

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HELICOBACTER PYLORI* VE KLARİTROMİSİN
DİRENCİNİN PARAFİN BLOKLARDA
FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON (FISH)
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

EBRU DEMİRAY

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HELICOBACTER PYLORI* VE KLARİTROMİSİN
DİRENCİNİN PARAFİN BLOKLARDA
FLORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON (FISH)
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU DEMİRAY

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Özlem YILMAZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2005.KB.SAG.019 proje numarası ile desteklenmiştir)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yetişmemde büyük emeği geçen, tezimin her aşamasında sonsuz destek ve katkılarını gördüğüm danışman hocam Sayın Doç. Dr. Özlem YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Güzel bir bilimsel çalışma ortamı paylaştığım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda proje arkadaşım Araş. Gör. Sait TÜMER'e ve Floresan *In Situ* Hibridizasyon teknolojisi ile floresan mikroskopisi konularında deneyimlerini paylaşan Yard. Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Y. Hakan ABACIOĞLU'na ve tüm hocalarıma tezimin gerçekleştirilmesinin en önemli aşamasında bana gösterdiği katkılardan dolayı Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Kutsal YÖRÜKOĞLU'na, tezimin istatistiksel analizindeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a, Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. İlkay Şimşek'e ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda deneysel alt yapı olanaklarından yararlanma fırsatını sağlayan Prof. Dr. Meral SAKIZLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

2004 yılından bu yana tezimle ilgili her konuda tüm bilimsel paylaşımı ve desteği için Julie Morris'e (ASCP, CDC, USA) teşekkür ederim.

Tüm eğitim yaşamımda çalışma aşkı ve çabamı destek ve sevgileriyle güçlendiren babam ve anneme sonsuz teşekkürlerimle...

Saygılarımla
Ebru DEMİRAY

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ	ii
RESİM LİSTESİ	iii
KISALTMALAR.....	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Tarihçe	7
4.2. <i>Helicobacter</i> Ailesi	8
4.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Yapısı ve Mikrobiyolojik Özellikleri	9
4.3.1. Bakterinin Morfolojisi.....	9
4.3.2. Tanımlanması ve Biyokimyasal özellikleri	13
4.3.3. Solunum ve Metabolizması	14
4.4. Epidemiyoloji ve Prevalans	14
4.5. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu ve Patogenez	16
4.5.1. Histopatolojik Değişiklikler	17
4.5.2. Doku Hasarının Mekanizması	17
4.5.2.1. Virülans Faktörleri	18
4.5.2.1.1. Midede Yangının İndüklenmesi	19
4.5.2.1.2. Mide Mukozal Bariyerinin Bozulması	22
4.5.2.1.3. Mide Fizyolojik Dengesinde Değişiklik	25
4.5.2.2. Kolonizasyon Faktörleri	25
4.5.2.2.1. Hareket	25
4.5.2.2.2. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz.....	25
4.5.2.2.3. Isı Şok Protein Homologları.....	26
4.6. <i>Helicobacter pylori</i> ile İlişkili Hastalıklar	26
4.6.1. Akut Enfeksiyon	27
4.6.2. Kronik Aktif Gastrit.....	27
4.6.3. Duodenal Ülser	27
4.6.4. Mide Ülseri	28

4.6.5. Mide Kanseri	28
4.6.6. Mide Lenfoması	28
4.6.7. Nonülser Dispepsi.....	29
4.6.8. Diğer Hastalıklar ve Sendromlar.....	29
4.7. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler	29
4.7.1. İnvaziv Yöntemler	30
4.7.1.1. Biyopsi Üreaz testi.	30
4.7.1.2. Histopatolojik İnceleme.....	31
4.7.1.3. Kültür.....	31
4.7.1.4. Moleküler Tanı Yöntemleri	32
4.7.1.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).	32
4.7.1.4.2. Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)..	33
4.7.1.4.3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)	33
4.7.1.4.4. DNA Enzim Immun Assay	33
4.7.1.5. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri	33
4.7.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler	34
4.7.2.1. Üre Nefes Testi	34
4.7.2.2. Serolojik Yöntemler	35
4.7.2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
4.7.2.2.2. Westernblot	36
4.7.2.3. Dışkı Örneklerinde Kullanılan Yöntemler	36
4.7.2.3.1. Dışkı Kültürü	36
4.7.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri	36
4.7.2.3.3. Dışkı PCR	37
4.7.2.3.4. Dışkı Real Time PCR.....	37
4.7.2.4. Diğer Örnekler İçin Kullanılan Tanı Yöntemleri.....	38
4.7.2.4.1. İdrar Antikor Testleri.....	38
4.7.2.4.2. Tükürük antikor Testleri.....	39
4.8. <i>H. pylori</i> Enfeksiyonunda Tedavi.....	39
4.8.1. Tedavide Kullanılan Ajanlar.....	39
4.8.1.1. Antisekretuar Ajanlar.....	39
4.8.1.2. Antimikrobiyal Ajanlar.....	40

4.8.2. Tedavi Seçimi.....	41
4.8.3. Tedavi Başarısızlığı.....	41
4.9. Antimikrobiyal Direnç	42
4.9.1. Antimikrobiyal Direncin Prevalansı	42
4.9.2. Antimikrobiyal Direnç ve Klinik Etki	43
4.9.3. Antimikrobiyal Direncin Moleküler Mekanizması	44
4.9.3.1. Metranidazol Aktivitesi ve Direnç Mekanizması	45
4.9.3.2. Tetrasiklin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	46
4.9.3.3. Klaritromisin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	46
4.9.3.4. Amoksisilin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	48
4.9.3.5. Florokinolon Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	48
4.9.3.6. Rifamisin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	48
4.9.4. Klaritromisin Direnci Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	48
4.9.4.1. Fenotipik Yöntemler	49
4.9.4.1.1. Agar Dilüsyon	49
4.9.4.1.2. Sıvı Dilüsyon.....	49
4.9.4.1.3. Disk Difüzyon	49
4.9.4.1.4. Epsilometer Test (E-test).....	49
4.9.4.2. Genotipik Yöntemler.....	49
4.9.4.2.1. PCR-RFLP	50
4.9.4.2.2. PCR-OLA.....	51
4.9.4.2.3. PCR-DEIA.....	51
4.9.4.2.4. PCR-LİPA	51
4.9.4.2.5. PCR-PHFA.....	51
4.9.4.2.6. 3M-PCR	51
4.9.4.2.7. Real-Time PCR Hibridizasyon Testi	52
4.9.4.2.8. Floresan In Situ Hibridizasyon	52
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
5.1. Çalışma Grubu	56
5.2. Biyopsi Örneklerinin Alınması	56
5.2.1. Hızlı Üreaz Testi.....	57
5.2.2. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi	57

5.2.3. Örneklerin Floresan İn Situ Hibridizasyon Yöntemi İle İncelenmesi.....	58
5.2.3.1.Örneklerin Floresan İn Situ Hibridizasyon Yöntemi İçin Hazırlanması.....	58
5.2.3.2. Deparafinizasyon.....	58
5.2.4. Kalite Kontrol Örneklerinin Floresan in situ hibridizasyon Yöntemi İle İncelenmesi.....	58
5.2.4.1. Kalite Kontrol Örneklerinin Floresan in Situ Hibridizasyon Yöntemi İçin Hazırlanması.....	58
5.3. Floresan İn Situ Hibridizasyon Yönteminin Uygulanması.....	59
5.3.1. Test Reaktiflerinin Hazırlanması	59
5.3.2. Hibridizasyon	60
5.3.3. Görüntü Analizi ve Değerlendirme	61
5.4. İstatistiksel Analizler	62
6. BULGULAR	62
6.1. Demografik Bulgular.....	62
6.2. Endoskopik Bulgular	63
6.3. Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine Göre Histopatolojik Bulgular.....	65
6.4. FISH bulguları	65
7. TARTIŞMA	72
8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	79
9. KAYNAKLAR	80
10. EK 1	98

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. <i>H. pylori</i> 'nin genel özellikleri.....	18
Tablo 2. Üst gastrointestinal sistem ve <i>H. pylori</i> ilişkisi.....	26
Tablo 3. <i>H. pylori</i> enfeksiyonu tanı testleri.....	30
Tablo 4. <i>H. pylori</i> tiplendirme yöntemleri.....	34
Tablo 5. <i>H. pylori</i> enfeksiyonunda tedavi	41
Tablo 6. <i>H. pylori</i> enfeksiyonu tedavisinde kullanılan antimikrobiyallerin prevalansı, etki mekanizması ve direnç.....	44
Tablo 7. Klaritromisin direncinin saptanmasında moleküler yöntemler.....	50
Tablo 8. FISH yönteminin epifloresan mikroskopunda değerlendirilmesi.....	61
Tablo 9. Hastaların cinsiyete göre dağılımı.....	63
Tablo 10. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin hızlı üreaz testi ve histopatoloji sonuçları.....	63
Tablo 11. <i>H. pylori</i> enfeksiyonunda antrum ve korpus histopatoloji ve FISH sonuçları..	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. A. <i>H. pylori</i> 'nin morfolojisi, B. <i>H. pylori</i> flajellasının yapısı.....	10
Şekil 2. <i>H. pylori</i> genomu.....	12
Şekil 3. <i>H. pylori</i> 'nin üreaz operonu.....	22
Şekil 4. Klaritromisin peptidiltransferazı bloklayıcı aktivitesi	47
Şekil 5. FISH metodu.....	53
Şekil 6. <i>H. pylori</i> spesifik oligonükleotid problemleri.....	54

RESİM LİSTESİ

- Resim 1.** Pozitif kontrol (klaritromisin duyarlı *H. pylori* ATCC 43504).....67
- Resim 2.** Pozitif kontrol (klaritromisin dirençli *H. pylori*)..... 68
- Resim 3.** Antrum kesitinde klaritromisin duyarlı *H. pylori* **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile (kırmızı floresan: klaritromisin direnci negatif) **C.** FITC/Rhodamin/DAPI triple band filtre ile görüntülenme (yeşil floresan: klaritromisin duyarlı *H. pylori*, mavi floresan: DAPI) (objektif büyütme:100x)..... 69
- Resim 4.** Antrum kesitinde klaritromisin dirençli *H. pylori* **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile görüntülenme (kırmızı floresan: klaritromisin direnci) (Objektif büyütme: 100x).....70
- Resim 5.** Antrum kesitinde *H. pylori*'nin görüntülenmesi (karışık populasyon) **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band (kırmızı floresan: klaritromisin direnci) **C.** FITC/Rhodamin/DAPI triple band filtre ile görüntülenme (sarı floresan: klaritromisin dirençli *H. pylori*, yeşil floresan: klaritromisin duyarlı *H. pylori*) (objektif büyütme:100x).....71

KISALTMALAR

<i>Helicobacter pylori</i>	: <i>H. pylori</i>
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
MALT	: Gastrik mukoza ilişkili lenfoid doku lenfoması
IACR	: International Agency for Cancer Research
UBT	: Urea breath test (üre nefes testi)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
E-test	: Epsilometer test
PNL	: Polimorfonükleer lokositler
σ^{28}	: Sigma faktör 28
σ^{54}	: Sigma faktör 54
LPS	: Lipopolisakkarit
OMPs	: Dış membran proteinleri
HspB	: Isı şok proteini B
BabA ₂	: Blood-group antigen binding adhesin
bp	: Baz çifti
<i>VacA</i>	: Vacuolating cytotoxin (Vakuol oluşturuucu sitotoksin)
<i>CagA</i>	: Cytotoxin-associated gene (Sitotoksin ile ilişkili gen) A
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNase	: Deoksiribonükleaz
IL 8	: İnterlökin 8
TNF α	: Tümör nekrozis faktör alfa
<i>Cag</i> PAI	: <i>cag</i> pathogenicity island
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa B
AP-1	: Erken-yanıt transkripsiyon faktör aktivatör protein 1
HP-NAP	: <i>H. pylori</i> nötrofil adherans faktör
VCAM-1	: Vascular adhesion molecules 1
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecules 1
PAF	: Platelet activating factor
Le _x	: Lewis x antijeni

Le_y	: Lewis y antijeni
kDa	: Kilodalton
ABC transporter	: The Human ATP-Binding Cassette Transporter
ATPase	: P tip adenzin trifosfat
Hpn	: Histidine-rich protein
INOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
NO	: Nitrik oksit
SOD	: Süperoksit dismutaz
AhpC	: Alkil hidroperoksit redüktaz
NAP	: Neutrophil activation protein (Nötrofil aktive eden protein)
IFN-γ	: İnterferon gama
<i>glr</i>	: Glutamat rasemaz
TORs	: Toksik oksijen radikalleri
NSAID	: Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaç
GORD	: Gastroözofagal reflü
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	: Real-time polimeraz zincir tepkimesi
SDS-PAGE	:Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
EHPSG	: Avrupa <i>Helicobacter pylori</i> Çalışma Grubu
MIC	: Minimal inhibitör konsantrasyonu
PPI	: Proton pompa inhibitörü
PBPs	: Penisilin bağlayan protein
NADPH	: Nikotinamide adenine dinucleotide phosphate
QRDR	: Kinolon direnç belirleme bölgesi
RFLP	: Restriksiyon uzunluk polimorfizmi
OLA	: Oligonükleotid ligasyon testi
DEIA	: DNA enzim immun assay
LİPA	: Line prob assay

PHFA	: Preferential homoduplex formation assay
3M-PCR	: 3' mismatched reverse primer polimeraz zincir tepkimesi
M-FISH	: Multipleks floresan in situ hibridizasyon
GIS	: Gastrointestinal sistem
HLO	: <i>Helicobacter</i> like organism
PBS	: Phosphate Buffered Saline
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
PCI	: Görüntü analiz sistemi
IM	: İntestinal metaplazi
SPSS	: Statistical package for the social sciences

1. ÖZET

***Helicobacter pylori* ve Klaritromisin Direncinin Parafin Bloklarda Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH) Yöntemi ile Belirlenmesi**

Helicobacter pylori enfeksiyonunda klaritromisin direnci artış göstermekte ve eradikasyon tedavisinde başarısızlık oranı artmaktadır. 23S rRNA geninin 2142, 2143 ve 2144 pozisyonundaki nokta mutasyonları ile oluşan klaritromisin direncinin belirlenmesinde fenotipik duyarlılık testlerinin yanısıra moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Çalışmamızda parafin blokları mide biyopsi örneklerinde deparafinizasyon sonrası *H. pylori* enfeksiyonu tanısı ve klaritromisin direncinin saptanması için floresan *in situ* hibridizasyon metodu (FISH) uygulandı.

Mayıs-Kasım 2003 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne dispeptik yakınmaları ile başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan toplam 54 hasta (17 erkek, 37 kadın, yaş ortalaması 46.48±13.12; yaş aralığı 21-78) çalışmaya alındı. Herbir hastadan 2 antrum ve 2 korpus biyopsi örneği alındı ve *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için hızlı üreaz testi ve histopatolojik inceleme altın standart yöntemler olarak uygulandı. *H. pylori* enfeksiyonu varlığı hızlı üreaz testi ve histopatoloji olumluluğu ile, *H. pylori* enfeksiyonu yokluğu ise her iki testin olumsuzluğu ile belirlendi. Toplam 108 formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş antrum ve korpus biyopsilerinden hazırlanan histolojik kesitler deparafinize edildi ve FISH (seaFAST *H. pylori* Combi-Kit; SeaPro Theranostics International bv, Lelystad, The Netherlands) metodu ile incelendi. Bu teknikte *H. pylori*'nin spesifik identifikasyonu için Hpy1 ve *H. pylori*'nin klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarını hedefleyen ClaR1 (A2143G), ClaR2 (A2144G) ve ClaR3 (A2143C) floresan işaretli oligonükleotid probalar kullanıldı. Toplam 54 hastanın 45'i (%83.3) altın standart yöntemler ve FISH metoduna göre *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 9'u (%16.7) olumsuz bulundu. 45 hastanın 14'ünde (%31.1) klaritromisin duyarlı *H. pylori* suşu, 4'ünde (%8.9) klaritromisin dirençli *H. pylori* suşu ve 27'sinde (%57.5) ise klaritromisin dirençli ve klaritromisin duyarlı *H. pylori* suşu saptandı. Klaritromisin dirençli suşlar yüksek oranda saptandı, bu da bu hasta grubundaki olası tedavi başarısızlığını gösterecektir. Duyarlılık %95.6, seçicilik %77.8, olumlu öngörü değeri %95.6, olumsuz öngörü değeri ise %77.8 olup, altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi (p=1.00, kappa=0.73). Sonuç

olarak, parafin bloklı dokularda FISH metodu *H. pylori*'nin saptanması ve eş zamanlı olarak klaritromisin direncinin belirlenmesi için altın standartlara göre oldukça hızlı, 3 saat içerisinde uygulanabilen, kültürden bağımsız, fiyat açısından uygun ve güvenilir bir tekniktir. *H. pylori*'nin basiller formu ve kokoid formunu saptayabilen FISH metodu, parafin bloklı dokulara uygulanmasının yanı sıra taze biyopsi örneklerine ve *H. pylori* kültüründen izole edilen kolonilere de uygulanabilmektedir. Bu teknik klinik açıdan önemi nedeniyle, bakteriyal dansiteyi saptayabilme, tedavinin takibinde ve tedaviye başlanmadan önce tedavideki başarısızlığın önlenmesine olanak sağlayacağı için rutin uygulamalarda kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori*, FISH metodu, klaritromisin direnci

2. SUMMARY

Detection of *Helicobacter pylori* and Clarithromycin Resistance from Formalin-fixed, Paraffin-embedded Gastric Biopsy Specimens by Fluorescence *In Situ* Hybridization

Helicobacter pylori is etiologically associated with gastritis, gastric and duodenal ulcers, gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *H. pylori* can be detected by noninvasive and invasive methods, the latter requiring endoscopy. Recently, clarithromycin resistance in *H. pylori* strains is increasing and eradication therapy of this bacterium is becoming more difficult. Molecular methods have frequently been applied besides phenotypic methods for susceptibility testing to detect clarithromycin resistance due to mutations in the 2143 and 2144 positions of 23S rRNA gene. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method can be used to detect *H. pylori* and determine clarithromycin resistance simultaneously as a non culture method.

In this study, fifty four patients (17 males, 37 females; mean age, 46.48±13.12 years; age range, 21 to 78 years) were studied for the detection of *H. pylori* and determine clarithromycin resistance in paraffin embedded tissue sections retrospectively by FISH method between May and November 2003. All patients had dyspeptic symptoms and were referred to a diagnostic upper endoscopy. Two antrum and corpus biopsies were taken from each patient. Rapid urease test and histopathology were applied to all patients as gold standard methods for the diagnosis of *H.pylori* infection. A total of 108 paraffin embedded biopsy specimens were deparaffinized and examined by FISH (seaFAST *H. pylori* Combi-Kit; SeaPro Theranostics International bv, Lelystad, The Netherlands) method. This technique was performed using the fluorescence-labeled oligonucleotide probes: Hpy1 for the specific identification of *H. pylori* and ClaR1 (A2143G), ClaR2 (A2144G) and ClaR3 (A2143C) targeting to the point mutations for clarithromycin resistance. Forty five of 54 patients (83.33%) were diagnosed as positive and 9 (16.67%) were negative for *H. pylori* infection by gold standard methods and FISH method. Among the specimens from 45 patients infected with *H. pylori*, FISH identified *H. pylori* infection in 43 (95.5%) deparaffinized biopsy specimens. Among the 9 negative *H. pylori* infection, 7 (77.7%) were negative for *H. pylori* infection by FISH with 2 false positive results. *H. pylori* negativity was confirmed by histopathology showing no *H. pylori* on 2 consecutive tissue sections.

Fourteen (31.11%) positive biopsy samples exhibited clarithromycin-sensitive *H. pylori* strains, 4 (8.89 %) were clarithromycin-resistant *H. pylori* strains and 27 (57.45%) were both wild-type and clarithromycin resistant *H. pylori* strains. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for FISH method were 95.56%, 77.78%, 95.56% and 77.78%, respectively. The statistical difference was not found when compared to the gold standard methods ($p=1.00$, kappa=0.73). In conclusion, FISH method in paraffin embedded tissues is a rapid, accurate and cost-effective method for the detection of *H. pylori* infection and to determine clarithromycin resistance within three hours according to the gold standards as a non-culture method. This method can also be applied to fresh biopsy samples and to the isolated colonies from a culture of *H. pylori*, also detecting both the culturable bacillary forms as well as the coccoid forms of *H. pylori* besides the paraffin embedded tissue sections. This technique will be helpful determining the bacterial density and the success of treatment where clarithromycin has been widely used in populations to increase the efficacy of the treatment and to clarify the treatment failure *in vitro*.

Key words: *Helicobacter pylori*, FISH method, clarithromycin resistance

3. GİRİŞ VE AMAC

Helicobacter pylori (*H. pylori*) hareketli, spiral yapıda mikroaerofilik Gram negatif bakteridir (1-7). *H. pylori* gastrit, gastrik ve duodenal ülserler, gastrik adenokarsinoma ve mukoza-ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma da major patojen olarak bildirilmekte, ancak fonksiyonel dispepside rolü tartışılmaktadır (8,9). *H. pylori* enfeksiyonu ile oluşan gastroduodenal hastalıklar gözönüne alındığında bakterinin halk sağlığı açısından önemli bir rolü bulunmaktadır (9). *H. pylori* gastrik mukozada kolonize olur ve gastrik epitel hücreleri hedef alır (10). Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı %70-90, gelişmiş ülkelerde %25-50'dir (6,11). İnsandan insana bulaş birincil bulaş yoludur. Fekal-oral, oral-oral geçiş bildirilmektedir (12). Midenin kronik *H. pylori* enfeksiyonu gastroduodenal hastalıkların gelişiminde temel bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. *H. pylori* "International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından Sınıf I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (13).

