

T.C.
AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

“*Helicobacter pylori*” TANISINDA FLORESAN İN SİTU
HİBRİDİZASYON İLE DİĞER HIZLI TANI
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE EŞLİK
EDEN KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. BİROL ŞAFAK

AFYONKARAHİSAR 2007

T.C.
AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

“*Helicobacter pylori*” TANISINDA FLORESAN İN SİTU
HİBRİDİZASYON İLE DİĞER HIZLI TANI
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE EŞLİK
EDEN KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Birol ŞAFAK

Danışman: Yrd.Doç.Dr.İhsan Hakkı ÇİFTÇİ

AFYONKARAHİSAR 2007

T.C.
AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı: *Helicobacter pylori* Tanısında Floresan İn Situ Hibridizasyon ile Diğer Hızlı Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Eşlik Eden Klaritromisin Direncinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Arş.Grv.Dr.Birol ŞAFAK

Tez Savunma Tarihi: 12-07-2007

Tez Kabul Tarihi: 12-07-2007

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr.İhsan Hakkı ÇİFTÇİ

İşbu çalışma jürimiz tarafından MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN
Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ

ÜYE
Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE
(Danışman)

ÜYE
Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ

ÜYE
Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

ÜYE
Doç. Dr. Fatma AKTEPE

ONAY
DEKAN
Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım ve uzmanlık eğitimim sÜresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli tez danıŐmanım Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTCİ hocama yardımları için teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE baŐta olmak üzere, uzmanlık eğitimim ve tez çalıŐmalarım sÜresince katkı ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŐ ve Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA'ya teşekkür ederim. Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. F. Hüsniye DİLEK hocama yardımları için teşekkür ederim.

Tezimi alıŐtıđım sürece ve eğitimim boyunca hep yanımda olan anlayıŐı, sevgisi ve sabrıyla beni sürekli olarak destekleyen sevgili EŐime, tüm abalarımın onlar için olduğunun farkında olarak anlayıŐlı davranan çocuklarıma, ilgi ve destekleri ile güç verdikleri ve bana inanıp güvendikleri için Annem, Babam ve KardeŐlerime teşekkür ederim.

Birlikte alıŐtıđım, varlığını her zaman hissettirerek yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalıŐanlarına teşekkür ederim. Ayrıca Patoloji Anabilim Dalı laboratuvar çalıŐanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	IV
KISALTMALAR.....	VII
TABLolar ÇİZELGESİ.....	IX
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ.....	X
I-GİRİŞ.....	1
II-GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TARİHÇE	3
2.2. EPİDEMİYOLOJİ VE BULAŞMA YOLLARI	4
2.3. MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ.....	8
2.4. KÜLTÜR VE ÜREME ÖZELLİKLERİ.....	9
2.5.BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER.....	10
2.6. İNFEKSİYON PATOGENEZİ.....	12
2.6.1. Histopatoloji.....	13
2.6.2. Doku Hasarı Mekanizması.....	13
2.7. TANI.....	22
2.7.1. İnvaziv Metodlar	23
2.7.2. Noninvaziv Metodlar.....	30
2.7.3. <i>Helicobacter pylori</i> İnfeksiyonları Ayrımını Yapan Testler....	33
2.7.4. Tedavi Sonrası Tanı	34
2.8. TEDAVİ.....	34
2.8.1. İlaçlara Direnç	35
2.8.2. Korunma ve Aşı.....	36

III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. <i>Helicobacter pylori</i> stool antijen.....	37
3.2. Kültür İle <i>H. pylori</i> İzolasyonu.....	38
3.3. Agar Dilüsyon Yöntemiyle Duyarlılık Testi.....	39
3.4. Polimeraz chain reaction ile <i>H. pylori</i> Varlığının Tespit Edilmesi.....	40
3.5. Floresan İn situ Hibridizasyon	41
IV. BULGULAR.....	43
V. TARTIŞMA.....	49
VI. SONUÇLAR.....	59
VII. ÖZET.....	60
VIII. SUMMARY.....	61
IX. KAYNAKLAR.....	62

KISALTMALAR

ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Brain Heart Infussion
C	: Karbon
cagA	: Cytotoxin associated gene A
cagPAI	: cag Pathogenicity island
CLO	: <i>Campylobacter</i> Like Organism
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
copA	: Copper transporting P-type ATPase
copP	: Copper ion binding protein
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FDA	: Food and drug administration
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
HP-NAP	: <i>Helicobacter pylori</i> neutrophil-activating protein
HpSA	: <i>Helicobacter pylori</i> stool antijen
HspB	: Heat shock protein B
iceA	: Induced by contact with epithelium A
IMBS	: Immunomagnetic-bead-seperation
İNOS	: Inducible nitric oxide synthase
LPS	: Lipopolisakkarit
MALToma	: Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma

MİK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
NSAİ	: Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar
NO	: Nitrik oksit
oipA	: Outer inflammatory protein A
OOR	: α -ketoglutarate acceptor oxidoreductase
PAF	: Platelet activating factor
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	: Polymerase chain reaction
PFGE	: Pulsed field gel electrophoresis
PG-I	: Pepsinogen I
PG-II	: Pepsinogen II
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
POR	: Piruvate acceptor oxidoreductase
PPI	: Proton Pompa İnhibitörü
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	: Reaktif Oksijen Metabolitleri
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
sabA	: Sialyl Le ^x bağlayan Bakteriyel Adhezin
Th	: T helper lymphocyte
vacA	: Vacuolating cytotoxin

TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo-I	: <i>Helicobacter</i> Türleri ve İlişkili Organizmalar	5
Tablo-II	: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Biyokimyasal Özellikleri	11
Tablo-III	: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin bazı patojenite özellikleri	14
Tablo-IV	: <i>Helicobacter pylori</i> Tanısında Kullanılan Testler.....	24
Tablo-V	: Klinik, Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılım.....	43
Tablo-VI	: <i>Helicobacter pylori</i> Varlığını Gösteren Testler.....	45
Tablo-VII	: <i>Helicobacter pylori</i> Klaritromisin Direnci Oranları.....	48
Tablo-VIII	: Elde Edilen ozitifliklerin Karşılaştırılması ve Korelasyon Analizi.....	48
Tablo-IX	: <i>H. pylori</i> Tanısında Kullanılan Testlerin Karşılaştırılması.....	58

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil-1	: <i>Helicobacter pylori</i> Taksonomisi.....	4
Şekil-2	: <i>Helicobacter pylori</i> ile ilişkili gastrit ve ülser oluşumu	7
Şekil-3	: <i>Helicobacter pylori</i>	9
Şekil-4	: PCR İle Tespit Edilen <i>Helicobacter pylori</i> Varlığının Agaroz Jel Elektroforezinde Gösterilmesi.....	45
Şekil-5	: FISH İle <i>Helicobacter pylori</i> Varlığının Gösterilmesi.....	47
Şekil-6	: FISH İle <i>Helicobacter pylori</i> Negatif Preparat Gösterilmesi	47

I-GİRİŞ

Helicobacter pylori (*H. pylori*), insanların midesine yerleşen spiral şeklinde, Gram negatif, mikroaerofilik bir bakteridir. Bu mikroorganizma vücuda bir defa girdiğinde, tedavi edilmediği takdirde yaşam boyu varlığını devam ettirmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda bu bakterinin mide içerisinde normal flora üyesi olarak bulunduğu iddia edilse de günümüzde yapılan çalışmalar, *H. pylori*'nin lokal inflamasyon ve sistemik olarak da humoral bağışık yanıtı neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle de *H. pylori*'nin normal flora üyesi olamayacağını, patojen bir mikroorganizma olarak kabul edildiğini göstermiştir (1).

Gelişmiş ülkelerde erişkinlerin %50'si, gelişmekte olan ülkelerde ise toplumun %80-90'ı *H. pylori* ile infekte olmaktadır. Genelde antruma yerleşen bu mikroorganizma için yapılan epidemiyolojik çalışmalar; gastrik ülser, duodenal ülser, gastrik Mucosa associated Lymphoid Tissue Lymphoma (MALToma), distal gastrik kanserde *H. pylori*'nin major etyolojik rolünü açıkça göstermiştir (2,3). En önemli geçiş yolu fekal-oral olmak üzere farklı geçiş yolları bulunduğu bildirilmiştir (4).

H. pylori tanısında invaziv ve non-invaziv testler kullanılmaktadır. Serolojik testler daha çok kitle taramalarında ve geçmişteki *H. pylori* enfeksiyonu ile temasın varlığının araştırılmasında kullanılır. Tedavi öncesi histoloji ve kültür, tedavi takibinde ise üre solunum testi daha yararlıdır (4).

Tedavisinde gelişen antibiyotik direnci nedeniyle başarısızlıklar görülmüştür ki bunlardan Klaritromisin direnci, tedavi başarısının etkileyen çok önemli bir faktördür.

Bu çalışmada *H. pylori* tanısında Florösan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ve diğer tanı yöntemlerinin karşılaştırılması yoluyla klaritromisin direnci bakılacak

ve çalışma ile pozitif bulgu veren vakalar kliniklere bildirilerek tedavi protokolunun belirlenmesinde yardımcı olunacaktır.

II-GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

W. Jaworski 1886 yılında insan mide sedimentinde spiral bakteri varlığının farkına varmış ve bunu *Vibrio rugula* olarak adlandırmıştır. Bizzozero 1893 yılında köpek midesinde spiral bir mikroorganizma gözlemiş, 1906'da Krienitz benzer bir bakteriyi mide kanserli bir hastanın midesinden izole etmiş, buna rağmen asitli ortamından dolayı 1979 yılına kadar mide steril kabul edilmiştir (4)

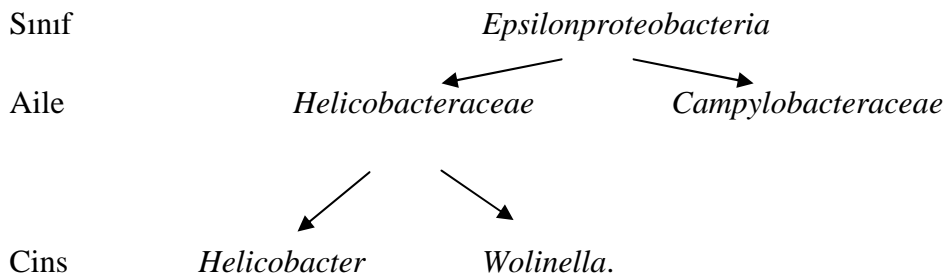
Avustralya'da patolog olarak çalışan Robin Warren, ilk defa 1979 yılında histopatolojik inceleme için gönderilen gastrik biyopsi örneklerinde kıvrık bakterilerin varlığını gözlemiştir. Bu bakterilerin gastrik mukozada olmayıp, dokuyu örten mukus tabakası içinde bulunduğunu saptamıştır (5). Barry Marshall, 1981 yılında Warren ile birlikte izolasyon çalışmalarına başlamıştır. İlk önceleri bu mikroorganizma kıvrık ve gram-negatif bir basil şeklinde olduğu için *Campylobacter* cinsi içinde değerlendirilmiş, bakteriye *Campylobacter pyloridis* adı verilmiştir (6,7). Daha sonra moleküler analizler ile *Campylobacter* genusuna ait olmadığı gösterilmiş ve üreyi güçlü hidroliz etmesi, yağ asidi profilinin farklı olması nedeniyle *Wollinella* cinsine yakınlığı gösterilmiştir (8,9). 1989'da Goodwin ve ark. tarafından *H. pylori* adı verilmiştir (4).

H. pylori infeksiyonunda gastrik inflamasyon (kronik süperfisyal gastrit) ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonu olduğu, yani kronik aktif gastrit oluşturduğu 1984 yılında belirlenmiştir. *H. pylori*'nin etyolojik ajan olarak peptik ülser hastalığındaki rolü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (7). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1994 yılında Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health), *H. pylori*'nin peptik ülser hastalığının başlıca nedeni olduğunu ve infekte olan bireylerin organizmanın eradikasyonu için tedavi edilmesi gerektiğini bildirmiştir (10). *H. pylori* infeksiyonu ile gastrik kanser ilişkisi olduğu yönünde

çalışmalar ilk kez 1991 yılında yayınlanmıştır ve 1994 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün bir dalı olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Cancer Research) *H. pylori*'nin insanlarda karsinojen olduğunu bildirmiştir (11,12). Gastrik nonHodgkin's lenfoma ve gastrik MALToma ile ilişkisi de bulunmuştur. Gastrik MALToma'lı hastalarda *H. pylori* eradike edilince tümörde regresyon görülmüştür (1,13). Günümüze dek çok sayıda araştırmalar yapılmış, farklı tanı yolları bulunmuştur. Warren ve Marshall *H. pylori*'yi ürettikleri; gastrit, ülser ve malignensideki rolünü kanıtladıkları için 2005 yılında Nobel Tıp ödülünü almışlardır (14). Özet olarak, *H. pylori*'nin gastroduodenal dokuyla ilişkili olarak gastritten ülser ve malignansilere kadar pek çok hastalıkta rolü olduğu bilinmektedir.

2.2. EPİDEMİYOLOJİ VE BULAŞMA YOLLARI

İnfekte bireylerin çoğunun 10 yaşından önce mikroorganizma ile tanıştığı bildirilmiştir (15). Dünya üzerindeki tüm bölgelerde yaygın olarak bulunduğu ve insan nüfusunun yaklaşık yarısının *H. pylori* ile infekte kabul edildiği bildirilmiştir. Bir çok çalışmada kadın/erkek enfeksiyon oranının birbirine yakın olduğu ve istatistiksel fark gözlenmediği bildirilmiştir. Sosyoekonomik seviye azaldıkça enfeksiyon oranının arttığı, ayrıca yaşın artışıyla birlikte de enfeksiyon oranında artış gözlendiği bildirilmiştir (9). İnsan midesinden başka *H. pylori* için rezervuar olarak primat ve kedilerde bulunur (16). Helicobacter cinsinin taksonomisi Şekil-1'deki gibidir (2):



Şekil-1: *H. pylori* Taksonomisi

Diğer *Helicobacter* türleri ve bulunduğu rezervuarlar Tablo-I’de özetlenmiştir (8).

Tablo-I. *Helicobacter* Türleri ve İlişkili Organizmalar

	Konakçı	İzole Edildiği Bölge
<i>H. acinonychis</i>	Çita	Gastrik Mukoza
<i>H. bilis</i>	Fare	Safra, Karaciğer, Bağırsak
<i>H. bizzozeronii</i>	Köpek	Gastrik Mukoza
<i>H. canis</i>	Köpek, İnsan	Dışkı
<i>H. cinaedi</i>	İnsan, Hamster	Kan, Rektal Sürüntü (insan), Bağırsak (hamster)
<i>H. felis</i>	Kedi, Köpek	Gastrik Mukoza
<i>H. fennelliae</i>	İnsan	Kan, Rektal Sürüntü
<i>H. hepaticus</i>	Fare	Karaciğer, Bağırsak
<i>H. muridarum</i>	Sıçan, Fare	Bağırsak
<i>H. mustelae</i>	Gelincik	Gastrik Mukoza
<i>H. nemestrinae</i>	Maymun	Gastrik Mukoza
<i>H. pametensis</i>	Vahşi Kuşlar, Domuz	Dışkı
<i>H. pullorum</i>	Tavuk, İnsan	Bağırsak, Karaciğer (tavuk), Dışkı (insan)
<i>H. pylori</i>	İnsan, Maymun, Kedi	Gastrik Mukoza
<i>Helicobacter</i> sp. strain flexispira	Koyun, Köpek, İnsan	Karaciğer (koyun), Mide (köpek), Dışkı (insan)
<i>H. heilmanni</i>	Çita, İnsan	Gastrik Mukoza
CLO-3	İnsan	Rektal Sürüntü

H. pylori’nin bulaşıyla ilgili günümüzde 3 farklı geçiş yolu gösterilmiş olup bunlar:

İatrojenik: Yapılan çalışmalarda kesinliği kanıtlanan bir geçiş yolu olup endoskop tüpü ve biyopsi setlerinin rol oynadığı ancak bu yolla geçiş oranında ciddi azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (17). Yapılan bir çalışmada üst gastrointestinal sistem endoskopisi uygulanan 400 hastadan 128’i hızlı üreaz testiyle *H. pylori* (+) bulunmuş, bunlara yapılan manuel ve dezenfektanlarla temizlik sonrası 1 (%0.8) örnekte üreme tespit edilmiştir (18).

Tüm bu nedenlerle endoskopun etkili dezenfeksiyonu çok önemlidir. Ama öncesinde fırçayla uygun bir mekanik temizlik ve yıkama yapılması gerekmektedir. Sonrasında yapılacak dezenfeksiyon işlemiyle ilgili olarak güncel çalışmalarla, kullanılacak etkili yeni dezenfektanlar bildirilmiştir. Bunlar; 5dk 50⁰C üzeri ısıyla %0.05 Cidex OPA concentrate (%0.55 ortho-phthaldehyde), 10dk 20⁰C'de % 3.4 glutaraldehyde ve % 26.0 isopropanol (Aldahol III high level disinfectant), 5dk 25⁰C ısıda % 8.3 hydrogen peroxide ve % 7.0 peracetic acid (Acecide™ high level disinfectant and sterilant) ve hidrojen peroksidin yerini alan bir sistem olan STERRAD NX system olarak sıralanmıştır (19).

Fekal-Oral: Kusma ve diareli hasta dışkıyla temas sonucu bulaş çok sık görülmektedir. En önemli geçiş yolu olmasına rağmen bakteri atımının aralıklı olması nedeniyle dışkıdan izolasyonun da başarısızlık söz konusudur. Su kaynaklı *H. pylori* geçişi, geçiş döngüsünde önemli bir özellik olarak bildirilmiştir (20).

Oral-Oral: Kadınların yiyecekleri çocuklarına vermeden önce kendilerinin çiğnemesiyle olan bulaş şekli olarak bildirilmiştir (21).

Tüm *H. pylori* infekte hastalarda genelde bulgu vermeyen kronik diffüz süperfisiyal gastrit bulunduğu vurgulanmıştır (8). Ayrıca *H. pylori*'nin etkili olduğu diğer hastalık grubu ülserli hastalardır; duodenum ülserli hastaların % 90'dan fazlası *H. pylori* ile infekte iken bu oran gastrik ülserli hastalarda % 65 olarak vurgulanmıştır (15). Bunun sebebi olarak da mide ülserlerinde NSAİ veya aspirin kullanımına bağlı ülserlerin daha sık gözlenmesi gösterilmiştir (9). *H. pylori* ile ilişkili gastrit ve ülser oluşumu Şekil-2'de özetlenmiştir (4).

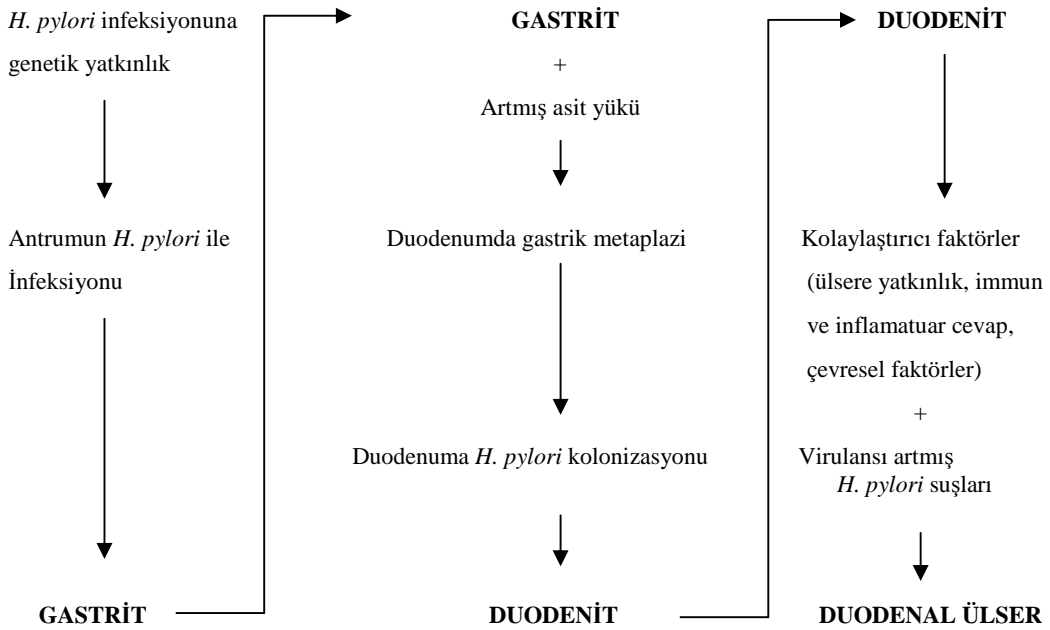
H. pylori varlığı, gastrik kanser prekürsör lezyonu olan atrofik gastrit riski için güçlü birliktelik taşıdığından distal mide adenokarsinoma sıklığıdır (22). Dünyada kansere bağlı ölümlerin 2. en önemli nedeni mide kanseridir (23).

