrit	13
2.6.2. Duodenal Ülser	13
2.7. Tedavi	13
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Serum örnekleri	15

3.1.2. Biyopsi Örnekleri	15
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri	15
3.1.4. Elektrikle Çalışan Araçlar	15
3.1.5. Madeni Araçlar	16
3.1.6. Cam malzemeler	16
3.1.7. Kimyasal Maddeler	16
3.2. Metod	17
3.2.1. Endoskopik inceleme	17
3.2.2. Histopatolojik inceleme	17
3.2.3. Mikrobiyolojik inceleme	17
3.2.4. Serolojik inceleme	19
4. BULGULAR	21
5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	30
7. ÖZET	31
8. SUMMARY	32
9. KAYNAKLAR	33
EK-1	43

1. GİRİŞ VE AMAÇ

20. yüzyılın başlarından itibaren araştırmacılar tarafından mide mukozasında kıvrık bakteriler belirlenmiş fakat bu kıvrık bakterilerin mide mukozaya biyopsilerinde izole edilip tanımlanmaları 1980'li yılları bulmuştur. 1983 yılında Marshall ve Warren yaptıkları çalışmalarda mide mukozaya biyopsilerinde kıvrık bakterileri göstermişler ve izole etmişlerdir (1,2). Bu bakteriler önceleri Campylobacter Like Organism (CLO), daha sonra Campylobacter pyloridis olarak adlandırılmıştır. Zamanla Campylobacter pylori olarak düzeltilen adlandırma yeni araştırmalarda Helicobacter pylori olarak tanımlanmıştır (3).

1983'de Helicobacter pylori'nin teşhis edilmesinden beri, mide antrum hücrelerinde zarara neden olduğu ve inflamasyonda rol oynadığı bilinmektedir (2). Mide antrum hücrelerinde hızla biriken Helicobacter pylori kronik gastrit ve duodenal ülserli hastalarda yüksek yayılma göstermektedir. Ayrıca Helicobacter pylori gastrit ilişkisi idiyopatik kronik duodenal ülserli hastalarda gösterilmiştir (3).

Peptik ülser hastalığının etyopatogenesinde ve kronik gastritte bakteriyel infeksiyonun rolü tartışma halindedir. Bu problem ilaçla tedavide özellikle önemlidir. Çünkü ilaç, gastrik salgıda azalmaya neden olurken bakterinin fazla büyümesine imkân vermektedir. Bu nedenle alkali özelliğinden dolayı birçok mikroorganizmanın yetişmesinde inhibitör etkiye sahip olan bizmuth tuzları uzun yıllar peptik ülser tedavisinde kullanılmıştır (2).

Kronik gastrit ve duodenal ülserli hastaların aile fertlerinde yapılan çalışmalarda seroprevalans yüksek olarak bulunmuştur (2).

Helicobacter pylori'nin peptik hastalıklardaki rolü yapılan birçok çalışma sonucu büyük oranda belirlenmiştir. Fakat izolasyon oranları, yaş ve cinsiyet ilişkileri, bağışıklık konusu araştırmalarda farklı sonuçlar vermektedir. Bölgemizde peptik hastalık oranı yüksek olduğu için *Helicobacter pylori*'nin çocuklarda görülme sıklığı ve kronik gastritle olan ilişkisini belirleyebilmek amacı ile bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada çocukların *Helicobacter pylori* ile ne zaman, hangi yaş döneminde karşılaştığını belirlemek de amaçlanmıştır.

Çocuklarda endoskopli yöntemi hemen hemen uygulanamayan bir yöntemdir. *Helicobacter pylori*'nin çocuklarda görülme sıklığını belirlemede serolojik yöntemlerin uygulanması düşünülmüştür. Çalışmada *Helicobacter pylori*'ye karşı oluşan IgG antikorlarının Indirect Immunoflourescence Assay ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca serolojinin tanıdaki önemide araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

insan midesinde spiral mikroorganizmaların varlığı uzun yıllardır bilinmektedir (4). ilk olarak Krienitz 1906 yılında karsinomalı midelerde spiroketleri göstermiştir (5). Daha sonra Lüger ve Neuberger bu mikroorganizmaların normal midelerde de seyrek olarak bulunabileceğini bildirmişlerdir (6). Doenges 1938'de yaptığı bir çalışmada 242 rutin otopside aldığı mide örneklerinin % 43'ünde spiroket bulunduğunu rapor etmiştir, ancak bu mikroorganizmaların varlığı ile gastrik hastalıklar arasında bir ilişki kuramamıştır(7).

Freedberg ve Barron karsinomalı 35 olgunun mide mukoza örneklerinde spiroketleri göstermişlerdir. Bu çalışmada spiroket prevalansını duodenal ülserlilerde % 14.2, benign veya malign gastrik ülserlilerde % 52.3 olarak bildirmişlerdir. Palmer 1954 yılında 1000 olgudan kör aspirasyonla biyopsi örneği almış, ancak yukarıdaki prevalansı gösterememiştir(8). Palmer mide mukozasının yutma ile veya öldükten sonra bu mikroorganizma ile kontamine olduğuna karar vermiştir (9).

Steer ve Colin Jones gastrik ülserli hastaların mide mukozasında Gram negatif bir bakterinin varlığını % 80 oranında bulmuşlardır (10). Steer 1978'de elektron mikroskopla yaptığı çalışmada preplorik bölgede ve duodenal bulbusun gastrik metaplazı gösterdiği bölgelerde spiral yapılı bol miktarda mikroorganizma görmüş ve bu mikroorganizmanın intestinal tip epitelyal hücrelerle ilgisi bulunmadığını belirtmiştir (11).

Warren ve Marshall aktif gastritli ve duodenal ülserli hastaların mide antrumunda « S » şeklinde basiller görmüşlerdir (12). Marshall ve arkadaşları bu bakteriyi 1983 yılında izole etmeyi başarmışlardır (13).

ilk zamanlar bu bakteri *Campylobacter pyloridis*, daha sonra *Campylobacter pylori* ve son olarak *Helicobacter pylori* olarak adlandırılmıştır (3). Marshall ve Warren *Helicobacter pylori*'nin gastritin tek nedeni olmadığını ancak gastritin oluşmasında yüksek bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Bundan sonra dünyanın her yerinde değişik yaş gruplarında *Helicobacter pylori* ile ilgili çalışmalar başlamıştır (12).

2.2. Sistematik

Helicobacter pylori ilk olarak spiral yapısı, fırlama hareketi ve üreme şartlarından dolayı *Campylobacter Like Organism* olarak tanımlanmıştır. *Helicobacter pylori* morfolojik olarak küçük, spor oluşturmayan, 4-6 adet unipolar flagella içeren, Gram negatif bir bakteridir (11).

Helicobacter pylori'yi *Campylobacter* cinslerinden ayıran özellikleri şöyle sıralayabiliriz:

1. *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* cinslerinden farklı olarak hayvan cinslerinin midelerinde uç kısmının yuvarlak olması ile tanınır (14).

2. *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* cinslerinden farklı olarak düzgün görünüme ve tek yağ asidi kompozisyonuna sahiptir (14).

3. *Helicobacter pylori*'nin major yağ asitleri tetradekanoik asit ve cis 9-10 metilen oktadekanoik asittir. *Campylobacter* cinslerinde heksadekanoik, oktadekanoik, heksadekanoik asitler daha fazladır (14).

4. Romaniuk ve arkadaşları *Helicobacter pylori*'nin 16 s r-RNA'larının *Campylobacter* cinslerinin r-RNA'larından farklı olduğunu görmüşlerdir (15).

5. Von Wulfen DNA hibridizasyon yöntemi ile *Helicobacter pylori* DNA'sının *Campylobacter* cinslerinden farklı olduğunu göstermiştir (16).

6. *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* cinslerinden farklı olarak tek SDS PAGE profili gösterir. Antijenik yapılarında yakın bir ilişki yoktur (17).

7. *Helicobacter pylori* susları ile diğer *Campylobacter* cinsleri arasında çapraz bir reaksiyon vardır ve bu çapraz reaksiyon flagel proteinleri dışında görülmemiştir (17).

2.3. Mikrobiyoloji

Helicobacter pylori Gram-negatif, kıvrık, çomak şeklinde, hareketli bir bakteridir. 3 m. uzunluğunda, 0,5-1 m. genişliğindedir. *Helicobacter pylori*'nin membran örtüsü ile çevrelenmiş 4-6 adet flagellası vardır (14).

Bu organizma üremek için hemin, nişasta, serum, odun kömürü veya kana ihtiyaç duyar. Organizma için en iyi üreme koşulu nemli çukolata veya kanlı agarda, 37°C'de, mikro-aerofilik koşullarda gerçekleşir. Bu ortamda 3-5 günde, 0,5-1 mm. çapında küçük koloniler oluşturur (13).