Mide mukozasına kolonizasyonda yüksek hareket özelliği, bol miktarda üreaz üretimi, yüzey lektinlerinin ekspresyonu gibi hücresel karakteristikler rol oynar (10). *H. pylori* enfeksiyonu tanısında invaziv-noninvaziv testler geliştirilmiştir. Non invaziv testler; idrar, tükürük ve feçes gibi klinik örneklerin incelenmesi, seroloji, ¹³C üre nefes testi (UBT)'dir (6). Dışkı antijen testleri ve dışkı PCR non invaziv yöntemlerdir. İnvaziv testler (kültür, histopatolojik inceleme, hızlı üreaz testi, biyopsi PCR) endoskopi gerektiren biyopsi temelli yöntemlerdir (2). Histoloji ve kültür enfeksiyonunun saptanmasında kolay ve pratik uygulanamamasına rağmen duyarlılık ve özgüllük açısından altın standart yöntemlerdir (1,2). Enfeksiyonun eradikasyonunda klaritromisin ve amoksisilin ya da metronidazol ile PPI temelli 7 ve 14 günlük üçlü tedavi protokolü uygulanmaktadır (3,7,14). Klaritromisin, *H. pylori* eradikasyonu için önerilen birçok tedavi protokolleri içinde önemli bir role sahiptir (15). Ancak günümüzde klaritromisine dirençli suşlar artmakta ve eradikasyon tedavisinin başarısını azaltmaktadır (7). Klaritromisin direnci Amerika'da %5-14, Avrupa'da %10'un üzerinde bildirilmektedir (7,16). Son yıllarda ülkemizde bu direnç oranı, bir çalışmada %16.8, diğer çalışmalarda ise %52-56 olarak bildirilmiştir (17-19). *H. pylori* kültürü ve antibiyogram uygulamalarındaki teknik zorluklar ve zor üreyen bir bakteri olması nedeniyle direncin belirlenmesi için pratik, ucuz ve uygulanabilir yöntemler gereklidir. Tedavi öncesi direncin varlığının saptanmasının önemi bildirilmektedir (14,20). Klinik *H. pylori* izolatlarında,

klaritromisin direnci 23S rRNAda baskın üç ayrı nokta mutasyonu aracılığı ile gerçekleşir (3,15,21). Adenin rezidüsünün 2143 ve 2144 pozisyonlarında guaninle (A2143G ve A2144G) ya da 2143 pozisyonunda sitozinle yer değiştirdiği üç mutasyon 23S rRNAnın peptidil transferaz bölgesinde lokalizedir (3,14,21,22). *H. pylori* rRNAsının floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) metodu ile saptanması; kültürden bağımsız, gastrik doku kesitlerinde patojenin ve klaritromisin direncinin belirlenmesinde spesifik bir yöntem olduğu bildirilmektedir (3,7). Oldukça duyarlı ve gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin saptanmasında geleneksel olarak kültürden daha güvenilir ve daha pratik bir metod olduğu düşünülmektedir (21).

Bu çalışmada, retrospektif olarak gastrik dokudan *H. pylori*'nin ve eş zamanlı olarak rRNA hedefli floresansla işaretlenmiş oligonükleotit problemleri ile klaritromisin direnç genotipinin saptanmasında FISH tekniğinin uygulanması, klaritromisin ve benzer antibiyotiklere karşı gelecekte ülkemizde oluşabilecek direncin saptanmasında uygulanabilirliği ve değeri araştırılması amaçlanmıştır (4,21).

H. pylori enfeksiyonunun klinik öneminin artması çeşitli tanısal metodların geliştirilmesini ve rutinde uygulanabilirliklerinin araştırılmasını gerekli kılmıştır. *H. pylori* enfeksiyonunun doğru tanısında altın standart patojenin kültürü olduğu kadar ¹³C üre nefes testi, hızlı üreaz testi ve histopatolojik olarak pozitif bulunmasıdır (21). Gastrik biyopsi örneklerinden patojenin kültürü ve makrolid direncinin saptanmasında E-test ya da agar dilüsyon yöntemi kullanılmaktadır. Her iki teknik, kültürün daha uzun sürede enkübasyonunu gerektirir ve suşta varolan nokta mutasyonlarının tipini tanımlayamaz (15).

FISH'in temel avantajı, hedef rRNA'nın floresanla işaretlenmiş oligonükleotid problemleri makrolid duyarlılığının tanısında kullanılabilir, böylece klinisyene doğru tedavi programı için önemli bilgi sağlanmaktadır (21). E-test fenotipik olarak klaritromisin direncini saptamakta, FISH ise klaritromisin dirençli mutantlar ile klaritromisin duyarlı wild tip arasında ayırım yapabilme ve *H. pylori*'nin saptanması için kanıtlanmış genotipik bir tekniktir (14). FISH klaritromisin dirençli *H. pylori* mutantlarının saptanması için hızlı bir yöntemdir ve sonuçlar endoskopiden sonra üç saat içinde verilebilmektedir. Problemler ticari olarak sağlanabilir ve bu yöntem maliyet açısından çok uygundur, epifloresan mikroskobu dışında özel donanıma gerek duymaksızın laboratuvarlarda uygulanabilir (14,23).

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

H. pylori ve gastroduodenal hastalıklardaki rolünün bulunması bakteriyoloji ve gastroenteroloji için son yirmi yılın en önemli buluşlarından biridir (24).

Hayvan ve insanlardaki gastrik spiral yapıdaki bakteriler 100 yıldan fazla bir süredir biliniyordu. Hayvanlarda spiral bakteriler ilk kez Rappin tarafından 1881'de ve Bizzozero tarafından 1893'te yayınlandı (25,26). 1896'da Salomon kedi, köpek ve sıçanların midesinde spiral bakterileri tesbit etti ve farelerden geçmiş olabileceğini belirtti (24,25). 1899'da, Jaworski insanlardan aldığı gastrik yıkama suyunun sedimentinde spiral mikroorganizmaları tanımladı. Ancak bu buluşu sadece Polonya'da yayınlandığı için fazla dikkat çekmedi (24).

20. yüzyılın başlarında 1906'da Balfour maymun ve köpeklerin gastrik ülser örneklerinde, Krienitz gastrik kanserli bir hastanın gastrik örneklerinde spiral mikroorganizmaları tanımladı (16). Luck ve Seth midedeki üreaz aktivitesini tanımladılar ve antibiyotik tedavisi ile kaybolduğunu bildirdiler, ancak gastrik mikroorganizmalar ile ilişki 1984'e kadar kurulamadı. 1938 yılında Doenges, otopsi örneklerinin %43'ünün midesinde spiral mikroorganizmaları saptadı. Örnekler postmortem toplanmış ve kontaminasyon riski nedeniyle bu bulgular şüpheyle karşılandı (24,26,27). İki yıl sonra mide ülserli ve kanserli hastaların cerrahi örneklerinde de spiroket tesbit edildi. Bu son çalışma, mikroorganizmanın bir postmortem kontaminan olmadığını ve gastrik bir patojen olduğunu destekledi (24).

1940 yılında Freedburg ve Barron midede kıvrımlı mikroorganizmalar olduğunu bildirdi. Fitzgerald ve Murphy, 1950 yılında peptik ülser hastalığı ile mukoza yüzeyindeki üreaz aktivitesi arasında ilişki olduğunu gösterdi (27). 1954'te Palmer, insan mide biyopsi örneklerinde yaptığı incelemede bakteriye rastlamadığından gastrik ortamdaki tüm bakterilerin kontaminan olduğunu bildirdi. Salgılanan asit nedeniyle mide lümeninin steril olduğu, mukozal lezyonlara gastrik asiditenin sebep olduğu düşünüldü. 1910 yılında Schwartz'ın "no acid no ulcer" kavramı kabul edildi (24).

Liebre ve Le fevre 1959 yılında tetrasiklin tedavisinden sonra midede üreaz aktivitesinin kaybolduğunu ve bu enzimin bakteri kaynaklı olabileceğini bildirdiler. 1968 yılında Delluva germ-free hayvanlarda midede üreaz bulunmadığını ve bu enzimin bakteri kaynaklı olduğunu saptadı (27).

1975’de Steer ve Colin-Jones, gastrik mukozada mukus salgılayan hücrelerle ilişkili, en az bir flagellası bulunan spiral bakterileri tanımladılar. Bu bakterilere yanıt olarak da polimorfonükleer lökositlerin (PNL) gastrik mukozaya göç ettiklerini öne sürdü. Endoskopik biyopsi örnekleri kültüre alındı. Ancak kültürde spiral bakteriler değil, sadece *Pseudomonas aeruginosa* üretildi. Dört yıl sonra Fung ve arkadaşları kronik gastritli hastaların gastrik mukozalarında histolojik ve yapısal olarak bakteriyi gösterdiler. Ancak mukozal lezyonlarla ilişkisi saptanamadı (24,27).

J. Robin Warren ise *Campylobacter jejuni*’ye benzeyen spiral bakterinin mide hastalıklarıyla ilişkisini ve midenin steril olmadığını bildirdi. Robin Warren ve Barry Marshall biyopsi örneklerini *Campylobacter* ve nonselektif besiyerinde kırk sekiz saat inkube ettiler. Fakat üreme saptanmadı. 1982’de beş günlük tatilden döndüklerinde *Campylobacter*’e benzer bakterilerin ürediğini gördüler. Morfolojik olarak *Campylobacter*’e benzediğinden “*Campylobacter like organism*” adı verildi (24,28,29).

1984’de Warren ve Marshall *Campylobacter pyloridis* olarak isimlendirdi (24,28,29).

1986’da massif üreaz salgıladığı kanıtlandı (28).

1987’de *Campylobacter pylori* adını aldı (28).

1989’da Goodwin ve arkadaşları bakterinin *Campylobacter* ailesine ait olmadığını gösterdiler ve *Helicobacter pylori* adını verdiler (24,27).

1994’de “National Institutes of Health” *H. pylori*’nin peptik ülserin birincil nedeni olduğunu; “International Agency for Cancer Research” de sınıf I karsinojen olduğunu bildirdi (30,31).

2005’de Warren ve Marshall *Helicobacter pylori* bakterisini ve onun peptik ülser ve gastritteki rolünü gösterdikleri için Nobel tıp ödülünü almaya hak kazandılar (32).

4.2. *Helicobacter* Ailesi

Helicobacter ailesi yapı olarak diğer Gram negatif kıvrımlı basillerden (örneğin *Campylobacter*) enzimatik aktiviteleri, yağ asiti profilleri, üreme özellikleri, nükleik asit hibridizasyon profilleri ve 16S rRNA sekans analizlerine göre ayrılır. *Campylobacter jejuni* ve *H. pylori* genomlarının sekanslanmasıyla da *Campylobacter* ve *Helicobacter* organizmaları arasındaki farklılıklar kanıtlanmıştır (11,25,33).

Helicobacter ailesi 20 tür içerir. Aile, 0.3-1.0 µm en ve 1.5-10 µm boyda spiral veya kıvrımlı basilleri içerir. *Helicobacter* türleri Gram-negatif, spor oluşturmeyen basillerdir, uzamış kültürlerde küresel veya kok şekline dönüşürler, hareketlidirler ve genellikle çok sayıda bipolar kılıflı flagellaları vardır (11,25). Diğer *Helicobacter* türlerinden farklı olarak *H. pylori*'nin çok sayıda, monopolar, kılıflı flagella'sı vardır. Çeşitli *Helicobacter*'ler (örneğin *Helicobacter pullorum* ve *Helicobacter canadensis*) *Campylobacter*'ler gibi kılıfsız flagella içerir (11,25,27). Tüm *Helicobacter*'ler oksidaz pozitifdir. Karşılaştırmalı genomik analizler, *H. pylori*'de pentoz-fosfat yolu, Entner-Doudoroff yolu, glikoliz, Krebs reaksiyonunun siklik olmayan şekli gibi önemli katabolik yolların bulunduğunu desteklemektedir. *Helicobacter* türleri, memelilerin ve kuşların gastrointestinal ve hepatobilier sistemlerinden izole edilmiştir (11,25).

H. heilmannii (eski adı *Gastrospirillum hominis*); insan gastrik biyopsi örneklerinde tanımlanmış, kültürde üretilmiştir. İnsanlarda gastritin sık olmayan bir sebebidir, nadir izole edilir (5,11,25). *H. pylori*'ye göre daha uzun ve daha sık kıvrımları olan bir bakteridir (34).

4.3. *H. pylori*'nin Yapısı ve Mikrobiyolojik Özellikleri

4.3.1. Bakterinin Morfolojisi

H. pylori spiral şeklinde, gastrik biyopsi örneklerinde uçları yuvarlak, mikroaerofilik, Gram-negatif bakteridir. Katı besiyerindeki kültürlerinde basile benzer yapıda görülür, spiral şekli nadir görülür veya hiç görülmez. Katı veya sıvı besiyerindeki uzamış kültürlerinde ise kok yapısı daha fazla görülür (11,16,27,35). Elektron mikroskopunda kok yapısının U şeklinde basil olduğu ve iki kolunun da membranöz bir yapıyla bağlandığı görülmüştür. Kok formu metabolik olarak aktiftir ancak, *in vitro* kültürde üretilemez. Gastrik biyopsi örneklerinde bakterinin uzunluğu 2.5-5.0 µm, genişliği 0.5-1.0 µm'dir. Unipolar yerleşimli 4-6 adet flajellası vardır (11).

i. Flajellanın Yapısı

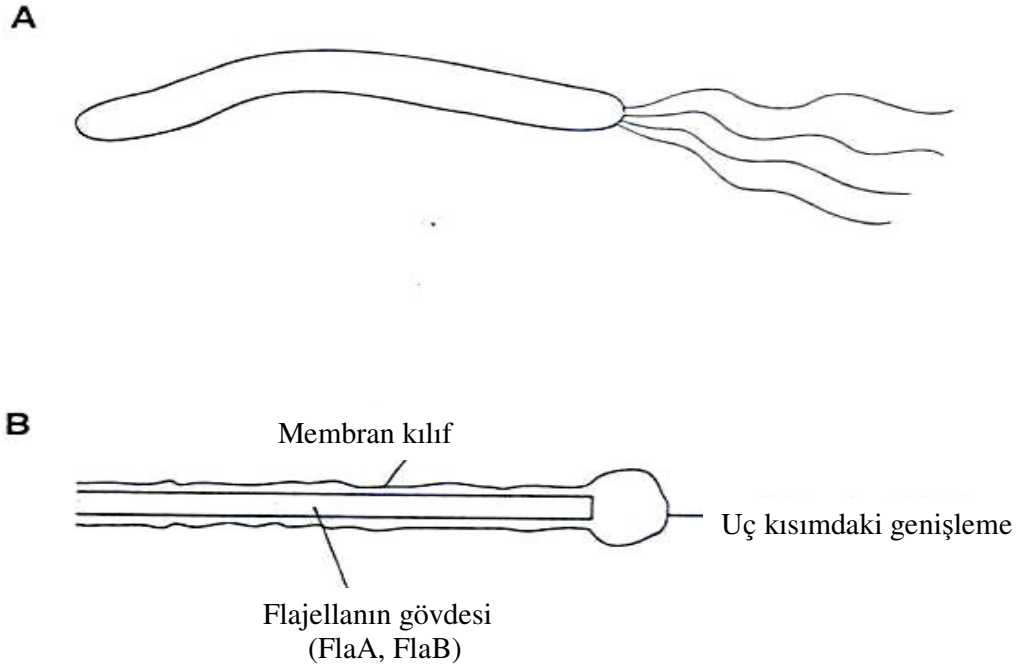
Flajella bakterinin hareketini sağlar (11,24). Her bir flajellum yaklaşık 30 µm uzunluğunda, 2.5 nm kalınlığındadır. Üç kısımdan oluşur (Şekil 1).

1. Bazal cisim: Flajellanın motor ünitesidir. Ortamın proton veya sodyum gradiyentine göre hareketi düzenler

2. Flajellar çengel (kıvrım): Bazal cisim ile eksternal flajellar filamenti bağlar ve FlgE proteinini içerir.

3. Flajellar filament: Uzun heliks yapısındadır, rotasyon ile bakteriyi ileriye doğru hareket ettirir.

Flajellar kılıf fosfolipid, lipopolisakkarit ve proteinden oluşan, bakteriyel dış membrana benzeyen tipik çift katlı bir membrandır. Protein ve yağ asiti yapılarında fark vardır. Flajellar kılıfın görevi flajellar filamenti mide asiditesinden korumak, diğer bir muhtemel fonksiyonu da flajelline karşı oluşan antikorların bakterinin hareketini engellemesini önlemektir (11,24). Flajellar filament FlaA ve FlaB flajellin proteini içerir. *flaA* geninin transkripsiyonu için sigma faktör 28 (σ^{28}), *flaB* geninin transkripsiyonu için sigma faktör 54 (σ^{54}) gereklidir. *flaA* ve *flaB* genleri bakteri kromozomunun farklı bölgelerinde yerleşmiştir ve regulasyonu da farklıdır. Bu iki proteinin konsantrasyonundaki değişikliklerin bakterinin enfeksiyon oluşturması ile persistan kalması gibi farklı durumlara uyumunda etkili olduğu düşünülmektedir (24,36).



Şekil 1: A. *H. pylori*'nin morfolojisi, B. *H. pylori* flajellasının yapısı *

* 36. kaynaktan alınmıştır.

ii. Hücre Duvar Yapısı

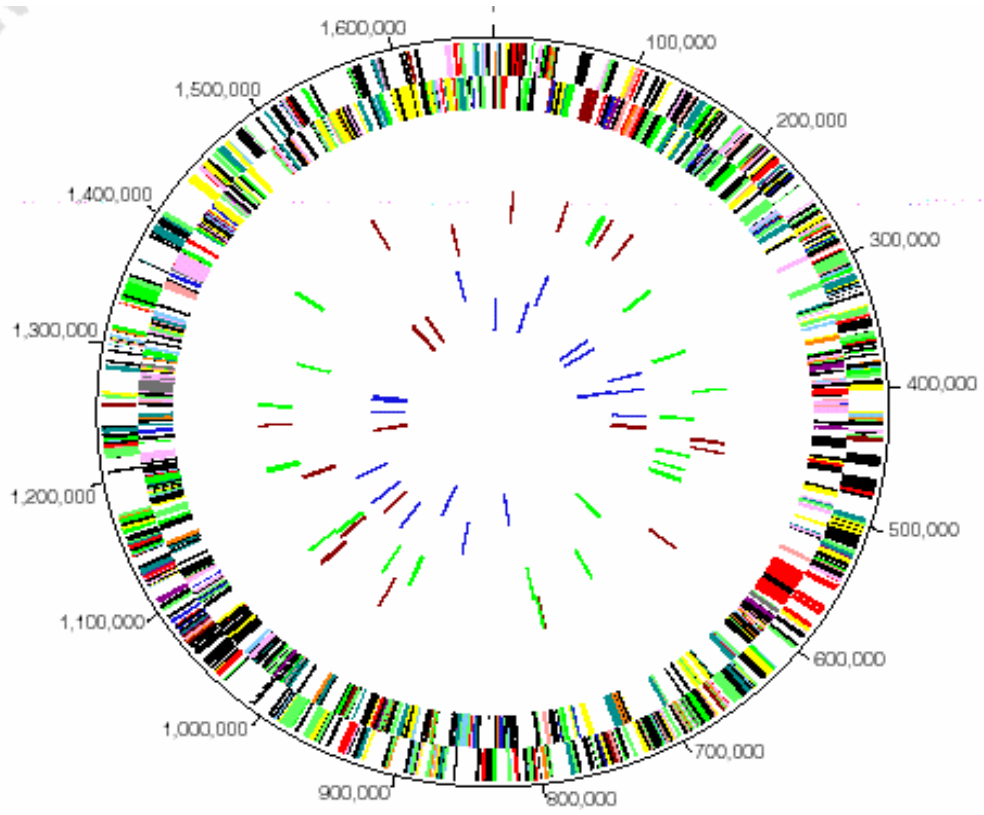
Gram negatif hücre duvar yapısı görülür. Dış membran Gram negatif bakteri yüzeyinde süreklilik gösteren yapısal bir elemandır. Asimetrik çift tabakalıdır. İç tabakada fosfolipidler ve iri glikolipidler olan lipopolisakkarit (LPS) bulunur. Dış membran, *H. pylori* gibi bakteriyel patojenlerde konak koruyucu immunitesinin potansiyel hedefidir ve konak immun yanıtından kaçmasını sağlar. Bu yüzden dış membran aşılı mikroorganizmalara karşı koruma yanıtının uyarılmasında kullanılmıştır (37,38). Moleküler ağırlığı 31-80 kDa arasında değişen dış membran proteinleri (OMPs) tanımlanmıştır. Üreaz ve ısı şok protein B (HspB) bulunur (11). Dış membran proteinlerini 32 genden oluşan bir “supergene” ailesi kodlar. Bu dış membran proteinlerinden bakteriyel adhezin olan BabA2 insan kan grup antijeni olan Lewis b'ye bağlanır. Diğer iki OMP, AlpA ve B, *H. pylori*'nin gastrik dokuya bağlanmasında gereklidir; AlpA, B ve BabA2 için farklı reseptörler vardır (39). AlpAB bir operonda organize olan HopB ve HopC, iki çeşit kanal şekilli membran poruna sahiptir (40). HopA, HopB, HopC, HopD olarak tanımlanan dört porin ailesi dış membranda yer alır, muhtemelen besin up-take'inde etkilidirler ve bakterinin kolonizasyonu ve persistansında önemli rol oynarlar (41). HopE porin molekülü de tanımlanmıştır (11). HopZ vital adezin proteindir. HopZ primer olarak bakteri yüzeyinde yerleşir. HopZ geni belirgin olarak *H. pylori* yoğunluğu ve kolonizasyon yeteneği ile ilişkilidir. HopH dış inflamatuvar proteini de tanımlanmıştır (40). *H. pylori* genomunun dizi analizinin yapılması ile 32 dış membranla ilişkili protein (Hop proteinleri) bulunmuştur. Bunlar, en fazla bilinen *H. pylori* adhezinlerini kapsar (42).

H. pylori'de LPS yapının enfeksiyonun sürekliliğinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. *H. pylori* LPS'nin O zinciri yapısal olarak Lewis kan grup antijenlerine benzer. Konak ve *H. pylori* arasındaki bu benzerlik bakterinin patogenezinde rol oynar (11,24,43).

iii. Genom Yapısı

H. pylori genomu oldukça küçük, 1.6-1.73 Mb boyutlarındadır (36,44). *H. pylori* 26695 suşu 1.667.867 baz çifti (bp) bulunan 1.590 gen dizisi içerir (45). G+C içeriği % 34.1-37.5, yaklaşık % 35.2'moldür. *H. pylori* suşlarının % 40'ı 1.5-23.3 kb arasında değişen büyüklükte plazmid içerirler. Ancak bunlar virulans faktörü değildir (Şekil 2) (11). *H. pylori* kromozomu

16S ve 23S rRNA genlerinden üç kopya içerir. *H. pylori* genomu suşlar arasında değişkenlik gösterir. Fakat *H. pylori* suşları arasında fenotipik değişiklik azdır. Aynı hastanın antrum, fundus ve korpus'undan izole edilen suşlar aynı genomik yapıyı gösterirler (44). *H. pylori* genomunda değişik lokalizasyonlarda bulunan genlerce üreaz, flajellin, VacA (vakuol yapıcı sitotoksin) ve CagA (cytotoxin-associated gene) proteinleri sentezlenir (11). *H. pylori* genom dizisi TCA döngüsündeki enzimler ve çeşitli glukoz oksidize yollakları enzimlerini kodlayan genlerin dizilerini içerir (36).