B lenfositlerden kaynaklanan MALToma diye adlandırılan mide lenfoması

ile ilişkisi retrospektif çalışmalarda % 90 olarak belirlenmiştir ve *H. pylori* tedavisinin erken dönem MALToma hastalarının histolojisinde düzelme yapması da bunun kanıtı olarak bildirilmiştir. Ayrıca non-Hodgkin mide lenfomalarıyla da ilişkilendirilmiştir (9). Ayrıca *H. pylori*'nin Menetrier hastalığı yani Hipertrofik Gastrit ile ilgisi olabileceği gösterilmiştir (24,25).

Bir başka çalışmada otitis media ve adenoid hipertrofi bulunan çocuklardan alınan effüzyon ve adenoid biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığına RT-PCR yöntemiyle bakıldığı, 34 hastanın 16'sında (% 47) pozitiflik saptandığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada adenoid doku örneklerinin sadece birinde pozitiflik saptandığı buradan yola çıkarak da adenoid dokunun *H. pylori* için rezervuar olamayacağı vurgulanmıştır (26).

Nadir olarak izole edildiği bölgeler ise mide suyu (duyarlılığı düşük), kan (gastrik lenfomalı bir hastada) ve karaciğer (Wilson hastalığı olan hastada) olarak bildirilmiştir (2).



Şekil-2. *H. pylori* ile ilişkili gastrit ve ülser oluşumu

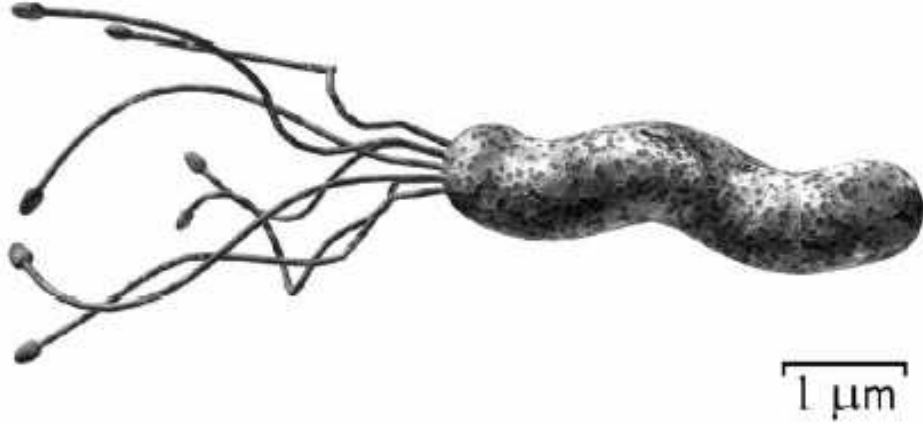
2.3. MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Spiral, kıvrık, Gram negatif hareketli basillerdir (8). *H. pylori*'nin uzamış inkübasyon süresi, havayla temas, alkali ortam, yüksek sıcaklık, antibiyotik ve proton pompa inhibitörleri ile temas sonucunda kokoid şekillere dönüştüğü bildirilmektedir. Elektron mikroskopuyla kokoid form "U" şeklinde basil olarak görülür (27,28). Bazı araştırmacılar, spiral formdan kokoid forma dönüşümün protein sentezi gerektirmeyen pasif bir süreç olduğunu ve bakteriyel hücre ölümünün morfolojik bulgularının gözlemlendiğini belirtirken (29), diğer gruplar kokoid formdaki bakterilerin metabolik olarak aktif olduğunu, bu formun *H. pylori*'nin biyolojik döngüsünün bir parçası olduğunu ya da bakterinin çevre koşullarına adaptasyonu ile ilişkili bir dönüşüm olabileceği görüşünü ileri sürmektedir (30).

H. pylori'nin hücre duvarı diğer Gram negatif bakterilere benzer bir yapıdadır. Mikroorganizmanın büyüklüğü gastrik biyopsi örneklerinde 2.5-5 µm uzunluk ve 0.5-1 µm genişliktedir, 4-6 adet terminal kısmı ampul benzeri bipolar flageli bakterinin motilitesini sağlar (Şekil-3) (31). *H. pylori* dış membranında gastrik epitelyal mikrovillüslere tutunmayı sağlayan glikokaliks benzeri yapı bulunur. Tannik asit ile boyandığında belirginleşen bu yapının; mide biyopsi örneklerinden yapılan incelemelerde glikokaliks tabakanın bakterileri mukoza hücrelerine bağlayan iğsi oluşumların meydana gelmesinde rol aldığı ileri sürülmektedir (32,33).

H. pylori LPS'i, bilinen tüm diğer bakteriyel lipopolisakkaritlere göre daha düşük biyolojik aktiviteye sahiptir (34). Lipid A'nın farklı açılasyon ve fosforilasyon paternleri LPS'in düşük potensine neden olarak gösterilmektedir (35). Ayrıca *H. pylori* LPS O spesifik zinciri Lewis kan grubu antijenleriyle yapısal benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik *H. pylori*'ye immun sistemden

kaçış özelliği vereceği gibi çapraz immün reaksiyon ile patogeneizde rol almasına da neden olabilmektedir (3).



Şekil-3. *H. pylori*

H. pylori dış zar proteinleri HopA, HopB, HopC, HopD ve HopE olmak üzere 5 tip porin molekülünden oluşmaktadır. HopE, *Haemophilus influenza* P2 poriniyle benzerlik göstermekte ve antijenik özellik taşımaktadır (36).

2.4. KÜLTÜR VE ÜREME ÖZELLİKLERİ

Mikroaerofilik şartlarda ürerler; %5 O₂, %75 N₂, % 10 CO₂, % 10 H₂ gazlarından oluşan nemli bir atmosferde inkübe edilmelidir. Aerobik şartlarda bakteri metabolizmasında yaşamsal öneme sahip olan POR ve OOR enzimleri inhibe olmaktadır (37). Laboratuvar pasajları sonrası biraz aerotoleran hale gelirler. Anaerobik şartlarda zayıf ürerler. 30-37⁰C'de ürer, fakat 25⁰C'de üremez (15).

Karmaşık besin gereksinimleri olan bakteriyi üretmek için besiyerine tam kan, hemin, mısır unu, yumurta sarısı gibi zenginleştirici maddeler katılmalıdır (38). BHI agar, Brucella agar, Columbia agar ve Skirrow besiyerleri bu amaçla

kullanılmaktadır. Bunlarda % 5-7 oranında at veya koyun kanı kullanılsa da insan kanının da kullanılabileceği bildirilmiştir (2). Ayrıca besiyerlerine çeşitli antibiyotiklerin ilavesiyle seçiciliğin artırılacağı bildirilmiştir. Bu amaçla besiyerlerine Gram pozitif mikroorganizmalar için Vankomisin veya Teikoplanin, Gram negatif basiller için Polimiksin, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Kolistin veya Sefsulodin, funguslar için Amfoterisin B veya Nistatin ilave edilmelidir (2).

Mide biyopsi örneklerinden ilk izolasyonda 3-4. günde üreme görülse de kültürde üreme olmadı diyebilmek için 7-10 gün beklemek gerektiği vurgulanmıştır. Pasajlanan kültürlerde ise 48-72 saatlik inkübasyon sonucunda üreme görüldüğü bildirilmiş ve küçük S tipi gri-saydam görünümlü koloniler oluşturduğu bildirilmiştir (2).

Kültürde üreyen kolonilerden yapılan Gram boyama, katalaz ve oksidaz pozitifliği, üreaz enzimi içermesinden yararlanılmaktadır (8). Katalaz negatif mutant suşlar olabileceği de bildirilmiştir (2).

2.5. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

H. pylori tarafından kullanılan tek karbonhidrat olan glukozun oksidatif ve fermentatif yollardan metabolize edildiği bildirilmektedir. Pentoz fosfat yolunu kullanarak biyosentez reaksiyonları için NADH ve NADPH oluşturmasının yanında, nükleotid biyosentezi için 5 karbonlu fosforile karbonhidratları da sentezlemektedir (39).

Aerobik ve anaerobik solunum sistemleri bulunduğu ve metabolizmasını sürdürebilmesi için oksijene gereksinim duyduğu bildirilmektedir. Ayrıca *H. pylori*'yi oksidatif hasara karşı koruyan süperoksit dismutaz, katalaz ve alkilhidroperoksit redüktaz enzimlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak yine de normal atmosferik oksijen konsantrasyonların da bakterinin metabolizmasında

yaşamsal öneme sahip POR ve OOR enzimlerinin inhibe olduğu bildirilmektedir. Bu sebeple *H. pylori*'nin metabolik aktivitesi ve yaşamını sürdürmesi için mikroaerofil atmosfere gerek duyduğu vurgulanmıştır (37).

H. pylori yüksek miktarlarda üreaz sentezlemektedir. Yapısında nikel bulunan bir metalloenzimdir ve protein yapıdadır. Üreaz üreyi amonyak ve karbondioksite parçalayarak bakteri çevresinde asiti nötralize eden amonyum bulutu oluşturmakta, böylece mide asidinden kendini korumaktadır. Bu nedenle üreaz enziminin kolonizasyonda önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir (40). *H. pylori* üreazının diğer bakteri üreazlarından farkı; hem sitoplazma hem de hücre yüzeyinde bulunması, asidik şartlarda daha yüksek substrat afinitesi ve 3 alt ünitelerden oluşan diğer üreazların aksine UreA ve UreB olmak üzere 2 alt ünitelerden oluşması olarak gösterilmiştir (41,42).

Biyokimyasal özellikler Tablo-II'de özetlenmiştir (8,15).

Tablo-II. *H. pylori*'nin Biyokimyasal Özellikleri

Biyokimyasal Reaksiyon	Özellik	
Oksidaz	Pozitif	
Katalaz	Pozitif	Midede ve fagositler içinde vakuollerde yaşayabilme
Üreaz	Pozitif	Midede pH'yı alkalileştirerek asitten korunma ve yaşayabilme
Hippurat Hidrolizi	Negatif	<i>Campylobacter jejuni</i> 'den ayırım
Gama Glutamil Transpeptidaz	Pozitif	Diğer Helikobakter türlerinden ayırım
Nitrat Radüksiyonu	Negatif	Kampilobakterlerden ayırım
Sefalotin	Duyarlı	Kampilobakterlerden ayırım
Nalidiksik Asit	Dirençli	
TSİ ağarda H ₂ S Yapımı	Negatif	Kampilobakterlerden ayırım

2.6. ENFEKSİYON PATOGENEZİ

Mide mukozasına özgül olan bu bakterinin kolonizasyonu için özellikle antral mukoza uygundur ve burada mukus tabakasına yerleşir. *H. pylori*'nin kronik süperfisiyal gastrite neden olduğuyla ilgili geniş kanıtlar vardır (43,44). Mide mukozasının diffüz inflamasyonu olan gastrit bilinen bir etkene bağlı olarak ortaya çıkmışsa ve etkenin uzaklaştırılması ile hızla düzeliyorsa akut gastrit söz konusudur. Genellikle antrumun tutulduğu bu durumda ödem, konjesyon, nekroz ve erezyonlar görülür. Mononükleer hücrede artış, atrofi, metaplazi saptanmaz. Sıklıkla alkol, ilaç gibi toksik maddelerin alımıyla gelişen bu durumda nadiren etyoloji *H. pylori*'dir. Kronik gastrit ise etyoloji ve virulansın yanı sıra, kişinin genetik olarak belirlenmiş immun yanıtına ve çevresel faktörlere bağlı heterojen bir kimliğe sahiptir (45). Otoimmün tip gastritte inflamasyon bölgesi fundus olup, tutulum diffüzdür (TipA Gastrit). Buna karşın etyolojik olarak vakaların %95'inden fazlasında *H. pylori*'nin sorumlu olduğu dış etkenlere bağlı gastritte ise antral mukoza tutulur (TipB Gastrit) (46).

H. pylori, gastrik mukozal D hücrelerinden somatostatin salımını azaltırken, bakterinin stimulan etkisiyle G hücrelerinden gastrin salınmasını artırır. Salgıladığı üreaz enzimi de lümeninde pH'ı yükselterek gastrin salınmasını dolayısıyla asit salgısını artırmaktadır (47). *H. pylori* enfeksiyonu ve duodenal ülseri olan hastalarda serum PGI düzeylerinin azalması ve PGII düzeylerinin artmasıyla PGI/PGII oranının küçülmesi *H. pylori* enfeksiyonları için belirleyici kabul edilmektedir (48).

H. pylori'nin peptik ülser oluşturma mekanizmalarından en önemlisi, hipergastrinemi yaparak mide asit salgısının artışına neden olması olarak gösterilmiştir (47). *H. pylori* ile peptik ülser arasındaki ilişkiyi kanıtlayan en önemli bulgulardan biri olarak *H. pylori* eradikasyonundan sonra peptik ülser

iyileşme oranının çok yüksek ve nüks oranının çok düşük olarak bulunması gösterilmiştir (49).

H. pylori'nin midede normalde bulunmayan lenfoid doku ve foliküllerin oluşumuna (MALT) yol açarak bu neoplastik gelişimin köken aldığı hücrelerin bulunduğu dokunun gelişimi ile lenfoma patogeneğinde ilk ve en önemli işlevi gördüğü bildirilmiştir (50).

H. pylori'nin bazı patojenite özellikleri Tablo-III'de özetlenmiştir. (4,15)

2.6.1. Histopatoloji

H. pylori çok yaygın olarak kronik süperfisiyal gastrit ile birlikte. Bu pattern, epitelin nötrofilik infiltrasyonu ile ilişkili olarak mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile karakterizedir ve metaplazik değişim, granülom ve fundus atrofisiyle ilişkisi yoktur. İnflamasyon miktarı değişkendir, lamina propria minimal infiltrasyonu vardır. Ortak olarak görülen dejeneratif değişiklikler; münis azalması, sitoplazmik vokuolizasyon, PMNL artışı ve mukozal gland değişikliklerdir. Tedavi bitiminden 4 hafta sonra yapılan kontolde bu bulguların hızla kaybolduğu, buna rağmen mononükleer hücrelerin birkaç ay görülebildiği vurgulanmıştır (51).

2.6.2. Doku Hasarı Mekanizması

2.6.2.1. Gastrik İnflamasyon İndüksiyonu

H. pylori ile infekte hastalar değişmez olarak süperfisiyal gastrit ile karakterizedir ki bu da gastrik mukozanın PMNL ve/veya mononükleer hücre infiltrasyonu ile gerçekleşir. Gastrik mukozanın inflamasyonu, *H. pylori*'nin *in vivo* yaşamını sürdürmesi için oldukça önemlidir (3).

Tablo III-H. *pylori*'nin bazı patojenite özellikleri

Özellik	Etki
Spiral şekil	Mukus içinde motiliteyi sağlar.
Kamçı (Flajel)	Hareketin etkin oluşunu sağlar.
Lipopolisakkaritler; GM3 gangliozid ve Lewis B antigenlerine özgül bağlanmayı sağlar.	Gastrik mukus sekrete eden hücrelere selektif kolonizasyon
Üreaz A ve B	Gastrik ortamda yaşam sürdürme (bazı deneysel çalışmalarda amonyağın epitel hüresine toksik etkisi gösterilmiş)
Katalaz	Gastrik ortamda ve muhtemelen de fagositik vakuollerde (H ₂ O ₂ 'den korunarak) yaşama
Fosfolipaz A ve B	Mukusun epitelial hücre membranını sindirimi, mukus ıslaklığının artışı
Proteaz	Mukusun ve epitelial hücre membranını sindirimi, mukusun eriyebilirliğinin artışı.
<i>vac A</i>	Epitel hücresi zararlanması
Düşük molekül ağırlıklı kemoatraktif proteinler(porinler)	Nötrofil ve mononükleer hücreleri kendine çekerek reaktif oksijen bileşikleri ve interlökinlerin salınması
<i>cag A</i>	Hücre iskeletini bozmak, Tip IV sekresyon sisteminin bağlanması ve peptik ülserle ilişkili olduğu düşünülüyor.
Hsp A ve B	Otoimmünitede rol oynar.

2.6.2.1.1. IL-8

Potent inflamatuvar mediyatör olan IL-8'in nötrofil aktivasyonu yaptığı bilinmektedir. *H. pylori* infeksiyonlarında IL-8'in rolünün araştırıldığı çalışmalarda bakterinin yerleşimi için gerekli olan tipik inflamatuvar cevapların IL-8 tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Ayrıca *H. pylori*'nin IL-8 sekresyonuna neden olduğu ve IL-8'in yüksek miktarda salgılanması ile gastrik mukozal hasar arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir (3,52).

2.6.2.1.2. babA

H. pylori infeksiyon sürecinde ilk olarak bakterinin adezyonu ve daha sonra proinflamatuvar sitokin salınımı gerçekleşmektedir. *babA*₁, *babA*₂ ve *babB* olmak üzere 3 farklı alleli bulunduğu bildirilmiştir. Protein yapıda olan *babA*'nın gastrik epitel Lewis^b (α -1,3/4 difucosylated) kan grup antijenleri epitoplarına bağlanarak mide adenokanseri, peptik ülser ve gastrit oluşumunda rol aldığı bildirilmiştir. *babA*₁ ve *babA*₂ olmak üzere iki tipi vardır ki bunlardan *babA*₂ diğer patojenik genlerle korele olarak bulunur. *babA*₂'nin sadece Lewis^b antijenine bağlanınca üretildiği gösterilmiştir (44,53).

2.6.2.1.3. Nötrofil Adherensi

Diğer adhezin faktörü olan ve bakterioferritin ailesiyle homolog olan HP-NAP proteini nötrofil adherensine neden olur (3,44).

2.6.2.1.4. PAF

Fosfolipid yapıda mediatördür ve ülserojenik ajandır. Bazal şartlarda ve gastrine cevap olarak LysoPAF yapılır. PAF, parietal hücre reseptörleri aracılığıyla gastrik asit salınımını stimule eder. Nonülserojenik olan prekürsör LysoPAF, PAF'a döner. PAF asit sekresyonu artışıyla mukozal hasar yapar (3).

2.6.2.1.5. LPS

H. pylori LPS'i bakteri-konakçı arasında etkileşimde rol oynar. *H. pylori* LPS'i, mukozal reseptör ve müsin arasında etkileşim ile gastrik mukus tabakasını bozar (1). Ayrıca bakterinin immun yanıtı kaçmasını sağlar (8).

Lipid A, O antijenik polisakkarid bölge ve core polisakkaridi olmak üzere 3 bölgeden oluşur ki bunlardan Lipid A'nın farklı açılasyon ve fosforilasyon paternleri bilinen tüm diğer bakteriyel lipopolisakkaritlerden daha düşük güce

sahip olmasına neden olarak gösterilmektedir (34,35,44). Ayrıca *H. pylori* LPS O spesifik zinciri Lewis kan grubu antijenleriyle yapısal benzerlik göstermektedir. Bu benzerliğin *H. pylori*'ye immun sistemden kaçış özelliği vereceği gibi çapraz immün reaksiyon ile patogeneizde rol alabilmesine de neden olduğu ve atrofik gastrit oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca H⁺/K⁺ pompasına etkisiyle kronik gastrit gelişimine katkıda bulunduğu belirtilmiştir (44). Tüm bunların dışında bakterinin adezyonunu güçlendirdiği, bakteriyel agregasyonu artırdığı ve bakteri-konakçı arasındaki antijen-antikor etkileşiminde rol oynadığı bildirilmiştir (54).