Organizma katalaz ve oksidaz oluşturur, glikozu fermente etmez, nitratı redüklemez, zayıf H₂S oluşturur, hippurati hidroliz etmez, Ureaz aktivitesi çok yüksektir (22, 23). Ureaz aktivitesinin yüksek olması özelliği gastrik biyopsi örneklerinde hızlı tanı testi olarak kullanılabilir (21). *Helicobacter pylori* konağın mukus - bikarbonat bariyerini parçalayabilecek bir musinolitik proteaz salgılamaktadır (25, 36). *Helicobacter pylori* asit ortama hassastır ve

gastrik epitele afinitesi yüksektir (27, 28). Kültürden elde edilen mikroskopik görünüm in-vivo görünümünden farklıdır. Gram boyamada « S » şeklinde bakteri görüntüsü azdır. Yeni kültürlerde genellikle « U » veya «halka» şeklinde görülmürler (20).

2.4. Teşhis

2.4.1. Boyama Teknikleri

Helicobacter pylori tanısı koymakta birçok boya yöntemi kullanılmıştır.

1. Freedberg ve Barron ilk olarak histokimyasal boyalar kullanarak 1940 yılında *Helicobacter pylori*'yi göstermişlerdir (8).

2. Gram boyama basit, kolay uygulanabilir bir boyama şeklidir. Biyopsi örneği steril bir lām üzerine sürülmek suretiyle preparat hazırlanarak boyanır. *Helicobacter pylori* « S » şeklinde ya da «kıvrık» Gram negatif basil şeklinde görülür.

3. *Helicobacter pylori*'nin tanımlanmasında hematoksilen eosin boyası, gastritin histopatolojik sonucunu vermede önemlidir (29).

4. Marshall ve Warren 1983'de bakteriyi ilk izolasyonlarından sonra, *Helicobacter pylori* ile peptikülser arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalarında Warthin-Starry gümüşleme boyasını, Gram boyama ve kültür ile birlikte kullanmışlardır. Bu boyama gümüş nitrat ve hidrokinon solüsyonlarını içermektedir. Spiroketlerin boyanmasında kullanılmıştır(11).

5. Ayrıca akridin, oranj, giemsa gibi birçok tekniklerde boyamada kullanılmaktadır (30).

Helicobacter pylori izole edilmiş vakalarda, Gram boyama, kültür ve hematoksilen-eozin arasında % 92 pozitif ilişki saptanmıştır (31). McNulty ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda hematoksilen-eozinle boyanmış 14 biyopsi örneğinde organizma görülmemiş, 3'ünde *Helicobacter pylori* kültürde üremiş, Gram boyamada 1 tanesinde *Helicobacter pylori* görülmüştür (32).

Gram boya, kültür veya Warthin-Starry ile tek başına yapılan araştırmalarda % 18'lik bir pozitiflik sağlanmış, Gram veya gümüşleme ile negatif olan örneklerin hiçbiri kültürde üreme göstermemiştir. Hematoksilen-eozin sadece histolojik gastritin varlığını göstermek için kullanılır. Peptik hastalıklarla *Helicobacter pylori* arasındaki ilişkiyi anlamak için kültür temel ilkedir.

2.4.2. Kültür Ortamları

Helicobacter pylori gastrik biyopsilerden elde edilen, mikroaerofilik koşullarda nazik üreyen bir bakteridir. İlk izolasyon için minimum gereksinimleri % 7 at kanı ilâve edilmiş Brain-Heart infüzyon agarla karşılanabilmektedir (13). Besiyeri olarak Brucella agar base, GC agar base, Müller-Hinton agar veya Trypticase soy agar kullanılabilir. Bunlara % 1 hemoglobin, % 5 at serumu veya % 1 mısır nişastası ilâve edilerek kullanılır (33).

Selektif Skirrow besiyeri (34, 35), modifiye Thayer Marthin besiyeri (36) ve Querioz ve arkadaşları tarafından tanımlanan indikatör besiyeri *Helicobacter pylori* için kullanılabilir (37).

Helicobacter pylori'nin izolasyonunda atmosferik koşullar çok önemlidir (38, 39, 40, 41). % 5 O₂, % 10 CO₂, % 85 N₂ karışımı kullanılabilir. Nem % 98 olmalıdır. Optimal ısı 35-37°C'dir.

Kültür için endoskopiyle elde edilen gastrik mukoza örnekleri kullanılır. Çünkü *Helicobacter pylori* gastrik mukoza ile ilişkilidir.

Helicobacter pylori'nin izolasyonunda katı besiyeri kullanılacaksa gastrik biyopsi örneği camdoku parçalayıcısı ile küçük parçalara parçalanmalıdır (Uniform ekim için) (43).

Marshall original çalışmasında çukolata agar kullanmıştır (42). Selektif Skirrow besiyerinde bulunan Vacomycin 10 mg/1, Trimethoprim 5 mg/1, Polymycin B 2500 UI/1 üst respiratuar ve üst gastrointestinal traktustaki florayı suprese etmektedir. *Helicobacter pylori*'ye olumsuz etkisi yoktur. Bu besiyeri *Helicobacter pylori*'nin kültürde üreme şansını artırır (43).

Helicobacter pylori'nin ürememesinin nedenleri arasında şunları sıralayabiliriz:

1. Endoskopiye hazırlık sırasında gargara olarak kullanılan Lignocainin yutulması.
2. Daha önce antibiyotik veya bizmuth bileşikleri alınması.
3. Biyopsinin düzgün alınmaması.
4. Mikrobiyolojik tekniğin yetersiz oluşu.
5. Yöntemlerin usulüne uygun yapılamaması.

2.4.3. Hızlı Üreaz Testleri

Helicobacter pylori tarafından bol miktarda üreaz oluşturulmaktadır. Bu üreaz, üreyi amonyum ve bikarbonata indirgeyip ortamın pH'sini yükseltmektedir. Bu olay bir pH indikatörü sayesinde görülmektedir.

1946 yılında geliştirilen Christensen agar, mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen zayıf, fakültatif üreaz aktivitesini gösterebilmektedir (44).

McNulty ve Wise, *Helicobacter pylori* için ilk hızlı Üreaz testini tanımlamışlardır. Bu araştırmacılar 61 olgudan aldıkları gastrik mukoza örneklerini 0,5 ml'lik % 2 Christensen Üreaz broth içeren tüplere koyarak inkübe etmişlerdir. Bu hızlı Üreaz testin sonuçlarını Gram boyama ve kültürle karşılaştırmışlar. Gram boyama ve kültürde pozitif olanlarda % 98 pozitif, negatif olanlarda % 88 negatif sonuç elde edilmiştir (45).

Marshall tarafından geliştirilen modifiye Chistensen agar içeren *Campylobacter Like Organism* test (CLO-test) ticari olarak satılmaktadır. Bu gel tablet, diğer Üreaz oluşturabilen mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için bakteriyostatik bir ajan içermektedir. Marshall ve arkadaşları antral biyopsi örnekleri aldıkları 141 hastada CLO-test giemsa boyama ve histolojik olarak pozitif olan örneklerde % 100 pozitif, negatif olan örneklerde % 98 negatif sonuç vermiştir (46).

Helicobacter pylori glikozu fermente etmez, peptonu kullanır. Üreaz oluşturan diğer mikroorganizmalar hem peptona hem de glikoza ihtiyaç duyarlar. Bu özellik yeni geliştirilen hızlı Üreaz testin spesifisitesini arttırmaktadır.

2.4.4. Seroloji

Helicobacter pylori gastrik epitelyuma emsalsiz yeteneği ile kolonize olur. İnsan vücudunun diğer dokuları ile birleşmiş olarak bulunması nadirdir. Birçok kompleks ortamda mikroaerofilik koşullar altında insan gastrik biyopsi örneklerinden *Helicobacter pylori* için kültür metotları geliştirilmiştir (1).

Helicobacter pylori'nin direkt teşhisi endoskopi ile gastrik mukozadan elde edilen biyopsi örneklerinden yapılır. Endoskopi invaziv bir yöntemdir ve örneklerin yanlış olması, düzensiz olması yanlış sonuçlar verebilir. Ayrıca kli-

nik örneklerden *Helicobacter pylori*'yi maksimum düzeyde geri almak için kültürde gecikmesiz biyopsi örneği tercih edilir. Fakat gastroenteroloji kliniği ve diagnostik laboratuvar arasında kısa bir fiziksel mesafe mutlaka vardır. Bu farklı koşulları değerlendirmede küçük bir motivasyondur (1). Bu nedenle *Helicobacter pylori*'nin teşhisinde serolojik testler geliştirilmiştir. Serolojik teşhiste;

- Bakteriyel Aglütinasyon
- Pasif Hemaglütinasyon
- indirect immunofluorescence Assay
- Complement Fixation
- Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- Flow Microsphere - Immunofluorescence Assay

yöntemleri kullanmaktadır.

Bu yöntemler içinde en çok kullanılanı ELISA'dır (47, 48). Çünkü ELISA çabuk uygulanabilen ucuz bir yöntemdir. Ayrıca antikorun tipini (sınıf ve spesifikliğini) belirlemeye imkân verir. Fakat ELISA standart değildir. Çünkü çalışmalarında farklı antijen preparatları kullanılır, bu nedenle çalışmadan çalışmaya sonuçlar değişir. Bu aksaklığı gidermek için United States ve United Kingdom'da gastrik biyopsilerin kültür ve histolojilerden elde edilen sonuçlar «altın standart» gibi kullanılarak farklı ELISA'ların değerlendirilmesi sağlanır (47).