Şekil 2. *H. pylori* genomu *

*45. kaynaktan alınmıştır

iv. Üreme Özellikleri

H. pylori'yi kültürde üretebilmek için besinsel olarak zengin ortam, serum ve mikroaerofilik şartlar gerekir. Seçici olmayan agar bazlı besiyerinde en iyi şartlar altında

küçük koloni yapılarının görülebilmesi için 2-3 gün gerekir. Tam kan, serum, maya ekstresi, parçalanmış insan eritrositleri, Iso Vitalex, hemin, siklodekstrin ve kolesterol gibi bazı katkı maddeleri *H. pylori*'nin sıvı besiyerinde üremesini artırır. Ancak bakterinin sıvı besiyerinde üremesinde ekilen bakteri yoğunluğunun ve suş farklılıklarının da rolü vardır (46). Nemli ortamda, 37 °C' de, % 5-10 karbondioksit, % 80-90 nitrojen ve % 5-10 oksijen içeren ortamda en iyi ürer. Nemli atmosferde artan hidrojen içeriği *H. pylori*'nin üremesini artırır. At kanı, at serumu veya koyun kanı eklenmiş beyin kalp infüzyon agar, brucella agar, Tryptone Soya agar, Columbia agar veya Skirrow's agar kültürde kullanılan besiyerlerindedir (25,27,33,47). *H. pylori* oda ısısında hızla yaşayabilirliğini kaybettiği için, biyopsi örnekleri 2 saat içinde petri kabına konmalıdır. *H. pylori* çevresindeki atmosfer ve kurumaya duyarlıdır ve bu nedenle uygun transport ortamı kullanılmalıdır. Önerilen transport ortamı %20 gliserollü brucella broth, %20 gliserollü sistein ablimi broth ya da Stuart's transport ortamını içerir. Gastrik biyopsi örneklerinin kültürde üremesi için en az 5 gün gereklidir (25,27). Birçok suş 3-5 günde ürer, bu süre nadiren 7 güne kadar uzar (32-34). Besiyerine, diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek için *H. pylori* suşlarının birçoğunun doğal dirençli olduğu antibiyotiklerden vankomisin, trimetoprim, amfoterisin B, sefsulodin, polimiksin B, nalidiksik asit eklenebilir (27,31,46,47).

4.3.2. Tanımlanması ve Biyokimyasal özellikleri

Seçici olmayan kan içeren besiyerinde küçük, ışığı geçiren gri koloniler şeklinde ürer. Zayıf β hemoliz görülür. Gram boyama yapıldığında da küçük, kıvrımlı hafif tombul basiller şeklinde görülür. Gram boyama özelliği, katalaz, oksidaz, üreaz pozitifliği *H. pylori*'nin tanımlanmasında kullanılır (31,34). Gram boyama ile genellikle soluk boyanır, karbol fuksin ile zıt boyama tanımlanmasına yardımcı olabilir. Faz-kontrast mikroskobu ile birçok *Helicobacter* suşlarının hareketi görülür. *H. pylori* ve birçok *Helicobacter* türü katalaz pozitifdir. *H. pylori* suşları sitokrom oksidaz, katalaz ve üreaz aktivitesi gösterirler (25). Ayrıca *H. pylori*'nin alkalen fosfataz, gamma glutamil aminopeptidaz, lösin aminopeptidaz, Deoksiribonükleaz (DNase) aktiviteleri pozitif; hızlı H₂S, hippurat hidrolizi, nitrat indirgeme reaksiyonları, indoksil asetat aktivitesi negatiftir (48).

4.3.3 Solunum ve Metabolizması

H. pylori'nin karbonhidratları fermentatif veya oksidatif yolla parçalamadığı gösterilmiştir. Ancak bakterinin pentoz fosfat döngüsü için tipik olan enzim aktivitesine sahip olduğu ve hücre membranının glikoz kinaz aktivitesi taşıdığı belirlenmiştir. Böylece D-glikozu parçalayabilir. *H. pylori* üre döngüsü de içerir. Bu sayede fazla nitrojeni bakteriden atabilir (11). *H. pylori*'de Entner-Doudorof yolunun varlığı gösterilmiştir. Aminoasitleri anaerop bakteriler gibi fermentatif yolla metabolize edebilir (11,49). *H. pylori* de solunum zincirinin son halkası olan sitokromlar gösterilmiştir. İn vitro üremesi için gerekli olan yüksek CO₂ seviyesi kısmen asetil koenzim A karboksilaz enziminin aktivitesiyle karşılanabilmektedir. *H. pylori* hücreleri fosfat granülleri içerir. Bakteri midede dejenere olmuş epitel tabakasıdayken dış enerji kaynağı bulunmadığında, yedek enerji kaynağı olarak bunları kullanabilir (11).

4.4. Epidemiyoloji ve Prevalans

H. pylori dünyada yaygın olarak görülen enfeksiyonlardan biridir ve primer olarak 10 yaşından önce kazanıldığı kabul edilmektedir (11,31,50,51). Enfeksiyonun prevalansı, ülkeler arasında ve aynı ülkedeki populasyon grupları arasında büyük farklılık gösterir (42,51). Enfeksiyonun prevalansı sosyoekonomik düzeyle yakından ilişkilidir. Düşük sosyoekonomik şartlardaki etnik gruplarda yapılan çalışmalarda prevalans yüksek bulunmuştur (42,52,53). Ayrıca sosyoekonomik düzeyi düşük ailelerin çocuklarında enfeksiyon genellikle hayatın birinci yılında alınmaktadır (54,55). Gelişmekte olan ülkelerde prevalans % 70-90 iken, gelişmiş ülkelerde % 25-50'dir (11,27,31). Gelişmiş ülkelerde yaklaşık olarak populasyonun üçte biri *H. pylori* ile enfekte olduğu bildirilmiştir (31). Gelişmiş ülkelerde *H. pylori* ile enfekte olma oranının azalma göstermesi; yaşam standardının yükselmesi, eğitim düzeyinin artması ve hijyen şartlarındaki düzelmedir (16,42,51,56). Yaş enfeksiyonun prevalansı ile ilişkili en önemli değişkendir. Enfeksiyon oranı 1950'den önce doğan insanlarda daha yüksektir (16). Prevalans çocuklarda ~%10, 50 yaşındaki bireylerde ~%50 oranında olup yaşla birlikte artış gösterir (29,31). Ancak yaş ile birlikte *H. pylori* prevalansındaki artış "doğumsal kohort etkisi", sürekli maruz kalma, düşük düzeyde de olsa erişkin çağında

kazanılan enfeksiyon ile açıklanabilir. Doğumsal kohort etkisi; söz konusu erişkin popülasyonun çocuklukta enfekte olduğu zaman dilimindeki daha yüksek bulaş oranını yansıtmaktadır. Yaşla birlikte artışı en iyi bu görüş açıklamaktadır (16,31,42,51,56). Gelişmekte olan ülkelerde 20 yaşına kadar enfekte olma oranı % 80 iken; gelişmiş ülkelerde ise bu oran % 10'dur. Vietnam, Tayland, Peru, Türkiye gibi ülkeler *H. pylori* prevalansı açısından gelişmekte olan ülkeler grubundadır. ABD, Fransa, Finlandiya, Hollanda gibi ülkeler ise gelişmiş ülkeler arasındadır (57). İzmir'de ilkokul öğrencileri ile yapılan bir çalışmada *H. pylori*'nin seroprevalansı % 23.8 olarak bulunmuş, bu oranın yaşla birlikte arttığı görülmüştür (58).

Enfeksiyonun kadın ve erkeklerde aynı oranda görüldüğü, bazı çalışmalarda ise enfeksiyonun erkeklerde daha sık görüldüğü belirtilmiştir (30).

H. pylori, bir insan patojenidir. *H. pylori*'ye benzer mikroorganizmalar maymun, domuz ve kedilerden de soyutlanmış olmasına rağmen bu hayvanlarla temas enfeksiyonun yüksek prevalansını açıklayamamaktadır. İnsandan insana bulaş birincil bulaş yoludur. Fekal-oral, oral-oral bulaş ileri sürülmektedir (59).

Fekal-oral bulaş en önemli bulaş yoludur (11). Bakterinin mide sıvısından izole edilmesi, Gambiya'lı çocukların dışkılarından yapılan kültürde üretilmesi ve Peru'da su kaynaklarından izole edilmesi besin kaynaklı veya su kaynaklı enfeksiyonu desteklemektedir (27,59). Su kaynaklarından da bulaş yolu olduğu gösterilmiştir. *Helicobacter* organizmaları çevresel kaynaklardan asla kültüre edilememesine rağmen, moleküler ve immunolojik metodlar yeraltı sularında ve şehir suyunda *Helicobacter* DNA'sının saptanması için kullanılabilir (60,61). Ancak bakteri dış ortam şartlarına son derece dayanıksızdır. Enfeksiyonun prevalansı, fekal-oral yolla bulaşan diğer bir mikroorganizma olan hepatit A virusu ile yakın bir paralellik göstermektedir (62,63).

Üzerinde durulan diğer bir bulaş yolu oral-oral (öpme, annenin çocuğa gıdayı önce kendi ağzından çiğneyip yumuşatarak vermesi) bulaş yoludur (16,62,64). *H. pylori* tükürük ve dental plakta da izole edilmiştir (16,27,29,59,71).

Seksüel geçiş bildirilmemiştir. Aile içi geçişte enfekte anneden çocuğa geçiş önemli rol oynar. Annenin öğrenim durumu ile çocuğun enfekte olması arasında ters ilişki vardır. Aile içi bulaşta kalabalık aile yapısı risk faktörüdür. Çocuk bakım ünitelerinde de çocuklar arası bulaş bildirilmiştir. Belirtilen diğer bir geçiş yolu da uygun sterilizasyonu yapılmamış endoskoplardan bulaştır. Ev hayvanlarından geçiş gösterilememiştir. Ancak, dünya

populasyonunun yarısının *H. pylori* ile enfekte olmasına rağmen geçiş yolu kesinlik kazanmamıştır (11,65-67).

4.5. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Patogenez

Gastrik mukoza bakteriyal enfeksiyonlara karşı iyi korunmuş bir bölgedir. *H. pylori*, bu ekolojik çevreye iyi uyum sağlar (27,42). *H. pylori* düşük pH'ya oldukça duyarlıdır. Bu sebepten dolayı, *H. pylori* mide lümenine kolonize olmaz fakat gastrik mukozayı kaplayan mün tabakasına kolonize olur. Sülfatlanmış polisakkaritlerden oluşan mukus mide asidinden protonların difüzyonuna karşı koyar. Böylece, mukus mukozal yüzeyde alkali pH'yı sürdürebilmek için bir tampon olarak rol oynar ve aside duyarlı olan mukozal hücreleri korur. *H. pylori*'nin yaşamını sürdürebilmesi için mün tabakasına erişebilmesi gerekmektedir. *H. pylori*'nin en önemli virulans faktörü hareket özelliğine sahip olmasıdır. *H. pylori* yalnızca yüksek hareket özelliği değil aynı zamanda kemotaksis gösterir. Ayrıca *H. pylori* sahip olduğu üreaz enzimi sayesinde mün tabakasına erişebilmek için midenin asit pH'ında yeterince uzun yaşayabilmektedir. Üreaz enzimine sahip olmayan bir mutantın hayvan modellerinde kolonize olmadığı gösterilmiş ve üreazın *H. pylori* kolonizasyonunun ilk evresinde önemli olduğu kabul edilmiştir (36).

Gastrik mukoza hücreleri tarafından mide içine karbonat ve üre salgılanır. Üreaz enzimi amonyak ve CO₂ üretmek için gastrik hücrelerden salgılanan üreyi hidrolize ederek *H. pylori*'nin çevresinde mide asidini nötralize eden amonyak tabakası oluşturur (74,76). Üreazın hücrel lokalizasyonu hakkında hala belirsizlik vardır. *H. pylori*'nin üreyi alıp, amonyağı dışarı verdiği ya da parçalanan *H. pylori*'deki üreaz enziminin hayatta kalan *H. pylori*'nin etrafını kapladığı düşünülmektedir (36)

Mukus sürekli olarak üretilerek mide lümeni içine salınır. *H. pylori*, mukozal hücreden salgılanan ve şekillenen yeni mün tabakası içinde flajeli sayesinde kazarak ilerleyebilmektedir. Enfekte birey ya da hayvandan alınan örneklerde, bakterilerin çoğu mukozal hücrelerin tarafına değil mün tabakasına yerleşir (36). *H. pylori* mide epiteli yüzeyindeki mukus tabakasında yaşayarak gastrik asiditeden korunmakta, az bir kısmı gastrik epitele yapışmaktadır. Doku içine invaze olmamaktadır (27). *H. pylori* sülfatlanmış mün şekerlerine ve epitel hücreye bağlanmasına izin veren adezinler üretir. Epitel hücrelerin yüzeyinde bulunan bir karbohidrat antijeni olan Lewis b antijenini tanıyan BabA en iyi

karakterize edilmiş bir adezin tipidir. Bütün *H. pylori* suşlarında flajel ve üreazın bulunmasına rağmen, BabA yalnızca bazı suşlarda bulunur (36).

H. pylori midede uzun süreli yangıya neden olur, ancak kolonize olduğu kişilerin küçük bir bölümünde peptik ülser veya gastrik kanser gelişir. *H. pylori* suşları arasındaki fenotipik ve genotipik farklılıklar konak yangısal cevabını ve klinik sonucu etkilemektedir (68). Üreaz enziminin üreyi parçalaması sonucu oluşan amonyak ökaryotik hücreler için toksiktir ve enzim kendi kendine gastrik mukozada inflamatuvar bir etkiye sahiptir. Ülserli hastalarda, *H. pylori*'nin sahip olduğu üreaz enzimine karşı serum antikorları üretilir (36).

4.5.1. Histopatolojik Değişiklikler

H. pylori, kronik yüzeyel gastrit nedenidir (11,47). Enfekte kişilerde sürekli bir gastrik yangısal yanıtı sebep olmaktadır. Bu yangısal yanıtta, epiteldeki hasarlı bölgeye başlangıçta nötrofillerin, bunu izleyen T ve B lenfosit, plazma hücresi ve makrofajların göçü görülür (42). Yangının derecesi değişkendir. Lamina propriyanın az miktarda infiltrasyonu ve bozulmamış gland yapısından, yoğun yangı hücrelerinin görüldüğü mikro abselere ve reaktif epitelyal atipiyeye kadar değişir. Sık görülen değişiklikler olan yüzey epitel hücrelerindeki musin azalması, sitoplazmada vakuol oluşumu, mukozal gland yapısındaki bozulma antimikrobiyal eradikasyon tedavisi ile kısa sürede geriye döner. Ancak mononükleer hücreler aylarca kalır. Çocuklardaki histolojik değişiklikler erişkinlerden farklıdır. Granüler veya noduler mukozal yapı görülür, bunlar lenfonoduler hiperplazi alanlarıdır. Nötrofil miktarı da erişkinlerden düşüktür (11).

4.5.2. Doku Hasarının Mekanizması

İki grupta incelenebilir: Virulans faktörleri bakterinin patojenik etkisini, kolonizasyon faktörleri ise bakterinin kolonizasyonunun devamını sağlar. *In vivo* ortamda bu faktörler birbirinden keskin sınırlarla ayrılamaz (11).

4.5.2.1. Virülans Faktörleri

Tablo 1. *H. pylori*'nin genel özellikleri *

Gram negatif, sporsuz, Spiral şekilde, Bir uçta 4-6 kirpik	Mukus içinde etkin hareketi sağlar.
Oksidaz	+
Katalaz	+ Midede ve fagositler içinde vakuollerde yaşayabilme
Üreaz	+ Midede pH'yı alkalileştirerek asitten korunma ve yaşayabilme
Fosfolipaz	+ Mukusun sindirilmesi ve ıslaklığının artışı
Proteaz	+ Mukusun sindirilmesi ve eriyebilirliğin artması
Hippurat hidrolizi	– <i>Campylobacter jejuni</i> 'den ayırım
TSİ agarda H ₂ S yapımı	– Çeşitli <i>Campylobacter</i> türlerinden ayırım
γ Glutamil transpeptidaz	+ Diğer <i>Helicobacter</i> türlerinden ayırım
Nitrat redüksiyonu	– <i>Campylobacter</i> 'lerden ayırım
Mikroaerofilik üreme 25° C de 37° C de 42° C de	Termofilik <i>Campylobacter</i> 'lerden ayırım - + –
% 1 Glisinde üreme	–
Nalidiksik aside duyarlılık (30 g disk) Sefalotin'e duyarlılık (30 g disk)	R S <i>Campylobacter</i> 'lerden ayırım
VacA (Vakuol oluşturucu sitotoksin)	Epitel hücrede vakuol oluşturan zararlanma
Cag A (Sitotoksin ile ilişkili gen A)	Sitotoksin oluşumu ve mide ülseri ile ilişkili
Porinler	Nötrofil ve mononükleer hücreleri çekerek reaktif bileşikler ve interlökin salınması
Isı şok proteinleri	Otoimmunitede rol oynar

*57. kaynaktan alınmıştır

4.5.2.1.1. Midede Yangının İndüklenmesi

Gastrointestinal sistem epitel hücrelerinden interlökin-8 (IL-8), ENA-78, GRO- α , MCP-1 gibi doğal direnç mekanizmasını düzenleyen kemokinler salgılanır (24,27). Ayrıca IL-6, IL-7, IL-15, gibi antijene özgün yanıtta düzenleyici rolü olan sitokinler de salgılanır. Epitel hücreleri birçok sitokin için reseptörler içerir. Bu yüzden, aktive olmuş mukozal hücrelerden salınan sitokinler epitel fonksiyonunda değişiklikler yapabilir. İnterferon-gamma epitel hücresinde MHC sınıf II ekspresyonunu artırır (24).

H. pylori mide epiteli üzerinde, mukus tabakası üzerinde bulunur; epitel hücrelerinin içine girmez. *H. pylori* ile enfekte kişilerin mide mukoza epitel hücrelerinden proinflamatuvar sitokinler olan interlökin (IL) 1 β , interlökin 2, interlökin 6, interlökin 8 ve tümör nekrozis faktör α (TNF α) salınımı artar (27,42,69).

i. İnterlökin 8

İnterlökin 8, nötrofilleri aktive eden, kemokin ve yangıda önemli rol oynayan küçük bir peptiddir (70). *cag*-PAI (*cag* patojenite adası) içeren *H. pylori* suşları içermeyenlere göre daha kuvvetli IL-8 salgılanmasına neden olur (42,69). Çeşitli *cag* genlerinin kodladığı ürünler, tip IV sekresyon sistemlerinin komponentlerine benzerlik gösterir. Bu sebeple, bakteri epitel hücresine yapıştığında Src-bağımlı tirozin fosforilasyonu ve bir ökaryotik fosfataz olan SHP-2'nin aktivasyonu ile CagA epitel hücresi içine girer. Bu da konak hücre proteinlerinin defosforilasyonuna ve hücre morfolojik değişikliklere yol açar (68). Özellikle *cag*-PAI içeren bakterinin mide epiteline yapışması ile Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve erken-yanıt transkripsiyon faktör aktivatör protein 1 (AP-1) aktive olur (27,42). Diğer kemokinler olan GRO- α ve ENA-78 de artar ve bunlar da IL-8 salınımını artırır. IL-8'in lamina propriyadaki proteoglikanlara bağlanması sonucunda oluşan gradiyent ile PNL'lerin epitele doğru kemotaksisi görülür (24,27). Mide epitel hücreleri tarafından sentezlenen kemokinler, proteoglikan iskelete bağlanarak PNL'lerin toplandığı yere doğru yönelirler (27).

ii. Nötrofil Yapışması

Nötrofil CD 11b/CD 18 ekspresyonunu ve endotel hücrelerine nötrofil yapışmasını artıran, *H. pylori* nötrofil adherans faktör (HP-NAP) 150 kDa'luk bir proteindir (30). Nötrofil infiltrasyonu, *H. pylori* ile indüklenen gastritin ayırteıcı bir özelliğidir. *H. pylori* ile endotel hücrelerinin stimulasyonu adhezyon molekülleri olan VCAM-1, ICAM-1 ve E-selektin yanısıra IL-8'in de up-regulasyonu yoluyla nötrofillerin göçüne katkıda bulunur (68).

iii. Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF)

Lyso-PAF sağılıklı kişilerde gastrine yanıt olarak mide mukoza hücrelerince üretilir. PAF ise ülserojenik etkisi olan bir fosfolipid mediatördür. *H. pylori* ülserojenik olmayan Lyso-PAF'ı PAF'a metabolize edebilir; böylece asit sekresyonunu artırarak direk ve indirek mekanizmayla mukozal hasarı artırır (70).