2.6.2.1.6. Üreaz

Temel kolonizasyon faktörü olan üreaz tüm *H. pylori* suşlarında bulunur. Farede kolonize olamayan üreaz negatif mutant suşlar aracılığı ile bir kolonizasyon faktörü olduğu gösterilmiştir (3). Hipoklorhidri durumunda *H. pylori*'nin kolonize olamadığı gözlenmiştir (44). Sentezlediği yüksek miktar üreaz, yapısında nikel bulunan bir metalloenzimdir ve protein yapıdadır. Üreaz üreyi amonyak ve karbondioksite parçalayarak bakteri çevresinde asiti nötralize eden amonyum bulutu oluşturmakta, böylece mide asidinden kendini korumaktadır. Bu nedenle üreaz enziminin kolonizasyonda önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir (40). Ayrıca oluşan amonyum barsak içinde toksik etkiyle DNA sentezini bozarak viral infeksiyon riskini artırır ve karsinojenik etki yapar (44). *H. pylori* üreazının diğer bakteri üreazlarından farkı hem sitoplazma hem de hücre yüzeyinde bulunması, asidik şartlarda daha yüksek substrat afinitesi ve 3 alt üniteden oluşan diğer üreazların aksine UreA ve UreB olmak üzere 2 alt üniteden oluşması olarak gösterilmiştir (41,42). Ayrıca *H. pylori*'nin üreaz aracılığıyla MHC II'ye bağlanarak mide mukoza apoptozisini artırdığı yönünde görüş bildirilmiştir (44).

2.6.2.2. Gastrik Mukozal Bariyerin Bozulması

2.6.2.2.1. Fosfolipaz

PAF yapımında fosfolipaz A₂ aracılığıyla gliserofosfolipid membrandan araşidonik asit salımı anahtar basamaktır, bakteriyel inflamasyonda başlangıçtaki inflamatuvar mediatördür. Fosfolipaz A₂ ve C salarak mukus hücresinin apikal membranındaki fosfolipidden zengin koruyucu tabakayı bozduğu bildirilmiştir (3,55).

2.6.2.2.2. Müsinaz

Vibrio cholerae'nin müsinaz geniyle hemen hemen aynı olan bu özellik aracılığıyla gastrik mukozal bariyeri bozduğu bildirilmektedir (3).

2.6.2.2.3. *vacA*

H. pylori izolatlarının tamamına yakınında *vacA* geni bulunur ancak izole edilen suşların yaklaşık yarısı *vacA* yapar. Bu sitotoksin hücrenin sitoplazmasında asidik vakuol oluşturur ki bu da hücre ölümüne neden olur. *vacA* en şiddetli vakuolizasyona *H. pylori* üreazı varlığında neden olur. *Neisseria gonorrhoeae*'nin IgA proteaz prekürsörünün C terminal fragmanı ile homolog, sitotoksin salımından sorumlu C terminal fragmanı vardır. Bu toksini üreten suşlarla infekte kişilerde gastritten daha sık olarak peptik ülser ve kanser görüldüğü bildirilmektedir (43,56). Vakuol oluşumundan başka antijen sunumunu bozduğu, epitelyal hücrelerde permeabilite artışına neden olduğu ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (44).

Mozaik bir yapıya sahip olan *vacA* geninin farklı suşlarda yapılan dizi analizlerinde 5' ucunda yer alan ve amino terminal sinyal dizisini kodlayan bölgenin s1 ve s2, orta bölgenin ise m1 ve m2 genotiplerinin bulunduğu gösterilmiştir. *vacAs1* genotipindeki *H. pylori* suşlarında diğerlerine göre daha sıklıkla *cagPAI* bulunduğu ve daha fazla epitelyal hücre hasarına yol açtığı, s2

genotipindeki toksin molekülüne sahip olanların ise göreceli olarak düşük toksik etki gösterdikleri bildirilmektedir. m2 tip toksin molekülünün mide adenokarsinom hücrelerinde vakuolizasyona yol açtığı gösterilmiştir. Üretimi ve aktivitesi en yüksek *vacA* genotipinin s1m1 olduğu bildirilmektedir (44).

2.6.2.2.4. ROS

H. pylori, gastrik mukozada ROS sentezine neden olur. ROS yapımının, *H. pylori* infeksiyonuyla gastrik mukozal hasar arasında pozitif ilişki oluşturduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca *cagA* pozitif suşlarda daha yüksek düzeylerde reaktif oksijen metaboliti saptandığı bildirilmiştir. Sigara, ilaç ve alkol ROS yapımını etkileyen diğer faktörler arasında gösterilmiştir. DNA hasarına neden olan serbest O₂ radikali için marker olan 9-hydroxydeoxyguanosine seviyesinin infekte ve risk faktörlerine sahip bireylerde arttığı gösterilmiştir (44,57).

2.6.2.2.5. İNOS

NO, lökosit adezyonunu önleyerek ve kan akımını artırarak mide mukozasını korumaktadır. Normal mide mukozasında İNOS salgılanmadığı ama *H. pylori* ilişkili gastrit varlığında sekresyonunun arttığı belirtilmiştir (44).

2.6.2.2.6. Apoptozis

H. pylori'nin, gastrik epitel hücrelerinin programlı hücre ölümüne (apoptozis) ve oksidatif DNA hasarı stimülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (57). Gastrik epitel hücre migrasyonu ve proliferasyonunun inhibisyonu şeklinde gerçekleşen bu etkinin mukoza hasarı yaptığı bildirilmiştir (3).

2.6.2.2.7. *cagA*

cagA, *vacA* ile birlikte eksprese edildiğinden bu adı alır. Tip I izolatlar *cagA* ve *vacA* eksprese etmekte ve hücrelerde vakuolizasyona neden olmaktadır, bunlar şiddetli gastroduodenal hastalığı olan kişilerden izole edilmişlerdir . Tip II

izolatların ise *cagA* geni içermediğinden kromozomlarında *vacA* geni bulunsa da vokuolizasyon yapmadıkları belirtilmektedir (58). CagA'nın hücre içine girişini sağlayan TipIV sekresyon sistemini *cagPAI* kodlar. Bu patojenite adası olan suşların peptik ülser, MALT lenfoması ve mide adenokarsinomu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu virülen suşlar tutundukları mide epitel hücrelerinde mikrovillüslerin silinmesine neden olmaktadır (44).

Ayrıca *cagPAI* adacığında bulunan diğer gen *cagE*, kısmi TipIV sekresyon yapar. *cagE* pozitifliği ile duodenal ülser bulunması arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (44).

2.6.2.2.8. *iceA*

vacA üreten, *cagPAI+* *H. pylori* suşları ile infekte birçok bireyde peptik ülser gelişmediği, bunların asemptomatik kaldığı gözlenmiştir. Bu da peptik ülser gelişiminde başka faktörlerin rol oynayabileceğini akla getirmiştir. İnsan gastrik mukozasına adhere olduğunda indüklenen, peptik ülserli hastalardan izole edilen suşlarda bulunan bir gen olduğu bildirilmiştir (59). Yeni keşfedilen ve tüm ayrıntıları henüz bilinmeyen *iceA1* ve *iceA2* olmak üzere iki varyantının bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca son çalışmalarda *iceA1*'in epitele temasla indüklendiği ve peptik ülserle arasında güçlü bir ilişki olduğu vurgulanmıştır (60).

2.6.2.2.9. *oipA*

H. pylori'nin adherensinde dolayısıyla virulansında rol oynayan *oipA*'nın fonksiyonel olarak peptik ülser hastalığının göstergesi olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir. *oipA*'nın bu fonksiyonuyla gastrit (nonfonksiyonel *oipA*) ve duodenal ülser (fonksiyonel *oipA*) ayrımı yapılabildiği gösterilmiştir (61).

2.6.2.3. Gastrik Hemostaz Değişikliği

Antrumda lokalize olan *H. pylori*'nin uyarıcı etkisiyle ve parietal hücrenin gastrine yanıtı azaldığından hipergastrinemi oluşabildiği gözlenmiştir. *H. pylori*

infeksiyonu ve duodenal ülseri olanlarda PGI ve II düzeylerinde de artış olduğu bildirilmiştir (3,4).

2.6.2.3.1. Motilite

Temel kolonizasyon faktörü olduğu ve tek uçtan çıkan 2-6 adet kılıflı, lofotriköz görünümünde flagelleriyle hareket ettiği bildirilmiştir. A ve B olmak üzere 2 tip olan flagellerinin her ikisinin birlikte bakterinin net hareketini ve kolonizasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Hareketle ilgili istisnai durum olarak bildirilen bir çalışmada domuz yavrularında hareketsiz *H. pylori* variantlarına rastlandığı bildirilmiştir (3).

2.6.2.3.2. Katalaz ve Superoksid Dismutaz

İntrasellüler mikroorganizmalarla, *H. pylori*'nin katalaz ve superoksid dismutaz aktivitesi homologdur. Bu aktivitenin fagositlerin öldürmesine karşı direnç oluşturduğu düşünülüyor (14). Ayrıca katalaz aktivitesinin *cagA*+ suşlarda yüksek seviyelerde bulunduğu, bu enzimin supresyonuyla DNA hasarının arttığı vurgulanmıştır (44).

2.6.2.3.3. HspB

HspB salınması üreaz aktivitesini artırır (3). Diğer risk faktörleri çıkarıldığında koroner kalp hastalığı riskini 1.9 kat artırdığı görülmüş, ancak bu bilgi giderek destek kaybetmektedir (62).

2.6.2.3.4. P-type ATPase

Cd^{+2} ve Cu^{+2} ATPase ile homolog olan *copA* ve *copP* bulunduğu, bunlardan *copA*'nın herbirinde H1-8 arası 8 transmembran bölgeler içerdiği bulunmuştur. Transmembran bölgelerin ATP bağlamada ve fosforilasyonda rol oynadığı bildirilmiştir (63). Proton pompa inhibitörlerinin bakterisidal etkisinin hedefi ATPase'dir (3).

2.6.2.4. Bakteriyel Adhezinler ve Hücrese Reseptörler

H. pylori'nin içerdiği hemaglütininler sayesinde adherens yaptığı ve hemaglütinin titresıyla gastrik epitel hücrelerine adhere olması arasında korelasyon bulunduğu gösterilmiştir (64). Fosfotidiletanolamin ve gangliotetraosilseramid, mide mukozasında *H. pylori* adhezinleri için lipid reseptörlerdir (65).

H. pylori'nin Lewis kan grup antijenleri aracılığıyla mukus hücresine yapıştığı gösterilmiştir. A ve B kan grubunda fucosylated reseptörü olmadığından adhezyonda bu kişilerde yapışmada kan grubu antijenlerinin rolunun olmadığı, O kan grubunda ise peptik ülser riskinin yüksek oluşunun bu reseptör varlığı ile açıklandığı çalışmalar bildirilmiştir (65).

Eksternal polisakkarit tabaka, *H. pylori* adherensinde rol oynar (3). Ayrıca dış membran proteini olan, *sabA* varlığı gösterilmiştir (66).

2.6.2.5. *H. pylori*'ye İmmunolojik Yanıt

H. pylori infeksiyonu konakta sistemik özgül ve özgül olmayan bir dizi yanıt oluşmasına neden olur. Bakteriye karşı nonspesifik savunma mekanizmaları mukus, sindirim enzimleri, lizozim, laktoferrin ve oral kavite ile midedeki diğer antimikrobiale komponentlerdir. *H. pylori* midenin mukus bariyerini, spiral yapısı ve flagellası ile geçerek mide mukozasına ulaşmayı başarır. *H. pylori* mide mukozasına ulaşınca, epitel hücrelerinin birbirine temas ettikleri birleşim bölgelerine tutunur. Serbest kalan bakteriyel antijenler, kemotaksinler ve diğer komponentler özellikle PMNL ve makrofajları aktive eder. Daha sonra IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- β salgılanır. *H. pylori* antijenleri olgunlaşmamış B lenfositlerine sunulur. İlk antikor yanıtı IgM şeklindedir. Daha sonra IgA ve IgG antikorları salgılanır. IgM birkaç ay içinde kaybolur. IgA ise mide mukozasındaki lokal yanıtın bir parçasıdır ve *H. pylori*'nin mide epiteline yapışmasını önler. Sistemik antikor yanıtının en önemli komponenti olup daha duyarlıdır. IgG ve özellikle de

IgG₁ kompleman fiksasyon ve aktivasyonda rol oynar. Kısa ömürlü olan IgG₂ ve IgG₄ yanıtları yeni bir infeksiyon lehine değerli bir bulgudur. *H. pylori* eradikasyonu sağlanırsa hem IgG hem de IgA düzeyinde azalma gözlenirken, eradikasyon sağlanamasa bile antijen yükü ile alakalı olarak IgA düzeyinde düşüş gözlenir (4,9).

H. pylori infeksiyonunda Th lenfositler artar. Aktive edilen T lenfositler kronik inflamasyonun genişlemesine neden olur. İnflamasyon kontrol altına alınmazsa devamlı epitel hasarı ile atrofik gastrit gelişir (4).

2.6.2.6. İmmun Kaçış

H. pylori hücre duvarının major yapı taşı LPS'tir. *H. pylori* LPS'i diğer Gram negatif bakterilerin LPS'lerinden farklılık gösterir. *H. pylori* LPS'inde lipid A bulunmaz. Böylece endotoksin aktivitesini yitiren LPS'in antijenik gücü diğer Gram negatiflere göre daha düşüktür. Ayrıca O spesifik zincirde yer alan tekrarlayan Lewis tipi (Lewis x ve Lewis y) karbonhidrat antijenleri insan eritrosit ve mide mukoza hücrelerinin yüzeyinde yer alan Lewis antijenleri (Lewis a ve Lewis b) ve O grubu insan eritrositlerindeki H-1 antijenleri ile yapısal olarak homologdur. Bu özellikler, kronik kolonizasyona ve immün toleransa yol açar (9). LPS'e karşı antikor oluşursa, çapraz reaksiyon ile mide mukoza hücrelerine karşı da antikor oluşur. Böylece kompleman aktivasyonu ve fagositik hücre stimülasyonu ile inflamasyona katkıda bulunarak gastrik epitel hücrelerinde hasarı artırır (51).

Kokoid forma dönmesi de immün kaçış da rol alabilir. Her ne kadar kokoid forma uzamış kültürlerde döndüğü bildirilse de Chan ve arkadaşları insan gastrik mukozasında da kokoid forma döndüğünü göstermiştir (67).

2.7. TANI

H. pylori infeksiyonlarında tedaviye yönelik tanı, *H. pylori* Avrupa çalışma grubunun Maastricht toplantılarında karara bağladığı ve 2005 yılında

modifiye edilen tanı tedavi rehberinde belirlenmiştir. Bu yeni düzenlemeye göre enfeksiyonun sık görüldüğü bölgelerde 45 yaş altındaki hastalarda kanama, kusma, iştahsızlık, anemi ve kilo kaybı gibi alarm semptomlar yoksa, tanı değeri çok önemli olmakla beraber pahalı ve zaman alıcı olması sebebi ile üst GİS endoskopi bazlı invaziv testler yerine, dışkıda *H. pylori* antijenlerinin araştırıldığı veya nefesde işaretli CO₂ moleküllerinin ölçüldüğü üre nefes testleri gibi non-invaziv testler önerilmektedir. Ancak endemik bölgelerde veya alarm semptomların görülmesi halinde üst endoskopik girişim ve bununla ilintili olan biopsi bazlı invaziv testler önerilmektedir (68). Ayrıca *H. pylori* tanı testlerinden bazılarında kantitasyonun da mümkün olduğu, bunların kültür, histoloji, PCR ve üre nefes testi olduğu vurgulanmıştır (2). Tanıda kullanılan testler Tablo-IV’de özetlenmiştir (4.69)

2.7.1. İnvaziv Metodlar

Endoskopide *H. pylori* ilişkili gastriti olan birçok hastada gastrik mukoza normal görünür. Sıklıkla yama tarzı inflamasyon yapması nedeniyle endoskopik örneklerden yapılan biopsi, kültür ve hızlı üreaz testlerinden yanlış negatif sonuç alınabilir. En az 2 biopsi örneği pilordan 5 cm aralıklarla alınmalıdır (70). Özellikle midenin insisura angularisinden alınan örneklerde % 100 duyarlılık bildirilmiştir (71). Antral nodülerite ve komplike olmayan duodenal ülser hastalığında hemen hemen daima *H. pylori* enfeksiyonu bulunmuştur (72). Endoskopide bu görünümle karşılaşıldığında test yapmaya gerek olmadığı bildirilmiştir (3).

Tablo-IV. *H. pylori* Tanısında Kullanılan Testler

Metod	Örnek	D (%)	Ö (%)	PPD (%)	NPD (%)	Yorum
Hızlı serolojik	Serum	95	85	91	98	Kalitatif 10 dk. da sonuç
ELISA	Serum	95	95	96.8	100	Antikor titrasyonunu gösterir, tedavi sonrası her zaman Ak düşüşü çabuk olmaz (12-18 ay) ve bu devam eden enfeksiyonu da gösterebilir.
	Mide sıvısı	95	100			
	Dışkı	95	95			
Üre nefes testi	Nefes	95-98	95-98	100	100	C ₁₃ 'de radyasyon yok, pahalı. C ₁₄ daha ucuz, daha basit.
CLOtest	Mide biyopsi	90-95	98	100	87.5	20 dk.da sonuç alınabilir.
Histoloji (Giemsa, HE)	Mide biyopsi	98	98	99.2	94.5	Basit ve oldukça kesin, tekrarlanabilir.
Kültür (biyopsi)	Mide biyopsi	90-95	100	100	97.7	Uzun sürer, pahalı.
Kültür (dışkı)	Dışkı	30-50	100	100	96	Araştırma amaçlı yapılıyor.
PCR	Mide biyopsi	95	95	100	97.7	Araştırma amaçlıdır, yalancı pozitiflikler göz önüne alınmalı.
PCR	Dışkı	65	75	93	27	
HpSA	Dışkı	97	99	100	96	Dışkıda <i>H. pylori</i> antijenini saptayan ELISA testidir.

D: Duyarlılık Ö: Özgüllük PPD: Pozitif prediktivite değeri NPD: Negatif prediktivite değeri

2.7.1.1. Kültür

Gastrik biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin seçici veya seçici olmayan besiyerlerinde üretilmesi tanıda altın standarttır. Bu yöntem en standart, en özgül ve oldukça duyarlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (1,8). Ancak bu yöntem, örneğin sayısı veya büyüklüğü, örnekdeki bakteri miktarı, örneğin transport şekli, transport süresi, kullanılan besiyerleri ve inkübasyon şartları ile çalışan personelin tecrübesine dayanarak değişken duyarlılık gösterir. Optimal şartlar sağlandığında duyarlılık ve özgüllük sırası ile % 95 ve % 100 olarak bildirilmiştir (2,68).

Hastadan alınacak örneklerin kemoterapotik kullanımına başlanmadan önce alınması, özellikle PPI'nin endoskopiden en az 2 hafta önce kesilmiş olması gerektiği bildirilmiştir (2). Ancak örneklerin ekimi için gecikme söz konusu olursa transport vasatları kullanılması önerilmektedir. Kısa süreli (4 saatten az) transportlar için tuzlu su kullanılabilir, eğer kültür gecikecek ise Stuart's Medium veya Brain Heart Infusion Broth kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Stuart's Medium'da +4°C'de 24 saat yaşayabildiği gösterilmiştir (2,68).

Kültür için antrumdan alınan tek biyopsi örneğinin tanıda duyarlılığının iyi fakat yeterli olmadığı, yama tarzı enfeksiyon yapması nedeniyle antrumdan çoklu biyopsi örneği alınmasının daha uygun olacağı görüşü bildirilmiştir. Ayrıca nadir de olsa corpusda da enfeksiyon yapabileceğinin akılda tutulması gerektiği, özellikle PPI tedavisi sonrası sadece corpusda pozitiflik kalabileceği vurgulanmıştır (2).