IgG antikorlarının keşfi için Linda M. Best ve arkadaşları tarafından FMIA (Flow Microsphere Immunofluorescence Assay) geliştirilmiştir. Bu yöntem için bir multicomponent antijen hazırlanmıştır. *Helicobacter pylori* pozitif olan 28 hastadan ve *Helicobacter pylori* negatif olan 27 hastadan alınan serum örnekleri FMIA ve ELISA ile test edilmiştir. FMIA ve ELISA'nın her ikisinde de % 100 sensitif ve % 89 spesifik sonuç elde edilmiştir (48).

FMIA, *Helicobacter pylori*'nin histolojisi ve kültürü ile oldukça ilişkili sonuçlar vermiştir. FMIA pahalı olmayan ve hızlı gelişen bir yöntemdir. Bu yöntem McHugh ve diğerleri tarafından da kullanılmıştır (48).

Helicobacter pylori'nin keşfi için geliştirilen IFA test (Indirect Immunofluorescence) diğer standart metodlarla karşılaştırılmıştır. *Helicobacter pylori* kolonizasyonu % 68 (226 hastadan 154'ü), Gramboyama % 78, IFA % 96, üreaz test % 60, kültürasyon % 55 oranında belirlenmiştir (49). Çalışma popülasyonunun 191 hasta örneğinden alınan serumların % 73'ü pozitif sınırın üzerinde okunan bir absorbans vermiştir. Bu değer optical density olarak 0,35'in üzerinde göstermiştir. *Helicobacter pylori* belirlenmiş 132 serum örneğinde % 97, *Helicobacter pylori* belirlenemeyen 12 serum örneğinde % 12 yükselmiş antan spesifik antikor düzeyi belirlenmiştir (49).

2.5. *Helicobacter pylori*'nin Doğal Rezervuarı ve Yerleşimi

Helicobacter pylori, insan midesinde lokalize olmaktadır. Yapılan çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin feces, kan, oral kavite gibi yerlerde üretilmesinin mümkün olmadığını göstermiştir (50, 51).

Midede, *Helicobacter pylori*'nin en sık yerleştiği bölgeler fundus, korpus ve antrumdaki mukus tabakasının alt kısımlarıdır (27, 28).

Mukus içerisinde son derece hareketli olan *Helicobacter pylori*, bu hareketi uzun aksını mukoprotein fibrillere paralel hale getirerek yapmaktadır (22).

2.6. Helicobacter pylori'ye Bağlı Enfeksiyonlarda Patogenez

Helicobacter pylori ile gastrit arasında yakın bir ilişki vardır. Helicobacter pylori enfeksiyonlarının başlangıcında akut bir dönem vardır, daha sonra enfeksiyon kronik şekilde devam eder (52).

Helicobacter pylori'nin virulans faktörlerinin neler olduğu bilinmemekle beraber, muhtemel virulans faktörlerinin karakteristikleri şöyle sıralanabilir:

a) Gastrik asiditenin öldürücü etkisinden kaçmak ve hareketlilik,

b) Gastrik hücre tiplerini ayırt edebilmek ve bunlara yapışabilmek,

c) Konağın immun cevabından kurtulabilmek.

Helicobacter pylori'nin spiral yapısı ve fırlama hareketi bu virulans faktörlerini açıklayabilmektedir (53). Ayrıca Helicobacter pylori'nin fibrilli yüzeyel yapısı ve indirgeyici enzimler de virulans faktörlerini açıklayabilmektedir. Bütün bunlar beslenmeyi kolaylaştırıp, hareketi ve yapışmayı sağlamaktadır.

Visköz ortamda oldukça hareketli olan Helicobacter pylori, aktif hareketi sayesinde mukus tabakanın içine hızla penetre olur (53). Bu hareketlilik spiral yapı ve unipolar flagelle ile gerçekleşir.

Üreaz aktivitesi, Helicobacter pylori'de çok yüksektir (22, 23).

Helicobacter pylori'nin indirgeyici enzimleri sayesinde konak hücrenin glycocalyse komponentlerinden düşük mole-

küller ağırlıklı maddeler oluşturarak bunları besin kaynağı olarak kullanabilmektedir. Slomany ve arkadaşları *Helicobacter pylori*'nin proteolitik aktivitesini göstermişlerdir(26).

2.6.1. Gastrit

Kronik non-spesifik gastritte *Helicobacter pylori*'nin patojenik rolü belirgindir. Bu belirginlik aşağıdaki faktörlerle gösterilmektedir:

a) Kronik non-spesifik gastritli kişilerde *Helicobacter pylori* prevalansı % 70-100 arasındadır (54, 55, 56).

b) iki kişi üzerinde yapılan deneyde, bunlara *Helicobacter pylori* iğirilmiş ve sonuçta bunlarda akut non-spesifik gastrit olduğu görülmüştür (54, 57).

c) Kronik aktif non-spesifik gastrit antimikrobiale ajanlarla yapılan tedavi ile gerilemiştir (58, 59).

d) *Helicobacter pylori* taşıyıcılarında lokal ve sistemik humoral cevaplar göstermiştir (60, 61).

e) Mukoza hücrelerinde *Helicobacter pylori* nedeniyle ultrastrüktürel değişimler gösterilmiştir (62, 63, 60, 61).

f) Spesifik gastrit tiplerinde *Helicobacter pylori* prevalansı düşük gösterilmiştir (64, 65).

2.6.2. Duodenal Ülser

Helicobacter pylori ile kronik duodenal ülser arasındaki ilişki günümüzde yoğun olarak araştırılmaktadır. 1985 yılında yapılan araştırmalarda *Helicobacter pylori* ile kronik duodenal ülser arasında sık bir ilişki olduğu gösterilmiştir (54).

Helicobacter pylori'nin gastrik tip epitele kuvvetli bir afinitesi vardır. Bunun yanında diğer tip epitellerde *Helicobacter pylori* hiç görülmemiştir (54). Duodenal gastrit metaplazinin duodenal ülserli kişilerde, duodenal hiper asidite nedeniyle olduğu varsayılmaktadır (66). Bir hipoteze göre; gastrik metaplazinin duodenal ülserle yatkın olan hastalarda ilk histopatolojik değişim olduğu ileri sürülmektedir (67). Bu kişilerde asit varlığında bir süre sonra duodenal ülser oluşmaktadır (54, 68).

2.7. Tedavi

Helicobacter pylori, in-vitro olarak penicillin G, ampicilin, amozellin, eritromicin, tetrasiklin, gentamicin gibi birçok antimikrobiale ajanlara duyarlılık gösterir. Trimethoprim sulfametaksazol, nalidixik asit, colistin, cefsulodin, vancomycin'e rezistanstir. Bizmut tuzlarına orta derecede hassastır (38, 39).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Serum örnekleri

Haziran 1993-Haziran 1994 tarihleri arasında değişik şikayetleri nedeniyle KTÜ. Tıp Fakültesi, Pediatri Anabilim dalı polikliniklerine başvuran hastalardan rastgele seçilen, 96 94'sinin serum örnekleri *Helicobacter pylori* IgG antikorları açısından incelendi.

3.1.2. Biyopsi örnekleri

Helicobacter pylori suşlarının izolasyonu için değişik mide şikayetleri nedeniyle KTÜ. Tıp Fakültesi polikliniklerine başvuran hastaların endoskopi sonucu midenin antrum mukozasından alınan örnekleri çalışmada değerlendirildi.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Brain-Hearth infüzyon agar (Koyun kanlı, antibiyotikli)
Mueller-Hinton infüzyon agar, *Helicobacter pylori* suşlarının üretim için kullanıldı.

3.1.4. Elektrikle Çalışan Araçlar

37°C'ye ayarlı etüv
180°C'ye ayarlı Pasteur fırını
Otoklav
Derin dondurucu
Vakum pompası
Işık mikroskobu

Immunfloresan mikroskobu
Faz kontrast mikroskobu
Koloni mikroskobu
Magnetik karıştırıcı
Benmari

3.1.5. Madeni Araçlar

Hassas terazt
Bünzen beki
Tüp Sporları

3.1.6. Cam Malzemeler

Desikatör (Cam kavanoz)
BBL Gaspak
Petri kutuları
Balonlar ve erlenmayerler
Pipetler, mikropipetler (10, 100, 1000 ml'lik pipet uçları)
Tüpler
Lamyelameller
Plate (96'lik)

3.1.7. Kimyasal Maddeler

Gas Generating Kit Campylobacter System BR 56 (Oxoid)
Anti-Human IgG (-chain spesific)
fitc conjugat antibody developed in goat (product no=F-6255)
Phosphate-Buffered Saline (Code BR 14a Oxord)
Distilesu
Trimethoprim
Vacomycin
Gramboya seti
Nalidixic asit
x 3'lük H₂O₂

% 5'lik tetramethyl para phenylene diamin hydrochlorid NaCl

Gaz karışımı (% 5 O₂, % 10 CO₂, % 85 O₂) Paşabahçe Şişe Cam Fabrikasında hazırlanmıştır.