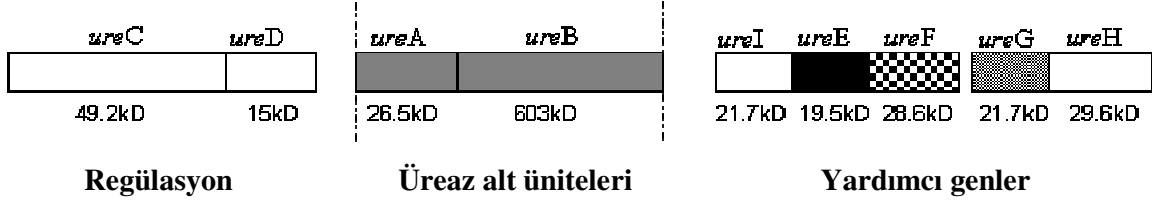
iv. Lipopolisakkarit

H. pylori LPS'i musin ve mukozal reseptörleri arasındaki ilişkiyi bozarak gastrik mukus tabakasını hasara uğratar, bazal membranındaki epitel hücresi reseptörleri ile etkileşir ve pepsin aktivasyonuna neden olur (24). *H. pylori* LPS'i enterobakterial LPS'e göre daha düşük düzeyde immunojenik aktiviteye sahiptir. Daha düşük düzeyde konak yanıtına neden olması *H. pylori* enfeksiyonlarının agresif patojenlere göre daha uzun sürme nedeni olabilir. Lewis (Le) kan grup antijen sisteminde; tip 1 antijenler Le a ve Le b'dir. Tip 2 antijenler ise Le x ve Le y dir ve bunlar ABO kan gruplarıyla ilişkilidir. *H. pylori* LPS O özgün zincirinin kan grup antijenlerinin özellikle tip 2 kan grup determinantlarını eksprese ettiğii bulunmuştur. Tip 1 ve 2 Le antijenleri eritrosit yüzeyinin yanısıra gastrik mukozada da eksprese edilir (71). Polimerik Le x, Le y veya her ikiside sıklıkla eksprese edilir. Fakat Le a, H tip I antijeni de bulunabilir. Le antijenlerinin ekspresyonu oldukça korunmuştur. Sadece birkaç suş bu epitoptan yoksundur. *H. pylori* genetik yapısı suşlar arasında farklılıklar göstermektedir. Bu korunmuş yapı ve gastrik hücrelerle benzerliğinin bakterinin immun yanıtta kaçmasında rolü olduğı ve bu antijenlere karşı oluşaın antikorların otoimmun mekanizmada rolü olduğunu destekleyen çalışmalar vardır (36,43,72). Ancak zıt yönde de yayınlar vardır. Farelerde

yapılan bir çalışmada Le antijenlerinin bakterinin kolonizasyonunda gerekli olmadığı gösterilmiştir (73). *H. pylori* Lewis x ve Lewis y içeren LPS O antijenini sentezlerken bir seri enzime ihtiyaç duyar. Bunlar; α -3 ve α -2 fukozil transferazlar, GlcNac transferazlar ve Gal transferazlardır (72).

v. Üreaz

H. pylori'nin ürettiği 550 kDa ağırlığında nikel içeren multimerik bir enzim olan üreaz, ürenin amonyak ve karbonik aside hidrolizi reaksiyonunu katalizler. Oluşan amonyak mide asidini nötralize ederek bakterinin kolonizasyonuna yardımcı olur (68,74-76). Üreaz operonu *H. pylori* kromozomunun 34 kb kısmına lokalizedir. *Ure* operonu, UreA ve UreB olan iki yapısal alt üniteyi, UreC ve UreD olan iki regülatör alt üniteyi kodlar. Ayrıca UreI, UreE, UreF, UreG, UreH olan beş yardımcı proteini kodlar (24,68,74,77). Regülatör genler *ureC* ve *ureD* bir mRNA transkriptinde, yapısal genler *ureA* ve *ureB* ikinci mRNA transkriptinde ve yardımcı genler *ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG* ve *ureH* üçüncü mRNA transkriptinde gösterildiği bildirilmektedir (Şekil 3) (74,77). *H. pylori*, gastrik mukozal tabakaya girer, üreaz metalloenziminin bir araya gelmesi başlar. Sitozolik metalloenzim katalitik aktivite için 6 aktif bölgenin her birinde 2 nikel iyonuna gereksinim duyar. Yardımcı proteinler apoenzime nikel iyonunun eklenmesinde görevlidirler. NixA hücre içine nikel iyonlarının transportunu sağlayan sitoplazmik membran proteinidir (24,68,78). Nikel birleşiminde aynı zamanda bir başka protein NixA'da gerekir. İlk olarak nikel iyonları hücre içerisine transport edilir, onlar NixA transporter'ından salınırlar ve *ureE* onları biriktirir. *UreE* geni sonra nikel iyonlarıyla üreazın aktif bölgesine verilir. *ureF* ve *ureG*, *ureE* ile kompleksin etkileşimini kolaylaştırarak metallomerkez toplanma bölgesine karbondioksit götürdüğü hipotezi mevcuttur (74). *ureI* H⁺ kapılı üre kanalını kodlar (74,75,79). "ABC transporter", "P-tip adenosin trifosfat (ATPase)", "Hpn (histidine-rich protein)" ve HspA, nikel iyon transportunu etkileyebilen ve üreaz aktivitesini artırabilen diğer proteinlerdir (24,68,74). Bu proteinler NixA'nın değiştiği bölgelerde NixA için yedek sistem gibi rol oynar (74). İndüklenebilir nitrik oksit sentazın up-regülasyonu ve nitrik oksit salınımının *ure A* ekspresyonuyla ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür. Buna göre üreazın sadece amonyum üretiminde değil, yangıda da rolü olabileceği düşünülmektedir (68).



Şekil 3. *H. pylori*'nin üreaz operonu*

*77. kaynaktan alınmıştır.

4.5.2.1.2. Mide Mukozal Bariyerinin Bozulması

i. Musinaz

Mukus tabakasının yapısını ve akışkanlığını bozarak bakterinin epitel tabakasına kolayca geçişini sağlar (30).

ii. Fosfolipaz

Fosfolipaz A2 ve C, membran fosfolipidlerini parçalar, mide mukozasının hidrofobik özelliğini azaltır; mukus tabakası inceler, depolimerizasyon ve desülfasyon sonucu yapısı değişir (27,62).

iii. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS)

iNOS ekspresyonu yüksek miktarda nitrik oksit (NO) sentezi ile sonuçlanır. Bu da doku hasarına ve immun aktivasyona neden olur. *H. pylori*'nin, *in vitro* olarak makrofajlarda iNOS yapımını arttırdığı bildirilmiştir (30).

iv. Antioksidan Aktivite

H. pylori'nin konakta uzun süreli kolonize olabilmesinde etkili virulans faktörlerinden biri de süperoksit dismutaz (SOD) yoluyla oluşan toksik oksijen türlerini etkisiz hale getirebilmesidir. *H. pylori* oksijene bağımlı radikallerin yanısıra azot içeren reaktif türleri de

detoksifiye edebilen proteine sahiptir. *H. pylori*'de alkil hidroperoksit redüktaz (AhpC) enzimi ve NapA antioksidan aktivitesi olan proteinlerdir (80,81).

v. Apoptoz

H. pylori enfeksiyonu mide epitel hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) indükler. *H. pylori* sitokrom c aracılığıyla ve sırasıyla "caspase 9", "caspase 8", "caspase 6" ve "caspase 3" aktivasyonu ile mide epitel hücrelerindeki mitokondriyal apoptotik yolu aktive eder. *H. pylori* enfeksiyonunda epitel hücre apoptozunun proinflamatuvar sitokinler TNF- α ve IFN- γ ile ilişkisi *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak TNF- α ve IFN- γ üretimi gastritin derecesiyle, bakteri yoğunluğuyla, Fas/Fas-ligand ekspresyonu ile de ilişkilidir (68). VacA da mitokondri membranını etkileyerek sitokrom c salınımını artırır ve apoptozu uyarır (27,42).

vi. Vakuol Oluşturucu Sitotoksin

H. pylori suşlarının yaklaşık %50'si tarafından üretilir. *vacA* geni tarafından kodlanan epitel hücrelerinde intrasellüler vakuol oluşturan bir toksindir. Ancak yapılan çalışmalar *vacA* geninin suşların tamamına yakın bir bölümünde bulunduğunu göstermiştir. Tox+ (Tip I) suşlarda VacA toksini üretilir, Tox- suşlarda ise üretilmez. VacA toksini 140 kDa'luk öncül protein olarak sentezlenir, hücre dışına çıktığında 87 kDa'luk polipeptiddir. Toksin çiçek şeklinde 6 veya 7 simetrik oligomerden oluşur; difteri, antraks toksinleri gibi AB toksin yapısında olduğu düşünülmektedir. Asidik şartlarda vakuol oluşturucu aktivitesi artar. *vacA* geni yapı olarak *Haemophilus influenza* ve *Neisseria gonorrhoea*'nın IgA proteazlarına benzer (24,68). *vacA* toksini, kendisini epitelyal hücre zarı içine sokar ve voltaj bağımlı bir kanal oluşturur (27). Vakuoller H⁺/ATPaz aracılığıyla asitlendirilir. Vakuollerin içine katyon akışı vakuollerin şişmesine neden olur (36).

vacA geni iki değişken bölge içerir. Sinyal peptid kodlayan s bölgesi s1 ve s2 allelik tiplerini içerir. Tip 1 suşlarında 1a, 1b ve 1c alttipleri tanımlanmıştır. m (orta) bölge m1 ve m2 allelik tiplerini içerir. *cagA* ve *vacA* s1 arasında yakın ilişki vardır. Çünkü birçok s1 suşu *cagA* pozitifdir; klinik yansıması da daha şiddetli olmaktadır (27,82,83). Gastrik epitel hasarı *vacA* m1 suşu ile enfekte olanlarda m2 ile enfekte olanlara göre daha kuvvetlidir. Tox+ suşlar epitel hücrelerine Tox- 'lerden daha fazla hasar verir. *vacA* s1 ile enfeksiyonda yangı s2'den

daha şiddetlidir. Ayrıca s1a allele sahip suşlar s1b'den daha fazla seviyede yangıya neden olur (24).

vi. Sitotoksin İle İlişkili Gen

Bazı *H. pylori* suşları 31 geni olan 40 kbp'lık bir patojenite adası (*cag* PAI) içerir. *cag* PAI, Tip IV sekresyon sistemi özelliği gösterir (24,36). Bu sistem *Bordetella pertussis* (pertussis toxin liberation genes) *Agrobacterium tumefaciens* (Ti plazmidindeki *virB*, *D*, *E* bölgeleri), *E. coli* (*tra* genleri) ve *H. pylori* (*cag* PAI) genomlarında bulunur (24). Hayvan modellerinde *cag* patojenite adasına sahip olan suşların olmayanlara göre daha virulan olduğu gösterilmiştir (36). Makromoleküllerin sekresyonunda konjugatif transfer aşamasında hedef hücre (genellikle epitel hücresi) ile temasta kullanılan bir mekanizmadır. Tip I suşlarında *cag* PAI bulunur. Tip II'de bulunmaz. Kromozomal glutamat rasemaz (*glr*) genine entegre olmuştur. Epitel hücrelerinden IL-8 salınımının azaldığı *cag* geni içermeyen izogenik mutantlarda gösterilmiş, bu sebeple kronik yangıda rolü olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca *cag* PAI içeren suşlar ile temas sonrası yalancı ayak oluşumunun indüklenmesi, konak proteinlerin tirozin fosforilasyonu, hücre iskeletinde oluşan değişiklik *in vitro* olarak gösterilmiştir (24). *cag* PAI'de konaktaki sitokin üretimine katkıda bulunan *picB*, *picC* olarak isimlendirilen iki gen bulunmuştur. *picB* geni taşıyan suşların, *cagA* genini de bulundurdukları bildirilmiştir. *cagA* ve *picB* genini beraber taşıyan suşların, mide mukozasından IL-8 üretimini arttırdıkları gösterilmiştir (27). *cagA*, bakteriyel yapışmayı izleyerek Src-bağımlı tirozin fosforilasyonu ve aktive olmuş bir ökaryotik fosfatazın (SHP-2) yol açtığı konak hücre proteinlerinde değişiklikler yoluyla konak hücre içine girer (68). Batı ülkelerinde *vacA* s1 ve *cagA* varlığının peptik ülser hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak bu ilişki Asya ülkelerinde gösterilememiştir. *vacA* s1a ve s1b genotipleri batı ülkelerinde daha fazla, doğu Asya'da ise s1c genotipi daha sık görülmektedir (83).

vii. Epitele yapışmaya neden olan gen

iceA geni, *iceA1* ve *iceA2* olarak iki tip içerir. *iceA1* geni, *H. pylori*'nin epitele teması ile uyarılır ve *H. pylori*'nin gastrik epitele yapışmasını artırır. Peptik ülser hastalığının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir (9,27).

4.5.2.1.3. Mide Fizyolojik Dengesinde Değişiklik

H. pylori enfeksiyonu mide asidini arttıran peptid yapılı hormon gastrinin ekspresyonunu artırır; asidi azaltan hormon olan somatostatinin ekspresyonunu baskılar. Bu etkisi gastrik yangı varlığında görülür (30,70).

4.5.2.2. Kolonizasyon Faktörleri

4.5.2.2.1. Hareket

Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda *H. pylori*'nin mide mukozasına kolonizasyonunda ve enfeksiyonun sürekliliğinde hareketin önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* özellikle viskozitesi yüksek ortamlarda hareketlidir ve hareketi pH'a bağlıdır. pH 4'ün altında bakteri hareketsizdir (24). Bu sebeple *H. pylori* mide lümeninde kolonize olamaz; ancak gastrik mukozayı kaplayan musin tabakasında oldukça iyi kolonize olur. Mukus mide asidinden kaynaklanan protonların difüzyonuna direnç gösterir. Çünkü sulfatidile polisakaritler nedeniyle negatif yüklüdür. Mukus mukozal yüzeyi kaplayan alkali bir tampon olarak görev alır. Bu rolü ile aside duyarlı olan mukozal hücreleri korur. *H. pylori* mukus tabakasında yaşayabilir ve hareketlidir ve kemotaksis özelliğini gösterebilir (36).

4.5.2.2.2. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz

H. pylori enfeksiyonlarında antral mukozadan alınan biyopsi örneklerinde toksik oksijen radikallerinin (TORs) konsantrasyonunun arttığı görülmüştür. TORs miktarı bakteri yoğunluğu ve nötrofil yangı derecesiyle doğru orantılıdır (24). *H. pylori*'nin süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerini kodlayan genlerinin hücre içi patojen mikroorganizmalarla benzerlik göstermesi, bu enzimlerin bakterinin PNL'ler tarafından öldürülmesine dirençte rol oynadığını düşündürmektedir (11,27). *H. pylori* katalaz ve süperoksit dismutazın üretimiyle hücre içi ölümden ve fagositozdan korunur (35).

4.5.2.2.3. Isı Şok Protein Homologları

"Chaperonin"ler düşük düzeylerde eksprese edilen, tüm organizmalarda bulunan, korunmuş, tüm ısı düzeylerinde normal hücre fonksiyonunun devamını sağlayan proteinlerdir. Bunlar daha sonra ısı şok proteinleri (Hsp) olarak adlandırılmıştır. Diğer bakteriler gibi *H. pylori*'de de, bir GroEL benzeri protein (HspB); birincil "Chaperonin" ve GroES benzeri protein (HspA) ikincil "Chaperonin" bulunur (24,84). *H. pylori*'de HspB'nin kodlandığı gen bölgesi oldukça korunmuş bir bölgedir. Yapısal benzerliğe dayanarak HspB'nin üreaz için moleküler "chaperon" olabileceği ileri sürülmüştür. *H. pylori hspA* geni, C terminal bölgesinde nikel-bağlayan bölüm içeren bir gendir. Fonksiyonel üreaz molekülüne nikel bağlanmasında rolü olduğu ileri sürülmüştür (11). HspA ve HspB proteinlerinin, üreaz ile beraber salınımı deneysel olarak üreaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (27).

4.6. *H. pylori* ile İlişkili Hastalıklar

H. pylori enfeksiyonunun klinik yansıması değişkendir; mikrobiyal ve konak faktörlerinden etkilenir (Tablo 2) (42).

Tablo 2. Üst gastrointestinal sistem ve *H. pylori* ilişkisi *

Gastrointestinal sistem bulgusu	<i>H. pylori</i> ile ilişki
Kronik histolojik gastrit	Nedensel ilişki kurulmuş
Peptik ülser hastalığı	Zollinger-Ellison sendromu ile ya da NSAID ile ilişkili olmayan ülserler için nedensel ilişki kurulmuş
Gastrik adenokarsinoma	Nedensel ilişki kurulmuş, kofaktörler olasılıkla önemli
Gastrik lenfoma	Nedensel ilişki kurulmuş
Nonülser dispepsi	Zayıf
Gastroözofagal reflü (GORD)	<i>H. pylori</i> koruyucu olabilir
Gastroözofagal bağlantı tümörleri	<i>H. pylori</i> koruyucu olabilir
Kardiovasküler hastalık	Zayıf

*31. kaynaktan alınmıştır.

4.6.1. Akut Enfeksiyon

Akut *H. pylori* enfeksiyonu gastrointestinal huzursuzluk, mide bulantısı, üst abdominal ağrı, abdominal distansiyon, nadiren de kusma, ateşe sebep olabilir (27,31,51,85). Belirtiler 3 ile 14 gün arasında kaybolur. Genellikle bir haftadan az sürer. Besin zehirlenmesi ile karışabilir. Özellikle çocuklarda diyare de bulunabilir (51,85). Birçok kişide akut *H. pylori* enfeksiyonu kısa sürelidir ve çoğu hastada enfeksiyonun klinik sekelleri gelişmez (31). Erişkin dönemde enfekte olunursa akut enfeksiyon bulgularının görüldüğü; ancak genellikle enfeksiyonun çocukluk çağında kazanıldığı yönünde yayınlar çoğunluktadır. Enfeksiyonun alımından haftalar sonra şiddetli gastrit ve hipoklorhidri gelişir, bir yıldan fazla sürebilir. *H. pylori* konakta yıllarca kalabilir (51,85).

4.6.2. Kronik Aktif Gastrit

H. pylori ile enfekte bireylerde hayat boyu devam eden ve genellikle asemptomatik seyreden kronik yüzeysel aktif bir gastrit oluşmaktadır. Ancak bu kişilerin yaklaşık %20'sinde klinik bir hastalık gelişmektedir. Kronik gastrit, mide kanserinin gelişiminde en iyi bilinen risk faktörüdür (27). Antral gastritte, duodenum ülseri gelişimi daha sık görülürken, korpus gastritinde mide ülseri, mukozal atrofi ve intestinal metaplazi gelişme ihtimali daha yüksektir (25,27). Endoskopi ile tanımlanabilen gastritin erosiv ya da diğer formları birbirinden ayırlanamamaktadır (31).

4.6.3. Duodenal Ülser

Duodenal ülser; aspirin, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaç (NSAID) kullanımı veya Zollinger-Ellison Sendromu nedeniyle oluşan ülserlerin dışında, genellikle *H. pylori* kolonizasyonuna bağlıdır (51,85). *H. pylori* enfeksiyonu ve duodenal ülser arasındaki ilişki gastrik ülserden daha güçlüdür (23). %90'dan fazla duodenal ülser hastası *H. pylori* ile enfektedir. *H. pylori* duodenumda aktif duodenit sonucu oluşan gastrik metaplazi alanlarında kolonize olabilir. Bu da ülserasyonun öncül lezyonudur (51,85).

4.6.4. Mide Ülseri

Benign gastrik ülserli hastaların % 50-80'i *H. pylori* ile enfektidir. Gastrik ülser patogeneğinde aspirin veya NSAID kullanımını duodenal ülserle göre daha fazla görülür (51,85). NSAID ile ilişkili ülserler dışındaki peptik ülserlerin >%80'i *H. pylori* ile ilişkilidir (16,31). *H. pylori* ile ilişkili ülserlerde, anti asit kullanımı ile yapılan tedaviler sonrasında enfeksiyonun sıklıkla tekrarladığı ancak antibiyotik tedavisi ile tekrarlama olasılığının ender görüldüğü bildirilmiştir (31). *H. pylori* eradikasyonu ile *H. pylori*'nin sebep olduğu peptik ülser oranı belirgin şekilde düşer (42). *H. pylori*/ NSAID etkileşiminin uzun süre NSAID kullanan tüm hastalarda *H. pylori*'nin test edilmesi ve enfeksiyon bulunduğunda tedavi verilmesi gerektiği Maastricht 2-2000 ve 3-2005 konsensus raporunda bildirilmiştir (16,86,87).

4.6.5. Mide Kanseri

H. pylori enfeksiyonunun arttırdığı doku yanıtı "kronik gastrit" olarak adlandırılır. Kronik gastritin mide kanseri gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Ayrıca *H. pylori* enfeksiyonunda görülen intestinal metaplazi ve atrofik gastrit de mide kanseri gelişimine sebep olur. *H. pylori* ile enfekte olan bireylerde gastrik kanser gelişme riski yaklaşık olarak altı kat daha fazladır (31). *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansının yüksek olduğu ülkelerde mide kanseri oranı da yüksektir. Bu ilişki mide antrum, korpus adenokarsinomlarının intestinal ve diffüz tiplerinin her ikisinde de görülür. Adenokarsinom gelişim mekanizmasında kabul edilen görüş: *H. pylori*'nin indüklediği doku yanıtının (yangı) kronikleşmesi ile atrofik ve metaplastik histolojiye değişimdir. Konağa ve bakteriye ait faktörler de kanser gelişiminde önemli rol oynar (29,51).

4.6.6. Mide Lenfoması

Mide lenfoması B lenfositlerden köken alır ve mukoza ilişkili lenfoid doku lenfoması (MALT) olarak adlandırılır. Hastaların >75'inde etkili *H. pylori* eradikasyonu ile tümör histolojisinde iyileşme olabilir (31). Kabul gören patogeneze mekanizması, *H. pylori*'nin neden olduğu kronik antijenik stimülasyonun poliklonal lenfoid yanıtı indüklediği ve bir klonun

proliferasyonu sonucunda neoplastik transformasyona uğradığı şeklindedir (51,85). Gastrik adenokarsinoma göre mide lenfoması daha az oranda görülür (52). MALT lenfomalı hastaların % 72-98' i *H. pylori* ile enfektedir (42).

4.6.7. Nonülser Dispepsi

Dispepsi gastroözofagal reflü hastalığı, peptik ülser hastalığı ve ilaç kullanımı gibi nedenlerle oluşabilir (16). Nonülser dispepsi varlığı etiyojisi çok iyi bilinmediğinden tanımlanması yetersizdir. Birçok randomize klinik denemelerde nonülser dispepside *H. pylori* için antibiyotiklerin etkisi değerlendirilmiştir. Genel olarak, antibiyotik tedavisi ile hastaların %20-25'inde semptomatik düzelme görülür (31).

4.6.8. Diğer Hastalıklar ve Sendromlar

H. pylori enfeksiyonu birçok ekstragastrik durumla ilişkilidir (16). Romatolojik hastalıklarda olduğu gibi, *H. pylori* ve kardiovasküler hastalıklar ile ilişkili birçok kayıt mevcuttur (31,88). Gıda alerjisi, kısa boy, tiroid hastalığı, kronik ürtiker, baş ağrısı, diabet ve Raynaud's fenomeni ile zayıf ilişkili olduğu düşünülmektedir. *H. pylori* ile pernisiyöz aneminin ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Gerçek otoimmün pernisiyöz anemi korpus atrofisi ile, ancak *H. pylori* ile ilişkili pernisiyöz anemi antrum ve korpus atrofisi ile ilişkilendirilmiştir (16). *H. pylori*'nin koroner arter hastalığı gelişiminde; fibrinojen düzeyini, C-reaktif protein ve vasküler hastalık riskini arttıran diğer enflamasyon bulgularını arttırması ya da yol açtığı kronik gastrit sonucu gelişen folat eksikliğine bağlı bazı kişilerde artan homosistein vasküler endotele toksik etki göstermesi sonucu etkili olduğu ileri sürülmektedir (27).

4.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler

H. pylori tanısında kullanılan yöntemler; endoskopi gerektiren invaziv yöntemler ve özafagogastroduodenoskopi gerektirmeyen invaziv olmayan yöntemler olmak üzere iki büyük grupta incelenir (89). Bu iki grupta çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Tablo 3) (31).

Tablo 3. *H. pylori* enfeksiyonu tanı testleri *

	Avantajlar	Dezavantajlar
İnvaziv olmayan		
Serum ELISA	Ucuz	Takip için kullanışlı değil
Üre Nefes Testi	Takip için kullanışlı	Pahalı, asit baskılayıcı tedavide hastalarda yalancı negatif sonuç verebilir.
Dışkı Antijen Testi	Ucuz, takip için kullanışlı	Uygun değil
Tam Kan testi	Ucuz, hızlı	Serum ELISA'dan daha az kesin
İnvaziv (endoskopik)		
Histoloji	Patolojinin görülmesi	Düşük düzeyde enfeksiyonları kaçırabilir
Hızlı üreaz	Hızlı	Yanlış pozitif olabilir
Kültür	Antibiyotik duyarlılık bakılabilir	Maksimum duyarlılıkta değildir; rutin için uygun değildir, 4-7 güne ihtiyaç duyar

* 31. kaynaktan alınmıştır.