Zenginleştirilmiş antibiyotik katkılı besiyerlerinde, nötral pH'da, %5 CO₂'li ve %96-100 nem oranına sahip atmosferde 35°C'de 3-4 günde üreyebilir. Ancak üreme için optimal 7 gün beklenmesi önerilir. İlk izolasyon % 5-7 tercihan % 10 at veya koyun kanı ve Vankomisin, Trimetoprim, Amfoterisin B, Sefsulodin gibi antibiyotik ilaveli BHI agar, Brusella agar, Columbia agar gibi non selektif besiyerlerinde yapılabilir. Küçük şeffaf su damlası şeklinde koloniler oluşturduğu bildirilmiştir. Besiyerinden hazırlanan preparatlarda Gram negatif kıvrık, virgül şeklinde görünür. Oksidaz, katalaz ve üreaz pozitifliğine bakılır. İzole edildikten sonra agar dilüsyon, E test veya disk difüzyon testlerinden bir veya ikisi kullanılarak antibiyotik duyarlılığına bakılması önerilmiştir (2,8). Broth mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık çalışmaları bildirilmiştir (73). Üretilen suşların -70°C'de skim-milk veya %15-20 gliserol içeren BHI broth besiyerinde saklanabileceği ancak bu işlemle bakterilerin kaybedilebileceği, bakterinin canlılığını sürdürebilmesinin +4°C'de liyofilize vialerde saklanması ile mümkün olabileceği bildirilmiştir (1,2).

Kantitatif kültür ekimleri yapılabileceği de bildirilmiş ve bu konuda yapılan çalışmalarda bakteri yükü $5-10^5$ cfu/mg olarak ifade edilmiştir. Yüksek sayıda bakteri yükü antrumdan alınan örneklerden elde edilmiştir. Bakteri yükünün yüksek olmasının bakteriyel virulans faktörleri (*cagA*, *vacA-s1m1*), gastrik inflamasyon, duodenal ülserasyon ve patogeneizde temel rol oynadığı bildirilmiştir. Ancak kantitatif kültürün pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle semikantitatif kültürün daha yaygın olarak kullanıldığı vurgulanmıştır. Ayrıca benzer özellikte başka bakteriler de kültürde üreyebileceğinden, pozitif sonuçların moleküler metodlarla doğrulanması gerektiği bildirilmiştir (2).

Nonendoskopik yolla elde edilen dışkı, diş plakları, tükürük, su ve gıda gibi örneklerden yapılan kültür çalışmalarıyla izolasyon oranının %10'u geçmediği bildirilmiştir (68).

2.7.1.2. Histolojik Tanı

İnvaziv yöntemler içinde en güvenilir ve duyarlı olanıdır. Duyarlılık % 95, özgüllük % 98'dir. Önceden duyarlılığı artırmak için 2 antrum ve 2 corpus örneği alınması önerilirken, daha sonra hastayı daha az travmatize etmek için antrumdan 2 örnek alınmasının yeterli olduğu gösterilmiştir. Altın standart olarak kabul edilmektedir. Epitel displazisi varlığını da tespit edilebileceği gösterilmiştir. Wartin-Starry gibi spesifik boyalarla doku içindeki bakteriler gösterildiği gibi modifiye Giemsa boyası kullanılarak da tanıya gidilebileceği bildirilmiştir (68). Ayrıca Gimenez, Ziehl-Nielsen, HP silver stain gibi çok değişik boyalar kullanıldığı bildirilmiştir. Günümüzde yaygın kullanımda olan Hematoksilen-Eozin boyasının bakteri ve mukus arasındaki boyama farkını açıkça göstermemesi nedeniyle *H. pylori* aranmasında uygun olmadığı vurgulanmıştır (2).

2.7.1.3. Biyopsi Üreaz Testi

Yöntem gastrik biyopsi örneklerinden üreaz aktivitesini tespiti için kullanılmaktadır. Test ortamında kullanılan üre besiyerinde örnekte bulunan *H. pylori* üreyi hidroliz ederek amonyak açığa çıkarmaktadır. Oluşan amonyak pH'ı yükselttiğinden fenol kırmızısıyla renk değişikliği yapmaktadır. Orofarenkste yerleşen ve üreaz üreten bazı bakteriler tükürükle kontaminasyona neden olsa da böyle zayıf enzimler midenin asidik lümeninde kolayca denatüre olacağından testin özgüllüğünü etkilememektedir. Ticari olarak sunulan CLO test ve *H. pylori* fast gibi jel testler ile *pylori* Tek gibi strip testler bulunmaktadır. Strip testler ile daha kısa sürede sonuç alınabildiği bildirilmiştir. Bunların duyarlılığı % 80-95 özgüllüğü % 95-100'dür ve 5 dk gibi çok kısa bir sürede bile sonuç alınabildiği gösterilmiştir. Pozitif sonuçların % 90'ı ilk yarım saatte görülür ve geç pozitiflik ertesi gün okumayı gerektirmektedir (1,68).

Bakteriyel yükün üreaz testinin duyarlılığını artırmada önemli olduğu, sonuç alınabilmesi için 10^5 bakteri olması gerektiği bildirilmiştir. Tedaviden sonra 4 hafta geçmemişse hatalı sonuç alınacağı gösterilmiştir. PPI'lerinin direkt antiüreaz aktivitesi bulunduğu da vurgulanmıştır. Ayrıca intestinal metaplazisi olanlarda yanlış negatif sonuç alınabileceği vurgulanmıştır (2).

2.7.1.4. Moleküler Yöntemler

Son yıllarda moleküler mikrobiyolojik tanı yöntemleri *H. pylori* tanısı, spesifik virulans faktörleri belirlenmesi, antibiyotik direncinin belirlenmesi, kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması gibi amaçlarla yoğun olarak kullanılmıştır. Ancak nükleik asit amplifikasyon bazlı teknikler canlı ve ölü bakteri ayrımını yapamadıkları için eradikasyon tedavisinin takibinde yalancı pozitif sonuçlar vereceklerinden kullanılmamalıdır (68).

Moleküler mikrobiyolojik yöntemlerin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip oldukları yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir. PCR duyarlılık ve

özgüllüğü çeşitli çalışmalarda % 100'e yakın değerlerde bulunmuştur. Primer seçimi, hedef DNA, örnek hazırlama, bakteriyel yoğunluk ve teknik; PCR işlemini etkileyen faktörler olarak vurgulanmaktadır (3).

PCR, RT-PCR, Nested-PCR, seminested-PCR, Multipleks PCR, RFLP gibi moleküler mikrobiyolojik tekniklerin kullanılabilmesi bildirilmiştir. Ancak PFGE, *H. pylori* suşlarının uzun tanıma bölgesine sahip restriksiyon enzimlerine dirençleri ve in-situ hibridizasyona duyarsızlıkları sebebi ile bu bakteride çok fazla kullanılmamıştır (68).

2.7.1.5. FISH

İn situ Latince bir kelime olup bölge anlamına gelmektedir. Hücrelerin veya kromozomların, içlerinde bulunan nükleik asit dizileri aracılığı ile işaretlenme yöntemi olarak bilinmektedir. İn situ hibridizasyon ile işaretli probalar kullanılarak kromozom üzerinde veya doku içinde lokalize spesifik RNA veya DNA sekansları aranabilmektedir. Kurala uygun ısı şartları sağlandığında İn situ hibridizasyonun DNA eldesinde ve hibridizasyonunda güvenilir olduğu bildirilmektedir (74).

Kromozomdaki aranan gen bölgesi floresan madde kullanılarak parlak şekilde gösterilir. Bu teknikle gen haritası çıkarılabileceği ve kromozomal anomalilerin tanımlanabileceği bildirilmiştir. FISH yönteminde tek zincirli DNA'nın kısa dizisinin hazırlanması söz konusudur. Probal, DNA'ya hibridize olur ve bağlanır, floresan işaretli uçlar araştırmacıların DNA'nın bu konumunu görmelerine izin verir. İzlenen floresan sinyali kromozomal DNA'nın bulunduğu işaret eder. Bu teknikle tüm bakteriler araştırılabilir. Bakteriyel FISH teknolojisinde bakteri türlerine özgü ribozomal RNA'ların (16S rRNA, 23S rRNA) kopyalarıyla tanımlanan oligonükleotidlerinin özgül DNA-DNA hibridizasyonu baz alınır. Bu oligonükleotidler floresan boya ile işaretlidir ve bakteri hücresine penetre olarak hedef dizisine bağlanır (74).

Diğer çoğu tekniklerin kullanıldığı kromozom çalışmalarında canlı bölünebilen hücelere gereksinim varken FISH bölünmeyen hücrelerin de kullanıldığı çok yönlü bir prosedür olarak bildirilmiştir. Ayrıca kültürü yapılmayan kokoid formları da saptayabildiği vurgulanmıştır. Northern ve Southern Blot teknikleri benzer olarak DNA veya RNA sekanslarının bulunmasını gösterse de farklı olarak hücrelerde lokalize sekansları açığa çıkarmaktadır. Özgüllüğü hücrenin geçirgenliği, prob tipi, işaretleme tekniği ve hibridizasyon şartlarına bağlıdır. FISH ise floresan işaretli DNA probuyla denatüre kromozomal DNA veya hibridize edilmiş kromozomal bölge veya özgü kromozomu gösterir (74).

FISH yönteminin *H. pylori*'nin varlığını ve klaritromisin direncini tespit etmede hızlı, doğru ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Endoskopi sonrası 3 saat içerisinde klinisyene tedavide yol gösterecek duyarlılık testi sonucunu genotipik olarak verilebilmektedir. Ticari olarak hazır bulunur ve floresan mikroskopu dışında özel ekipman gerektirmediğinden çoğu laboratuvarında uygulanabilir. *H. pylori*'ye özgül 16S ve 23S rRNA problemleri floresan ile işaretlenir ve floresan mikroskopunda incelenir. Taze örneklerden direkt olarak, kültürden veya parafinize dokudan çalışılabilir. 16S rRNA özgül olgonükleotid Hpy-1 uygulanarak *H. pylori* türlerinin yeşil işaretlenmesi sağlanır. Aynı anda genotipik antibiyotik direnci aranması için kırmızı işaretleme kullanılır. Tespit edilen ve 23S rRNA'daki 3 noktanın baz alındığı bu direnç üçlü tedavinin major ilacı olan klaritromisine karşıdır. Bu nokta mutasyonlar özellikle ClaWT, ClaR₁, ClaR₂ ve ClaR₃ problemleriyle işaretlenir ki farklı mutasyonlar farklı MİK değerleriyle korelasyon gösterir; ClaR₁ için karşılık gelen MİK değeri >64 mg/L, ClaR₂ ve ClaR₃ için 8-64 mg/L arası olarak gösterilmiştir (74).

2.7.2. Noninvaziv Metodlar

2.7.2.1. Dışkıdan PCR ile *H. pylori* Saptanması

Bu yöntemle dışkıda *H. pylori* gösterilmesinin çok başarılı olmadığı ve yalancı negatif sonuç verme olasılığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni olarak da dışkının içerdiği maddeler nedeniyle bakterinin DNA yapısı bozulmakta ve PCR inhibitörleri bulunduğundan sonuçlar hatalı olmaktadır (75).

Bir çalışmada dışkıdan PCR tekniğinin özellikle çocuklarda *H. pylori* aranmasında hızlı, doğru ve noninvaziv bir metod olduğu vurgulanmıştır. 16S rRNA geni, ureA ve ureC genlerinin herbirinin PCR ile amplifiye edilmesiyle infekte hastaların dışkısında *H. pylori* DNA aranmasında anlamlı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Buna rağmen PCR sonuçlarının etkilendiği değişkenlerin bulunduğu, bunların da elde edilen DNA miktarı, PCR öncesi basamakta mikroorganizma konsantrasyonunun düşük olması, dışkıda bulunan inhibitörlerin temizlenmesinde kullanılan teknik ve kullanılan amplifikasyon protokolu olduğu bildirilmiştir (76).

Barsak patojeni olmadığından dışkıda düşük konsantrasyonlarda bulunan *H. pylori*'nin ekstraksiyonuyla elde edilen DNA miktarını artırmak IMBS tekniğiyle sağlanabilse de duyarlılığı düşük olarak bildirilmiştir. Diğer güçlüklerden biri dışkı inhibitörleridir ki bunlar polisakkarid kompleksi yapısındadır ve DNA polimerazı inhibe ederler. Polisakkaritlerin % 80'den fazlasını ortadan kaldıran polypropylene filtre kullanıldığında duyarlılığın artarak % 95.6'yı bulduğu vurgulanmıştır. "Cetyl-trimethyl-ammonium" deterjents ile inhibitörler ortadan kaldırıldığında ise dışkıdan *H. pylori* tespit oranının % 25'de kaldığı gösterilmiştir. Santrifüjle inhibitörler kaldırılıp, column chromatography, fenol-kloroform ekstraksiyonu ve microcon filtreye konsantrasyon işlemleri uygulandığında ise duyarlılığın % 93.7'ye çıktığı görülmüştür (77).

2.7.2.2. Üre Nefes Testi

Nispeten pahalı bir yöntem olmakla beraber gerek tanı gerekse tedavinin takibi amacı ile kullanılabilen yüksek duyarlılık (% 95) ve özgüllük (% 100) oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu testin prensibi *H. pylori*'nin üreyi parçalayarak nitrojen ve karbondioksitde çevirmesi esasına dayanır. Hastaya sitrik asit içerisinde izotopkarbonla işaretli üre kapsülü yutturulur. Midede açılan kapsüldeki üre *H. pylori* tarafından parçalanınca ^{13}C işaretlilerde $^{13}\text{CO}_2$, ^{14}C işaretlilerde $^{14}\text{CO}_2$ açığa çıkar. İşaretli CO_2 kana geçerek akciğere taşınır. Kapsülün yutulmasının ardından 30 dk'da hastanın nefesi ile atılan işaretli CO_2 özel yöntemlerle tespit edilir. Radyoaktif madde içermediğinden çocuklar ve gebelerde bile güvenle kullanabilen Üre- ^{13}C işaretli testin noninvaziv testler için altın standart olarak kabul edildiği bildirilmiştir (68).

Yalancı negatif sonuçlardan kaçınmak için antibiyotik ve PPI kullanımı sırasında test uygulanmamalıdır (1).

Tedaviye cevap vermeyen veya tekrarlayan gastroduodenal yakınması olan hastalarda tanı amacı ile önerilir. Ayrıca tedavinin başarısını tespit etmek amacıyla tedavinin sonlandırılmasından 4-6 hafta sonra uygulanmalıdır (68).

2.7.2.3. Serolojik Testler

Serumda IgG ve IgA, sekresyonlarda ise IgA ve IgM türü antikorların tespiti tanıya yardımcı olabilir. Ancak antibiyotik, bizmut tuzları veya proton pompa inhibitörleri kullanımına bağlı olarak infekte şahısların %20-30'unda yalancı negatiflik görülebileceğine dikkat çekilmiştir (68). Endoskopik biopsiye göre hızlı, basit uygulanan, noninvaziv ve ucuz olduğu bilinmektedir (3).

Genelde 3 tip antijen kullanılır; ısı stabil, zenginleştirilmiş ve üreaz antijeni. 3 tip antijende de duyarlılık ve özgüllük %95'dir. Ancak farklı ELİSA ve lateks aglütinasyon kitinin karşılaştırıldığı bir çalışmada duyarlılık %85, özgüllük

%79 bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllük oranları düşük olmasına rağmen biyopsi ve üre nefes testiyle tespit edilemeyen atrofik gastritli infektif bazı hastalarda serolojiyle pozitiflik saptanabileceği bildirilmiştir. Pozitif sonuçları tekrarlamaya gerek yoktur ancak ilaç kullanmayan hastalarda alınan negatif sonuçların ülser kanamasıyla olabileceğinden doğrulanması önerilmektedir (3).

Tedaviden sonra IgG ve IgA düzeyleri %50 oranında düşer ama IgG düzeyi hiçbir zaman negatifleşmez. Bu yüzden tedavi öncesi ve sonrası antikor titreleri karşılaştırılmalıdır (1,68).

2.7.2.4. HpSA

Üre nefes testine en iyi alternatif olarak görülmektedir. Gastrik epitel hücreleri 1-3 gün içinde rejenere olur, dökülen gastrositler *H. pylori* ile birlikte dışkıyla atılır. Dışkıdaki *H. pylori* ilk olarak 1997 yılında poliklonal anti-*H. pylori* antikorlarının kullanıldığı immuncapture yöntemi ile gösterilmiştir. Daha sonra dışkıda *H. pylori* antijenlerini tespit amacıyla ticari tanı kitleri geliştirilmiş, bunlardan ilki 1998 yılında aktif infeksiyonun tespiti, tedavi süresince antibiyotik etkinliğinin izlenmesi ve antibiyotik eradikasyonunun başarısını takip amacı ile FDA'den klinik kullanım onayı almıştır. Bu kitler iki temel sistem üzerine kurulmuştur. Bunlardan ilki tavşanlardan elde edilen poliklonal antikorların kullanıldığı Premier Platinum *H. pylori*SA (Meridian Diagnostics, Inc, Cincinnati, Ohio) olup, testin duyarlılığı %90, özgüllüğü %98'dir. Ayrıca tedavi sonrası yalancı pozitif sonuçlar sık görülmektedir. İkinci test ise monoklonal antikorların kullanıldığı FemtoLab *H. pylori* (Connex GmbH, Martinsried, Germany) olup, bu testin duyarlılığı daha yüksek olmasına rağmen özgüllüğünün aynı olduğu bildirilmiştir. Bu testlerin duyarlılığı lot bağımlı olarak değişmekte ve kullanılan antijenler bilinmemektedir (68).

HpSA prevalansı farklı çalışmalarda değişik oranlarda bildirilmiştir. Bir çalışmada dispepsili hasta grubunda % 52.9 oranında HpSA pozitifliği saptanmış

ve duyarlılığı % 97.8, özgüllüğü ise % 94.9 olarak bildirilmiştir (78). Bir başka çalışmada Hiperemezis gravidarumlu hastalarda % 40.7 pozitiflik saptanırken aynı çalışmada kontrol grubunda % 12.4 pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (79).

2.7.3. *H. pylori* İnfeksiyonlarının Ayrımını Yapan Testler

Nokta mutasyonlar, genomik düzenlemeler, korunmamış genler, korunmuş genlerde allelik varyasyon, diziyeye mobil DNA girmesi ve plazmidler nedeniyle *H. pylori*'de temel özelliklerde farklılıklar bildirilmektedir (3).

2.7.3.1. *cagA*

Duodenal ülser ve distal mide adenokarsinomu için riski artıran *cagA*, bir çalışmada tüm suşların yaklaşık %73.4'ünde pozitif olarak bulunmuştur. Türkiye'de yapılan bir çalışmada bu oran %73.6 olarak bildirilmiştir (53,80).

2.7.3.2. *vacA*

Moleküler yöntemlerle bakıldığında s (sinyal dizisi) ve m (fora bölge dizisi) olmak üzere 2 bölgesi bulunmaktadır. s1a, s1b, s2, m1, m2 ile altı kombinasyon oluşmaktadır. Bunlardan beşi sokak tipinde gösterilmiştir. s1a en yüksek sitotoksin seviyesine sahipken, s1b'de daha az, s2'de olmadığı veya çok az sitotoksine sahip olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde s1a yapısı gastrik inflamasyonun şiddetiyle ilişkili bulunmuştur (44).

2.7.3.3. Diğer Polimorfik Bölge

iceA₁ ve *iceA₂* tespit edilmiştir. *iceA₁* ile duodenal ülser arasında güçlü birliktelik vardır (59). *iceA* geninin tüm *H. pylori* suşlarında bulunduğu, çeşitli çalışmalarda değişik oranlar bildirilse de *iceA₁* geninin (%74.7 ila %92.55) en sık bulunan tipi olduğu gösterilmiştir (79,80).