Kanada balsamı

3.2. Metod

Değişik yaş grubundaki çocuk hastaların serum örneklerinde IFA ile Helicobacter pylori'ye karşı IgG antikorları belirlemeden önce antijen olarak kullanılacak Helicobacter pylori suşlarının izolasyonu için endoskopik, histopatolojik ve mikrobiyolojik incelemeler yapıldı (27).

3.2.1. Endoskopik inceleme

12 saatlik açlığı takiben hastalar uygun şekilde hazırlandıktan sonra Welch-Allyn video endoskopi ile duodenumun ikinci kısmına geçildi. Duodenum mukozası, pilor ve pilor fonksiyonları, midenin antrum, korpus, fundus ve kardiyal mukozası, gastroözofageal junction ve farinje kadar özofagus mukozası değerlendirildi. Antral mukozadan biyopsi forsepsi ile biyopsi alındı.

3.2.2. Histopatolojik inceleme

Endoskopi sonucu alınan biyopsi örnekleri 2 cc'lik steril serum fizyolojik (% 10'luk formal) içinde tesbit edilerek patoloji laboratuvarına iletildi. Laboratuvarda Hematoxylin-eozin ile boyanarak incelendi.

3.2.3. Mikrobiyolojik inceleme

Besiyerinin Hazırlanması : Brain-Heart infüzyon agar ve Mueller-Minton infüzyon agar üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlandı.

Besiyerine Ekim : Endoskopi sonucu hastalardan alınan mide antral mukoza örnekleri 2 cc'lik steril serum fizyolojik içinde en geç 2 saatte mikrobiyoloji laboratuvarına iletildi. Laboratuvarda biyopsi örnekleri transport ortamından steril pensle alınarak steril lam yüzeyine sürüldü. Daha sonra Gram boyama için direkt yayma preparat hazırlanarak biyopsi örneğinden tek koloni düşecek şekilde besiyeri yüzeyine sürüldü. Ekimi yapılan plaklar cam desikatöre konuldu. Desikatör içindeki normal hava boşaltılarak yerine aynı oranda mikroaerofilik gaz karışımı dolduruldu ve 37°C'ye ayarlı etüvde enkübasyona bırakıldı.

Mikroskopik inceleme : Lam üzerine yayma şeklinde hazırlanan preparatlar ısı ile tespit edildikten sonra Gram boyama yöntemiyle boyandı. immersiyon objektifi ile Gram negatif « S » şeklinde kıvrık bakteriler araştırıldı.

Kültürlerin Değerlendirilmesi : Ekimi yapılmış olan plaklar 3., 5., 7. günlerde bakteri üremesi yönünden kontrol edildi. Ortalama 5. günde, yaklaşık 1 mm çapında düzgün, «S» tipi, transparan koloniler belirlendi. Bu koloniler *Helicobacter pylori* olarak tahmin edildi. Bu kolonilere kesin tesbit için aşağıdaki testler uygulandı.

a) **Hareket incelemesi :** Kolonilerden alınan bakteriler, lâm-lamel arası preparasyonla fakontrast fazkontrast mikroskopunda incelendi.

b) **Gram boyama :** Kolonilerden Gram boyama yapılarak, Gram negatif 0,5x2 m boyunda, çoğunluğu spiral veya kıvrık bakterilerin *Helicobacter pylori* olduğu şüpheli olarak belirlendi.

c) **Üreaz testi :** Üre besiyerine bir öze dolusu bakteri ekildi ve 37°C'de enkübe edildi. Belirli zaman aralıklarıyla kontrol edildi. Üre ortamının menekşe rengine dönüşmesi pas-

tif sonuç, 12 saat sonra renk deęiřtirmesi negatif sonuç kabul edildi.

d) Katalaz testi : % 3'lük yeni hazırlanmış H_2O_2 'den bir damla alınarak lam üzerindeki bakteri süspansiyonuna damlatıldı. Şiddetli hava kabarcıklarının meydana gelmesi pozitif olarak değerlendirildi.

e) Oksidaz testi : Kovaks yöntemine göre % 5'lik tetramethylphenylenediamine dihydrochlorideriyiği kurutma kağıdına emdirildi. Bir öze dokusu bakteri eriyiğın emdirildiği bölgeye sürüldü. Bu bölgenin erguvan renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Yukarıda şüpheli kabul edilen bakterik *Helicobacter pylori*'nin tipik biyoşimik yapısına uygunluk gösterdi.

3.2.4. Serolojik inceleme

IFA için Preparatların Hazırlanması : *Helicobacter pylori* suşu 3 gün mikroaerofilik koşulda, Koyun Kanlı Müller Hinton Agar besiyerinde üretildi. Bakteri kültürü içerisinde % 0,1 oranında NaN_3 bulunan yaklaşık 2 ml PBS ile süspansiyon haline getirildi 2 kez, 15 dakika, 10.000xg'de santrifüj yardımıyla yine PBS kullanılarak yıkandı. Daha sonra mikroskop altında 400 büyütmede her sahada yaklaşık 50 kadar bakteri olacak şekilde dilüe edildi. Bu süspansiyondan önceden alkolle temizlenen lam üzerine üç adet, yaklaşık 1 cm çapında yayma yapıldı. Kurumayı takiben boyanarak tekrar bakteri sayısı açısından kontrol edildi. Uygun sayının varlığı ile seri olarak lamlar hazırlandı. Kurutularak kullanılabilecek $-20^{\circ}C$ -de saklandı.

indirek Florasan Antikor Yöntemi : Hasta serumlarının bir mikroplyat kullanılarak 1:32'den 1:1024'e kadar PBS ile sulandırılmaları yapıldı. Sulandırılmadan önce derin dondurucudan çıkarılıp oda ısısında bekletilerek kurutulmuş olan

preparatlar üzerindeki yaymaların etrafı özel bir kalemle (Pap Pen) daire şeklinde işaretlendi. Her yayma üzerine hasta serumunun her sulandırmasından (1:32'den başlayarak) 10 bırakıldı ve tamamen yayılma sağlandı. Bu şekilde her hasta için 2 adet lam kullanıldı. Hasta serumu uygulanan lamlar nemli bir küvet içersinde 37°C'lik etüvde, 30 dakika antijen-antikor reaksiyonu için bekletildi. Daha sonra lamlar PBS ile yıkandı ve içerisinde PBS bulunan küvete konarak 15 dakika bekletildi. Sürenin bitimini takiben, distile su ile yıkayıp hafifce kurutuldu, üzerlerine her yayma için ayrı ayrı 10 önceden üretici firmanın önerdiği oranda sulandırılmış konjuge serum (FITC ile işaretlenmiş anti-human IgG keçi serumları) bırakıldı. Tekrar nemli küvet içinde 30 dakika, 37°C'de inkübe edildi. inkübasyonu takiben yukarıda anlatılan yıkama ve kurutma işlemleri tekrarlandı. Her bir yayma üzerine 1 damla gliserol (PBS ile dilüe edilen 10:1 gliserol) damlatılıp lammelle kapatılarak floresan mikroskopta 400 kez büyütme ile incelendi. Kenarları güçlü parlak floresan veren bakteriler IFA pozitif olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmada her yaş grubunda yaklaşık 10 hasta bulunan, yaşları 1-10 arasında olan toplam 96 çocuk hastanın serum örnekleri *Helicobacter pylori* IgG antikorları açısından IFA yöntemi ile incelendi. Cut off değeri tüm sonuçlar dikkate alınarak 1/200 şeklinde belirlendi 96 serum örneğinin IFA sonuçları yaş gruplarına göre tablo 1'de verildi. Tabloda görüldüğü gibi 0-1 ve 1-2 yaş grubu istatistikî açıdan değerlendirme özelliği nedeniyle 1-2 yaş grubu şeklinde alındı.

96 hastanın serum örnekleri ile yapılan çalışmada *Helicobacter pylori* pozitifliği yaşa bağlı olarak artış göstermiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$).

Tablo 1 : Çocuklarda Yaşa Bağlı Olarak *Helicobacter pylori*'ye Karşı Oluşan IgG Antikor Pozitifliği

Yaş Grubu	IFA'da antikor pozitifliği		IFA'da antikor negatifliği		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
1-2 yaş	2	2	17	17	19	19.80
3 "	3	3	7	7	10	10.40
4 "	1	1	9	9	10	10.40
5 "	3	9	7	7	10	10.40
6 "	5	5	3	3	8	8.40
7 "	7	7	3	3	10	10.40
8 "	3	3	7	7	10	10.40
9 "	4	4	6	6	10	10.40
10 "	3	3	6	6	9	9.40
Toplam	31	32	65	67	96	1000

Elde edilen sonuçlar çocukların okul öncesi (1-5 yaş) ve okul çağı (6-10 yaş) yaşlarına göre değerlendirildiğinde *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikor pozitifliği açısından önemli farklılıklar gösterdiği belirlendi (Tablo 2). Bu farkın istatistikî açıdan ileri derecede anlamlı olduğu görüldü ($P < 0,001$).