4.7.1. İnvaziv Yöntemler

4.7.1.1. Biyopsi Üreaz Testi

Mide biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin dolaylı olarak saptanmasında bakterinin fazla miktarda üreaz salgılama yeteneğinden yararlanılır. Üreaz temelli testlerin duyarlılığı midedeki bakteri yoğunluğu ile ilişkilidir (13). Üre içeren katı, yarı-katı veya sıvı ortamlar mevcuttur. *H. pylori* üreazı ortamdaki üreyi amonyak ve bikarbonata parçalar. Amonyum ile pH artar ve pH indikatörü ile ortamın rengi değişir (24,27,36). Ticari veya laboratuvarında hazırlanan üreaz testleri bulunmaktadır. "CLO test", "HUT test" ve "Hp fast" agar içeren ticari kitlere örnektirler. Konsantre (% 10'luk) üre içeren laboratuvarında hazırlanan üreaz testi 15 dakikada, hızlı sonuç verir (24).

4.7.1.2. Histopatolojik İnceleme

H. pylori varlığında gastrik biyopsi örneklerine uygulanan histolojik inceleme altın standart yöntemlerden biridir (9). Bakteri mukus içinde, yüzey epiteline tutunmuş olarak, sıklıkla da kriptin içine doğru derinlerde bulunur (11). *H. pylori*'nin çok miktarda kolonize olduğu örneklerde "smear" Gram boyama ile hızlı tanıda kullanılabilir. Rutinde kullanılan hematoksilin-eozin boyama ile *H. pylori* gösterilebilir. Ancak duyarlılığı patoloğun tecrübesine bağlıdır (9,90). Ayrıca bakteri sayısı az olduğunda ve lümende doku artıkları varsa hematoksilin-eozin boyama yanlış değerlendirmelere yol açabilir (11). Warthin-Starry gümüş boyası, modifiye Giemsa ve akridin oranj gibi özgün boyalarla bakterinin histolojik olarak tanımlanması daha kolaydır (11,24). Ancak patolojide rutin uygulamada, *H. pylori*'nin histolojik tanısında daha düşük maliyetli olan Giemsa boyama Warthin-Starry boyamaya göre daha çok tercih edilir (9).

H. pylori tanısında histolojik inceleme ile gastroduodenal patolojinin düzeyi ve pre-malign değişiklikler de saptanabilir. Histolojik incelemede yangısal yanıt görülmezse *H. pylori* enfeksiyonu tanısından uzaklaşılır (9). Monoklonal veya poliklonal floresan anti-*H. pylori* antikorlarının kullanıldığı immunohistokimyasal boyama da uygulanabilir. Bu yöntemin özgüllüğü yüksektir ve değerlendiren kişiye göre fazla değişiklik göstermez. Ancak laboratuvar maliyetini artırır. (9,24).

4.7.1.3. Kültür

H. pylori tanısında kültür altın standart yöntemlerden biridir. İki önemli avantajı vardır: Antimikrobiyal duyarlılık testlerine olanak sağlar ve kültürle elde edilen suş tiplendirme yöntemlerinde, ileri araştırmalarda kullanılabilir (11,24). Ancak *H. pylori*'nin inkubasyon periyodu uzundur (3-12 gün). Diğer bakteriler gibi, kültürde üreyebilmesi için canlı olması gerekmektedir. Örnek toplama ve laboratuvara ulaştırma da bakterinin kültürde üreyebilmesi için önemli basamaklardır. Bakteri genelde antrumda kolonize olduğundan, biyopsi örnekleri antrumdan alınır. Düzensiz dağılımı nedeniyle alınan biyopsi örneğinde bakteriye rastlanmayabilir. Kültür için iki biyopsi örneğinin alınması ve taze hazırlanmış besiyerine ekilmesi tavsiye edilmektedir. *H. pylori* tedavisi bakterinin midedeki dağılımını değiştirebilir. Bu yüzden tedavi sonrası kontrol biyopsisi alınacaksa veya hasta anti-sekretuar ilaç

kullanılmışsa fundustan da biyopsi alınmalıdır. Biyopsi örneği hızla laboratuvara ulaştırılmalıdır. En uygun transport ısı 10°C'nin altıdır, bakteri oksijene duyarlıdır. 4°C'de tuzlu su veya % 20'lik glikoz çözeltisinde 4 saatten az saklanabilir. Daha uzun (24 saat) saklanacaksa Stuart, Portagerm pylori (bioMérieux, France) gibi transport ortamları kullanılmalı ve 4°C'de saklanmalıdır. Biyopsi örneği 24 saatten uzun süre saklanacaksa -70°C veya sıvı nitrojen kullanılmalıdır (24). *H. pylori*'yi kültürde üretebilmek için çeşitli seçici ve seçici olmayan besiyerleri mevcuttur (11). At kanı, at serumu veya koyun kanı eklenmiş beyin kalp infüzyon agar, brucella agar, Tryptone Soya agar, Columbia agar veya Skirrow's agar kültürde kullanılan besiyerleridir (25,27,33,47). Besiyerine, diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek için *H. pylori* suşlarının birçoğunun doğal dirençli olduğu antibiyotiklerden vankomisin, trimetoprim, amfoterisin B, sefsulodin, polimiksin eklenebilir. *H. pylori* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnci de değişkendir (27,46,47).

H. pylori için rutin antimikrobiyal duyarlılık testi önerilmemektedir. Metranidazol ve klaritromisin ile tedavi sonrası düşük eradikasyon oranları antimikrobiyal direnç ile ilişkilidir. Antimikrobiyal duyarlılık testi farklı tekniklerle yapılabilir: disk difüzyon, E test, agar dilüsyon. *H. pylori* duyarlılık testlerinde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından agar dilüsyon yöntemi önerilmektedir (91).

4.7.1.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

4.7.1.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Moleküler yöntemler, özellikle PCR *H. pylori*'nin mide biyopsi, tükrük, dental plak, dışkı gibi klinik örneklerden tanısında kullanılır (6,24,92,93). Moleküler testlerin muhtemel klinik kullanım alanları; tedavi sonrası nüksü, re-enfeksiyondan ayırma, bakteri sayısının az olduğu dental plak, dışkı gibi örneklerden tanımlama ve klinik önemi olan DNA mutasyonlarını saptamadır. (94,95). Ayrıca *cagA*, *vacA*, *iceA* gibi virulans faktörlerinin saptanabilmesi ve canlı bakteriye gereksinim duyulmaması önemli avantajlarıdır (91,96).

4.7.1.4.2. Real Time Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR)

“Real-time” PCR yeni bir teknik olup TaqMan yöntemi gastrik mukozadaki bakteri miktarını saptamada kullanılmıştır. “Real-time PCR”ın diğeri bir kullanım alanı da 23S rRNA’nın peptidiltransferaz bölgesinde bulunan A2142C, A2142G ve A2143G nokta mutasyonlarıyla oluşan klaritromisin direncinin direk olarak ve kısa sürede saptanmasıdır (91,97-99).

4.7.1.4.3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

H. pylori ribozomal RNA’sının çoklu kopyaları ile oligonükleotidlerinin tanımlanmasının spesifik DNA-DNA hibridizasyonuna bağlıdır. Floresan boyalarla işaretli oligonükleotidler, bakteriyal hücreye penetre olur ve hedef sekansa bağlanır. Bu teknik ile *H. pylori*, hayvan modellerinde ya da *H. pylori* ile enfekte bireylerin gastrik biyopsi örneklerinde floresan mikroskopisi ile saptanabilmektedir (100,101).

4.7.1.4.4. DNA Enzim Immun Assay

DNA enzim immun assay; amplifiye örneklerin solid faz immobilizasyonu için spesifik biyotinlenmiş problemleri kullanan bir tekniktir. Streptavidin-biotin bağlı mikrotitre plate kuyucuklarına kaplanmış olan iplikli DNA problemleriyle amplifiye edilmiş DNA’nın hibridizasyonunu saptar. Prob ve DNA arasındaki hibrit, anti-DNA Mouse monoklonal antikorları kullanılarak tespit edilir. Bu antikor sadece çift iplikli DNA ile reaksiyon verir. Denature edilmiş DNA örnekleri kuyucuklara dağıtıldığında prob, varsa komplementer heliks ile spesifik olarak bağlanır ve hibrit oluşur. İnkubasyon ve örneklerin uzaklaştırılmasından sonra anti-çift iplikli DNA antikorunu, hibridizasyon olan bölgeyi karakterize eder (102).

4.7.1.5. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

Tıbbi olarak önemli birçok bakteri türü gibi *H. pylori* de biyokimyasal testler (biyotiplendirme), yüzey yapısal özellikleri (serotiplendirme) veya moleküler parmakizi analizlerine göre alt gruplara ayrılır (Tablo 4). *H. pylori*’nin tiplendirme yöntemleri özellikle

epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca aşı çalışmalarında da farklı coğrafik bölgelerde bulunan *H. pylori* türlerinin özelliklerinin belirlenmesinde yararlanılmaktadır (24).

Tablo 4. *H. pylori* tiplendirme yöntemleri *

Fenotipik Yöntemler	DNA-temelli Yöntemler
Biyotiplendirme	Restriksiyon endonükleaz kesme paternleri
Serotiplendirme	- Geleneksel elektroforez - “Pulsed field” jel elektroforez
Hemaglütinasyon	Southern blot hibridizasyon - Ribozomal RNA genleri
Lektin tiplendirme	- Üreaz genleri - Rastgele DNA parçaları
Dış membran protein profili	PCR’a dayalı RFLP analizi - Üreaz geni
İmmunoblotlama	- Flajellin geni - Tekrarlayan ekstrasjenik sekanslar
SDS-PAGE ¹ protein profili	- Arbitrary primer profilleri Plazmid profilleri

SDS-PAGE¹; Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

*24. kaynaktan alınmıştır.

4.7.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler

4.7.2.1. Üre Nefes Testi (UBT)

UBT birçok çalışmada altın standart yöntemlerden biridir. Ağız yoluyla alınan ¹³C veya ¹⁴C işaretli üre, *H. pylori* ile enfekte kişilerde bakterinin üreaz enzimi ile parçalanır. Oluşan işaretli CO₂’in solunum havasında tespit edilmesi esasına dayanır. Duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek tanı testi olmasının yanısıra; eradikasyon tedavisinin izleminde de kullanılmaktadır. Diğer bir gastrik *Helicobacter* olan *H. heilmannii* yalancı olumlu sonuçlara

neden olabilir. Antibiyotik tedavisi, bizmut tuzlarının kullanımı, veya proton pompa inhibitörlerinin kullanımı ise yalancı olumsuz sonuçlara neden olabilir (24,91).

4.7.2.2. Serolojik Yöntemler

4.7.2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

H. pylori enfeksiyonu sistemik ve lokal antikor yanıtına neden olur. Sistemik bağışık yanıtta; özgül IgM antikorlarındaki kısa süreli yükselmeyi, tüm enfeksiyon sırasında kalıcı olan IgG ve IgA artışı izler. Serum, tükürük ve idrardaki IgG ve IgA antikorlarını saptamaya yönelik tanısal testler geliştirilmiştir (33,35,103). Tedavi edilmeyen vakalarda antikor seviyeleri uzun süre, bazen de hayat boyu yüksek kalır. *H. pylori* eradikasyonu sonrası IgG ve IgA seviyeleri düşmeye başlar, yaklaşık altı ayda tedavi öncesi değerlerinin yarısı gözlenir. Düşük seviyelerde IgG yanıtı eradikasyondan sonra bile aylarca tespit edilebilir. Serolojik yanıtın tanıdaki önemini saptamaya yönelik çalışmaların yanısıra, kronik gastritli hastalarda IgG ve IgA'nın gastrit aktivitesini saptamadaki yerini açıklamak amacıyla da çalışmalar yapılmıştır (70,104-106).

H. pylori'ye özgül antikorların tespitinde bir serolojik testin yararlılığı kullanılan antijenin içeriğine bağlıdır. Genelde üç tip antijen kullanılmaktadır. Bunlar; tam hücreler ve tam hücre parçaları gibi ham antijenler; glisin ekstraktları ve ısı stabil antijenler gibi hücre parçacıkları; üreaz ve 120 kDa antijen gibi zenginleştirilmiş antijenlerdir (11). *cagA* veya *vacA*'ya karşı antikor saptamaya yönelik yeni serolojik testler geliştirilmiştir (94). Bu testler *cagA* proteini gibi özgün saflaştırılmış veya rekombinant antijenleri kullanır (107). Serolojik yöntemler çok sayıda kişinin tarandığı epidemiyolojik çalışmalarda tavsiye edilmektedir (70).

i. Hasta Başı Testler

Klinik veya muayenehanelerde *H. pylori* enfeksiyonu hızlı tanısında kullanılan testlerdir. Bir damla tam kan veya serum kullanılan tek basamaklı uygulanması kolay yöntemlerdir. Ancak yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllükleri düşük bulunmuştur (94,108).

4.7.2.2.2. Westernblot

H. pylori'ye karşı oluşan sıvısal bağışık yanıt bakterinin çeşitli bölümlerine karşı oluşur ve oldukça güçlüdür. “İmmunoblotlama” teknikleri ile başlıca hangi antijenlere karşı antikor yanıtı oluştuğu gösterilebilir. Bu antijenler CagA antijeni, üreaz alt üniteleri olan UreA ve UreB, ısı-şok proteinleri HspA ve HspB, flagellin alt üniteleri, katalaz, lipopolisakkarit, “current infection marker” ve OMP gibi önemi henüz bilinmeyen bazı antijenlerdir; yüzeyde sunulur veya bakterinin salgısal bileşenleridir. *H. pylori* suşları arasındaki farklılıkların yanı sıra bakteriyel enfekte kişilerdeki bağışık yanıtta da farklılıklar görülür. *H. pylori* tam hücre lizatlarının kullanıldığı Westernblot, bakteriyel antijenlere karşı oluşan antikor profili hakkında daha detaylı bilgi edinmemizi sağlar (109).

4.7.2.3. Dışkı Örneklerinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

4.7.2.3.1. Dışkı Kültürü

H. pylori'yi saptamada en özgün yöntem klinik örneklerden kültürdür. Ancak çok az araştırmacı *H. pylori*'yi dışkıdan izole edebilmiştir. Çeşitli bakterilerin dışkıda bulunması ve *H. pylori*'nin zor üremesi nedeniyle dışkı kültürü zordur; bunun için en iyi şartlar hala bilinmemektedir. Bu yüzden *H. pylori*, *E. coli*, *Shigella spp*, *Salmonella spp* veya *V. cholerae* gibi diğer kültürde kolay üretilen enterik bakterilerden farklıdır (6,110). 1992'de Thomas ve arkadaşları Gambiya'da malnütrisyonlu bebeklerin dışkılarından ve erişkinlerin diyareli dışkılarından yaptıkları kültürde *H. pylori*'yi üretmeyi başardılar (111). Dışkı kültüründe *H. pylori*'nin üretilmesi bakterinin canlı formunun dışkıda bulunduğunu göstermiştir. İnsan dışkısı yüksek oranda safra asitleri içerir ve bu yüzden *H. pylori*'nin dışkıdan izolasyonu güçtür. İntestinal flora ve onun ürünleri, barsaktan geçiş zamanı, dışkının içeriği ve saklama koşulları gibi diğer faktörler de önemlidir. *H. pylori*'nin dışkıdaki formu ve canlılığı konusundaki bilgiler henüz kesinlik kazanmamıştır. Bakteri *in vivo*, spiral veya kıvrımlı basil şeklindedir. *In vitro* deneylerle safra asitlerinin bakterinin morfolojisini küresel şekle dönüştürebildiği gösterilmiştir. Duodenum ve kolondaki anaerobik ortam da *H. pylori*'nin küresel veya kok yapısına dönmesine neden olabilir. Eski kültürlerde de bakteri kok yapısına

dönebilir ki bu formun da canlı ve dinlenen form olduğu gösterilmiştir. Kok yapısının patolojik önemi hakkında çelişkili açıklamalar mevcuttur (6,114).

4.7.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri

H. pylori' yi dışkı örneklerinden saptamaya yarayan ve ELISA esasına dayanan testlerdir (108,113). Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu (EHPSG) *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavi öncesi tanısında dışkı antijen testleri veya UBT'yi tavsiye etmektedir. Eradikasyon tedavisinin etkinliğinin izleminde ise UBT'ye alternatiftir (86,87,91). Antimikrobiyal tedavi tamamlandıktan sonraki 4 hafta içinde uygulandığında, eradikasyon tedavisinin kontrolünün yanı sıra kronik enfeksiyonun saptamasında da duyarlılığı ve spesifikliğı yüksektir (31). Poliklonal ve monoklonal anti-*H. pylori* dışkı antijen testleri kullanılmaktadır. Yeni geliştirilen monoklonal antikorun kullanıldığı bazı dışkı antijen testlerinin (FemtoLab *H. pylori* Connex) UBT'ye alternatif olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak bu konuda yeterli yayın bulunmamaktadır (6,114,115).

4.7.2.3.3. Dışkı PCR

Moleküler testler *H. pylori* tanısında klinik örneklerden nükleik asitlerin saptanması esasına dayanır (6). *H. pylori* için farklı genomik bölgelere yönelik PCR testleri tanımlanmıştır (116). Bakteri sayısı azsa, yavaş üreyorsa veya tanımlanması güçse PCR tanı için uygundur. Yüksek duyarlılığına rağmen klinik örneklerdeki kontaminantların varlığına bağlı inhibisyona duyarlı bir tekniktir. Bu yüzden yalancı negatif sonuçlar alınabilir (6). *H. pylori*' yi dışkı örneklerinden PCR ile saptamak için yapılan birçok çalışmada çelişkili sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlar, DNA' nın yapısının bozulması ve/veya dışkıda PCR inhibitörlerinin varlığına bağlıdır. Ayrıca intestinal bakteriyal patojenlerin canlı formlarının dışkıda yüksek konsantrasyonda bulunmasına rağmen *H. pylori*' nin düşük konsantrasyonda bulunması ve parçalanmış formunun saptanması da diğer olası nedenlerdir (117). İnsan dışkısı PCR inhibitörleri içermektedir. Bu inhibitörler hedef DNA amplifikasyonundan önce örnekten uzaklaştırılmalıdır. PCR inhibisyonunun dışkı süspansiyonunun dilüsyonu ile ortadan kaldırılabilceği ileri sürülmüştür. Ancak bu yöntemle testin duyarlılığı azalmaktadır. Çünkü dilüe örnekte daha az bakteri vardır. PCR amplifikasyonu için dışkıdan DNA'yı

safılaştırmada çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (6). Dışkıda *H. pylori* varlığı kolay uygulanabilen kısa sürede sonuç veren yeni bir noninvaziv yöntem olan “basit dışkı PCR” metodu ile saptanabilmektedir (118).

4.7.2.3.4. Dışkı Real Time PCR

Biprob teknolojisi kullanılarak dışkı örneklerinde *H. pylori* enfeksiyonunun saptanması ve klaritromisin direncinin belirlenmesinde Real-time PCR tekniği kullanılabilir. Biprob lar florofor Cy5 ile işaretlenmiş sekans spesifik problardır (97,119).

4.7.2.4. Diğer Örnekler İçin Kullanılan Tanı Yöntemleri

4.7.2.4.1. İdrar Antikor Testleri

İdrarda *H. pylori*'ye karşı antikorların saptanması için kullanılan immunokromatografi ve ELISA prensibine dayanan iki tip EIA testi vardır. İdrarda *H. pylori*'ye karşı IgG antikorlarını saptamak için ELISA ve immunokromatografik testler kullanılmaktadır (16, 88,120-124). İdrar temelli EIA testleri non invaziv, örnek toplanmasının basit, yüksek duyarlılık ve özgülüğe sahip olması nedeniyle avantajlıdır (86,87). İdrar EIA testlerine direk uygulanabilmekte ve 20 dakika kadar kısa bir sürede sonuç verilebilmektedir. İdrar temelli immunotestler tarama için uygundur ve geniş çaplı epidemiyolojik alışmalar *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansını etkiler (120,125).

4.7.2.4.2. Tükürük Antikor Testleri

Tükürük testi Helisal Assay testi duyarlılık ve spesifikliği çok düşüktür. Güvenilir bir tükürük testi geliştirilememiştir (16,126). *H. pylori*'nin klinik tanısı için uygun bir test olmamasına rağmen, noninvaziv, ucuz ve kolay uygulanabildiği için epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir bir test olduğu düşünölmektedir (126).

4.8. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunda Tedavi

20. yüzyılın başından beri, peptik ülser patogenezinde “no acid, no ulcer” kavramı, *H. pylori*'nin ülser patogenezinde önemli yerinin tanımlanması ile geçerliliğini yitirdi. Asit varlığı ülserde hala önemli olsada, *H. pylori* enfeksiyonunun sağaltımı ülser tedavisi için gereklidir (16).

H. pylori enfeksiyonu eradikasyonunda enfeksiyonun tekrarlama oranı çok düşüktür (27). Birçok tedavi rejimi klinik olarak basit ve başarılı olmasına rağmen, tedavi başarısızlığı gözlenebilmektedir. Bu nedenle *H. pylori* enfeksiyonunun kolaylıkla eradike edilemediği ve çoklu ilaç tedavisine gereksinim duyulduğu bildirilmektedir (16).

İdeal tedavi; ucuz, yüksek oranda başarı, uygulama basitliği, iyi tolere edebilme ve çok az yan etki gözlenmesi gibi özelliklere sahip olmalıdır. Tüm bu kriterlere sahip olan tedavi rejimi olmamasına rağmen, tedavilerin çoğu iyi tolere edilebilir ve etkilidir (16).

4.8.1. Tedavide Kullanılan Ajanlar

H. pylori ile ilişkili hastalıkların tedavisinde temel olarak asit giderici, antisekretuar ajanlar ve antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır. Asit gidericiler, H₂ reseptör antagonistler kullanılmaya başlanıncaya kadar peptik hastalıkların tedavisinde temel ajan olarak kullanılırdı (16).

4.8.1.1. Antisekretuar Ajanlar

Antisekretuar ajanlar etiyojisine bakılmaksızın ülserin iyileşmesini hızlandırır. Asit gidericiler gibi ülserle ilişkili rahatsızlıkları azaltır ve oldukça güvenilir ajanlardır (16).

H₂ reseptör antagonistleri geniş kullanımı olan antisekretuar ajanlardır. Parietal hücrelerde H₂ reseptöründe histaminin geri dönüşümlü inhibitörleridir. H₂ reseptör antagonistleri *H. pylori*'ye karşı antibakteriyal aktivite göstermezler (16).

Proton pompa inhibitörleri, gastrik parietal hücrelerin luminalinde hidrojen potasyum ATPaz pompasında asit sekresyonunu bloke eder. Bu pompa, hidrojen iyonlarının gastrik lümene salınması ve gastrik salgının düşük pH çevresel karakteristiğini yaratarak parietal hücre mikrovillus membranında karşılıklı hidrojen ve potasyum değişimini sağlar. PPIs

bağlanır ve intraluminal gastrik pH'yı arttırarak ATPazı inhibe eder. PPIs, H₂ reseptör antagonistlerinden daha iyi pH kontrolü yapabilen en etkili antisekretuar ajanlardır (16).