2.7.4. Tedavi Sonrası Tanı

2.7.4.1. Serolojik Testler

Tedavinin etkinliğini yani iyileşmeyi göstermek için *H. pylori* spesifik antikorları olan IgG ve IgA düzeylerinde % 50 azalma olmalıdır. *H. pylori* antikor seviyesindeki farka en az 6 hafta sonra bakılmalıdır. İyileşme gerçekleşen tüm hastalarda seronegatiflik olmayabilir (3).

H. pylori infeksiyonu ve duodenal ülseri olanlarda PGI (oksintrik mide mukozası) ve II (antrumda) düzeylerinin her ikisi de artar. Tedavi takibinde PGII azalması daha tipik olsa da bunların düzeyinin klinikte kullanımının uygun olmayacağı vurgulanmıştır (3). 1 ay sonra PGII'de % 25 azalma olması *H. pylori* eradikasyonu için % 82 sensitivite ve % 62 spesifitede bulunmuştur (73).

2.7.4.2. Üre Nefes Testi

Tedavinin etkinliğini belirlemede kullanılan diğer bir testte üre nefes testidir. Dikkat edilmesi gereken en önemli nokta olarak tedaviyi takip eden 4. haftanın sonunda yapılması gerektiği vurgulanmıştır (68,81).

2.8. TEDAVİ

H. pylori penisilinler, bazı sefalosporinlere (cefuroxime) fakat tümü değil, makrolid, tetrasiklin, nitroimidazol, nitrofuran, kinolon, bizmut tuzları, proton pompa inhibitörlerine invitro duyarlıdır. H₂ bloker, polimiksin, trimetoprim ise dirençlidir (3).

Antibiyotikler tek başına kullanıldığında *H. pylori* eradikasyonunda yetersiz kalmaktadır. Bugün kullanılan tüm tedavi protokolleri, bir ya da birden fazla antibiyotiğin yanı sıra mide pH'sını yükselterek antibiyotiğin etkin olmasını sağlayan H₂ bloker, proton pompa inhibitörleri veya bizmut tuzlarını içermektedir (82).

Ancak standart tedavi rejimlerinden birini alan hastaların %10-20'sinde *H. pylori* eradikasyonunun başarısızlıkla sonuçlandığı bildirilmiştir (83). Tedavide başarısızlık; hasta uyumu, ilaçların yan etkileri, bakterinin kemoterapötik ajana karşı doğal veya kazanılmış direnç mekanizmalarının bulunması, ilaçların düşük pH ile inaktivasyonu gibi nedenlere bağlanmaktadır (84). Tedavi sırasında dış membran proteininin kaybolmasıyla kokoid forma dönüşen suşların reaktivasyonu ile tedavi başarısızlığı arasında ilişki kurulmaktadır (67). Ayrıca gastrik metaplazi, özefagus alt kısmındaki Barrett epiteline ve dental plağa yerleşmiş mikroorganizma için antibiyotikler etkisiz kalabilmektedir (85).

Güncel olan bir çalışmada Bizmut tuzları+Amoksisilin+Metronidazol+PPI kombinasyonu ile en yüksek eradikasyon başarıları yakalandığı, bu tedavi rejimiyle eradikasyonu sağlanan hastaların oranının % 95 olduğu bildirilmiştir (86).

2.8.1. İlaçlara Direnç

Klaritromisin standart *H. pylori* eradikasyon rejimlerinde yer alan önemli antibiyotiklerden biridir. Aside dayanıklı ve yarı ömrü uzundur. Makrolid grubunun bir üyesi olan bu ilaca karşı direnç, 23S ribozomal RNA'da (rRNA) oluşan mutasyonlar sonucu gelişmektedir. *H. pylori*'de iki kopya bulunan 23S rRNA dizgesinin 2142 ve 2143. bazlarındaki değişimler, klaritromisinin ribozoma bağlanma afinitesini düşürerek dirence yol açan en sık görülen mutasyonlardır (84). Klaritromisin ilaç direnci % 10-20 arasında bildirilmiştir (82).

H. pylori'nin metronidazol duyarlılığında rolü olduğu bilinen iki oksijene duyarsız nitroredüktaz enzimi tanımlanmaktadır. Bakterinin metabolizmasındaki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamış olan bu enzimler rdxA tarafından kodlanan oksijene duyarsız NAD(P)H nitroredüktaz ve frxA tarafından kodlanan NAD(P)H flavin oksidoredüktazdır. Bu iki enzimden birinin ya da her ikisinin inaktivasyonu ile sonuçlanan rdxA ve frxA mutasyonlarının *H. pylori*'de metronidazol direncine yol açtığı bildirilmektedir (87). Metronidazol direnç

prevalansı gelişmiş ülkelerde %10-70, gelişmekte olan ülkelerde %90'lara çıkmaktadır (76). Ülkemizde ise %34-49 arasında bildirilmiştir (88,89).

Sık kullanılan antibiyotiklerden biri olan amoksisilin direncine nadir olarak rastlansa da son yıllarda direnç oranlarının hızla arttığı görülmüş ve %8.3-19.4 arasında direnç oranları bildirilmiştir (90,91,92).

Son zamanlarda bildirilmeye başlanan Tetrasikline direnç gelişiminde 16S rRNA dizisinin 965-967. nükleotidleri arasında kalan bölgedeki mutasyonların önemli olduğu belirtilmektedir (93).

2.8.2. Korunma ve Aşı

Mukozal adjuvan olarak kolera toksini veya ısıya dayanıksız *Escherichia coli* enterotoksiniyle *H. pylori* Üreaz B antijeninin kombine olarak verildiği oral aşı başarılı olmuştur ancak *H. pylori* infeksiyonu oluşmadan aşılama yapılması gerektiği bildirilmiştir. Üreaz holoenzim, üreaz subunitleri, *vacA* sitotoksini, HspB (GroEL) ve HspA (GroES) immünojenlerini içerir (3.94).

H. pylori'den korunma ve hastalığın kontrol yöntemleri günümüzde hala tam olarak açığa kavuşmamıştır. *H. pylori*'nin bugüne kadar iki kez akut gastrit epidemisine neden olduğu bildirilmiştir. Etkilenen kişilerde hipoklorhidri saptanmıştır, etkeni gastroskopi sırasında aldıkları bildirilmiştir. Bu nedenle en azından korunma amacıyla gastroskopide kullanılan aletlerin sterilizasyonuna özen gösterilmesi gerekliliği oldukça açıkça vurgulanmıştır (4).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi'ne 1 Ocak-30 Haziran 2006 tarihleri arasında dispeptik yakınmalar (en az 1 aydır epigastrik karın ağrısı, bulantı-kusma, şişkinlik, üst GİS kanaması) ile Gastroenteroloji ve Genel cerrahi polikliniklerine başvuran ve son 1 ay içinde bu sebeple tedavi almamış, endoskopik gastrik biyopsi uygulanan 147 hastanın antrum farklı bölgelerinden alınan 2 adet biyopsi örneği kültür, moleküler çalışmalar ve FISH çalışması için işlemlendi. Ayrıca hastaların 122'sinden HpSA testi çalışılmak üzere dışkı örnekleri toplandı.

3.1. HpSA

Laboratuvara gelen dışkı örnekleri çalışmaya alınana kadar -20°C 'de saklandı.

Dışkıdan *H. pylori* antijen varlığını tespit etmede Enzyme İmmunoassay (=EIA) testi olan monoklonal tipte FemtoLab *H. pylori* Cnx (Connex GmbH, Martinsried, Germany) kitleri kullanıldı.

Femtolab *H. pylori* Cnx'de Sandwich tip EIA testiyle insan dışkısından noninvaziv yolla *H. pylori* antijeni aranır ve *H. pylori* infeksiyonu tanısı koydurur. Ayrıca tedaviden 4-6 hafta sonra tedavi etkinliğini ve reenfeksiyonu saptamada kullanılır. Kutularda 96 kuyucuk, diluent, yıkama solusyonu, pozitif ve negatif kontrol, konjugat, TMB (=Tetramethylbenzidine)/substrat ve stop solüsyonu (H_2SO_4) içerir.

Bir strip için 1/10 dilue edilen yıkama sıvısı hazırlandı. Dışkı örneği (yaklaşık 0.1gr.) tüpte 500µl örnek sulandırım ile 15sn vortekste karıştırıldı. Daha sonra $\geq 5000\text{rpm}$ 'de 5 dk. santrifüj edildi. Her örnek için yeni pipet ucu kullanıldı.

Dışkı supernatantından 50µl, pozitif ve negatif kontrollerden 50µl farklı kuyucuklara pipetlendikten sonra her bir kuyucuğa 50µl antikor konjugat eklendi. 18-27⁰C'de karıştırıcı üzerinde 60±5dk inkübe edilip mikropate yıkayıcı kullanarak veya elle her bir kuyucuk 5 kez 250-300µl yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından mikropate, kurutma kağıdına hafifçe vurulduktan sonra 100µl substrat sıvısı eklendi. Oda ısısında ve karanlıkta 10dk. inkübe edildi. 100µl stop solüsyonu konulduktan sonraki 15dk. içinde spektrofotometri ile okutuldu. Tek okutucuda (450nm): ≥0.190 » Pozitif, <0.190 » Negatif olarak kabul edildi.

3.2. KÜLTÜR İLE *H. pylori* İZOLASYONU

Çalışmaya dahil edilen hastalardan üst Gastrointestinal sistem endoskopisi sırasında farklı bölgelerden alınan 2 adet antral biyopsi örneği, 0.5 ml BHI buyyonundan (Oxoid, England) oluşan taşıma besiyeri içine konarak, en kısa sürede laboratuvara ulaştırılması sağlandı. Laboratuvara gelen örnekler, en kısa sürede %7 insan kanlı 10 mg/l Vankomisin-5mg/l Trimetoprim-5 mg/l Amfoterisin B ilave ettiğimiz Beyin Kalp İnfüzyon agar (Oxoid, England) plaklarına ekildi. Kültür için işlemlenen 2 adet antral biyopsi örneği daha sonra moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere TE (Tris-EDTA; 1 ml 1 M Trisbase+0.2 ml 0.5 M EDTA+98.2 distile su) solusyonunda -20⁰C'de bekletildi. Plaklar 37⁰C'de CampyGen (Oxoid, England) kullanılarak oluşturulan mikroaerofil ortamda (% 5 O₂, % 10 CO₂, % 10 H₂, % 75 N₂) 3-7 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda *H. pylori* kolonileri Gram boyamada tipik morfolojinin görülmesi, kolonilerin üreaz, katalaz ve oksidaz aktivitelerinin değerlendirilmesi ile literatüre uygun yöntemler kullanılarak tanımlandı (8,68).

3.3. AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİYLE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ

H. pylori suşlarının klaritromisin duyarlılığı agar dilüsyon metodu ile CLSI önerileri doğrultusunda test edildi (95). İzole edilen suşlar % 7 insan kanlı antibiyotik içeren BHI agara pasajlanarak 48-72 saat mikroaerofil ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür plaklarından Gram boyama ile yapılan mikroskopik inceleme sonrasında bakterilerin logaritmik üreme fazında olduğuna işaret eden spiral formların kültüre hakim oldukları ya da %80'inden fazlasını oluşturdukları gözlemlendikten sonra antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirildi.

Antibiyotik duyarlılık testi için 8 - 0.064 µg/ml arasındaki 7 farklı konsantrasyonda klaritromisin ve % 5 oranında koyun kanı (en az 2 hafta bekletilmiş) içeren Müller Hinton agar (Oxoid, England) plakları kullanıldı. Liyofilize Müller Hinton agar besiyeri tozu her dilüsyon için 20 ml'ye uygun tartıldı. 18 ml su eklendi. 121⁰C'de 15dk. steril edilen besiyeri 60⁰C'ye ayarlanmış su banyosuna konuldu. Bunun üzerine 2 haftadan daha uzun süre bekletilmiş defibrine koyun kanı 1 ml ve klaritromisin dilüsyonu 1 ml konuldu ve besiyeri 90 mm'lik petri kabına döküldü.

Test edilecek her suş için % 0.9 sodyum klorür içinde 2 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlanarak, 10 µl bakteri süspansiyonları Müller Hinton test plaklarına inoküle edildi.

Kalite kontrol suşu olarak klaritromisin için MİK 0,25-1,0 µg/ml olan ATCC[®] 43504 suşu kullanıldı. Her suş da üreme kontrolünü yapmak için klaritromisin içeren plaklardan önce ve sonra klaritromisin içermeyen % 5 koyun kanlı Müller Hinton agar plaklarına inokülasyon yapıldı.

Plaklar 37⁰C sıcaklıkta CampyGen (Oxoid, England) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi

sonunda plaklarda gözle görülür koloni oluşumu not edilerek her suş için klaritromisin MİK değerleri okundu. Klaritromisin MİK değeri ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ bulunan *H. pylori* suşları dirençli kabul edildi (95).

3.4. PCR İLE *H. pylori* VARLIĞININ TESPİT EDİLMESİ

16S rRNA üzerindeki *ure A* geni arandı. Bunun için öncelikle biyopsi örneğinden DNA izolasyonu için sıvı A-B-C-D-E'den oluşan DZ DNA İzolasyon kiti (Dr.Zeydanlı) kullanıldı. İşlemler aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

Başlamadan önce 1 ml DNase-RNase free saf su ekleyerek Solüsyon A hazır hale getirildi.

1. Doku örneği 1,5 ml'lik ependorf tüp içine alındı. Üzerine 500 μl Solüsyon B ve 20 μl Solüsyon A konuldu.
2. Tüp, solüsyonların karışması için alt üst edildi ve 42°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyondan sonra tüpe 500 μl Solüsyon C (İki fazlıdır, alt fazdan alınmalıdır) konuldu.
4. İyice vortekslenip (Süt kıvamında bir sıvı oluştu) 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüjden sonra tüpte 2 faz oluştuğu görüldü. Berrak olan üst kısım temiz bir tüpe alınıp, üzerine 500 μl solüsyon D konuldu ve hafifçe vortekslendi. DNA miktarının artması için lizat oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 1 gün bekletilebilir.
6. Sonra 10.000 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı ve üzerine 500 μl Solüsyon E konuldu. Vortekslenerek yıkandı.
8. 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı. Tüpler 37 °C etüve koyularak alkol uçuruldu.
10. 50 μl distile su ile sulandırıldı ve bakteri DNA'sı elde edilmiş oldu.

Bundan sonra 500 µl P1+P2 (10pmol) hazırlamak için 50 µl P1 (Forward primer, 100pmol) ve 50 µl P2 (Reverse primer, 100pmol) bir ependorf tüpte birleştirildi ve üzerine 400 µl dH₂O ilave edilir.

Aşağıdaki gibi mix hazırlandı:

10X Buffer Incomplete	5 µl
25mM MgCl ₂	4 µl
25mM dNTP	0,2 µl
10 pmol P1+P2	1,5 µl
S. Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
dH ₂ O	33,8 µl
DNA (yaklaşık 10ng/ µl)	5 µl

Daha sonra şu PCR programı uygulandı: 95 °C' de 5 dk, 95 °C' de 15 sn, 60 °C' de 1 dk 40 siklus. Ardından agaroz jelde elektroforez ile DNA yürütülerek bantlar elde edildi. UV ışığı altında bantlar görüntülenerek pozitiflikler belirlendi.

3.5. FISH YÖNTEMİYLE *H. pylori* VARLIĞI VE KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN TESPİT EDİLMESİ

Seafast® *H. pylori* Combi Kit (Izinta, Hungary) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki aşamalar uygulanarak formalin fikse parafin gömme biyopsi örneklerinden çalışma gerçekleştirildi.

1. Test Reaktifleri Hazırlığı:

- a. Liyofilize DNA probları (Komponent A) rehidrasyonu yapıldı.
- b. Hibridizasyon prob karışımları (Komponent C) hazırlandı.
- c. 55ml 10X yıkama tamponu (Komponent D) 500 ml steril distile suya eklenerek 1/10 oranında sulandırıldı.
- d. Yeşil ve kırmızı filtreler yardımıyla floresan mikroskopta kontroller yapıldı.

2. Test Materyali Hazırlığı:

a. Fiksasyon: Duyarlılığı artırmak için 4 µm incelikte 2 kesit slide üzerine eklendi.

b. Deparafinizasyon: 2x30 dk ksilen, 2x30 dk % 96 etanol ile yapıldı.

c. 10 dk 400 W mikrodalga fırında bekletildi. Yaklaşık 10 dk soğutulduktan sonra 3 kez 2'şer dk distile suyla yıkandı ve 5-10 dk havada kurutuldu.

d. Nemlendirme bölmesi hazırlığı: Filtre kağıdı bölmedeki yerine konulduktan sonra 2 µl hibridizasyon tampon (Komponent C) eklenerek ıslatıldı.

3. Hibridizasyon: Örneğin yüzeyini örtecek kadar (yaklaşık 15 µl) hibridizasyon karışım prob lam üzerine eklendi ve lamel ile kapatıldı. Hibridizasyon bölmesi içinde kapağı sıkıca kapatılarak su banyosunda 46⁰C'de 90 dk bekletildi.

4. Yıkama: 2 kez 46⁰C'de 15dk yıkandı.

5. Lam hazırlığı: Wash buffer ile temizlendikten sonra PBS'de 2 dk yıkandı. Silindi ve +4⁰C'de karanlıkta floresan mikroskopunda incelendi.

6. Değerlendirme: Yeşil filtreyle (Fluorescein: Absorption 494 nm Emission 518 nm) tespit edilen yeşil floresan veren bakteriler *H. pylori*, kırmızı filtreyle (Cy3: Absorption 552 nm Emission 570 nm) kırmızı floresan veren bakteriler "Klaritromisin Dirençli" *H. pylori* olarak değerlendirildi.

IV. BULGULAR

Ocak-Haziran 2006 döneminde çalışmaya alınan 147 hastanın 91'i (% 61.9) kadın, 56'sı (% 38.1) erkekti. Yaşları 18-80 arasında olup yaş ortalaması 45.2 ± 14.9 idi. Kliniklere göre dağılımı incelendiğinde Gastroenteroloji 112 örnek (%76.2), Genel Cerrahi 35 örnek (%23.8) şeklinde dağıldığı gözlemlendi.

Klinik, yaş ve cinsiyete göre dağılım Tablo-V'de gösterildi.

Tablo-V. Klinik, Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılım

Klinik	Yaş	Cinsiyet		Toplam
		Erkek	Kadın	
Gastroenteroloji	17-29	5	16	21
	30-44	14	24	38
	45-59	13	17	30
	>60	12	11	23
	Toplam	44	68	112
Genel Cerrahi	17-29	2	1	3
	30-44	6	7	13
	45-59	3	9	12
	>60	1	6	7
	Toplam	12	23	35

Toplam 122 hastadan toplanan dışkı örneklerinden yapılan çalışmada 67 (% 54.9) örnekte HpsA için pozitif sonuç alınırken, 55 örnek ise negatif (% 45.1) olarak bulundu. Kliniklere göre izolasyon oranlarına bakıldığında Gastroenteroloji polikliniğinden gelen 93 örnekten 53'ünde (% 56.9), Genel Cerrahi kliniğinden gelen 29 örnekten 14'ünde (% 48.2) pozitiflik saptandı. Erkek hastaların % 58.6'sında (27/46), kadın hastaların ise % 52.6'sında (40/76) HpSA pozitif

bulundu. 17-29, 30-44, 45-59 ve >60 yaş gruplarında pozitiflik oranlarına bakıldığında ise sırasıyla % 63.2, % 59.6, % 58.8 ve % 31.8 olarak bulundu. PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktivite, negatif prediktivite ve total doğruluk oranları sırasıyla şöyle bulundu: % 66.6 (62/93), % 82.7 (24/29), % 92.5 (62/67), % 43.6 (24/55) ve % 78.6 (96/122).

İşlenen 147 örneğin 61 (% 41.5)'inde kültürde üreme oldu. Cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde erkek hastaların % 46.4'ünde (26/56), kadın hastaların % 38.4'ünde (35/91) etken izole edildi. 17-29, 30-44, 45-59 ve >60 yaş gruplarında pozitiflik oranlarına bakıldığında ise sırasıyla % 33.3, % 54.9, % 42.9 ve % 23.3 olarak bulundu. Gastroenteroloji polikliniğinden gelen örneklerin % 44.6'sında (50/112), Genel Cerrahi polikliniğinden gelen örneklerin ise % 31.4 (11/35)'ünde *H. pylori* izolasyonu gerçekleştirildi. Sonuçlar PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktivite, negatif prediktivite ve total doğruluk oranları sırasıyla şöyle bulundu: % 52.7 (57/108), % 89.7 (35/39), % 93.4 (57/61), % 40.6 (35/86) ve % 62.5 (92/147).