Tablo 2 : Okul öncesi Dönem ile Okul Çağı Arasında *Helicobacter pylori*'ye Karşı Oluşan IgG Antikor Pozitifliği

Dönemler	IFA'da antikor pozitifliği		IFA'da antikor negatifliği		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Okul öncesi (1-5 yaş)	9	18,37	40	81,63	49	51,05
Okul çağı (6-10 yaş)	22	46,80	25	53,19	47	48,95
Toplam	31	32,29	65	67,70	96	100

Helicobacter pylori pozitifliği açısından okul öncesi 1-5 yaş grubu ile okul başlangıç yıllarını kapsayan 6-7 yaş grubunun karşılaştırılması sonuçları tablo 3'de görülmektedir. Okul öncesi dönemden okula başlanan ilk iki yıla geçişteki IgG antikor pozitifliğindeki artış istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($P < 0,001$).

Tablo 3 : Çocuklarda Okul öncesi Dönemden Okul Çağına Geçişte Helicobacter pylori'ye Karşı Oluşan IgG Antikor Pozitifliği

Dönemler	IFA'da antikor pozitifliği		IFA'da antikor negatifliği		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Okul öncesi (1-5 yaş)	9	18,36	40	81,64	49	73,14
Okula başlayan ilk iki yıl (6-7 yaş)	12	66,67	6	33,33	18	26,56
Toplam	21	31,34	46	68,86	67	100

Okula başlanılan ilk iki yıl (6-7 yaş) ve sonraki okul yılları (8-10 yaş) dönemde bulunan 47 çocuğun serum örnekleri IgG pozitifliği açısından değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar tablo 4'de verildi. Bu iki grup arasında Helicobacter pylori IgG antikor pozitifliği açısından istatistikî açıdan anlamlı fark bulunamadı ($P > 0,05$).

Tablo 4 : Okula Başlanan ilk iki Yıl ile Okul Yılları Arasında Helicobacter pylori'ye Karşı Oluşan IgG Antikor Pozitifliği

Dönemler	IFA'da antikor pozitifliği		IFA'da antikor negatifliği		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Okula başlanan ilk iki yıl (6-7 yaş)	12	66,66	6	33,33	18	38,29
Daha sonraki okul yılları (8-10 yaş)	10	34,48	9	31,03	29	61,70
Toplam	22	46,80	25	53,19	47	100

5. TARTIŞMA

1983 yılında Warren ve Marshall'ın (1,2) mide biyopsi örneklerinden kıvrık bakterileri izole edip tanımlarından sonra günümüze kadar bu bakterilerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Başlangıçta Campylobacter daha sonra Helicobacter olarak isimlendirilen bu kıvrık bakterilerin gastrik hastalıklarla yakından ilişkisi olduğu belirlenmiştir (3).

Gelişmiş ülkelerde Helicobacter pylori enfeksiyonu çocuklarda düşük sıklıkla görülmektedir. Helicobacter pylori enfeksiyonu yaşla gastrite bağlı olarak artmaktadır. Bu sonuç Amerika, Avustralya ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (69,79,71,72,). Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada 20 yaş ve üstü yaş grubu hastalarda % 70'den yüksek oranda Helicobacter pylori enfeksiyonu bulunmuştur (73). Schubert ve Schnell (74) bir yıllık sürede inceledikleri 212 ülserli hastalarda % 85, ülcersiz hastalarda % 37, gastrik ülserli hastalarda % 53, duodenal hastalarda % 50 oranında Helicobacter pylori pozitifliği saptanmıştır. Duodenal ülserli erkek hastalarda kadınlara oranla daha yüksek pozitiflik bulunmuştur. Helicobacter Pylori enfeksiyonu sıklığı etnik gruplar ve ırklar arasında da farklılık göstermektedir. Örneğin USA'da beyazlara kıyasla siyah ırkta daha yüksek oranda Helicobacter Pylori enfeksiyonu belirlenmiştir (75).

Glassman ve ark (81) yaş ortalaması 12.5, kadın erkek oranı 27:30 olan 60 kişilik popülasyonda yaptıkları çalışmada 24 hastada (% 40) histopatolojik gastrit 14'ü kronik aktif gastrit, 10'u kronik gastrit; 11 hastada (% 18,3) kronik duodenit; 10 hastada (% 16,6) kronik akut gastrit ve duodenit; 1 (% 1,6) hastada özofagit; LÇ (% 23,3) hiçbir

patolojik anormallik bulunamamıştır. 60 hastanın hepsi epigastrik abdominal ağrılı 27'sinde ayrıca kusma görülmüştür. Kronik aktif gastritli 5 hasta (% 13,3)'nin tümünde *Helicobacter pylori* enfeksiyonu pozitif bulunmuştur. Bu 8 hastanın 7'sinde *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikorları % 87 sensitivite, 6'sında IgA antikorları % 75 sensitivite göstermiştir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu göstermeyen hastalarda IgG antikorları % 96 spesifik, IgA antikorları da % 100 spesifiktir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu göstermeyen 2 hastada IgG pozitif (false positive), fakat IgA negatif bulunmuştur. *Helicobacter pylori* negatif olanlara karşı *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda ELISA yöntemi ile elde edilen optical density oranları önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak; gastrik infeksiyonlar çocuklarda serolojik testlerle IgG antikorunun aranmasının kullanışlı bir teşhis aleti olabileceği düşünülmüştür (4,49).

Helicobacter pylori enfeksiyonu Michell ve ark. (49) tarafından 227 çocuktan 32'sinde (% 14,1) histopatolojik olarak gösterilmiştir. Bu çocukların hepsinde *Helicobacter pylori*'nin varlığı için yapılan hızlı üreaz test pozitif bulunmuştur. Histopatolojik olarak *Helicobacter pylori* enfeksiyonu pozitif gösterilen çocuklarda ayrıca IgG antikorları pozitif bulunmuştur. Histopatolojik olarak negatif 195 çocuktan 8'inde (% 4) ELISA pozitif bulunmuştur. Bu pediatrik popülasyonda ELISA'nın sensitivitesi % 100, spesifitesi % 95 bulunmuştur. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu için histopatolojik ve hızlı üreaz test ile pozitif gösterilen 32 çocuktan yarısında (% 50) antrumda sınırlanmış nodular gastritis bulunmuştur. Nodular gastritis *Helicobacter pylori* enfeksiyonu histopatolojik olarak negatif olan 95 çocuktan 1'inde (% 0,5) bulunmuştur.

Antral nodularite için örnek alınan 258 yetişkinden 139'unda (% 53,9) *Helicobacter pylori* enfeksiyonu histolojik olarak pozitif bulunmuştur. Bunların da 22'sinde (% 15,8) nodularite varlığı gösterilmiştir. *Helicobacter pylori* en-

feksiyonu için histolojik olarak negatif olan hastaların hiçbirinde nodularite gösterilememiştir (49).

Endoskopi için hazırlanan 227 çocuktan 12'si (% 5,3) peptik ülserli bulunmuştur. 12 peptik ülserlinin 9'u (% 75) duodenal (erkek-kız oranı 7:2) ve 3'ü (% 25) gastrik (hepsi erkek) ülserlidir. Gastrik ülserli 3 çocuktan yalnız biri *Helicobacter pylori* ile enfekte olmuştur. *Helicobacter pylori* negatif ülser hastalarının hiçbirisi serolojik yönden pozitif bulunamamıştır. Sonuç olarak, antral nodularite ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile karşılaşma çocuklarda yetişkinlerden daha az görülmektedir (49). Bizim yaptığımız çalışmalarda, çocuklarda yaşa bağlı olarak *Helicobacter pylori* IgG antikor pozitifliğinin arttığı görüldü. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$).

Cohen ve ark. (80) yapmış oldukları bir çalışmada 35 hastada boyama veya kültürle 24'ünde *Helicobacter pylori* (% 68) belirlemişler, ancak her iki yöntem birlikte değerlendirildiğinde % 83 oranında *Helicobacter pylori* varlığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar 22 hastada *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikor varlığını bulmuşlardır. Bu hastaların 19'unda *Helicobacter pylori* kültürel veya boyama ile belirlenmiştir.

Aydın ve ark. (79) yaptıkları çalışmalarda 42 hastadan aldıkları serum örneklerinden aynı yöntemle 34 (% 80,95) hastada *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikorları belirlenmişlerdir. Bu 42 hastanın 31'inde (% 73,80) Gram boyama ile 25'inde (% 59,52) kültürle *Helicobacter pylori*'yi pozitif bulduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca toplam 104 hastada yaptıkları mikroskopik kültürel ve bunların 42'sindeki serolojik sonuçlara göre 85 hastada *Helicobacter pylori* enfeksiyonu belirlemişlerdir. Uygulanan testler ayrı ayrı değerlendirildiğinde kültürle % 53,84 Gram boyama ile % 76,92 ve serolojik olarak % 80,95 pozitif sonuç elde etmişlerdir.