4.8.1.2. Antimikrobiyal Ajanlar

H. pylori enfeksiyonu tedavisinin temelini bakterinin duyarlı olduğu antimikrobiyal ajanlar oluşturur. Antibiyotiklerin etkinlikleri, mide asiditesi ile azaldığından bunların asit baskılayıcı bir ilaçla birlikte verilmesi gerekmektedir. İki ya da daha fazla antibiyotiğin birlikte kullanılması, eradikasyon başarı oranını arttırır ve dirençli suşların oluşma riskini azaltır (27).

i. Klaritromisin: Bakteriyal ribozomlara bağlanarak protein sentezini bozan ve bakteriyal hücre ölümüne neden olan, aside en dayanıklı ve en düşük minimal inhibisyon konsantrasyonununa (MIC) sahip bir makroliddir (16).

ii. Amoksisilin: *In vivo* olarak bakterisidal etkili asit dayanıklı semisentetik penisilindir. Amoksisilin antimikrobiyal aktivitesi pH bağımlıdır, pH artarsa MIC azalır. Amoksisilin konsantrasyonu antral mukozada en yüksektir, korpus mukozasında ve mukus tabakasında daha düşük düzeyde bulunur (16).

iii. Metranidazol: Mikroaerofilik mikroorganizmalara seçici olarak toksik etkili bir nitroimidazoldür. Metranidazol bir prodrugdur ve mikroorganizmanın yıkımı ve sitotoksik ürünlerin üretimine neden olan ilaçların kimyasal olarak reaktif indirgenmiş bir formudur. Metranidazol aktivitesi pH bağımsızdır (16).

iv. Tetrasiklin: Tetrasiklin hidroklorid *H. pylori*'ye karşı tek etkili tedavi olarak kullanılır. Tetrasiklin aktivitesi gastrik asiditeden bağımsızdır (16).

v. Bizmut: *H. pylori*'ye karşı direk olarak bakterisidal etkili topikal bir ajandır. Bizmut organizmanın üreaz aktivitesi inhibe eder ve bakterinin gastrik epitelyal hücrelerde hızla yakalanmasına yol açabilir ve hızla bizmut tuzları ile kaplanan bakterinin lizisine neden olur (29,31). Bizmut tuzlarına karşı herhangi bir direnç gelişimi yoktur (23).

4.8.2. Tedavi seçimi

H. pylori enfeksiyonu tedavisi için uygun rejimin seçilmesi için fiyat, basitlik, etkinlik, yan etkiler, toplumdaki antibiyotik direnci, doz, kullanım süresi, pH bağımlı olup olmadığının bilinmesi gereklidir (Tablo 5).

Tablo 5. *H. pylori* enfeksiyonunda tedavi *

<p>Proton pompa inhibitör üçlü terapi Günde 2 tane iki ya da üç antibiyotikle ve standard dozda proton pompa inhibitörü</p> <ul style="list-style-type: none">• Amoksisilin :1 gr• Klaritromisin : 500 mg• Metranidazol : 500 mg <p>Günde 4 kere verilen geleneksel üçlü terapi</p> <ul style="list-style-type: none">• Bizmut subsalisilat : 2 tablet• Metranidazol : 250-500 mg• Tetrasiklin : 500 mg• Antisekretuar ilaçlar : Günde 1 kere <p>Dörtlü terapi</p> <ul style="list-style-type: none">• Bizmut subsalisilat ya da sitrat: Günde 4 kere 2 tablet• Metranidazol : Günde 3 kere 500 mg• Tetrasiklin : Günde 4 kez 500 mg• Günde 2 kere proton pompa inhibitörü

* 16. kaynaktan alınmıştır.

4.8.3. Tedavi Başarısızlığı

H. pylori enfeksiyonunun tedavisi oldukça zordur. Tedavi başarısızlığının bazı nedenleri hastanın tedaviye uyumsuzluğu, antibiyotiğe dirençli *H. pylori* varlığı, zayıf etki ya da antibiyotik konsantrasyonudur (31,36,49). Tedavi başarısızlığı ve diğer faktörler arasındaki ilişki tedavi rejimleri arasında farklılık gösterebilir. Örneğin, PPI ve amoksisilini içeren ikili tedavi sigara içmek gibi eksternal faktörlere çok duyarlıdır. Antibiyotiklere karşı direnç gittikçe dünya çapında bir problem olarak tanımlanmaktadır. *H. pylori*'de antibiyotiklere karşı direnç kromozomal ilişkilidir ve izolatların yarısında plazmid bulunmasına rağmen, plazmid aracılı değildir (31).

4.9. Antimikrobiyal Direnç

4.9.1. Antimikrobiyal Direncin Prevalansı

H. pylori'de antibiyotik direnci tedavi başarısızlığının temel nedenidir ve antibiyotik direncinin saptanması önemlidir. *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılığı genellikle E-test, agar dilüsyon ve disk difüzyon gibi kültür temelli metodlar ile antibiyotiklerin MIC düzeylerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Ancak zaman alıcıdır ve sonuçlar değişkenlik gösterir. Hücre geçirgenliği, inokülasyon miktarı, inkübasyon şartları ve büyüme ortamı gibi faktörler sonucu etkileyebilir. Moleküler temelli metodlar bu faktörlerden bağımsızdır ve alternatif yöntemlerdir. Bu testler tekrarlanabilir sonuçlar verir ve kolaylıkla standardize edilir. Ayrıca, kültür temelli testlerden daha hızlıdır ve gastrik biyopsi örneklerine direk olarak uygulandığı zaman, sonuç endoskopinin yapıldığı gün elde edilebilir (127).

H. pylori'de antibiyotik direncinin prevalansı değişkendir. Suşların yalnızca az bir sayısını içeren tek merkezden orjinlenen çoğu çalışma, hastaların seçimini sıklıkla sınırlandırmakta ve antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesinde de farklı teknikler kullanılmaktadır. *H. pylori*'de antibiyotik direnç oranları, prevalansın olduğundan daha fazla ya da daha düşük tahmin olasılığını azaltmak amacıyla standard metodların kullanıldığı çok merkezli tarama programlarından sağlanmalıdır. Sürveyans programları pahalıdır ve yalnızca uygulanan bölgelerde değil, daha sıklıkla araştırmacıların olduğu birkaç ülkede yapılmaktadır (127).

H. pylori'de antibiyotik direnci oldukça yaygındır ve artış göstermektedir. Metranidazol direnci (MIC \geq 8mg/L) *H. pylori*'de en yaygın antimikrobiyal dirençtir. Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori*'de metranidazol direnç oranı yüksek olmasına karşın, endüstriyelmiş ülkelerde *H. pylori* suşlarının yaklaşık %35'i metranidazol dirençlidir ve bazı bölgelerde ise çoğu *H. pylori* suşları metranidazol dirençlidir. Bu jinekolojik, dental ve paraziter hastalıklarda nitroimidazol ve metranidazolün yaygın kullanımıyla ilişkilidir (127,128).

Metranidazol direnci ile karşılaştırıldığında, *H. pylori*'de klaritromisin direncinin prevalansı (MIC \geq 2 mg/L) çok düşüktür. Endüstriyelmiş ülkelerde, *H. pylori* suşlarının yaklaşık %10'u klaritromisin dirençlidir. Gelişmekte olan ülkelerde, klaritromisine karşı direnç oranı daha yüksektir ve %25-50 arasında değişmektedir (127). Klaritromisin direnci Amerika'da %5-14, Avrupa'da %10'un üzerinde bildirilmektedir (7,16). Son yıllarda

ülkemizde bu direnç oranı, bir çalışmada %16.8, diğer çalışmalarda ise %52-56 olarak bildirilmiştir (17-19,129).

H. pylori'de amoksisilin direnci ($MIC \geq 0.5$ mg/L) ve tetrasiklin direncinin ($MIC \geq 4$ mg/L) 20. yüzyılın sonlarına kadar olmadığı ya da çok ender olduğu bildirilmiştir. Bu antibiyotiklere karşı direnç diğer bakterilerde ise yaygındır. *H. pylori*'de amoksisilin ve tetrasiklin direncinin insidansının özellikle bu antibiyotiklerin reçetesiz elde edilebildiği belli coğrafik bölgelerde arttığı görülmektedir. Çin'de *H. pylori* amoksisilin ve tetrasiklin direnç oranı %72 ve %59 bildirilmiştir (127).

4.9.2. Antimikrobiyal Direnç ve Klinik Etki

Birçok çalışma, antimikrobiyal direncin anti-*H. pylori* tedavisinin başarısını azalttığını göstermektedir. *H. pylori* ilişkili hastalıklarda antibiyotik direnci ile klinik ilişki araştırılmaktadır. *H. pylori* eradikasyonunu azaltan antibiyotik direnci, *H. pylori* suşlarında direnç düzeyi, tedavinin süresi, antimikrobiyal ilaçların dozu ve tedavide kullanılan bileşenler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Birçok çalışmada, metranidazol dirençli *H. pylori* suşu ile kolonizasyonda, metranidazol içeren PPI temelli üçlü tedavinin eradikasyon oranı dirençli suşlarda %71, metranidazol duyarlı suşlarda ise %93'ten %20'ye düştüğü gösterilmiştir. Metranidazol direnci, metranidazol içeren PPI temelli üçlü tedavi ile elde edilen eradikasyon oranlarında geniş bir etkiye sahip olduğu, bu tedavilerle eradikasyon oranı ise dirençli suşlar için %63, duyarlı suşlar için %91 olarak belirtilmiştir. PPI temelli bir tedaviye bizmut bileşeninin ilavesinde tedavinin etkinliği dirençli suşlar için %77, metranidazol duyarlı suşlar için %91'den yüksektir. Metranidazol direncine karşı ranitidin bizmut sülfat temelli üçlü tedavi çalışmalarının sınırlı olmasına rağmen, eradikasyon oranları dördü tedavide dirençli suşlar için %76, metranidazol duyarlı suşlar için %99'dur (127,130).

H. pylori'de klaritromisin direncinin prevalansı düşüktür, çoğu çalışmada da klaritromisin direnci dramatik olarak bütün klaritromisin içeren tedavilerin başarısını azalttığı görülmektedir. Klaritromisin içeren ikili tedavinin (PPI ya da bizmut bileşeni) eradikasyon oranı klaritromisin dirençli suşlar için %28, klaritromisin duyarlı suşlar için %67'den %40'a azaldığı bildirilmektedir. Klaritromisin içeren üçlü tedavide ise (PPI ve amoksisilin ya da metranidazol) eradikasyon oranı, klaritromisin duyarlı suşlar için artmasına (%90) karşın, klaritromisin dirençli suşlar için bu oranın azaldığı (%36) belirtilmiştir. Tedavi

başarısızlığının amoksisilin ve tetrasiklin dirençli *H. pylori* suşlarının varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir, ancak tedavi başarısında bu dirençlerin etkisinin saptanmasında henüz yeterli bir veri yoktur (127,131).

4.9.3. Antimikrobiyal Direncin Moleküler Mekanizması

H. pylori'de antibiyotik direnç mekanizmaları moleküler yöntemlerle tanımlanmış olup, çoğu kromozomda lokalize olan nokta mutasyonlarına bağlıdır (Tablo 6). Diğer bakterilerde plazmidler, transpozonlar ve integronlarda lokalize olan antibiyotik direnç mekanizmalarından farklıdır. *H. pylori*'de antibiyotik direncin temeli muhtemelen *de nova* olmasına rağmen, dirençli ve duyarlı suşlar arasında *in vivo* horizontal gen transferi olduğu belirtilmiştir (127,131).

Tablo 6. *H. pylori* enfeksiyonu tedavisinde kullanılan antimikrobiyallerin prevalansı, etki mekanizması ve direnç

Antimikrobiyal ajan	Etki şekli	Direnç mekanizması	Direnç prevalansı
Metranidazol	Nitroredüktazlarla prodrugların üretilmesi, metranidazol ara ürünleri ve nitro anyon radikalleri oluşumuna ve sonrada DNA hasarına neden olur	<i>rdxA</i> ve <i>frxA</i> geninde mutasyona bağlı metranidazol oluşumunun yokluğu ve diğer redüktazların ekspresyonunun azalması	%20-95
Klaritromisin	23S rRNA ribozomal alt ünitesine bağlanır ve protein sentezinin inhibisyonuyla sonuçlanır	23S rRNA'da nokta mutasyonları	%5-30
Amoksisilin	Penisilin bağlayan proteinlere (PBPs) β - laktam antibiyotiklerinin bağlanması ile hücre bölünmesi inhibe olur	PBP-D (tolerans) ya da PBP1A (direnç)'e amoksisilin bağlanmasının azalması, membran geçirgenliğinin azalması (direnç)	%1-2
Tetrasiklin	Amino açıl tRNA ile birlikte ribozoma bağlanma ve protein sentezinin engellenmesi	<i>rrnA</i> ve <i>rrnB</i> , 16S rRNA geninde nokta mutasyonları	\leq %1
Florokinolonlar	Topoizomerazlar ve DNA girazların inhibisyonu, DNA replikasyonunu engeller	<i>gyrA</i> , DNA giraz geninde nokta mutasyonları	< %1

Rifamisinler	RNA polimeraza bağlanır, transkripsiyon inhibisyonu ile sonuçlanır	<i>rpoB</i> , RNA polimeraz geninde nokta mutasyonları	< %1
Nitrofuranlar	Nitroredüktazlarla prodrugların üretilmesi, nitro anyon radikalleri oluşumuna ve sonrada DNA hasarına neden olur	Bilinmiyor	< %0.1
Bizmut	Protein, ATP ve hücre membran sentezinin inhibisyonu	Bilinmiyor	-

Tablo 6'nın devamı

*127. ve 130. kaynaktan alınmıştır.

4.9.3.1. Metranidazol Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Metranidazol gastrik sıvı içerisine aktif olarak salınan ve antimikrobiyal etkisini düşük pH'da gösterebilen ve *H. pylori*'ye karşı oldukça etkili bir ilaçtır (127). Metranidazole karşı direnç tam olarak bilinmemektedir, ancak çeşitli olasılıklar söz konusudur: (i) transport eksikliği, (ii) ilaç modifikasyonu ya da export, (iii) biyolojik hedefin kaybı yada modifikasyonu, (iv) DNA tamir enzimi aktivitesinde artış, ve (v) oksijen radikallerini bulma yeteneğinin artması. Metranidazol direnci, metranidazol aktivasyonunu engelleyerek metranidazol indirgenme bölgesinden oksijen uzaklaştırılması ile ilişkili olabilir. Metranidazolün antimikrobiyal etkisi hedef hücrenin redoks sistemi tarafından metranidazolün indirgenme aktivasyonuna bağlıdır (132,133). Metranidazol bakteri sitoplazmasına inaktif prodrug olarak girer, *H. pylori* oksijene duyarlı nitroredüktaz enzimleri ile metranidazolü aktive eder. Metranidazol nitroredüktazı kodladığı düşünülen oksijenden etkilenmeyen NADPH nitroredüktaz geni *rdxA* ve metranidazol nitroredüktaz kodlayan gen NADPH flavin oksidoredüktaz gen *frxA* metranidazol direncinden sorumludur (49,127,132,133). *frxA* geni metranidazolü DNA'yı parçalayan aktif bir bileşene değiştirmede rol oynar. Yüksek düzey metranidazol dirençli bütün *H. pylori* izolatlarında anlamsız ve/veya frameshift mutasyonlarıyla oluşan *rdxA* ve *frxA* premature kesimi bulunur. Metranidazole karşı orta düzey dirençli izolatlar ya *rdxA* ya da *frxA*'nın tekli premature kesimini içerir. Düşük düzeyli metranidazol dirençli izolatlar *frxA* geninde tek bir anlamsız mutasyon içerir fakat *rdxA*'da spesifik bir değişikliğe neden olmaz. *rdxA* geninde nonsense ve/veya frameshift

mutasyonları metranidazol dirençli izolatların %68-78'inde bulunduğu bildirilmiştir (132,133).

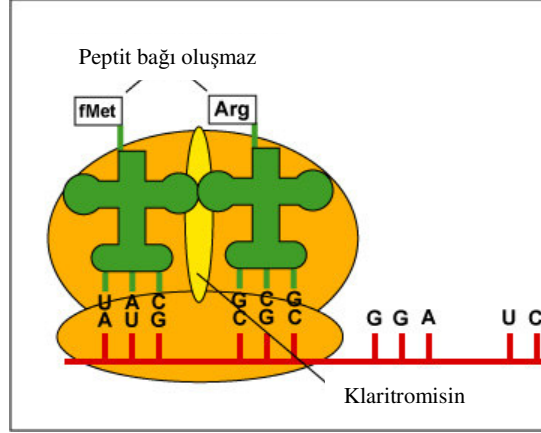
4.9.3.2. Tetrasiklin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Tetrasiklin 30S ribozomal alt üniteye bağlanan *H. pylori*'ye karşı aktif bakteriostatik bir antibiyotiktir. Ribozoma aminoasit tRNA'nın bağlanmasını engelleyerek, bakteri büyümesi ve protein sentezini inhibe eder (127). Tetrasiklin direncinin, suşların çok az bir kısmında görüldüğü bildirilmiştir (49). İlaç bağlanmasının yetersizliği ve/veya ilaç efflux'unda artış, ribozomal koruyucu proteinlerin değişimi veya 16S rRNA tetrasiklin bağlanma bölgesinde mutasyonlar *H. pylori*'nin tetrasiklin direncinden sorumludur (127).

H. pylori'de tetrasiklin direnci için en olası mekanizma üç yakın 16S rRNA rezidüsünde AGA₉₂₆₋₉₂₈ TTC üçlü baz çifti değişikliğine dayanmaktadır. Bu mutasyon tetrasiklinin primer bağlanma bölgesinde lokalizedir. İlaç-ribozom etkileşimi afinitesini etkileyebilir ve böylece translasyon inhibitörü olarak tetrasiklinin verimini azaltır. Üçlü baz çifti değişikliğinin yanı sıra A₉₂₆G, A₉₂₆T, A₉₂₈C, AG₉₂₆₋₉₂₇ GT ve A₉₂₆G/A₉₂₈C gibi birçok tekli ve çiftli baz değişiklikleri de *H. pylori*'de tetrasiklin direncine neden olmaktadır. Yüksek düzey tetrasiklin direnci yalnızca üçlü baz değişimi ile ilişkilidir, tekli ve çiftli baz değişiklikleri ise düşük düzey tetrasiklin direnci ile ilişkilidir (127).

4.9.3.3. Klaritromisin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Klaritromisin, 23S rRNA molekülü V domaininin peptidil transferaz bölgesine bağlanan makrolid gruba ait olan bakteriostatik bir antibiyotiktir. Bu bağlanma protein elongasyonunu engeller ve böylece etkili olarak bakteriyal protein sentezini durdurur (Şekil 4) (127,134). Klaritromisinin antibakteriyal aktivitesi diğer makrolidlerle benzerdir, ancak klaritromisin asidik gastrik mukus tabakasında daha iyi absorbe olur ve bu nedenle *H. pylori*'ye karşı daha etkilidir (127).



Şekil 4. Klaritromisinin peptidiltransferazı bloklayıcı aktivitesi

* 134. kaynaktan alınmıştır.

H. pylori'de klaritromisin direnci 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesinde 2142, 2143 ve 2144 pozisyonlarındaki adeninin guanin ile yer değiştirdiği ve 2142 ve 2143 pozisyonlarındaki adeninin sitozinle yer değiştirdiği nokta mutasyonlarıyla oluşur (3,4,14,15,21,22,135,136). *H. pylori*'de bu yer değişiklikleri birçok makrolid için ribozomların afinitesinin azalmasına neden olur ve artan dirençle sonuçlanır. A2143G yer değişikliği düşük MIC (<64 mg/L)'li izolatlarda sık bulunurken, A2142G ve A2142C özellikle yüksek klaritromisin MIC (>64 mg/L)'li izolatlarda daha çok görülmektedir. A2142G ve A2143G mutasyonları çok sık görülürken, A2142C mutasyonu daha az görülmektedir (127,137). Aynı zamanda A2115G, G2141A ve T2717C gibi diğer 23S rRNA mutasyonları da gösterilmiştir, ancak bu mutasyonlar çok nadir gözlenmektedir (4,99,131,138).

H. pylori iki 23S rRNA geni içerir ve mutasyonlar genellikle her iki kopyada da bulunur. Heterojenite klaritromisin direnci ile sonuçlanmasına rağmen, genellikle homojenik izolatlarda bulunandan daha düşük direnç seviyesiyle ilişkili görülmektedir. *H. pylori*'de heterojenitenin üzerinde homojenitenin daha yüksek prevalansı bu organizmada DNA rekombinasyonunun varlığını yansıtabilir. 23S rRNA'nın bir kopyasında mutasyon, yüksek klaritromisin direncinin homolog DNA rekombinasyonu ile diğer 23S rRNA genine kolayca transfer olabildiği gösterilmiştir (14,21,127).

Klaritromisin direnci diğer makrolidlere karşı dirençle uyudur. A2143G mutasyonu streptogramin ve klindamisine orta düzey direnç ve eritromisine yüksek düzey direnç

gösterirken, A2142G ve A2142C mutasyonları bütün makrolidlere yüksek düzey çapraz direnç verdiği bildirilmiştir (127).

4.9.3.4. Amoksisilin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Amoksisilin penisilin grubuna ait bakterisidal bir antibiyotiktir. Amoksisilin penisilin bağlayan proteinlere (PBPs) bağlanır ve böylece bakteriyal hücre duvar sentezini engeller, bakteri lizisi ile sonuçlanır. Penisilin bağlayan proteinlerde yapısal değişiklik, membran permeabilitesinde azalma ve aktif efflux potansiyel mekanizmalardır (26,127,131).

4.9.3.5. Florokinolon Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Florokinolonlar, DNA giraz ve topoizomerazları inhibe eden bakterisidal etkili antibiyotiklerdir. DNA giraz 2A alt ünitesi ve 2B alt ünitesini içeren tetramer yapıda bir enzimdir. *H. pylori*'de florokinolonlara karşı direnç DNA giraz A alt ünitesini kodlayan *gyrA* geninde mutasyon gelişimine bağlıdır (26,127,131). Direnç *gyrA* geninin 87, 88, 91 ve 97 aminoasit pozisyonunda kinolon direnç belirleme bölgesindeki (QRDR) nokta mutasyonlarla oluşur (127).

4.9.3.6. Rifamisin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Rifabutın ve diğer rifampin türevleri DNA bağımlı RNA polimerazın β alt ünitesine bağlanarak transkripsiyonun inhibisyonuna neden olan bakterisidal antibiyotiklerdir. Bu kompleksin β alt ünitesi *rpoB* geni tarafından kodlanır. *H. pylori*'de bu antibiyotiklere karşı direnç *rpoB* genindeki nokta mutasyonları ile ilişkilidir (127).