Değerlendirmeye alınan 61 suştan 43'ünde agar dilüsyon yöntemiyle klaritromisin direncine bakıldı. MİK değeri ≥ 1 olarak bulunan 5 suş (% 11.6) klaritromisine dirençli olarak kabul edildi. Erkek hastalarda klaritromisin direnci % 10.0, kadın hastalarda ise bu oran % 13.0 olarak bulundu. 17-29, 30-44, 45-59 ve >60 yaş gruplarında pozitiflik oranlarına bakıldığında ise sırasıyla % 14.3, % 9.5, % 16.6 ve % 0.0 olarak bulundu. Gastroenteroloji polikliniğinden gelen örneklerden üretilen suşlarda klaritromisin direnci % 9.0, Genel Cerrahi polikliniğinden gelen örneklerde ise % 20 olarak tespit edildi.

PCR ile Çalışılan 147 antral biyopsi örneğinin 108'inde (% 73.5) pozitiflik saptandı. Gelen mide biyopsi örneklerinden erkek hastaların % 73.2'sinde (41/56), kadın hastaların % 73.6'sında (67/91) PCR metoduyla *H. pylori* varlığı gösterildi.

17-29, 30-44, 45-59 ve >60 yaş gruplarında pozitiflik oranlarına bakıldığında ise sırasıyla % 70.9, % 74.5, % 76,2 ve %70.0 olarak bulundu. Gastroenteroloji polikliniğinden gelen mide biyopsi örneklerinden % 77.6'sında (87/112), Genel Cerrahi polikliniğinden gönderilen örneklerin ise % 60.0'ında (21/35) etken gösterildi.

PCR ile tespit edilen *H. pylori* varlığının agaroz jel elektorforezinde gösterilmesi Şekil-4'de yer almıştır.

Çeşitli yöntemlerle *H. pylori* varlığının tespit edilmesi Tablo-VI'da gösterilmiştir.



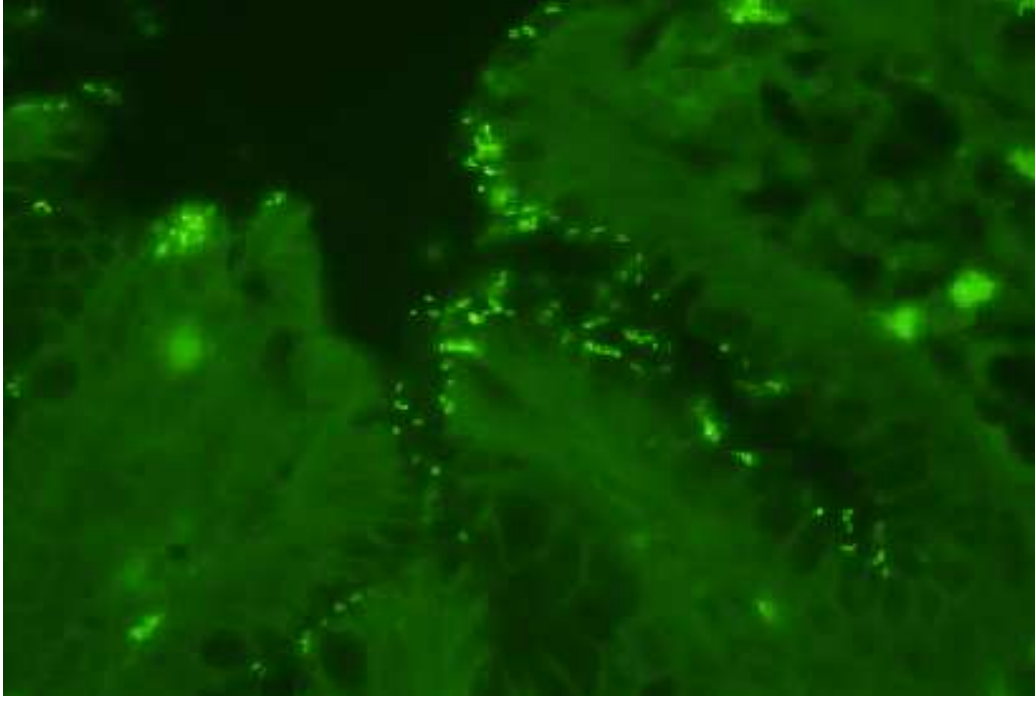
Şekil-4: PCR İle Tespit Edilen *H. pylori* Varlığının Agaroz Jel Elektorforezinde Gösterilmesi (Markır 1000 bp)

Tablo-VI. *H. pylori* Varlığını Gösteren Testler

	Örnek Sayısı	Pozitiflik Sayısı	%
HpSA	122	67	54.9
Kültür	147	61	41.5
PCR	147	108	73.5
FISH	133	82	61.7

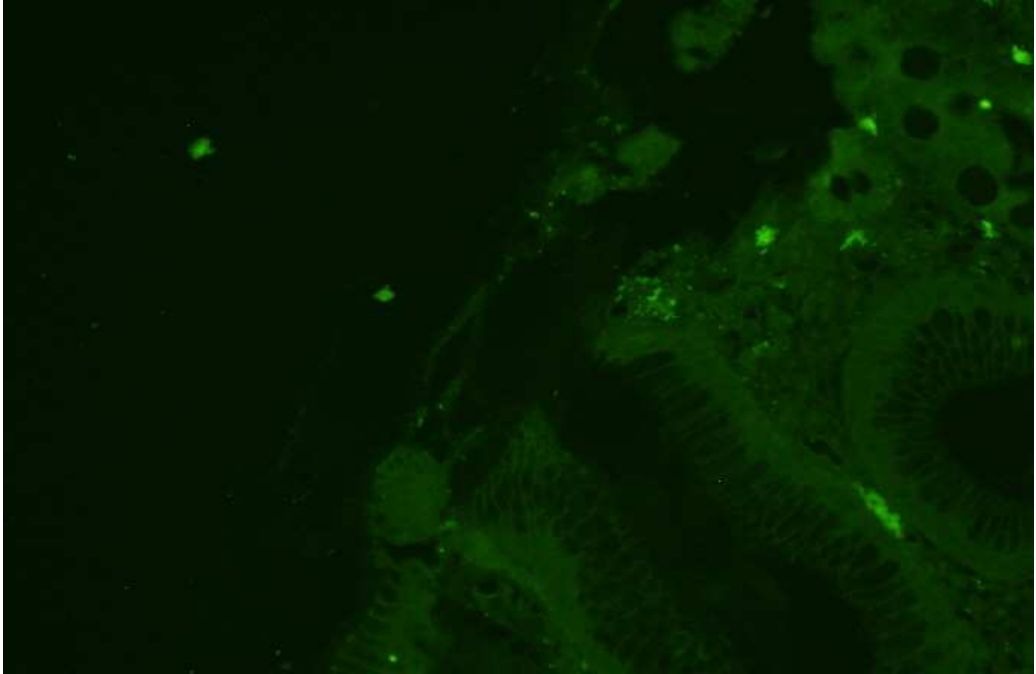
FISH çalışmasında kullanılan 133 formalin fikse parafin gömme biyopsi örneklerinden 82 (% 61.7)'sinde *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik saptanırken, 51 (% 38.3) örnek ise negatif olarak tespit edildi. Pozitif ve negatif FISH görüntüleri Şekil-5 ve Şekil-6'da gösterilmiştir. Kliniklere göre *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik oranlarına bakıldığında Gastroenteroloji polikliniğinden gelen 107 örnekten 66'sında (% 61.7), Genel Cerrahi kliniğinden gelen 26 örnekten 16'sında (% 61.5) pozitiflik saptandı. Erkek hastaların % 72.5'inde (37/51), kadın hastaların ise % 54.9'sında (45/82) FISH ile pozitiflik saptandı. 17-29, 30-44, 45-59 ve >60 yaş gruplarında pozitiflik oranlarına bakıldığında ise sırasıyla % 72.7, % 55.5, % 73.7 ve % 46.4 olarak bulundu. PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktivite, negatif prediktivite ve total doğruluk oranları sırasıyla şöyle bulundu: % 72.5 (74/102), % 74.1 (23/31), % 90.2 (74/82), % 45 (23/51) ve % 72.9 (97/133).

FISH yöntemi ile *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik saptanan 82 örnekten 20'sinde (% 24.4) klaritromisin direnci bulundu. Gastroenteroloji polikliniğinden gelen örneklerden pozitiflik saptanan suşlarda klaritromisin direnci % 25.8 Genel Cerrahi polikliniğinden gelen örneklerde ise % 18.8 olarak tespit edildi. Erkek hastalarda klaritromisin direnci % 16.2, kadın hastalarda ise bu oran % 31.1 olarak bulundu. 17-29, 30-44, 45-59 ve >60 yaş gruplarında pozitiflik oranlarına bakıldığında ise sırasıyla % 25.0, % 32.0, % 17.9 ve % 23.1 olarak bulundu.



Şekil-5: FISH İle *H. pylori* Varlığının Gösterilmesi

(Yeşil Filtre=GFP Filtre, Fluorescein Boya, Absorbsiyon 494 nm, Emisyon 518 nm, hedef bölge 16S rRNA) (Kırmızı Filtre=N2.1 Filtre, Cy3 boya, Absorbsiyon 552 nm, Emisyon 570 nm, hedef bölge 23S rRNA)



Şekil-6: FISH İle *H. pylori* Negatif Preparat Gösterilmesi

Çeşitli yöntemlerle klaritromisin direncinin tespit edilmesi Tablo-VII'de gösterilmiştir.

Tablo-VII. *H. pylori* Klaritromisin Direnci Oranları

	Örnek Sayısı	Pozitiflik Sayısı	%
Agar Dilüsyon	43	5	11.6
FISH	82	20	24.4

Çalışmamızda gerçekleştirilen tüm tanısal testler için elde edilen pozitiflikler ve diğer testlerle olan ilişkileri incelendiğinde önemli sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen kültür pozitiflikleri ile diğer testler karşılaştırıldığında PCR 4, FISH 3 ve HpSA 12 yanlış negatiflik göstermiştir. Benzer şekilde PCR pozitiflikleri ile bir karşılaştırma yapıldığında Kültür 51, FISH 28 ve HpSA 31 örnekte yanlış negatiflik gözlenmiştir. FISH ile elde edilen pozitiflikler ele alındığında kültür 29, PCR 8, ve HpSA ile 18 yanlış negatiflik olduğu saptanmıştır. Son olarak HpSA pozitiflikleri incelendiğinde kültürde 27, PCR'da 5, ve FISH'de de 12 yanlış negatiflik saptanmış olup veriler Tablo VIII'de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçların için gerçekleştirilen istatistiksel çalışmalarda anlamlı korelasyon saptanmıştır (Pearson Correlation). Testler arasında en yüksek korelasyon FISH ve PCR sonuçları arasında $r=0.420$ ile gerçekleşmiştir.

Tablo-VIII. Elde Edilen ozitifliklerin Karşılaştırılması ve Korelasyon Analizi

Yöntem	Kültür			PCR			FISH			HpSA		
	+	-	r	+	-	r	+	-	r	+	-	r
Kültür (n=61)	-	-	-	57	4	0.381	53	3	0.412	40	12	0.254
PCR (n=108)	57	51	0.381	-	-	-	74	28	0.420	62	31	0.337
FISH (n=82)	53	29	0.412	74	8	0.420	-	-	-	52	18	0.258
HpSA (n=67)	40	27	0.254	62	5	0.337	52	12	0.258	40	27	-

r: Pearson korelasyon analizi sonuçları

V. TARTIŞMA

Günümüzde *H. pylori* tanısında invaziv ve non-invaziv testler kullanılmaktadır. Serolojik testlerin daha çok kitle taramalarında ve geçmişteki *H. pylori* enfeksiyonu ile temasın varlığının araştırılmasında kullanılması önerilmiştir. Ayrıca dispeptik hastalarda öncelikle serolojik araştırmanın yapılması gerektiğine vurgu yapılmıştır. Tedavi öncesi histoloji ve kültür, tedavi takibinde ise üre solunum testi daha yararlı olabileceği bildirilmiştir (4).

H. pylori'nin penisilinler, bazı sefalosporinlere (cefuroxime), makrolid, tetrasiklin, nitroimidazol, nitrofuran, kinolon, bizmut tuzları, proton pompa inhibitörlerine invitro duyarlılığı gösterilmiştir. H₂ bloker, polimiksin, trimetoprim ise dirençli olduğu vurgulanmıştır (3). Antibiyotikler tek başına kullanıldığında *H. pylori* eradikasyonunda yetersiz kaldığından tüm tedavi protokolleri, bir ya da birden fazla antibiyotiğin yanı sıra mide pH'sını yükselterek antibiyotiğin etkin olmasını sağlayan H₂ bloker, proton pompa inhibitörleri veya bizmut tuzlarının kombine kullanımı önerilir (82). Tüm bunlara rağmen meydana gelen tedavide başarısızlık; hasta uyumu, ilaçların yan etkileri, bakterinin kemoterapötik ajana karşı doğal veya kazanılmış direnç mekanizmalarının bulunması, ilaçların düşük pH ile inaktivasyonu gibi nedenlere bağlanmaktadır (84). Tedavi sırasında dış membran proteininin kaybolmasıyla kokoid forma dönüşen suşların reaktivasyonu ile tedavide başarısızlık olduğu da bildirilmiştir (67). Ayrıca gastrik metaplazi, özefagus alt kısmındaki Barrett epiteline ve dental plağa yerleşmiş mikroorganizmalar için tedavi sonuçsuz kalabilmektedir (85).

İlk kez tedavi başlananlarda hastalarda %10-20 oranında tedavi başarısızlığı bildirilmekte ve bu başarısızlıkların en önemli nedeninde tedavi sırasında gelişen antibiyotik direnci alabileceği ifade edilmektedir. Söz konusu direnç

mekanizmaları arasında en önemlisi de tedavide aktif olarak kullanılan klaritromisine karşı gelişen direnci olarak bildirilmektedir. Klaritromisin dirençli suş oranları farklı çalışmalarla % 10-20 arasında bildirilmiştir (82).

Etkenin tanısında son zamanlarda sık kullanılan noninvaziv yöntemlerden bir tanesi olan dışkıda antijenin saptanmasına yönelik HpSA testleri gündemdedir. HpSA için iki temel sistem üzerine kurulu test kitleri bulunmaktadır: bunlardan ilki tavşanlardan elde edilen poliklonal antikorların kullanıldığı kit, ikincisi ise monoklonal antikorların kullanıldığı test kitidir. Poliklonal antikorların kullanıldığı test kitlerinde yalancı pozitiflik görülebildiği, monoklonal antikorların kullanıldığı kitlerde bu ihtimalin daha düşük olduğu bildirilmiştir (68).

Paimela ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada histoloji ve hızlı üreaz testi ile tanı almış 50 hastaya tedavi verilmiş ve tedaviden 4 hafta sonra eradikasyonun etkinliği üre nefes testi ve monoklonal ve poliklonal HpSA testleri yardımıyla araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada, sonuç olarak üre nefes testiyle karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllük değerleri monoklonal HpSA testi için % 94.0 ve % 100 bulunurken, poliklonal HpSA testinde ise % 88 ve % 97.0 olarak hesaplandığı bildirilmiştir. HpSA testlerinin; kolay uygulanır, ucuz oluşu, duyarlılık ve özgüllük değerleri göz önüne alındığında üre nefes testine alternatif bir noninvaziv test olarak önerilmiştir (96).

Türkiye'den bildirilen Demiray ve ark. tarafından 2006 yılında İzmir'de gerçekleştirilen bir çalışmada; üst gastrointestinal sistem kanaması olan 22 hastada histopatoloji ile karşılaştırıldığında Rapid Strip HpSA testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktivite ve negatif prediktivite değerleri sırasıyla % 60.0, % 86.0, % 90.0 ve % 50.0 olarak hesaplandığı bildirilmiş ve üst gastrointestinal sistem kanamalı hastaların eradikasyon kontrolünde klinik bir gösterge olarak rutinde Rapid Strip HpSA testlerinin kullanılabilceği konusunda vurgu yapılmıştır (97).

İspanya'dan 2006'da Gisbert ve ark tarafından yayımlanan ve hem bir derleme hem de metaanaliz özelliği taşıyan çalışmada, *H. pylori* tanısı almış eradikasyon tedavisi öncesi 2499 hastayı içeren 22 çalışmanın sonuçları ele alınmıştır. Araştırmacılar eldeki verilerle monoklonal antikor kullanılarak elde edilen HpSA testinin tedavi öncesi duyarlılık ve özgüllüğü % 94.0 ve % 97.0 olarak bulunurken, 957 hastayı kapsayan tedavi sonrası grupta HpSA testinin duyarlılık ve özgüllük değerlerinin ise % 93.0 ve % 96.0 olduğu göstermişlerdir. Özellikle tedavi sonrası eradikasyonu belirlemede kullanılan poliklonal antikor kullanılarak elde edilen HpSA testlerinin daha yüksek duyarlılık da olduğu bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla noninvaziv bir test olan ve hem monoklonal hem de poliklonal antikor kullanılarak elde edilebilen HpSA'nın başlangıç tanısında ve tedavi sonrası etkinliği belirlemede kullanılabileceği bildirilmiştir (98).

Inelmen ve ark. tarafından 2004 yılında İtalya'da yapılan yatarak tedavi gören 122 hastayı kapsayan başka bir çalışmada histoloji ve üre nefes testiyle karşılaştırıldığında HpSA duyarlılığı % 76.0, özgüllüğü % 95.0 olarak bulunmuştur. Basit, pahalı olmayan ve özellikle uyum göstermeyen yaşlı hastalarda *H. pylori* aranmasında uygun olarak gösterilmiştir (99).

Çalışmamızda iki farklı polikliniğin örnekleri değerlendirildiğinde Gastroenteroloji polikliniğinden gelen hasta örneklerinde (% 56.9) ve erkek hasta grubunda (% 58.6) daha yüksek oranda HpSA pozitifliği saptanmıştır. Yaş gruplarına bakıldığında ise >60 yaş grubunda pozitiflik oranı düşük bulunmuştur. Duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktivite, negatif prediktivite ve total doğruluk oranları ise sırasıyla şöyle bulunmuştur: % 66.6, % 82.7, % 92.5, % 43.6 ve % 78.6. Diğer ülkelerden bildirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında özellikle duyarlılık oranları düşük olarak bulunsa da Türkiye'den bildirilen ve Demiray ve ark. tarafından (97) 2006 yılında gerçekleştirilen bir çalışmayla uyumluluk göze çarpmıştır. Ayrıca çalışmamız sonuçları ile gözlenen düşük duyarlılık düzeyinin kullanılan testin lot bağımlı değişkenliği ile ilişkili olabileceği düşünülmüş,

sonraki çalışmalar için lot bağımlı değişkenliğin göz önüne alınarak farklı lot ve farklı marka ile gerçekleştirilmesinin yararlı olabileceği kanısına varılmıştır (68).

Gastrik biyopsi örneklerinden kültür ile *H. pylori* izolasyonu tanıda altın standarttır (1,8). Ancak bu yöntem; örneğin sayısına veya büyüklüğüne, örnekdeki bakteri miktarına, örneğin transport şekline, transport için geçen süreye, kullanılan besiyerlerine, inkübasyon şartlarına ve çalışmaları gerçekleştiren personelin tecrübesine bağlı olarak değişen duyarlılık ve özgüllük gösterebileceği bildirilmiştir (68).