Giuseppina Oderda ve arkadaşları (75) yaptıkları çalışmalarda 30 anne-babadan (ebeveyn) 21'inde (% 70), 17 kardeşten 8'inde (% 47) *Helicobacter pylori* IgG seviyelerini yüksek bulmuştur. Bunlardan elde edilen endoskopide *Helicobacter Pylori*'ye ait oranı ebeveynlerde % 78, kardeşlerde % 50 bulunmuştur. Peptik ülserli çocuklarda *Helicobacter pylori* negatiflik oranı küçük yaşlarda daha yüksektir. *Helicobacter pylori*'ye karşı oluşan IgG titresi ve pepsinogen I seviyesi *Helicobacter pylori* pozitif olanlarda daha yüksek bulunmuştur. Fakat serum gastrin düzeylerinde farklılık bulunamamıştır. *Helicobacter pylori* pozitif olan peptik ülserli çocukların ebeveynlerinin % 87'sinde peptik ülser görülmüştür. 3 tanesinde de duodenal ülser görülmüştür. *Helicobacter pylori* negatif olan çocukların ebeveynlerinin % 57'sinde peptik ülser görülmüştür. *Helicobacter pylori* pozitif olan peptik ülserli çocukların kardeşlerinde % 61 oranında *Helicobacter pylori* pozitif bulunmuştur. Buna karşılık *Helicobacter pylori* negatif olan çocukların 4 kardeşinde *Helicobacter pylori* bulunamamıştır.

G. Oderda ve arkadaşları (75) peptik ülserli 15 çocukta yaptıkları çalışmalarda şu sonuçları bulmuşlardır:

Duodenal ülserli 11 çocuktan 6'sı *H. pylori* için pozitif bulunmuştur (% 55). Gastrik ülserli 4 çocuktan 2'si (% 50) *H. pylori* için pozitif bulunmuştur. *H. pylori* pozitif çocukların yaşları 10-18 (ortalama 12,5)'dir. Bunlardan 6'sı erkektir. *Helicobacter pylori* negatif olan toplam 7 çocuk ise erkektir. Bunların yaşları ise 2-14 (ortalama 10)'dür. Bu çalışmada küçük yaşlar arasındaki gerçek istatistiksel değer elde edilememiştir. IgG ve pepsinojen I seviyeleri peptik ülserli, *Helicobacter pylori* pozitif çocuklarda yüksek bulunmuştur. IgG ve pepsinojen I seviyeleri, *Helicobacter pylori* negatif çocuklarda ise düşük bulunmuştur. Gastrin seviyeleri *Helicobacter pylori* pozitif ve negatif çocuklarda aynı bulunmuştur. IgG seviyesinin usensitivitesi ve spesifitesi her ikisinde de % 99, pepsinojen I seviyesi ise her ikisinde de

% 87 bulunmuştur. *Helicobacter pylori* pozitif ve negatif peptik ülserli çocuklar arasında histolojik farklar bulunmuştur.

Nicholus I. Talley, (47) 41 hasta ve 35 gönüllüde biyopsi örnekleri ile yaptıkları çalışmada aktif kronik gastrit ve *Helicobacter pylori* yoğunluğu arasında ilişki bulmuştur. Bu çalışmada serum örnekleri ELISA ile test edilmiş ve % 35 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Kullanılan farklı anti-jenlerle tüm Serolojik testler aktif kronik gastritle ilişki göstermiştir. Fakat IgA'nin yapılan testlerde farklı olarak hafif gastritin şiddetli gastritten ayrılmasında bilgi vereceği gösterilmiştir. *Helicobacter pylori* suşları arasında bulunan antijenik farklar istisna edilirse Amerika ve İngiltere'de yapılan ELISA testlerinin diagnostik karakteri spesifik ve sensitivite açısından aynı bulunmuştur (47).

Çalışmamızda bölgesel olarak *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile yaş arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan IFA yöntemi ile 96 hastanın 31'inde (% 32,29), serolojik olarak pozitiflik elde edilmiştir (Tablo 2). Sonuçlar yaş grupları açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çalışmamızda çocukların okul öncesi dönemi ile okul çağı döneminde *Helicobacter pylori* ile karşılaşma oranları arasında büyük fark bulunmuştur. Bu durum istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıdır ($P < 0.001$) (Tablo 3). Buna göre çocukların ev ortamından, daha büyük bir çevre olan okul ortamına geçişlerin de *Helicobacter pylori* ile karşılaşmanın arttığı hakkında yorum yapılabilmektedir. Ayrıca okul öncesi dönem ile okula başlanan ilk iki yıl dönemi arasındaki *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikor pozitifliği arasında da büyük fark bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıdır ($P < 0,001$) (Tablo 3).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Pediyatri kliniği'ne başvuran hastalar arasında rastgele seçilen, 1-10 yaş arasında 96 çocuğun serumlarının *Helicobacter pylori* pozitifliği açısından incelenmesinde aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1) 96 serum örneğinden, indirek İmmün Floresan Yöntem ile 31 (% 32, 29)'inde *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikorları belirlendi, yaşa bağlı olarak seroloji sonuçlarının artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu görüldü ($P < 0,05$).

2) incelenen 96 çocuğun okul öncesi ve okul çağı dönemine göre yaş grupları dikkate alındığında istatistiksel açıdan yine ileri derecede anlamlı oldukları belirlendi ($P < 0,001$).

3) Çalışma kapsamında bulunan okul öncesi ve okula başlanan ilk iki yıl dönemine ait 67 çocuğun seroloji sonuçları kıyaslandığında istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı fark olduğu tesbit edildi ($P < 0,001$).

4) Çalışma kapsamında bulunan okula başlanan ilk iki yıl (6-7 yaş) ile takip eden yıllara (8-10) alt yaş gruplarındaki toplam 47 çocuğun seroloji sonuçları dikkate alındığında iki grup arasındaki farkın anlamsız olduğu görüldü ($P > 0,05$).

Öneriler : Çalışmada elde edilen serolojik sonuçlara göre bölgemizde çocuklarda *Helicobacter pylori* ile karşılaşmanın yaşa bağlı olarak arttığı görülmektedir. Okul öncesi dönemden okul çağına geçişte *Helicobacter pylori*'ye karşı oluşan antikor oranında istatistiksel olarak anlamlı artış or-

taya çıkmaktadır. Bu da önemli bir epidemiyolojik gerçeği yansıtmaktadır. Ancak yaş grupları ailelerin ifadelerine göre dikkate alındığı için sayısal farklılıklar olabilmektedir. Bu nedenle kesin yaşları belli her yaş grubundan fazla sayıda serum örneği ile çalışılmasının mümkünse birden fazla yöntemin kullanılmasının bu önemli bulguları destekleyeceği ve kesinleştireceği düşünülmektedir.



Ö Z E T

Bu çalışma Haziran, 1993 - Haziran, 1994 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapıldı.

KTÜ. Tıp Fak. Pediatri polikliniğine başvuran hastalar arasından 96 (kız erkek karışık) çocuğun serum örnekleri klinik tanıya bakılmadan rastgele seçilerek çalışmaya alındı. Yaşları 1-10 arasında olan her yaş grubundan 10 kadar serum örneğinin alınmasına dikkat edildi.

Serum örnekleri IFA yöntemi ile *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikorları açısından incelendi (EK 1).

Serolojik olarak çalışılan 96 hastanın 31 (% 32,29)'inde *Helicobacter pylori* IgG antikorları belirlendi. Yaşa bağlı olarak *Helicobacter pylori* antikor pozitiflik oranındaki artışın istatistiksel değerlendirilmesi anlamlı bulundu ($P<0,05$). Ayrıca okul öncesi dönemden okul çağına geçildiğinde *Helicobacter pylori* pozitiflik oranında belirgin bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bulunduğu belirlendi ($P<0,001$).

S U M M A R Y

The study population comprised 96 consecutive patients. Their ages were from 1 to 10 years (male and female mixed).

An immunofluorescence assay (IFA) for the detection of immunoglobulin G antibodies directed against *Helicobacter pylori* was evaluated by comparing 96 serum specimens from consecutive patients coming of pediatrics center (Appendix:11). The resulting anti-*H. pylori* titers were classified as follows : positive, ≥ 200 ., Negative < 200 .

In 31 patients out of 96 patient (% 32.29), *Helicobacter pylori* antibodies were serologically positive. Statistical analysis showed that serological *Helicobacter pylori* positivity increases with age. Especially in children, *Helicobacter pylori* positivity incidence rate highly increases in the school starting age, this increase is found highly significant by statistical methods ($p < 0.001$)

In this study we showed that children are increasingly exposed to *helicopacter pylori* by age, especially in the age they start to school.