4.9.4. Klaritromisin Direnci Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

H. pylori duyarlılık testleri için kullanılan yöntemler difüzyon ya da dilüsyon temelli standart fenotipik yöntemler ve genotipik yöntemler olarak 2 grupta incelenir (138).

4.9.4.1. Fenotipik Yöntemler

4.9.4.1.1. Agar Dilüsyon

Agar dilüsyon, diğer test metodlarının doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan referans bir tekniktir (137). *H. pylori* için “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)’in önerdiği antimikrobiyal duyarlılık testi agar dilüsyondur (49,138,139). %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar ortamı kullanılarak 35°C’de 72 saat inkübe edilir (25). Klaritromisin duyarlılık testlerinin standardizasyonu; agarın tipi, büyüme içeriği, inokulum miktarı ve inkübasyon ile ilişkilidir. <0.25 mg/l duyarlı, 0.25-1 mg/l intermediate ve >1 mg/l dirençli olarak belirlenmiştir (25,138).

4.9.4.1.2. Sıvı Dilüsyon

H. pylori’nin sıvıda büyümesinin zorluğu nedeniyle çok sık kullanılmamaktadır (138).

4.9.4.1.3. Disk Difüzyon

Rutin duyarlılık testleri için en sık kullanılan metottur. Özellikle eritromisin diskinin kullanıldığı makrolidlere karşı direnci saptamak için uygun olduğu saptanmıştır (138). *H. pylori* için önerilmeyen bir yöntemdir (49).

4.9.4.1.4. Epsilometer Test (E-test)

E-test disk difüzyon metodunun kantitatif bir çeşididir. Agar dilüsyon metodu ile korelasyonu klaritromisin antibiyotiği için uyumludur (138). Pahalı olması bir dezavantajdır (49).

4.9.4.2. Genotipik Yöntemler

H. pylori’de klaritromisin direncinin saptanması için birçok teknik geliştirilmiştir (Tablo 7). Klaritromisin direnci 23S rRNA geninin V domaininin peptidiltransferaz

bölgesinde çeşitli nokta mutasyonlarına bağlıdır. Moleküler bazlı metotlar bakterilerin büyüme oranı ya da hücre canlılığına bağlı değildir (127,140).

Tablo 7. Klaritromisin direncinin saptanmasında moleküler yöntemler

Antibiyotik	Moleküler yöntem
Klaritromisin	PCR-RFLP PCR-OLA PCR-DEIA PCR-LipA PCR-PHFA 3M-PCR Real-time PCR hibridizasyon testi FISH

* 130. kaynaktan alınmıştır.

4.9.4.2.1. PCR-RFLP

Amplikonların çalışılmasında kullanılan farklı metotlar PCR temelli yöntemlerdir. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) amplikon içinde restriksiyon bölgesinin bulunmasını temel alan basit bir metottur. Bu test *BceA1* (A2142C), *BsaI* (A2143G) *BbsI* (A2142G) ve *MboII* (A2142G) restriksiyon endonükleazlarını kullanarak önceden tanımlanan 23S rRNA mutasyonlarının saptanmasını sağlar (127). Önceden A2142C mutasyonunu saptayamayan bu yöntem için sonradan A2142C mutasyonunun saptanmasına olanak tanıyan yeni bir restriksiyon enzimi tanımlanmıştır (127,131,138).

4.9.4.2.2. PCR-OLA

PCR oligonükleotid ligasyon testi (OLA), PCR'dan sonra ek bir hibridizasyon basamağı içerir (62). PCR ürünleri için oldukça zorlu şartlar altında işaretlenmiş oligonükleotit problemleri kullanılır (127,138,141).

4.9.4.2.3. PCR-DEIA

PCR-DNA enzim immün testi (DEIA), PCR'dan sonra ek bir hibridizasyon basamağı içerirler. Mikrotitre kuyucuklarda immobilize edilen, mutasyonların işaretlendiği problemlerle ters hibridizasyon prensibine dayanmaktadır (127,142).

4.9.4.2.4. PCR-LİPA

Nokta mutasyonlarına uygun oligonükleotid problemleri nitroselüloz bir stripe uygulanır ve amplifiye edilmiş ürünlerle ters hibridizasyon prensibine bağlıdır (138,142). Hibritler streptavidin-alkalin fosfataz konjugat/substrat kolorimetrik sistem aracılığıyla saptanır. PCR-LİPA, geniş sayıda örneklerin test edilmesi için oldukça uygundur ve yedi farklı direnç mutasyonunun saptanması için uygun ve basit bir sistemdir (142).

4.9.4.2.5. PCR-PHFA

Gastrik sıvı örneklerinde klaritromisin dirençli mutantların ve *H. pylori*'nin direk saptanması için uygulanır. Karışık populasyonu ve fenotipik metotlarla saptanamayacak kadar düşük konsantrasyonda dirençli populasyonu saptayabildiğinden daha duyarlı bir yöntemdir. Bütün midenin incelenmesine olanak tanır (138).

4.9.4.2.6. 3M-PCR

3' uygunsuz ters primer PCR (3'-mismatched reverse primer PCR; 3M-PCR) metodu A2142C mutasyonunda içeren tüm nokta mutasyonları için kullanılır (138).

4.9.4.2.7. Real-Time PCR Hibridizasyon Testi

Bu yöntemde, floresanla işaretlenmiş mutasyonlu ya da sıkıca bağlanan probun varlığında bir 23S rDNA fragmenti amplifiye edilir. Bu problemler PCR ürünleriyle hibridize olduğu zaman, bir floresan sinyal oluşur. PCR tamamlandıktan sonra, ısı mutasyon probunun erime noktasını saptamak için artırılır. Floresan sinyalin oluşturduğu ısı, mutasyon probunun ayrıldığı noktada (erime noktası) sinyal verir. Hedef sekansta uyumsuzluk olduğunda, daha düşük erime sıcaklığı hibrid birleşimi karşılaştırılarak elde edilir. Kültüre gereksinim duymadan, direkt gastrik dokuya uygulandığında üç saat içerisinde sonuç veren basit ve hızlı bir tekniktir (127,143,144).

4.9.4.2.8. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

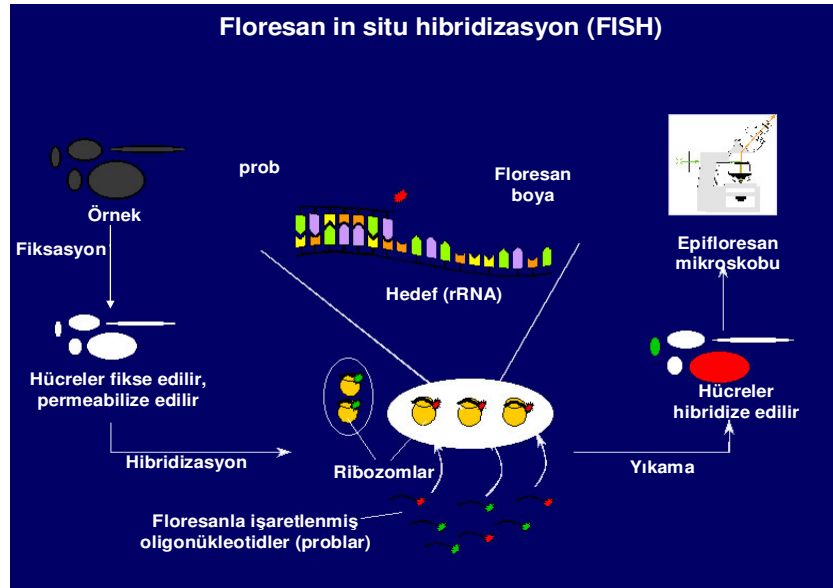
In situ hibridizasyon, nükleik asit dizilerinin (DNA ve RNA) morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak gösterilmesini sağlayan ve temel olarak çift iplikli nükleik asit oluşumu kinetiğini kullanan özgün bir yöntemdir. *In situ* hibridizasyonun diğer hibridizasyon yöntemlerinden (Southern veya Northern blot) farkı nükleik asitlerin biyolojik açıdan morfolojisi korunmuş hücresel ortamlarında tanınarak gösterilmesidir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin biyolojik yapılarıdaki yeri belirlenmiş olur (145).

Son yıllarda nükleik asitleri işaretlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Biotin, dioksijenin, dinitrofenil veya florokromlarla enzimatik olarak işaretleme genellikle tercih edilmektedir. Piyasada çeşitli prob işaretleme kitlerinin bulunması, bu işlemleri oldukça kolaylaştırmıştır. Rekombinant DNA preparasyonları ile saf prob elde edilebilmektedir. Prob seçimine bağlı olarak, belirli genom ve kromozomlar, tekrarlayan DNA dizileri, tek kopyalı diziler, mRNA ve viral diziler gibi farklı hedefler saptanabilmektedir (145).

Bakteriyal FISH teknolojisi, bakteriyal bir türün ribozomal RNA'sının çoklu kopyaları ile oligonükleotidlerinin tanımlanmasının spesifik DNA-DNA hibridizasyonuna bağlıdır (16S rRNA, 23S rRNA). Floresan boya ile işaretli oligonükleotidler, bakteriyal hücreye penetre olur ve hedef sekansa bağlanır. Bu teknik ile bakteri, hayvan modellerinde ya da enfekte insanların gastrik mukoza örnekleri gibi doğal habitatlarda floresan mikroskopisi kullanılarak saptanabilmektedir (100,101). Bu metotta *H. pylori*, floresanla işaretlenmiş *H. pylori* spesifik

16S ve 23S rRNA ile hibridize edilir. İşaretlenmiş problarla *in situ* olarak hibridize edilmiş bakteriler floresan mikroskopisi ile incelenir. Bu test eş zamanlı olarak *H. pylori* ve klaritromisin direncinin saptanmasına olanak verir ve direk olarak gastrik biyopsi örneklerine uygulanabilir (3,4,127,138,142).

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yönteminde istenilen lokus (gen ya da gen bölgesi) floresan molekülleri kullanılarak gösterilebilir. Bu teknik, özellikle kromozomal anomalilerin tanımlanması için ve gen haritalaması için uygundur. FISH, inceleme ve boyama için araştırmacının istediği DNA sekanslarına komplementer olan prob hazırlanmasını kapsar. Bu problemler hibridize olur ya da komplementer DNA'ya bağlanır ve onlar floresan işaretlendiğinden DNA'nın bu sekanslarının yerinin görülmesini sağlar. Prob sinyali bir floresan mikroskopunda incelenir ve klinik örnekteki DNA sinyalinin varlığı ya da yokluğu ile değerlendirilir (Şekil 5). Diğer tekniklerden farklı olarak, aktif olarak bölünebilen hücrelerdeki ökaryot kromozomlarla çalışılabilmekte, aynı zamanda bölünmeyen hücrelerde de uygulanabilmektedir (146-149).

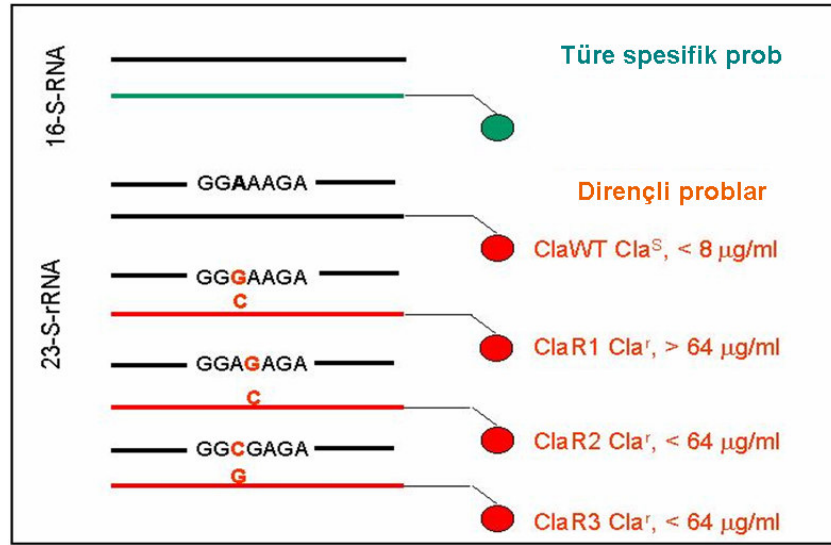


Şekil 5. FISH metodu *

* 101. ve 130. kaynaktan alınmıştır.

H. pylori için türe spesifik saptama yeşille işaretli 16S rRNA spesifik oligonükleotid Hpy-1 (5'-CACACCTGACTGACTATCCCG-3') ile yapılmaktadır. Eş zamanlı olarak tür için genotipik antibiyotik direncin saptanması mümkündür. *H. pylori* enfeksiyonuna karşı

üçlü tedavide kullanılan temel antibiyotik olan klaritromisine karşı direnç 23S rRNA'da tanımlanan üç nokta mutasyonuna dayanmaktadır. Bu nokta mutasyonları kırmızı ile işaretli ClaWT (5'-CGGGGTCTTTCCGTCTT-3'), ClaR1 (5'-CGGGGTCTTCCC GTCTT-3'), ClaR2 (5'-CGGGGTCTCTCCGTCTT-3') ve ClaR3 (5'-CGGGGTCTTGCCGTCTT-3') problemleri ile spesifik olarak hedeflenmiştir (Şekil 6) (3,4,5,15,100).



Şekil 6. *H. pylori* spesifik oligonükleotid problemleri

* 100. ve 130. kaynaktan alınmıştır.

Farklı uygulamaları olan üç farklı FISH probe kullanılmaktadır. **Lokus spesifik problemler** kromozomun tam bir bölgesini hibridize eder. Bu problemler, genin küçük bir kısmını izole etmek ve genin kromozoma yerleştiğini saptamak amacıyla kullanılır. **Alfoid ya da sentromerik tekrar problemleri** kromozomların sentromerlerinde bulunan tekrarlanmış sekanslardan oluşur. Her kromozom farklı florofor emisyonlar verebilir, bireyin doğru sayıda kromozomu olup olmadığını ya da bir kromozomun ekstra kopyasına sahip olup olmadığını saptamak için bu teknik kullanılır. **Bütün kromozom problemleri** aslında her biri aynı kromozom uzunlukları boyunca farklı bir sekansa hibridize olan daha küçük problemlerin toplanmasıdır. Bu probe kütüphanelerinin kullanılması ile bütün bir kromozom boyanabilir ve hayalet karyotipleri oluşturulabilir. Kromozomların bu çoklu florofor emisyonu, renklere bağlı olarak geleneksel karyotiplemedeki siyah ve beyaz görünen koyu ya da açık bant paternli kromozomlar arasında

ayrım yapılmasını sağlar. Bütün kromozom problemleri, dengesiz yapısal kromozom anomalilerini, kriptik translokasyonları ve marker kromozom identifikasyonunun saptanmasında oldukça kullanışlıdır (146,147).

FISH ile son zamanlarda pek çok mikrodelsiyon sendromu saptanabilmektedir (66). Klinik mikrobiyolojide FISH'in uygulama alanı ise kan kültüründen ve balgam örneklerinden patojenin saptanması, bronkoalveolar lavajda *Legionella pneumophila*'nın ve biyopsi örneklerinde ise *H. pylori*'nin saptanmasıdır (150).

FISH floresan mikroskop kullanımını dışında başka ekipmana gereksinim olmadan hızlı sonuç sağlama avantajına sahiptir. Geleneksel kromozom FISH metafaz dağılımında kullanılır (metafaz FISH) ve pozitif hibridizasyon sinyalleri her iki kardeş kromatidlerle hibridize olan proba ilgili olarak çift işaret olarak görülür. Komplike görüntü oluşturan aletlerin kullanılması ve reporter bağlayıcı moleküllerin farklı floroforları taşıması, eş zamanlı olarak düzenli birçok DNA'nın klonlanması ve haritalama için olanak sağlamaktadır (151).

FISH yönteminde, orijini bilinmeyen ekstra materyalin identifiye edilmesi yada rutin sitogenetiğin rezolüsyonu ötesinde spesifik mikrodelsiyonların saptanması için metafaz hücreleri kullanılabilir. Eğer bir kromozom basit bir delesyona sahipse yada zor veya kompleks bir yeniden düzenleme gerektiğinde, rutin sitogenetik tanımlamanın zor olduğu durumlarda yardımcı olabilir. Metafaz FISH belirli kanserlerde görülen spesifik kromozom yeniden düzenlenmelerinin bazılarını saptayabilir (19). Son zamanlarda, yüksek rezolüsyonlu, kromatin iplikleri ya da DNA'nın yapay gerilmesini içeren fiber-FISH gibi yeni varyasyonlar geliştirilmiştir. Belirli kanserlerde karakteristik bazı spesifik kromozom yeniden düzenlenmelerini ve kromozomlarda bir yada daha fazla kromozom sayısı farklılığını saptamada interfaz hücreleri kullanılabilir. İnterfaz FISH'in birincil avantajı hücre çoğaltılmasına gerek duyulmadan 24 saat içerisinde uygulanabilmesidir. Rutin sitogenetik, interfaz FISH ile saptanamayan anomalilerin saptanması yada sonuçların doğrulanmasında bir anoploidi taramayı kapsar (148). İnterfaz nükleusunda kromozomda FISH'de (interfaz FISH), kromozomlar prometafaz ya da metafaz kromozomlarına kıyasla çok uzatıldığı için yüksek rezolüsyon analizleri sağlanabilir (151).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu

Mayıs-Kasım 2003 tarihleri arasında dispeptik yakınmaları nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 54 hastanın (37 kadın, 17 erkek yaş ortalaması 46.48 ± 13.12 SD; yaş aralığı 21-78) parafin bloklu mide biyopsi örnekleri retrospektif olarak çalışıldı. Yakın zamanda kan tranfüzyonu alanlar, gastrik cerrahi operasyonu geçirenler, ciddi karaciğer hastalığı olanlar, özofagus varisleri bulunanlar, koagülopatisi olanlar, gebelik veya laktasyonda olanlar, son 6 ay içinde *H. pylori* eradikasyon tedavisi alanlar, son bir ay içinde antibiyotik, antisekretuar ilaç, bizmut tuzları ve sukralfat kullanan hastalar dışlama kriterleri nedeniyle çalışmaya alınmadı. Hastalardan alınan biyopsi örneklerine üreaz testi uygulandı ve histopatolojik incelemeye alındı.

i. Etik Kurul Onayı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu 21 Aralık 2004 tarih ve 04/17/04 numaralı toplantısında, 587 protokol numaralı "*Helicobacter pylori* ve klaritromisin direncinin parafin bloklarda floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemiyle belirlenmesi" isimli yüksek lisans tezi araştırma projesinin uygulanması onayı, 21.12.2004 tarih ve 183 sayılı yazı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne bildirilmiştir.

5.2. Biyopsi Örneklerinin Alınması

25.10.2001 tarih ve 01/15/06 numaralı toplantısında, 67 protokol numaralı etik kurul onaylı çalışmaya katılan hastalara, en az 8 saatlik açlıktan sonra Olympus QX 240 veya Olympus 2T 240 marka videoendoskopi ile üst GIS endoskopisi yapıldı. Endoskopi öncesi, endoskopi sırasında ve sonrasında hastalara bizzat refakat edildi. Endoskopi öncesinde % 10'luk Xylocain sprej ile farinkse lokal anestezi uygulandı. Endoskopi sırasında mide antrum ve korpusundan ikişer olmak üzere toplam dört biyopsi örneği alındı. Bir korpus ve bir

antrum biyopsi örneğine endoskopi sırasında hızlı üreaz testi uygulandı. Diğer korpus ve antrum örneği ise histopatolojik açıdan incelendi. Bu hastaların parafin blokları biyopsi örneklerinden yeni kesitler alınarak çalışıldı.

5.2.1. Hızlı Üreaz Testi

Bir gram üre 10 ml steril distile suda eritilerek hazırlanan karışımdan her test tüpüne birer ml dağıtıldı. Korpus ve antrum örnekleri üre solüsyonu içeren birer test tüpüne konuldu ve üzerlerine ikişer damla fenol kırmızısı solüsyonu eklendi. Karışımın renginde sarıdan pembeye değişimin görülmesi pozitif, sarı rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (24).

i. Endoskopların Temizliği

Endoskoplar önce mekanik olarak temizlendi; su ile yıkandı, fırçalandı. Daha sonra en az 15 dakika olmak üzere gluteraldehit içeren dezenfektan solüsyonda bekletildi. Su ile durulanıp kurularak bir sonraki hasta için hazırlandı (24).

5.2.2. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi:

Her hastadan bir korpus ve bir antrumdan alınan, histopatolojik açıdan incelenecek biyopsi örnekleri hemen %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonu içeren şişelere alındı. Aynı ayrı şişelerde alınan bölgeler belirtilerek rutin histopatolojik inceleme ve "Helicobacter-like organisms" (HLO) incelenmesi istemi ile Patoloji Laboratuvarına ulaştırıldı.

Ellidört hastanın histopatolojik antrum ve korpus toplam 108 biopsi örneği güncelleştirilmiş Sydney sistemine göre incelendi. Tamponlanmış formalin (%10) tespitindeki biyopsiler parafin bloklarda 3-5 µm kesilerek Hematoksilen-Eozin, Alcian blue ve Giemsa boya ile boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon E600), gastrointestinal patoloji ile ilgili patoloji uzmanı tarafından "Helicobacter-like organisms"(HLO) yönünden morfolojik olarak değerlendirildi. Bundan sonra metin içinde HLO, *H. pylori* olarak kullanıldı.

Alınan dört biyopsi örneğinden bir korpus ve bir antruma uygulanan histopatolojik inceleme ve/veya üreaz testlerinden en az biri pozitif olgular *H. pylori* ile enfekte; korpus, antrum üreaz ve histopatolojik incelemelerinin tümü negatif olgular sağlam kabul edildi.

Her hastaya bir numara verilerek "Hasta bilgilendirme ve rıza formu", endoskopi raporu ve patoloji raporları bir dosyada toplandı.

5.2.3. Örneklerin Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi ile İncelenmesi

5.2.3.1. Örneklerin Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi İçin Hazırlanması

%10'luk tamponlu formalinde tespit edilen korpus ve antrum biyopsi örneklerinden standart yöntemle parafin bloklar elde edilmiştir. Bu parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich, Cat. No: P8920) kaplı lamlara alındı.

5.2.3.2 Deparafinizasyon

Poly-L-Lysine kaplı lamlara parafin bloklardan alınan 4 µm kesitlerden parafinin uzaklaştırılması için deparafinizasyon işlemi uygulandı. Biyopsi kesitlerine 2x30 dakika inkubasyon fırınında 55°C ısıda n-Hekzan (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien) ve 2x30 dakika absolü etanol C₂H₆O (molecular biology grade/ethyl alcohol, AppliChem BioChemica) içeren şalelerde (Sigma S5766) deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Deparafinizasyonun her bir aşamasında taze solüsyon kullanıldı. Bu işlem uygulandıktan sonra lamlar havada kurutuldu.