Gisbert ve ark. tarafından Nisan 2006'da İspanya'dan yayınlanan, üst gastrointestinal sistem kanaması olan 314 hastayı kapsayan 3 bildirinin incelendiği metaanaliz çalışmasında kültürün duyarlılığı % 45.0, özgüllüğü % 98.0 olarak bildirilmiştir (100). Ankara'da 2004 yılında Özçay ve ark. tarafından 102 çocuk hastada yapılan çalışmada histoloji altın standart olarak kabul edildiğinde kültür duyarlılığı % 54.9 olarak bildirilmiştir (101). İstanbul'dan 2005 yılında İnan ve ark. tarafından bildirilen duodenit veya duodenal ülser tanısı alan 50 hastada mide biyopsi örneklerinden kültür ile izolasyon oranı % 68.0 olarak bildirilmiştir (102). Avusturya'da 2004 yılında Schabereiter-Gurtner ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 92 hastadan 45'inde (% 48.9) kültür ile pozitiflik saptanmıştır (103).

Çalışmamızda; HpSA sonuçlarıyla paralel olarak Gastroenteroloji hastalarında ve erkek hasta grubunda kültür ile yüksek oranda etken izole edildi. Yaş gruplarına bakıldığında ise 30-44 yaş arasında yüksek oranda *H. pylori* izolasyonu gerçekleşmiştir. İzolasyon oranımız % 41.5 iken duyarlılık ve özgüllük oranları PCR referans test olarak alındığında % 52.7 ve % 89.7 olarak bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllük oranları daha önceden bildirilen çalışmalarla (100, 101) benzerlik göstermektedir. Ancak çalışmamızda izolasyon oranında bazı çalışmalarla benzer oranlar elde edilse de (103), PCR ile karşılaştırıldığında

düşüklük göze çarpmaktadır. Bunun nedenini örnek alınan yer ile örneğin işlemlendiği yerin birbirinden uzak farklı bölgelerde olması sonucunda meydana gelen transportundaki gecikmelere ve *H. pylori* kültürü konusundaki tecrübesizliğimize bağlamaktayız.

H. pylori'nin tedavisinde antimikrobiyal direnç nedeniyle güçlüklerle karşılaşıldığı, direnç oranlarının coğrafi bölgeler ve çalışmalarda alınan gruplar arasında bile farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bunlardan en önemlisi olan klaritromisin direnci için Kore'de yapılan bir çalışmada % 5.9 oranı bildirilirken, Amerika'da yapılan çalışmada % 41.0 Fransa'da % 21 oranları bildirilmiştir. İran'daki çalışmada ise bu oran % 4.1 olarak gösterilmiştir. Almanya'da yapılan bir çalışmada ise primer klaritromisin direnç oranı saptanmış ve % 2.2 olarak gösterilmiştir (104). Kanada'dan 2003 yılında Best ve ark. tarafından CLSI önerilerine göre *H. pylori* antibiyotik direncinde standart metod olarak E test ve agar dilüsyon yöntemleri gösterildiği, bu yöntemler arasında yapılan karşılaştırmada çok az farklılıklar bulunduğu, bunun da sonuçlarda hataya neden olmadığı vurgulanan bir çalışma bildirilmiştir (105). E test ve agar dilüsyon yöntemi ile klaritromisin direncinin araştırılmasında benzer sonuçların alındığı vurgulanan Türkiye'de Ankara'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise % 20.5 oranında direnç bildirilmiştir (106). Janssen ve ark. tarafından 2005 yılında E test yöntemiyle gerçekleştirilen klaritromisin direnç oranlarının belirlendiği çalışmada % 3 oranında direnç bildirilirken kadınlarda daha yüksek direnç gösterilmiştir (107). Çin'de 2004 yılında 44 çocuk hastadan izole edilen *H. pylori* suşundan yapılan agar dilüsyon yönteminin kullanıldığı çalışmada klaritromisin direnç oranı % 18.2 olarak gösterilmiştir (108).

Ülkemizde ise İstanbul'dan 2005 yılında bildirilen İnan ve ark. tarafından yapılan çalışmada E test ve disk diffüzyon metodunun kullanıldığı ve klaritromisin direncinin % 8.8 olarak bulunduğu vurgulanmıştır (102). Aygül ve ark. tarafından 2007 yılında bildirilen çalışmada 200 hastadan alınan antral

biyopsi örneklerinden 110'unda *H. pylori* izole edilmiş ve bunlardan 87'sinde E test yöntemiyle klaritromisin direnci araştırılmış, % 24 oranına ulaşıldığı vurgulanmıştır (109). Çocuklarda daha düşük direnç beklenmesine rağmen gastrik biyopsi kültür pozitif 109 Portekiz'li çocuk ile 2005 yılında yapılan çalışmada E test yöntemi kullanılarak % 39.4 klaritromisin direnci bulunduğu bildirilmiştir (110).

Bu çalışmada CLSI-2005 tarafından standart metod olarak önerilen agar dilüsyon yöntemi kullanılarak klaritromisine karşı direnç oranı % 11.6 olarak bulundu. Cinsiyet ve kliniklere göre direnç oranlarına bakıldığında ise bazı çalışmalarda kadınlarda sık klaritromisin direncine rastlandığı vurgulansa da (107) bizim çalışmamızda cinsiyete göre anlamlı fark gözlenmezken, Genel Cerrahi polikliniğinden gelen örneklerde daha yüksek oranda direnç saptandı. Bu hastaların daha önceden tedavi almış ve komplike hastalar olduğu düşünüldü. Yaş gruplarına bakıldığında ise 45-59 yaş grubunda yüksek oranda klaritromisin direnci tespit edilmiştir. CLSI tarafından *H. pylori* antibiyotik direncinin belirlenmesinde standart metod olarak önerilen agar dilüsyon ve E test arasında benzer sonuçlar alındığı bildirilmiştir (105,106). Bu yüzden agar dilüsyon metoduyla yaptığımız klaritromisin direnci çalışması önceki öneri ve deneyimlere uygundur. Van'da yapılan çalışmada E test ile tespit edilen direnç oranı %24.0 (109), Ankara'da E test ve agar dilüsyon metoduyla gerçekleştirilen çalışmada bildirilen klaritromisin direnci oranı % 20.5 (106), İstanbul'da E test ile yapılan çalışmada ise % 8.8 oranında (102) klaritromisin direnci bildirilmiştir. Bu direnç oranları bölgesel farklılıklar olabileceğini akla getirmektedir. Elde ettiğimiz direnç oranı bölgemize ait ilk direnç oranını göstermesi bakımından anlamlı bulunmuştur.

Son yıllarda moleküler mikrobiyolojik tanı yöntemleri *H. pylori* tanısında yoğun olarak kullanılmıştır. Ancak nükleik asit amplifikasyon bazlı teknikler canlı ve ölü bakteri ayırımı yapamadıkları için eradikasyon tedavisinin takibinde

yalancı pozitif sonuçlar vereceklerinden kullanılmaması önerilmektedir (68). Moleküler mikrobiyolojik yöntemlerin yüksek duyarlılık ve spesifiteye sahip oldukları yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Primer seçimi, hedef DNA, specimen hazırlama, bakteriyel dansite PCR prosedürünü etkileyen faktörler olarak vurgulanmaktadır (3).

Çin’de 2006 yılında gastrik biyopsi örneğinde *H. pylori* varlığına bakılan 97 hastanın % 57.7’sinde PCR ile *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (111). Gürcistan’da 2006 yılında yapılan çalışmada PCR ile *H. pylori* varlığı yüksek oranda bulunmuş ve % 70.2 olarak gösterilmiştir (112). Gastrointestinal bulguları olan 250 hastaya uygulanan endoskopi sırasında antrumdan alınan çoklu biyopsi örneklerinden 2006 yılında yapılan çalışmada PCR ile % 44.0 oranında *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik bildirilmiştir (113). Bülent ve ark. tarafından 2003 yılında Malatya’dan bildirilen çalışmada yaş ortalaması 44.8 ± 15.9 olan gastrik ülser, duodenal ülser ve nonülser dispepsili 142 hastadan alınan antral ve corpus biyopsi örneğinden PCR ile *H. pylori* prevalansı %75.4 olarak bildirilmiştir (114).

Farklı coğrafik bölgeler ve farklı hasta gruplarında değişik oranlarla karşılaştığı bildirilmektedir (111-114). Bu çalışmada 147 antral biyopsi örneğinin 108’inde (% 73.5) PCR ile *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik saptandı ve Türkiye’den bildirilen çalışmalarla (114) benzer sonuçlar alındı. Erkek hastaların % 73.2’sinde, kadın hastaların % 73.6’sında PCR metoduyla *H. pylori* varlığı gösterildi. Cinsiyetlere göre bakıldığında *H. pylori* pozitifliğinde eşitlik söz konusuydu. Gastroenteroloji polikliniğinden gelen mide biyopsi örneklerinden % 77.6’sında, Genel cerrahi polikliniğinden gönderilen örneklerin ise % 60.0’ında etken gösterildi. Gastroenteroloji poliklinik hastalarında *H. pylori* pozitifliğinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Yaş gruplarına bakıldığında ise anlamlı bir fark gözlenmedi. Kültür ile karşılaştırıldığında duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktivite, negatif prediktivite ve total doğruluk oranları sırasıyla şöyle

bulundu: % 93.4, % 40.6, % 52.7, %89.7 ve % 62.5. Bildirilen bir çalışmada ise duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktivite ve negatif prediktivite değerleri sırasıyla % 95, % 95, % 100 ve % 97.7 olarak bulunmuştur (79). Karşılaştırıldığında bizim çalışmamızdaki düşük duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktivite değerlerinin kültürde izolasyon oranı düşüklüğünden kaynaklandığı düşünüldü.

FISH yönteminin *H. pylori*'nin varlığını ve klaritromisin direncini tespit etmede hızlı, doğru ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Endoskopi sonrası 3 saat içerisinde klinisyene tedavide yol gösterecek duyarlılık testi sonucunu genotipik olarak verilebilmektedir (73). Antrum ve korpustan endoskopik biyopsiyle alınan 100 örnek kültür ve FISH ile çalışılarak karşılaştırılmış, FISH yöntemiyle % 48.0, kültür metoduyla % 42 oranında pozitiflik bildirilmiştir. Buna göre duyarlılık ve özgüllük oranları % 98 ve % 100 olarak bulunmuştur (115). Almanya'da 2001 yılında yapılan bir çalışmada 67 mide biyopsi örneğinde kültür ve FISH ile % 73.1 *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik gösterilmiştir (116). Ankara'da 2005 yılında 117 mide biyopsi örneğinin kültür ile 47'sinde (% 40.2), formalin fikse parafin gömme preparatlardan yapılan FISH çalışmasında ise 70'inde (% 59.8) pozitiflik bildirilmiştir (117).

Bu çalışmada formalin fikse parafin gömme biyopsi örneklerinden yapılan FISH çalışmasında % 61.7 oranında *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik saptandı. Bu oran bildirilen bazı çalışmalardan yüksek olarak bulunsa da (115) Türkiye'den bildirilen çalışmayla (117) benzer sonuç bulunması coğrafi farklılıklar olabileceğini akla getirmektedir. Kliniklere göre *H. pylori* varlığı yönünden pozitiflik oranlarına bakıldığında anlamlı fark gözlenmedi. Erkek hastada ve ileri yaş grubunda yüksek pozitiflik saptandı. PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılık % 72.5, özgüllük % 74.1 olarak bulundu. Bildirilen çalışmalara göre (115) duyarlılık ve özgüllük oranlarını düşük bulundu. Bunun

sebebi olarak duyarlılık ve özgülüğü çok yüksek olan PCR'ın referans test olarak alınması düşünülmektedir.

Demiray ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan bir derlemede *H. pylori*'de klaritromisin direncinin günümüzde artış gösterdiği, bundan dolayı tedavide başarısızlıklara neden olduğu bildirilmiştir. FISH metodunun kültüre bağlı olmadan aynı anda hem *H. pylori* varlığı hem de klaritromisin direncinin belirlendiği moleküler teknik olduğu vurgulanmıştır (118). Rüssmann ve ark. FISH metoduyla % 16.3 klaritromisin direnci tespit ederken, dirençli ve duyarlı suşların bir arada bulunduğu örnek oranını ise % 8.1 olarak bildirmişlerdir (116). Can ve ark. ise formalin fikse parafin gömme örneklerde ise % 23.9 oranında pozitiflik saptanmıştır (117). Tedaviye dirençli hastalarda Almanya'da 2004 yılında yapılan bir çalışmada ise formalin fikse parafin gömme 104 örnekte FISH metoduyla % 68.3 pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (119). İzmir'den Yılmaz ve ark. tarafından 2007 yılında dispepsili 54 hastanın formalin fikse parafin gömme örneklerinden FISH metoduyla klaritromisin direnci % 8.9, dirençli ve duyarlı suşların birlikte bulunma oranı ise % 60.0 olarak bildirilmiştir (120). FISH metoduyla klaritromisin direnci tespit edilmesinin duyarlılık ve özgülük oranları agar dilüsyon metoduyla karşılaştırıldığında % 97 ve % 94 olarak bildirilmiştir (121).

H. pylori tanısında kullanılan testlerin karşılaştırılması Tablo-VIII'de özetlenmiştir.

Bu çalışmada % 24.4 oranında klaritromisin direnci saptandı. Bu oran daha önceden bildirilen çalışmalarla özellikle de ülkemizden bildirilen çalışmalarda oranlarla paralellik göstermektedir (117). Tüm dünyada % 10-20 direnç görüldüğü (82) ancak tedaviye dirençli hastalarda bu oranın % 68.3'leri bulunduğu unutulmamalıdır (119). Çalışmamızda kültür ile karşılaştırıldığında duyarlılık % 100, özgüllük % 71.8 olarak bulundu. Bildirilen çalışmalara göre (121) özgüllük oranımız düşük olarak bulundu. Klaritromisine dirençli bulduğumuz 20 hastadan 2 tanesinde (% 10) duyarlı ve dirençli suşları aynı anda tespit edildi. Bu oran Rüssmann ve ark. (116) tarafından % 33.3, Yılmaz ve ark. (120) tarafından ise % 60 olarak bildirilmiştir. Genel olarak % 20'nin üstünde direnç görülen antibiyotikler için duyarlılık testi yapılması gerektiğinin önerildiği göz önüne alınırsa, üst GİS endoskopi ile tanıya gidilen dispeptik yakınmaları olan bölgemizdeki hastalarda klaritromisin direncine bakılmasının uygun olacağı düşünüldü.

Tablo-IX. *H. pylori* Tanısında Kullanılan Testlerin Karşılaştırılması

	HpSA (%)	Kültür (%)	PCR (%)	FISH (%)
Bizim Çalışmamız	54.9	41.5	73.5	61.7
Altındış ve ark. (78)	52.9	-	-	-
Cevrioğlu ve ark. (79)	40.7	-	-	-
Demiray ve ark. (97)	68.2	-	-	-
Inan ve ark. (102)	-	68.0	-	-
Gurtner ve ark. (103)	-	48,9	-	-
Chang ve ark. (111)	-	-	57.7	-
Olivares ve ark. (112)	-	-	70.2	-
Nimri ve ark. (113)	-	-	44.0	-
Bulent ve ark. (114)	-	-	75.4	-
Samarbaf ve ark. (115)	-	-	-	48.0
Rüssmann ve ark. (116)	-	-	-	73.1
Can ve ark. (117)	-	-	-	59.8

VI. SONUÇLAR

1 Ocak-30 Haziran 2006 döneminde son 4 haftada tedavi almamış, dispeptik yakınmaları olan hasta grubuna tanısal amaçlı üst gastrointestinal endoskopi uygulandı ve bu esnada antrumdan 2 adet biyopsi örneği alındı. Biyopsi örneklerinden kültür, FISH ve PCR çalışmaları yapıldı. Biyopsi örnekleri işlemlenen 147 hastanın 91'i (% 61.9) kadın, yaş ortalaması 45.2 ± 14.9 idi. Kliniklere göre dağılımı incelendiğinde Gastroenteroloji 112 örnek (%76.2), Genel Cerrahi 35 örnek (%23.8) şeklinde dağıldığı gözlemlendi. Ayrıca örnek verebilen 122 hastaya ait dışkı numuneleri HpSA testi için çalışmaya alındı.

HpSA için incelenen 122 dışkı örneğinden 67'sinde (% 54.9) pozitiflik saptandı. 147 biyopsi örneğinden kültür ile 61'inde (% 41.5) pozitiflik saptanırken, PCR ile 108'inde (% 73.5) pozitiflik bulundu. Çalışmaya alınabilen 133 parafin gömme blok örneğinden yapılan FISH incelemesinde ise 82 (% 61.7) pozitiflik görüldü. Klaritromisin direnci incelemesinde ise agar dilüsyon yöntemiyle % 11.6, FISH yöntemiyle % 24.4 pozitiflik gösterildi.

PCR ile karşılaştırıldığında FISH için duyarlılık % 72.5, özgüllük % 74.1 olarak bulundu. Bildirilen çalışmalara göre duyarlılık ve özgüllük oranlarını düşük bulundu.

VII. ÖZET

***Helicobacter pylori* Tanısında Floresan İn Situ Hibridizasyon ile Diğer Hızlı Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Eşlik Eden Klaritromisin Direncinin Araştırılması**

Helicobacter pylori, insanların midesine yerleşen spiral şeklinde, Gram negatif, mikroaerofilik bir bakteridir. Gelişmiş ülke populasyonlarında erişkinlerin % 50'si, gelişmekte olan ülkelerde ise toplumun % 90'ı *H. pylori* ile infekte olmaktadır. Gastrik ülser, duodenal ülser, gastrik MALT lenfoma, distal gastrik kanserde *H. pylori*'nin major etyolojik rolü açıkça gösterilmiştir.

Uygun tedavi protokollerinin belirlenmesi ve özellikle bakterinin eradikasyonu için etkenin doğru saptanması önemlidir. *H. pylori* tanısında invaziv (histopatolojik tanı, kültür, üreaz testi, moleküler metodlar) ve non-invaziv (üre nefes testi, serolojik testler, *H. pylori* gaita antijen testi) testler vardır. Semptomatik hastaların primer tanısı için invaziv testler halen kabul görmesine rağmen noninvaziv metodlar daha çok kullanılmakta ve uygulanması da oldukça kolay olmaktadır.

Çalışma 147 hastadan alınan (% 61.9 kadın ve yaş ortalaması 45.2±14.9) antral biyopsi örnekleriyle gerçekleştirildi. FISH ve HpSA çalışmaları sırasıyla 133 ve 122 örneğe uygulandı. Klaritromisin direnci varlığı FISH ve agar dilüsyon metodlarıyla araştırıldı.

Kültür ile 61 (% 41.5) hastada, HpSA ile 67 (% 54.9) hastada pozitiflik saptandı. FISH ve PCR ile sırasıyla 82 (% 61.7) ve 108 (% 73.5) hastada pozitiflik bulundu. Klaritromisin direnci incelemesinde ise agar dilüsyon yöntemiyle % 11.6, FISH yöntemiyle % 24.4 pozitiflik gösterildi. Bu çalışmada FISH için duyarlılık % 72.5, özgüllük % 74.1 olarak bulundu.

Çalışmamıza göre FISH metodu *H. pylori* infeksiyonu tanısında ve klaritromisin direncinin tespit edilmesinde, diğer tanı yöntemlerini destekleyen hızlı, duyarlı ve basit bir metod olarak kullanılabilir.

VIII. SUMMARY

Comparison of Fluorescent In Situ Hybridization and Rapid Diagnostic Methods on *Helicobacter pylori* Diagnosis, and Detection of Accompanying Clarithromycin Resistance

Helicobacter pylori, is a spiral shaped gram-negative, microaerophilic bacterium which colonizes gastric mucosa. The infected population with *H. pylori* prevalence rate is 50 % in developed countries and over 90 % in developing countries. Persistent infection induces peptic ulcer and chronic gastritis and has also been associated with gastric cancer and mucosal associated lymphoid tissue lymphoma.

The accurate detection of the organism is essential for proper patient management and particularly for the eradication of the bacteria following treatment. There have been many invasive (histopathological diagnosis, culture, urease tests, molecular test) and noninvasive methods (urea breath test, serological tests, HpSA) for the detection of *H. pylori*. Although some of the invasive methods are still accepted for the primary diagnosis in symptomatic patients, noninvasive methods are much more utilized in practice easier to perform.