K A Y N A K L A R

1. Soltesz, V., Zeeberg, B., Wadström, T. Optimal Survival of Helicobacter pylori under Various Transport Conditions. J.Clin Microbiol, 30:1453-1456, 1992.
2. Thoene, J.G, Burken M.I., Hopkins, R.J., Russeu, A.G., Morris, G.J. : Seropositivity to Helicobacter pylori: Lack of Association with Length of Hospitalization. Journal of Clinical Microbiology, 29:1392, 1991. 7
3. Marshall, B.J., Goodwin, C.S: Revised nomenclature of campylobacter pylorids. Int. J. Syst. Bacteriol, 37-68, 1987.
4. Oderda, G., Vaira, D., Holton, J., Ainley, C., Altare F., Boero, M., Smith, A., and Ansaldi, Helicobacter pylori in children with peptic ulcer and Their Families. Digestive Diseases and sciences, 36:572-576, 1991.
5. Cedro, D., C., Socha, J., Telsseyre, M.: Campylobacter pylori mupper digestive tract diseases in children, 4:259-262, 1989.
6. Krienitz, W: Veber das Auftreten von Spirochäten verschiedener form im Mageninhalt bei carcinoma ventriculi Dtsch. Med. Wochenschr, 28:872, 1906.
7. Lüger A, Neuberger, H: Veber Spirochäten gefunden im Magensaft und deren diagnostische Bedeutung für das carcinoma ventriculi 2t schr. F. Klin.Med, 92:54-75, 1921.

8. Freedberg, AS, Barron, LE: The presence of Spirochaetes in human gastric mucosa. Am. J. Dig. Dis, 7:443-445, 1940.
9. Palmer, ED: Investigation of the gastric mucosa spirochaetes of the human Gastroenterology, 27:218:220, 1954.
10. Steer, HW, Colin-Jones, DG: Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. Gut, 16:590-597, 1957.
11. Steer, HW: Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. J. Clin. Pathol, 28:639-649, 1975.
12. Warren, JR, Marshall, BJ: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1:1273-1275, 1983.
13. Marshall, BJ, Royce, H, Annear, DI, et al. Original isolation of campylobacter pyloridis from human gastric mucosa. Microbiol letters, 25:83-88, 1984.
14. Godwin, CS, McCulloch, RK. et al. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (Campylobacter pyloridis). From the human gastric mucosa. J. Med. Microbiol, 19:257-267, 1985.
15. Romaniuk, PJ, Zoltowska, B, Trust, TJ. et al.: Campylobacter pylori the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true Campylobacter sp. J. Bacteriol, 169:2137-2141, 1987.

16. Von Wulfen, HV: Low degree of relatedness between *Campylobacter pyloridis* and enteropathogenic *Campylobacter* species as revealed by DNA DNA blot hybridization and immunoblot studies. *FEMS Microbiol Lett*, 42:129-133, 1987.
17. Newel, DG: Identification of the outer membrane proteins of *Campylobacter pyloridis* and antigenic cross-reactivity between *Campylobacter pyloridis* and *Campylobacter jejuni*. *J.Gen. Microbiol*, 133:163-170, 1987.
18. Buck, GE, Smith, JS: Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *J.Clin.Microbiol*, 25:597-599, 1987.
19. Goodwin, CS. et al.: *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J. Clin. Pathol*, 38:1127-1131, 1985.
20. Morgan, DR, Freedman, R, et al.: Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. *J. Clin. Microbiol*, 25:2123-2125, 1987.
21. McNulty, CAM, Dent, JC: Rapid identification of *Campylobacter pylori* by preformed enzymes. *J. Clin Microbiol*, 25:1683-1686, 1987.
22. Langenberg, ML, Tytgat, GN. et al.: *Campylobacter* Like organisms in the stomach of patients and healthy individuals *Lancet*, 1:111, 1985.
23. Owen, RJ, Martin, SR, et al.: Rapid urea hydrolysis by gastric *Campylobacters* *Lancet*, 1:111, 1985.
24. McNulty, CAM, Wise, R: Rapid diagnosis of *Campylobacter* associated gastritis. *Lancet*, 1:1443-1444, 1985.

25. Sarosiek, J, Slomiany, A, Slomiany, BL: Evidence for weakening of gastric mucus integrity by *Campylobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol*, 23:585-590, 1988.
26. Slomiany, BL, Bilski, J, Sarosiek, J. et al.: *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochem Biophys Res. Commun*, 144:307-314, 1987.
27. Hazell, SL, Lee, A. et al.: *Campylobacter pyloridis* and gastritis. *J. Infect. Dis*, 153:658-663, 1986.
28. Marshall, BJ. et al.: Survival of *Campylobacter pylori* at acid pH. *Gastroenterol*, 1517 (abstract), 1987.
29. Taylor, DE, Hargreaves, JA, et al.: Isolation and characteristics of *Campylobacter pyloridis* from gastric biopsies. *Am. J. Clin. Pathol*, 87:49-54, 1987.
30. McMullen, L, Walker, MN, Bain, LA. et al.: Histological identification of *Campylobacter* using Gimenez technique in gastric antral mucosa *J. Clin. Pathol*, 40:464-465, 1987.
31. Humphreys, H, O Morain, C: Culture of the Organisms and histochemical identification. *Scand. J. Gastroenterol*, 157:16-20, 1989.
32. McNulty, CAM, Gearty, JC, et al.: *Campylobacter pyloridis* and associated gastritis: Investigator blind, placebo controlled trial of bismuth salicylate and erythromycin ethylsuccinate *Br. Med. J*, 293: 645-649, 1986.
33. Buck, GE, Smith, JS: Medium supplementation for growth of *C. pylori*. *J. Clin. Microbiol*, 25:597-599, 1987.

34. Skirrow, WB: *Campylobacter* enteritis: a «new» disease
Br. Med. J, 2:9-11, 1987.
35. Itoh, T, Yanagawa, Y. et al.: Isolation of *C. pyloridis*
from human gastric mucosa and characterization of
the isolates. Microbiol Immunol, 31:603-614, 1987.
36. Parsonnet, J, Welch, K, et al.: Simple microbiologic
detection of *Campylobacter pylori*. J.Clin.Microbiol,
26:948-849, 1988.
37. Queriroz, DMM, Mendes, EN, Rocha, GA: Indicator medium
for isolation of *Campylobacter pylori*. J.Clin micro-
biol, 25:2378-2379, 1987.
38. Kasper, G, Dickgiesser, N: Antibiotic sensitivity of
Campylobacter pylori. Eur. J.Clin. Microbiol, 3:444.
1984.
39. Lambert, T, Gerboud, G, et al.: Susceptibility of
Campylobacter pyloridis to 20 antimicrobial agents.
Antimicrob. Agents Chemother, 30:510-511, 1986.
40. Buck, GE, Gourley, WK, Lee, WK. et al.: Relation of
C. pylori to gastritis and peptic ulcer J. Infect.
Dis, 153:664-669, 1986.
41. Jones, DM, Lessells, AM, Eldridge, J: *Campylobacter*
Like organisms on the gastric mucosa; Culture, his-
tological and serological studies. J. Clin. Pathol,
37:1002-1006, 1984.
42. Warren, JR, Marshall, B: Undeidentified curved bacilli
on gaskrik epithelium in active-chronic gastritis.
Lahcet, 2:1273-1275, 1983.

43. Godwin, CS, Blincow, ED, Warren, JR. et. al.: Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa *J. Clin. Pathol*, 38:1127-1131, 1985.
44. Christensen, WB: Urea decomposition as a means of differentiating proteus and paracolon cultures from each other and from salmonella and shigella types. *J. Bacteriol*, 52:461-466, 1946.
45. Langenberg, ML, Tytgat, GNJ. et al.: *Campylobacter*-Like organisms in the stomach of patients and healthy individuals (Letter). *Lancet*, 1:1348, 1984.
46. Marshall, BJ, Warren, JR, et al.: Rapid urease tests in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am. J. Gastroenterol*, 82 : 200-210, 1987.
47. Talley, NJ, Newell, DG. et al.: serodiagnosis of *Helicobacter pylori* Comparison of Enzyme-Linked Immuno sorbent Assays. *J. Clin. Micro*, 29:1635-1639, 1991.
48. Best, LM, Veldhuyzen, SJO. et al: Serological Detection of *Helicobacter pylori* by a Flow Microsphere Immuno fluorescence Assay *J. clin. Micro*, 30:2311-231. 1992.
49. Mitchenell, H. M., Bohane, T.D, et al.: *Helicobacter pylori* Infection in children: Potential Clues to Pathogenesis, 16:120-125, 1993.
50. Karabiber, N., Turet, S., Waker, A. ve Ark., Norma Populasyonda *Helicobacter Pylori* Antikor Prevalansı, *Doğa. Tr. J. of Medical Sciences*, 16:479-82, 1992.