This study was carried out with 147 patients (61.9% females; mean age 45.2 ± 14.9) who has taken antral biopsy. FISH and HpSA examinations were made on 133 and 122 samples respectively. The presence of clarithromycin resistance investigated with FISH and agar dilution methods.

A total of 61 (41.5%) biopsy samples were positive for culture and 67 (54.9%) stool samples were positive with HpSA. FISH and PCR positivity rates were found 61.7% (82) and 73.5% (108) respectively. Clarithromycin resistance was detected 11.6% with agar dilution and 24.4% with FISH. In our study on *H. pylori*, we have evaluated the sensitivity and specificity of the FISH method as 72.5% and 74.1% respectively.

Our study suggests that the FISH method can be used in the diagnosis of *H. pylori* infections and for detecting clarithromycin resistance as a rapid, sensitive and simple method to support other diagnostic tools.

IX. KAYNAKLAR

1. Yılmaz YA. *H. pylori*: Mikrobiyolojik tanı yöntemleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:182-186.
2. Francis M, Philippe L. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2007, p. 280–322
3. Dunn BE, Cohen H, JBlaser M. *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews 1997;10(4):720-741.
4. Altındış M, Özdemir M. *H. pylori* ve tanısı. Kocatepe Tıp Dergisi 2003; 2:1-12.
5. Marshall BJ. History of the discovery of *Campylobacter pylori*, *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease, Igaku Shoin Publishers, New York, N.Y. 1989: 7-24.
6. Langenberg ML, Tytgat GNJ, Schipper MEI, Rietra PJGM, Zanen HC. Campylobacter-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. Lancet 1984; i:1348.
7. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; i:1311-1315
8. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Curved Gram-Negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: *Campylobacteraceae* and *Vibrionaceae*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2006:392-428.
9. Kadanalı A, Özkut Z. *H. pylori* infeksiyonu: Epidemiyoloji, patogenez ve ilişkili hastalıkları. Klimik Dergisi 2004; 17(3):146-150.
10. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA 1994:65-69.
11. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. Br.Med.J. 1991; 302:1302-1305.

12. Anonymous. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 1994; 61:1-241
13. Bayerdorffer E, Ritter MM, Hatz R, Brooks W, Ruckdeschel G, Stolte M. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. Lancet 1995; 345:1591-1594.
14. Yılmaz YA. *H. pylori*: Nereden Nereye? *H. pylori* sempozyumu Ankara 2005; 9-11.
15. Erdem B. *Campylobacter ve Helicobacter*. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara. 1999:531-540.
16. Dubois A, Fiala N, Heman-Ackah LM, Drazek ES, Tarnawski A, Fishbein WN, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. Gastroenterology 1994; 106:1405-1417.
17. Akamatsu T, Tabata K, Hironaga M, Kawakami H, Uyeda M. Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. AM. J. Infect. Control 1996; 24:396-401.
18. Nurnberg M, Schulz HJ, Ruden H, Vogt K. Do conventional cleaning and disinfection techniques avoid the risk of endoscopic *Helicobacter pylori* transmission? Endoscopy. 2003 Apr;35(4):295-9.
19. Douglas B Nelson, Lawrence F Muscarella. Current issues in endoscope reprocessing and infection control during gastrointestinal endoscopy. World J Gastroenterol 2006;12(25):3953-3964
20. Bellack NR, Koehoorn MW, MacNab YC, Morshed MG. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. Epidemiol Infect. 2006 Jun;134(3):439-49. Epub 2006 Mar 2. Review.
21. Megraud F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. Aliment. Pharmacol. Ther. 1995; 9(Suppl. 2):85-91.
22. Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, DiMagno EP, Carpenter HA, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. J. Natl. Cancer Inst. 1991; 83:1734-1739.

23. Neugut AI, Hayek M, Howe G. Epidemiology of gastric cancer. *Semin. Oncol.* 1996; 23:281-291.
24. Bayerdorffer E, Ritter MM, Hatz R, Brooks W, Ruckdeschel G, Stolte M. Healing of protein losing hypertrophic gastropathy by eradication of *Helicobacter pylori*-is *Helicobacter pylori* a pathogenic factor in Menetrier's disease? *Gut* 1995; 35:701-704.
25. Tokuhara D, Okano Y, Asou K, Tamamori A, Yamano T. Cytomegalovirus and *Helicobacter pylori* co-infection in a child with Menetrier disease. *Eur J Pediatr.* 2007 Jan;166(1):63-5. Epub 2006 Jul 21.
26. Yilmaz MD, Aktepe O, Cetinkol Y, Altuntas A. Does *Helicobacter pylori* have role in development of otitis media with effusion? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005 Jun;69(6):745-9. Epub 2005 Feb 16.
27. Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 1993; 111:483-490.
28. Mizoguchi H, Fofioka T, Kishi K, Nishizono A, Komada R, Nasu M. Diversity in protein synthesis and viability of *Helicobacter pylori* coocoid forms in response to various stimuli. *Infect Immun* 1998;66(11):5555-5560
29. Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JAG, Vandenbroucke Grauls CMJE. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* 1997;65(9):3672-3679.
30. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, Vieira MJ. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2007; Mar 30
31. <http://www.jyi.org/articleimages/101/originals/img1.jpg>
32. Goodwin DY, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* 1987;19:257-267.
33. Ogata M, Araki K, Ogata T. An electron microscopic study of *Helicobacter pylori* in the surface mucous gel layer. *Histol Histopathol.* 1998 Apr;13(2):347-58.

34. Birkholz S, Knipp U, Nietzki C, Adamek RJ, Opferkuch W. Immunological activity of lipopolisaccharide of *Helicobacter pylori* on human peripheral mononuclear blood cells in comparison to lipopolisaccharides of other intestinal bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993;6:317-324
35. Kanegasaki S, Tanamoto K, Yasuda T. Structure activity relationship of lipid A: Comparison of biological activities of natural and synthetic lipid A's with different fatty acid compositions. *J Biochem (Tokyo)*. 1986;99:1203-1210.
36. Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterisation of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1995;63:1567-1572.
37. Marais A, Mendz GL, Hazell SL, Megraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genomic era. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999;63(3):642-674
38. Hachem CY, Clarridge JE, Evans DG, Graham DY. Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*. 1995;48:714-716.
39. Burns BP, Mendz GL, Hazell SL. Characterization of the glucose transport in *Helicobacter pylori*. *Acta Gastroenterol Belg*. 1993;56:44.
40. Olivera-Severo D, Wassermann GE, Carlini CR. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz J Med Biol Res*. 2006 Jul;39(7):851-61
41. Dunn BE, Vakil NB, Schneider BG, Zitzer JB, Peutz T, Phadnis SH. Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein homolog in human gastric biopsies. *Infect Immun*. 1997;65:1181-1188.
42. Clayton CL, Pallen MJ, Kleanthous H, Tabaqchali S. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucleic Acid Res*. 1990;18:362.
43. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB and Glancy RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust*. 1985;142:436-439
44. Olivares D, Gisbert JP. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98:374-386.

45. Heatley VR, Wyatt JI. Gastritis and Duodenitis.in:Haubrich Ws Schafner F ed. Bockus Gastroenterology 5.edit.Philedelphia: W.B.Saunders Company 1995;639-640.
46. Marshall B. *Campylobacter pyloridis* and gastritis. Lancet 1986; 153:650.
47. Liu Y, Vosmaer GD, Tytgat GN, Xiao SD, Ten Kate FJ. Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: *Helicobacter pylori* associated and non-associated gastritis. J Clin Pathol. 2005 Sep;58(9):927-31.
48. Miki K, Urita Y. Using serum pepsinogens wisely in a clinical practice. Chin J Dig Dis. 2007;8(1):8-14.
49. Sandıkçı MU, Doran F, Köksal F, Sandıkçı S, Uluhan R, Karaer P. *Helicobacter pylori* eradikasyonundan sonra duodenal ülser rekürrensi. 10.Türk Gastroenteroloji kongresi kitapçığı. 1993;69.
50. Wotherspoon AC, Hidalgo CO, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet. 1991;338:1175-1176.
51. Çırak MY. *H. pylori* fizyopatolojisi. IV. Ulusal Sindirim Yoluyla Bulaşan İnfeksiyonlar Sempozyumu. Mersin 2005:50-58
52. Shao SH, Wang H, Chai SG, Liu LM. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. World J Gastroenterol. 2005 May 28;11(20):3011-3.
53. Gatti LL, Modena JL Payao SL et al. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. Acta Tropica. 2006;100:232–240
54. Sheu SM, Sheu BS, Yang HB, Lei HY, Wu JJ Anti-Lewis x Antibody Promotes *Helicobacter pylori* Adhesion to Gastric Epithelial Cells. Infect Immun. 2007;75(6):2661-7.
55. Slomiany BL, Slomiany A Cytosolic phospholipase A2 activation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-induced interference with gastric mucin synthesis. IUBMB Life. 2006;58(4):217-23.

56. Hirai M, Azuma T, Ito S, Kato T, Kohli Y, Fujiki N. High prevalence of neutralizing activity to *Helicobacter pylori* cytotoxin in serum of gastric-carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 1994;56:56–60.
57. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14648-14653.
58. Christine PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules. *Trends Microbiol* 2000;8:354-360.
59. van Doorn LJ, Figueriredo C, Sanna R, Plaiser A, Scheneberger P, de Boer WA, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998;115:58-66.
60. Çırak MY. *H. pylori* enfeksiyonlarının patogenezi. *H. pylori* sempozyumu. Ankara 2005:12-19.
61. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Tevy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield C. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br. Heart J.* 1994; 71:437-439.
62. Clyne M and Drumm B. Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. *Infect. Immun.* 1993;61:4051–4057.
63. Bayle D, Wangler S, Weitzenegger T et al. Properties of the P-Type ATPases Encoded by the *copAP* Operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *Journal of Bacteriology.* 1998;180(2):317–329
64. Lingwood CA, Wasfy G, Han H Huesca M. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 1993;61:2474–2478.
65. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993;262:1892–1895.
66. Boyle EC, Finlay BB. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Current Opinion in Cell Biology.* 2003;15:633–639.

67. Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F and Ng CS. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994;102:503–507.
68. Köksal F. *H. pylori* tanısında mikrobiyolojik yaklaşım. *H. pylori* sempozyumu. Ankara 2005:28-46.
69. Sen N, Yılmaz O, Simsek I, Kupelioglu AA, Ellidokuz H. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. *Helicobacter.* 2005 Aug;10(4):353-9.
70. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, Rathbone BJ, Heatley RV and Axon AT. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. 1991;*Gut* 32:1415–1418.
71. Genta RM and Graham DY. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *H. pylori* density and distribution. *Gastrointest. Endosc.* 1994;40:342–345.
72. Laine L, Cohen H, Sloane R, Marin-Sorensen M and Weinstein WM. Interobserver agreement and predictive value of endoscopic findings for *H. pylori* and gastritis in normal volunteers. *Gastrointest. Endosc.* 1995;42:420–423.
73. Wada S, Matsuda M, Shingaki M, Kai A Takahashi S, Itoh T. Antimicrobial susceptibility tests and resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Kansenshogaku Zasshi.* 2003;77(4):187-94
74. Yılmaz Ö, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence in situ hybridization method in diagnosis of *H. pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *H. pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2007 February 7; 13(5): 671-675.
75. Gürler N. *H. pylori*'nin tanısında yenilikler ve hasta başı testlerin önemi. IV. Ulusal Sindirim Yoluyla Bulaşan İnfeksiyonlar Sempozyumu.Mersin 2005:58-64.
76. Bindayna KM, Al Baker WA, Botta GA. Detection of *Helicobacter pylori* *cagA* gene in gastric biopsies, clinical isolates and faeces. *Indian J Med Microbiol.* 2006;24(3):195-200.
77. Liviu A. Sicinschi, Pelayo Correa, Luis E. Bravo, Barbara G. Schneider. Detection and typing of *Helicobacter pylori* *cagA/vacA* genes by radioactive, one-

step polymerase chain reaction in stool samples from children. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;52:197– 207

78. Altindis M, Dilek ON, Demir S, Akbulut G. Usefulness of the *Helicobacter pylori* stool antigen test for detection *Helicobacter pylori* infection. *Acta Gastroenterol Belg*. 2002 Apr-Jun;65(2):74-6.

79. Cevrioglu AS, Altindis M, Yilmazer M, Fenkci IV, Ellidokuz E, Kose S. Efficient and non-invasive method for investigating *Helicobacter pylori* in gravida with hyperemesis gravidarum: *Helicobacter pylori* stool antigen test. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004 Apr;30(2):136-41.

80. Erzin Y, Altun S, Dobrucali A et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA₂* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*. 2006 Dec;11(6):574-80.

81. Opekun AR, Abdalla N, Sutton FM et al. Urea breath testing and analysis in the primary care Office. *J Fam Pract*. 2002 Dec;51(12):1030-2.

82. Kearney DJ. Retreatment of *Helicobacter pylori* infection after initial treatment failure. *Am J Gastroenterol* 2001;96(5):1335-1339

83. Lopez-Brea M, Martinez MJ, Domingo D, Snachez I, Alarcon T. Metronidazol resistance and virulence factors in *Helicobacter pylori* as markers for treatment failure in a pediatric population. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;24:183-188

84. Breger SA, Gorea A, Moskowitz M, Santo M, Gilat T. Effect of inoculum size on antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:782-783

85. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:285-289.

86. Adrienne Z. Ables, I. Simon, Emily R. Update on *Helicobacter pylori* Treatment. *American Family Physician*. 2007;75(3):351-358.

87. Kwon DH, Kato M, El-Zaatari FAK, Osato MS, Graham DY. Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol Let* 2000;188:197-202

88. Büke AÇ, Aydın A, Tünger A, Günşar F, Ersöz G, Saydam C, Günhan C. *Helicobacter pylori*'nin amoksisilin, klaritromisin ve metronidazole karşı duyarlılığın disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. *İnfeksiyon dergisi (Turkish Journal of Infection)* 1997;11(3):267-269
89. Engin D, Ercis S, Özarslan E, Özen H, Güneş D, Hasçelik G, Demir H, Şimşek H. Antibiotic susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains isolated in Turkey. 11th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms, 1-5 Eylül 2001, Freiburg, Almanya
90. Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR, Realdi G, Osata MS. Sensitivity of amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* to other penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1803-1804
91. Kumala W, Rani A. Patterns of *Helicobacter pylori* isolate resistance to fluoroquinolones, amoxicillin, clarithromycin and metronidazoles. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006 Sep;37(5):970-4.
92. Fallahi GH, Maleknejad S. *Helicobacter pylori* culture and antimicrobial resistance in Iran. *Indian J Pediatr*. 2007 Feb;74(2):127-30.
93. Trieber CA, Taylor DE. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline.. *J Bacteriol* 2002 apr;184(8):2131-40
94. Dominique Velin, Pierre Michetti. Immunology of *Helicobacter pylori* infection. *Digestion*. 2006;73(2-3):116-23.
95. Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS), 2006.
96. Paimela HM, Oksala NK, Kaariainen IP, Carlson PJ, Kostiala AA, Sipponen PI. Faecal antigen tests in the confirmation of the effect of *Helicobacter* eradication therapy. *Ann Med*. 2006;38(5):352-6.
97. Demiray E, Yilmaz O, Sarkis C, Soyturk M, Simsek I. Comparison of invasive methods and two different stool antigen tests for diagnosis of *H. pylori* infection in patients with gastric bleeding. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul 14;12(26):4206-10.
98. Gisbert JP, de la Morena F, Abreira V. Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006 Aug;101(8):1921-30.

99. Inelmen EM, Maccari T, Enzi G, Gasparini G, Fuson F, Davanzo B, Tiozzo F, Ancona F, Sergi G, Maggi S. *Helicobacter pylori* infection diagnosis in hospitalised elderly patients: the stool antigen test (HpSA) in comparison with other methods. *Aging Clin Exp Res*. 2004 Oct;16(5):349-55.
100. Gisbert JP, Abaira V. Accuracy of *Helicobacter pylori* diagnostic tests in patients with bleeding peptic ulcer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006 Apr;101(4):848-63.
101. Ozcay F, Kocak N, Temizel IN, Demir H, Ozen H, Yuce A, Gurakan F. *Helicobacter pylori* infection in Turkish children: comparison of diagnostic tests, evaluation of eradication rate, and changes in symptoms after eradication. *Helicobacter*. 2004 Jun;9(3):242-8.
102. Inan A, Gulsun S, Guveli H, Tascioglu J, Goktas P. An investigation of *Helicobacter pylori* using culture, histopathological and serological examination methods and its antimicrobial sensitivities. *Saudi Med J*. 2005 Apr;26(4):597-600.
103. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens *Clin Microbiol*. 2004 Oct;42(10):4512-8..
104. Fallahi GH, Maleknejad S. *Helicobacter pylori* culture and antimicrobial resistance in Iran. *Indian J Pediatr*. 2007 Feb;74(2):127-30.
105. Best LM, Haldane DJ, Keelan M et al. Multilaboratory comparison of proficiencies in susceptibility testing of *Helicobacter pylori* and correlation between agar dilution and E test methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Oct;47(10):3138-44.
106. Can F, Demirbilek M, Selcuk H, Arslan H, Boyacioglu S. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from antral biopsy specimens. *Mikrobiyol Bul*. 2004 Oct;38(4):349-53.
107. Janssen MJ, Schneeberger PM, de Boer WA, Laheij RJ, Jansen JB. Low prevalence of metronidazole- and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in the 's-Hertogenbosch region, 1998-2003. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2005 Sep 24;149(39):2175-7.
108. Chen J, Chen FB, Yu JD, Chen XJ, Li ZY, Zhang XP. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistant to clarithromycin, amoxicillin and metronidazole in children. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2004 Oct;42(10):769-71.

109. Aygül K, Berktaş M, Mete R, Güdücüoğlu H, Türkdoğan K. *Helicobacter pylori*'nin antral biyopsi örneklerinden izolasyonu ve antimikrobiklere duyarlılığı. ANKEM Dergisi. 2007;21(Ek1):44.
110. Lopes AI, Oleastro M, Palha A, Fernandes A, Monteiro L. Antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* strains in Portuguese children. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 May;24(5):404-9.
111. Chang YH, Wang L, Lee MS, Cheng CW, Wu CY, Shiau MY. Genotypic characterization of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* from biopsy specimens of patients with gastroduodenal diseases. *Mt Sinai J Med*. 2006 May;73(3):622-6.
112. Olivares A, Buadze M, Kutubidze T et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Georgian patients with dyspepsia. *Helicobacter*. 2006 Apr;11(2):81-5.
113. Nimri LF, Matalka I, Hani KB, Ibrahim M. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. *BMC Gastroenterol*. 2006 Oct 4;6:27.
114. Bulent K, Murat A, Esin A et al. Association of *cagA* and *vacA* presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol*. 2003 Jul;9(7):1580-3.
115. Samarbaf-Zadeh AR, Tajbakhsh S, Moosavian SM et al. Application of Fluorescent in-situ Hybridization (FISH) for the Detection of *Helicobacter pylori*. *Turk J Med Sci*. 2006;36:1-6
116. Rüssmann H, Kempf VAJ, Koletzko S, Heesemann J and Autenrieth IB. Comparison of Fluorescent In Situ Hybridization and Conventional Culturing for Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsy Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39:304–308.
117. Can F, Yılmaz Z, Demirbilek M et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization from formalin-fixed, parafin-embedded gastric biopsy specimens. *Can J Microbiol*. 2005;51(7):569-73.
118. Demiray E, Yılmaz O. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* and molecular methods for the detection of resistance. *Mikrobiyol Bul*. 2005;39(3):399-408.

119. Juttner S, Vieth M, Miehke S et al. Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue. *Mod Pathol*. 2004;17(6):684-9.

120. Yılmaz O, Demiray E, Tumer S et al. Detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin susceptibility using formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens by fluorescence in situ hybridization. *Helicobacter*. 2007;12(2):136-41.

121. Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG et al. Evaluation of seaFAST, a rapid fluorescence in situ hybridization test, for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3494-6.