51. De Cothi, GA. et al.: Campylobacter-Like organisms and heterotopic gastric mucosa in meckel's diverticula. *J. Clin. Pathol*, 42:132-134, 1989.
52. Marshall, BJ, Armstrong, JA, McGechie, DB. et al.: Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter. *Med. J. Aust*, 142:146-149, 1985.
53. Lee, A, Hazell, SL: Campylobacter pylori in health and disease an ecological perspective. *Microb. Ecol. Health. Dis*, 1:1-16, 1989.
54. Marshall, BJ, McGechie, DB, et al.: Pyloric Campylobacter infection and gastroduodenal disease. *Med. J. Aust*, 142:439-444, 1985.
55. Nedenskov-Sorensen, P, Bjorneklett, A. et al. Campylobacter pylori infection and its relation to chronic gastritis: *Scand. J. Gastroenterol*, 23:867-874. 1988.
56. Buck, GE, Gourley, WK. et al.: Relation of Campylobacter pyloridis to gastritis and peptic ulcer. *J. Infect. Dis*, 153:664-669, 1986.
57. Morris, A, Nicholson, G: Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol*, 82:192-199, 1987.
58. Glupczynski, Y, Burette, A. et al.: Campylobacter pylori associated gastritis: a double-blind placebo-controlled trial with amoxicillin. *A.J. Gastroenterol*, 83:365-372, 1988.
59. Bayendorffer, E, Oltenjann, R: The role of antibiotics in Campylobacter pylori associated peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl*, 142:93-100, 1988.

60. Evans, DJ, Jr, Evans, DG, Graham, DY: A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterol*, 96:1004-1008, 1989.
61. Dooley, CP, Cohen, H. et al.: Prevalance of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N. Engl. J. Med*, 321:1562-1566. 1989.
62. Bode, G, malfrertheiner, P, Ditschuneit, H: Pathogenic implications of ultrastructural findings in *Campylobacter pylori* related gastroduodenal disease *Scand. J. Gastroenterol Suppl*, 142: 25-39, 1988.
63. Saulde, M. et al.: Evaluation of an Immunofluorescence Assay for Specific Detection of Immunoglobulin G Antibodies Directed against *Helicobacter Pylori*, and Antignic Cross-Reactivity between *H. Pylori* and *campylobacter Jejuni*. *J. clin. micro*, 29 : 323-327, 1991.
64. O'connor, HJ, Axon, ATR, Dixon, MF. et al.: Effect of duodenal ulcer surgery and enterogastric reflux on *Campylobacter pyloridis*. *Lancet*, 2:1178-1181, 1986.
65. Talley, MJ, Cameron, AJ, et al.: *Campylobacter pylori* and Barrett's ezophagus. *Mayo Clin. Proc*, 63: 1176-1180, 1988.
66. James, AH: Gastric epithelium in the duodenum. *Gut*, 5:285-294, 1964.
67. Ormand, JE, Talley MJ. *Helicobacter pylori*: *Mayo Clin. Proc*, 65:414-426.

68. Godwin, CS: Duodenal ulcer, *Campylobacter pylori* and the «Leaking roof» concept. *Lancet*, 2:1467-1469, 1988.
69. Morris, A, Micholson, G. Loyd, G. et al.: Seroepidemiology of *campylobacter pyloridis*. *M2. Med. J*, 99: 657-659, 1986.
70. Perez-Perez, GI, Dworkin, BM. et al.: *Campylobacter pylori* antibodies in humans *Ann. Intern. Med*, 109: 11-17, 1988.
71. Czun, SY, Dahms, BB. et al.: *Campylobacter*-Like organisms in association with symptomatic gastritis in children. *J. Pediatr*, 109:80-83, 1986.
72. Schaub, N, Stalder, GA. et al.: *Campylobacter pylori* gastritis and ulkuskrankheit. *Schweiz Med. Wochenschr*, 118: 293-301, 1988.
73. Mohammad, A, Moagel, AL. et al.: Irrevalence of *Helicobacter pylori* infection in Soudia Arabia and Comparison of Those with and without upper Gastrointestinal Symptomes. *Am. J. Gastroenterology*, 8:944-948, 1990.
74. Schubert, TT, Schnell, GA: Prevalance of *campylobacter pylori* in patients undergoing upper endoscopy *Am. J. Gastroenterol*, 84:637-642, 1989.
75. Graham, DY, Adam, E, et al.: Comparison of the prevalence of asymptomatic *C. pylori* infection in the united states. Effect of age gender and race. *Gastroenterology*, 96:A 180, 1989.

76. Altın, M, Finci, R. ve ark.: Endoskopik olarak normal ve duodenum ülserli bulbus mukozasında *Campylobacter* ve inflamasyonla ilişkisi. GATA bülteni, 30: 787-792, 1988.
77. Köksal, F, Akan, E, Sandıkcı, M. ve ark.: Üst Gastrointestinal Endoskopi uygulamalarında *Helicobacter pylori* insidansı. Türk Mikrobiyol. Cem.Der, 20 (1-2): 24-31, 1990.
78. Ertugrul, N, Örmeci, N, Tekeli, E. ve ark.: Mide malignitelerinde *Helicobacter pylori* insidansı. Ulusal Gastroenteroloji Kong. Bildiri, 53, 1991.
79. Aydın, F, Koseahmet, F, Bingöl, R, Bakır, T.: Antral Kronik gastritte *Helicobacter pylori* sıklığı. Ulusal Gastroenteroloji Kong. Bildiri, 59, 1991.
80. Cohen, H, Gramisu, M. et al.: *Campylobacter pylori*: Associations with Antral and fundic mucosal histology and diagnosis by serology in patients with upper Gastrointestinal symptoms. Am. J. Gastroenterology, 84:367-371, 1989.
81. Glasjman, M.S, Dallal, MD, S. et al.: *Helicobacter pylori* Related Gastroduodenal Disease in Children Dig. Dis and Scien, 35:993-997, 1990.

EK 1 : 96 Çocuk Hastanın Serumunda Araştırılan Helicobacter Pylori Antikorlarının IFA Sonuçları

Sıra No	Hasta	Yaş Grubu	IFA titresi	Sıra No	Hasta	Yaş Grubu	IFA titresi
1	E.Y.	1 Yaş	1 :32	49	A.M.	5 Yaş	1 :64
2	O.G.	"	1 :32	50	M.K.	6 Yaş	1 :512
3	H.T.	"	1 :64	51	S.A.	"	1 :256
4	B.K.	"	1 :256	52	B.A.	"	1 :512
5	D.T.	"	1 :128	53	Y.O.	"	1 :256
6	K.E.	"	1 :32	54	Ç.H.	"	1 :128
7	F.U.	"	--	55	E.U.	"	1 :256
8	E.D.	"	1 :32	56	Z.E.	"	1 :128
9	R.A.	"	1 :	57	A.ö.	"	1 :128
10	M.Ş.	2 Yaş	1 :64	58	S.K.	7 Yaş	1 :128
11	O.E.	"	1 :32	59	H.K.	"	1 :128
12	M.F.	"	1 :64	60	E.ö.	"	1 :256
13	M.K.	"	1 :32	61	G.C.	"	1 :512
14	M.Y.	"	1 :64	62	A.D.	"	1 :512
15	B.G.	"	1 :	63	Y.B.	"	1 :256
16	i.H.M.	"	1 :256	64	A.S.	"	1 :256
17	N.A.	"	--	65	U.Ü.	"	1 :256
18	Z.K.	"	--	66	T.S.B	"	1 :256
19	E.ö.	"	1 :32	67	E.A.	"	1 :32
20	i.K.	2 Yaş	1 :128	68	F.A.	8 Yaş	1 :128
21	D.Ç.	"	1 :128	69	Ç.D.	"	1 :512
22	S.G.	"	1 :64	70	B.U.	"	1 :128
23	Ü.C.	"	1 :102	71	E.K.	"	1 :128
24	F.Y.	"	1 :	72	O.K.	"	1 :128
25	B.A.	"	1 :32	73	E.Y.	"	1 :32
26	S.N.	"	1 :256	74	Ç.D.	"	1 :32
27	O.D.	"	1 :512	75	Ç.Y.	"	1 :256
28	K.B.	"	1 :32	76	E.Y.	"	1 :128
29	A.B.	"	1 :64	77	Ş.Y.	"	1 :256
30	M.Y.	4 Yaş	1 :128	78	A.E.	9 Yaş	1 :128
31	Ş.T.	"	1 :64	79	R.T.	"	1 :128
32	M.A.	"	1 :64	80	A.B.	"	1 :32
33	D.F.Y.	"	--	81	D.C.	"	1 :256
34	M.A.	"	1 :512	82	K.O.	"	--
35	O.A.	"	1 :64	83	A.S.	"	1 :128
36	S.A.	"	1 :64	84	L.ö.	"	1 :128
37	E.E.	"	1 :128	85	Ş.E.	"	1 :256
38	A.Y.	"	1 :32	86	E.ö.	"	1 :512
39	Y.Y.	"	1 :128	87	O.Z.Y.	"	1 :256
40	ö.K.	5 Yaş	1 :128	88	S.G.B.	10 Yaş	1 :64
41	E.H.	"	1 :64	89	O.M.	"	1 :64
42	F.D.	"	1 :256	90	Ç.O.	"	1 :64
43	A.E.	"	1 :64	91	G.K.	"	1 :512
44	O.K.	"	1 :32	92	E.i.	"	1 :128
45	I.G.	"	1 :64	93	S.K.	"	1 :128
46	C.D.	"	1 :256	94	T.ö.	"	1 :256
47	S.ö.	"	1 :128	95	ö.Ş.	"	1 :64
48	Ü.K.	"	1 :512	96	N.S.	"	1 :256