5.2.4. Kalite Kontrol Örneklerinin Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi ile İncelenmesi

5.2.4.1. Kalite Kontrol Örneklerinin Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yöntemi İçin Hazırlanması

FISH yönteminde pozitif kontrol olarak klaritromisin duyarlı *H. pylori* ATCC 43504 suşu, klaritromisin dirençli *H. pylori* hasta biyopsi kesiti kullanıldı. Bu suşlar Julie Morris

ASCP (the American Society of Clinical Pathology) Arctic Investigations Program Centers for Disease Control (CDC)-USA tarafından protokol 1 (SeaFAST *H. pylori* Combi Kit)'e göre hazırlandı ve fotoğraflandırılarak tarafımıza gönderildi. Firma kalite kontrol referans suşlarından negatif kontrol olarak formalin ile fikse edilmiş *E. coli* (seaPro cf0717), *Burkholderia cepacia* (seaPro FF04) ve *Pseudomonas aeruginosa* (seaPro cf0737) kültür süspansiyonları kullanıldı. Bu kültür süspansiyonları ise protokol 2 (SeaFAST-PRE Kit)'ye göre hazırlandı. Ayrıca bilinen *H. pylori* enfeksiyonu pozitif ve negatif formalin ile tespit edilmiş parafin gömülmüş biyopsi kesitleri internal kalite kontrolü olarak kullanıldı.

Protokol 1: Üreyen bakteri kolonisinden bir öze dolusu alınarak 100 µl PBS (BIOCHROM AG) içeren 1.5 ml steril eppendorf tüpünde (Greiner bio-one) suspense edildi ve karıştırıldı. 10 µl %37'lik formaldehit solüsyonu (Fluka Riedel-de Haën) eklendi, karıştırıldı ve 15 dakika oda ısısında enkübe edildi. 10 dakika 12000 rpm'de santrifüjlendi. Supernatant atıldıktan sonra kalan pellet 200 µl PBS ile yeniden suspense edildi ve ilk basamak tekrar uygulandı. Bu pellet 100 µl PBS içinde suspense edilerek 100 µl etanol eklenerek karıştırıldı. Elde edilen bakteri solüsyonundan 10 µl 8 bölmeli mikroskopik lamlara (seaPro cF0508) alındı ve havada kurutuldu. Alevde tespit edilerek hibridizasyon aşaması için hazırlandı.

Protokol 2: Mikroorganizmalar 250 µl de-iyonize steril su ile suspense edildi. Bu süspansiyonlardan 10 µl 8 bölmeli mikroskopik lamaların ayrı kısımlarına alındı ve havada kurutuldu. Alevde tespit edildikten sonra lam %50, %80 ve %96'lık etanol serilerinde üçer dakika bekletilerek dehidrate edildi. Havada kurutulularak hibridizasyon aşaması için hazırlandı.

seaFAST *H. pylori* Combi Kit referans suşlar ile üretici tarafından kalite kontrole tabi tutulmuştur.

5.3. Floresan *In Situ* Hibridizasyon Yönteminin Uygulanması

5.3.1. Test Reaktiflerinin Hazırlanması

i. DNA prob karışımının hazırlanması

Liyofilize DNA prob karışımı birkaç saniye santrifüj edildi ve 110 µl DNA tamponu ile rehidrate edildi, + 4 °C'de saklandı.

ii. DNA hibridizasyon solüsyonunun hazırlanması

4 µl rehidrate DNA prob karışımı 1.5 ml mikrosantrifüj tübüne (Eppendorf, Greiner bio-one) aktarıldı ve 36 µl hibridizasyon tamponu eklendi. Kullanmadan önce tamamen karıştırıldı.

iii. Nemli ortamın hazırlanması

Yeşil kapaklı hibridizasyon tüpüne (SeaPro Theranostics International, Lelystad, The Netherlands) bir parça kağıt havlu konuldu ve 2 ml hibridizasyon tamponu ile ıslatıldı. Tüp sıkıca kapatıldı.

iv. Yıkama tamponunun hazırlanması

500 ml DNAaz RNAaz içermeyen steril de-iyonize su (Ultra pure water for HPLC BIOCHROM AG), 10x yıkama tamponuna eklenerek dilüe edildi ve 48°C'de gerekli miktarı önceden ısıtıldı.

5.3.2. Hibridizasyon

40µl DNA hibridizasyon solüsyonu deparafinize edilmiş korus ve antrum biyopsi kesitlerini içeren poly-L-lysine'li lam üzerine eklendi. Hava kabarcıkları uzaklaştırılarak poly-L-lysine'li lamın üzerine lamel (24x50mm, ISOLAB) kapatıldı. Lamalar hazırlanan nemli ortama konuldu ve 90 dakika 46°C'de enkübe edildi. İnkübasyon sonrasında lamel atıldı. Lam önceden ısıtılmış 1-2 ml yıkama tamponu solüsyonu içeren özel şalenin (SIGMA S5766) içinde 15 dakika 48°C'de enkübe edildi. Enkübasyon sonunda PBS (BIOCHROM AG) ile lam yıkandı ve havada kurutuldu. 8 µl 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI/Antifade- MC Q-BIOgene) solüsyonu ile korus ve antrum biyopsi kesitleri kaplandı, üzeri lamelle kapatıldı ve 5 dakika oda ısısında enkübe edildi.

5.3.3. Görüntü Analizi ve Değerlendirme

Hibridizasyon aşaması tamamlandıktan sonra, antrum ve korpus biyopsi örneklerinin herbiri için FISH preparasyonları DAPI, FITC, rhodamine, çift-bant (FITC ve rhodamine) ve üç-bant (DAPI, FITC ve rhodamine) filtre donanımı olan Nikon Eclipse E600 epifloresan mikroskobu (Nikon Corp, Tokyo, Japan) ile incelendi. Görsel analizlerde iki ve üç bant filtreler kullanıldı. Her deney için tek-renk görüntüler, Power Macintosh bilgisayarını ile entegre edilmiş, yüksek duyarlılıklı, monokrom CCD (“Charged Coupled Device”) kamera aracılığı ile bilgisayara aktarıldı. Özgül olmayan artalan emisyonları FISH için tasarlanmış MacProbe 4.0.1 yazılımı (PCI Scientific Systems, USA) ile görüntüden çıkarıldı. DAPI, FITC ve rhodamine florokrom emisyonlarına ait, gri skala olarak bilgisayara aktarılmış her bir görüntü kanalına yazılım tarafından asıllarına uygun yalancı-renkler verildi. Elde edilen her bir florokrom emisyonuna ait (DAPI, FITC, rhodamine) yalancı renk verilmiş görüntüler üst üste çakıştırıldı.

Antrum ve korpus biyopsi kesitlerinin *H. pylori* varlığının saptanmasında, klaritromisin duyarlı ve dirençli *H. pylori* suşlarının değerlendirilmesinde DAPI filtreli 40x ve 100x oil objektifte incelendi. Yeşil floresan filtrede parlak yeşil floresan veren bir bakteri morfolojisi *H. pylori* olarak değerlendirildi. Kırmızı floresan filtrede kırmızı floresan veren bakteri klaritromisin dirençli *H. pylori* olarak değerlendirildi. Dual band filtre kullanılarak yeşil ve kırmızı floresan veren bakteri sarı görüldü. Ayrıca, *H. pylori* ile enfekte dokuda eş zamanlı olarak duyarlı ve dirençli bakteri kolonizasyonu (karışık populasyon) ve *H. pylori*'nin kokoid formunda saptandı. DAPI boyası da kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 8. FISH yönteminin epifloresan mikroskobunda değerlendirilmesi

Floresan	Yorum
Yeşil	<i>H. pylori</i> identifikasyonu
Kırmızı	Klaritromisin direncinin saptanması
Sarı*	Klaritromisin dirençli <i>H. pylori</i>

* çift-bant kullanıldığında

5.4. İstatistiksel Analizler

i. Geçerlilik

Uygulanan testlerin geçerliliği (tanı değeri) için dört gözlü düzenek oluşturuldu. Altın standart yöntemler olarak histopatoloji ve hızlı üreaz testi kullanıldı. Alınan dört biyopsi örneğinden bir korpus ve bir antruma uygulanan histopatolojik inceleme ve üreaz testlerinden en az biri pozitif olgular *H. pylori* enfeksiyonu varlığı; korpus, antrum üreaz ve histopatolojik incelemelerinin tümünün negatifliği *H. pylori* enfeksiyonu yokluğu olarak değerlendirildi.

a: Doğru olumlu

b: Yalancı olumlu

c: Yalancı olumsuz

d: Doğru olumsuz

Duyarlılık: $a/(a+c).100$

Seçicilik: $d/(b+d).100$

Olumlu öngörü = $a/a+b.100$

Olumsuz öngörü: $d/c+d.100$

Tanısal Doğruluk: $a+d/a+b+c+d$

FISH metodu ile altın standart yöntemlerin karşılaştırılmasında duyarlılık, seçicilik, olumlu ve olumsuz öngörü değeri ve tanısal doğruluk kullanıldı. McNemar Ki-kare testi uygulandı (SPSS Version 11.0 for Windows).

6. BULGULAR

6.1. Demografik bulgular

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne Mayıs-Kasım 2003 tarihleri arasında başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan dispeptik yakınmalı 54

olgu çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hastalar 21 ile 78 yaş grubunda olup yaş ortalaması 46.48 ± 13.12 SD bulundu.

Tablo 9. Hastaların cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Sayı	Yüzde
Erkek	17	31,5
Kadın	37	68,5
Toplam	54	100

6.2. Endoskopik bulgular

Çalışmaya alınan hastaların endoskopik bulguları incelendi. Hızlı üreaz testi ve histopatoloji *H. pylori* enfeksiyonu açısından altın standart yöntemler olarak değerlendirildi (24).

Tablo 10. Antrum korpus biyopsi örneklerinin hızlı üreaz testi ve histopatoloji sonuçları

Hasta No	Hızlı Üreaz testi		Histopatoloji		Değerlendirme
	Antrum	Korpus	Antrum	Korpus	
1	-	-	+	-	+
2	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+
5	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-
8	+	-	+	+	+
9	-	+	-	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+

15	-	-	-	-	-
16	+	-	+	+	+
17	+	+	+	+	+
18	+	-	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	-	+	+	+
21	-	-	+	-	+
22	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+
24	+	-	+	+	+
25	+	-	+	-	+
26	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+
28	+	-	+	-	+
29	+	-	+	+	+
30	+	+	+	+	+
31	+	-	+	-	+
32	-	-	-	-	-
33	+	-	+	-	+
34	-	-	+	-	+
35	+	+	+	+	+
36	+	-	+	+	+
37	-	-	+	+	+
38	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+
40	-	-	-	-	-
41	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+
47	-	-	+	+	+
48	-	-	+	+	+
49	+	+	+	+	+
50	-	+	+	+	+
51	-	-	-	-	-
52	+	+	+	+	+
53	+	+	+	+	+
54	-	-	-	-	-

Tablo 10'un devamı

Çalışmadaki 54 hastadan 35'inde antrum üreaz testi, 26'sında korpus üreaz testi pozitif bulundu.

6.3. Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine Göre Histopatolojik Bulgular

Ellidört hastanın histopatolojik antrum ve korpus toplam 108 biyopsi örneği gastrik aktivite açısından; yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2), ve şiddetli (grade 3) olarak güncelleştirilmiş Sydney sistemine göre incelendi. Toplam 108 biyopsi örneğinin 82'si (%75.9) *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 26'sı (%24.1) olumsuz saptandı. Histopatolojik incelemede *H. pylori* enfeksiyonu yönünden 44'ü (%53.7) antrum pozitif ve 38'si (%46.3) korpus pozitif bulundu. Sonuç olarak 54 hastadan 45'i (%83.3) her iki altın standart yöntemine göre *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, kalan dokuz (%16.7) hasta *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olarak değerlendirildi (24).

6.4. FISH Bulguları

Toplam 108 formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş antrum ve korpus biyopsilerinden hazırlanan histolojik kesitler deparafinize edildi ve FISH yöntemi ile değerlendirildi. Bu biyopsi kesitlerinin 79'u (%73.1) *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 29'u (%26.9) olumsuz saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu olumlu saptananların 41'inde (%51.9) antrum ve 38'inde (%48.1) korpus olumlu bulundu. Antrum olumlu kesitlerden 2'sinde *H. pylori* olumluluğunun yanı sıra dikkat çekici olarak *H. pylori* kokoid formu gözlemlendi.

Klaritromisin direnci yönünden, 79 pozitif biyopsi kesitinin 28'i (%35.4) duyarlı, 8'i (%10.1) dirençli ve 43'ü (%54.4) duyarlı/dirençli olarak saptandı. 41 antrum pozitif kesitin 17'si (%41.5) duyarlı, 21'i (%51.2) duyarlı/dirençli ve 3'ü (%7.3) dirençli bulundu. 38 korpus pozitif kesitin 11'i (%28.9) duyarlı, 22'si (%57.9) duyarlı/dirençli ve 5'i (%13.2) dirençli saptandı (Tablo 11) (Resim 1-5). EK 1'de farklı biyopsi örnekleri floresan mikroskopisi görüntüleri bulunmaktadır.

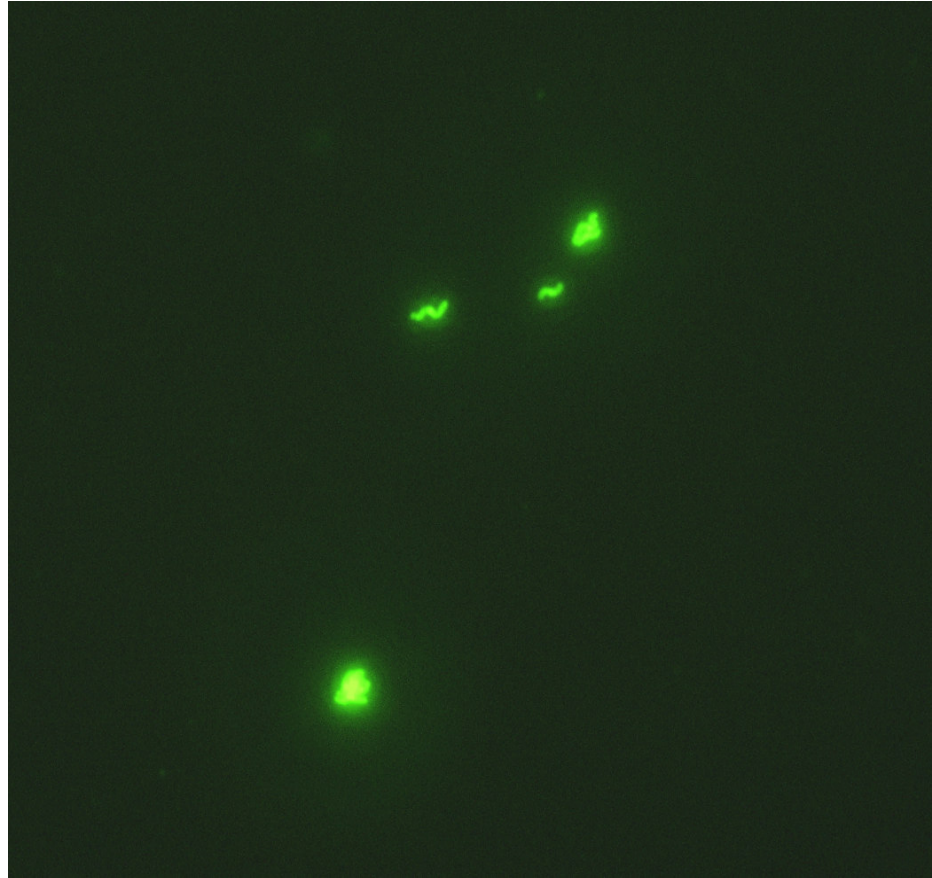
54 hastanın 45'i (%83.3) FISH metodu ile olumlu, 9'u (%16.7) olumsuz bulunmuştur. 2 hastada histopatolojik inceleme ile *H. pylori* olumlu bulunurken, FISH yöntemi ile *H. pylori* olumsuz saptanmıştır. Ayrıca 2 hastada FISH ile *H. pylori* olumlu bulunurken, histopatoloji ile *H. pylori* olumsuz bulunmuştur. FISH metodunun duyarlılığı %95.6, seçiciliği %77.8, olumlu öngörü değeri %95.6, olumsuz öngörü değeri %77.8 ve tanı kesinliği %92.6 olup, altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi (p=1.00,kappa=0.73).

Tablo 11. *H. pylori* enfeksiyonunda antrum ve korpus histopatoloji ve FISH sonuçları

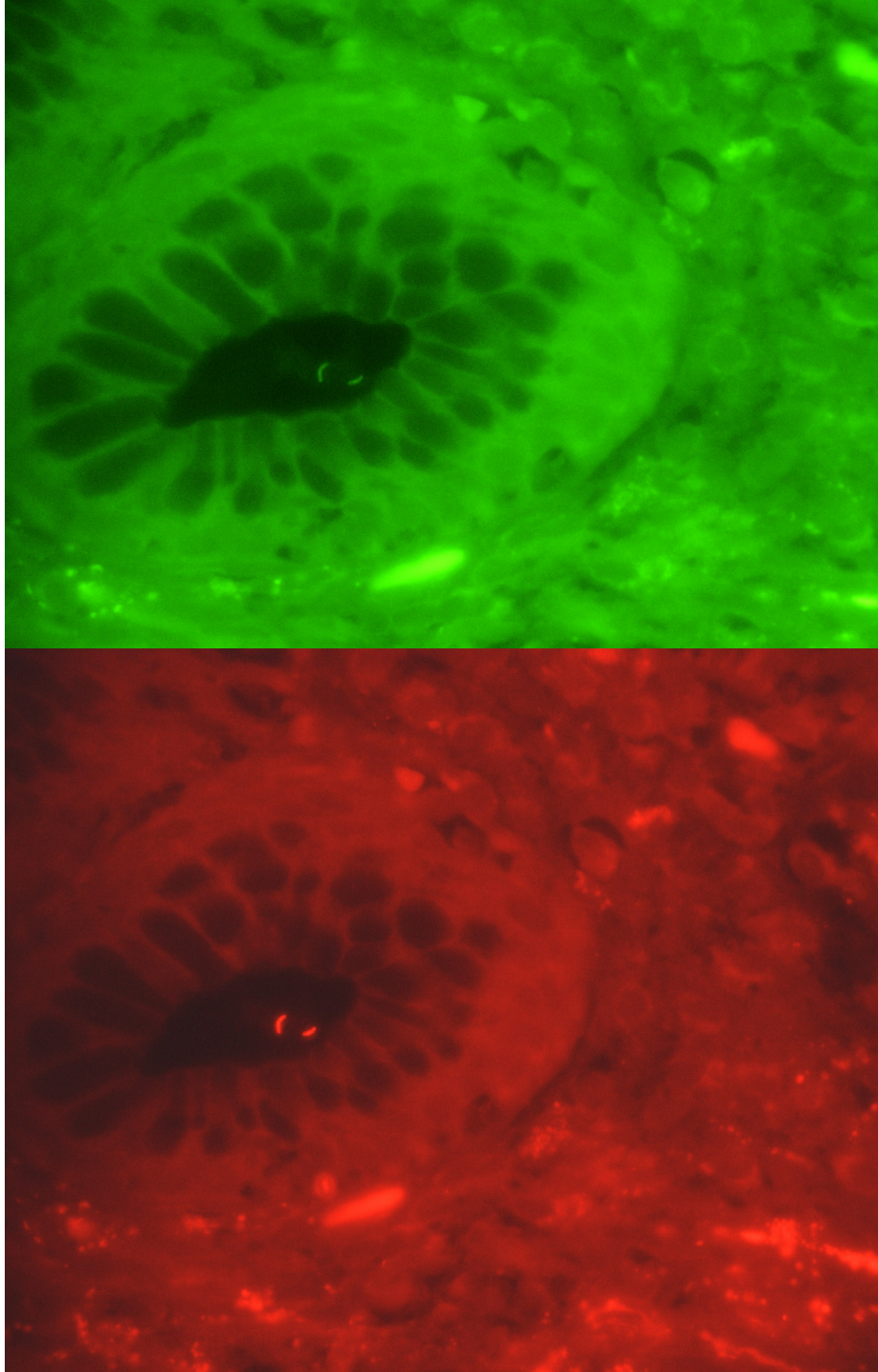
Hasta No	Histopatoloji		FISH	
	Antrum	Korpus	Antrum	Korpus
1	+	-	1+ Duyarlı	1+ Duyarlı
2	-	-	-	-
3	+	+	1+ Duyarlı/Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
4	+	+	1+ Dirençli	-
5	+++	+	2+ Duyarlı	1+ Duyarlı
6	++	+	1+ Duyarlı	1+ Duyarlı/Dirençli
7	-	-	-	-
8	+	+	2+ Duyarlı/Dirençli	1+ Duyarlı/Dirençli
9	-	+	2+ Dirençli	1+ Dirençli
10	+++	+	2+ Duyarlı/Dirençli	1+ Duyarlı/Dirençli
11	+	++	3+ Duyarlı	2+ Duyarlı
12	-	-	1+ Duyarlı	-
13	-	-	1+ Duyarlı/Dirençli	-
14	+++	+	3+ Duyarlı/Dirençli	-
15	-	-	-	-
16	+++	+	3+ Duyarlı/Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
17	+	+	1+ Duyarlı	1+ Duyarlı
18	+	+	2+ Duyarlı	1+ Duyarlı
19	++	+	3+ Duyarlı/Dirençli	1+ Duyarlı/Dirençli
20	+++	+++	3+ Duyarlı	3+ Duyarlı
21	+	-	1+ Duyarlı	1+ Duyarlı/Dirençli
22	+++	++	2+ Duyarlı/Dirençli	3+ Duyarlı/Dirençli
23	+++	+	3+ Duyarlı	2+ Dirençli
24	++	++	3+ Duyarlı/Dirençli	3+ Duyarlı/Dirençli
25	+++	-	3+ Duyarlı	2+ Duyarlı/Dirençli
26	++	++	2+ Duyarlı/Dirençli	1+ Duyarlı/Dirençli
27	+	++	-	2+ Dirençli
28	++	-	3+ Duyarlı/Dirençli	-
29	+	+	2+ Duyarlı/Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
30	+	+	2+ Duyarlı	-
31	++	-	2+ Duyarlı/Dirençli	1+ Duyarlı/Dirençli
32	-	-	-	-
33	+	-	2+ Duyarlı	1+ Duyarlı
34	++	-	2+ Duyarlı	1+ Duyarlı
35	++	+	3+ Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
36	++	++	2+ Duyarlı/Dirençli	3+ Duyarlı/Dirençli
37	+	+	-	-

38	++	++	2+ Duyarlı	2+ Duyarlı
39	+++	+++	3+ Duyarlı	3+ Duyarlı
40	-	-	-	-
41	+	+	-	2+ Dirençli
42	+++	+++	2+ Duyarlı/Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
43	+	+	2+ Duyarlı/Dirençli	1+ Duyarlı/Dirençli
44	++	+++	2+ Duyarlı/Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
45	+	+++	2+ Duyarlı/Dirençli	3+ Duyarlı/Dirençli
46	+++	+++	2+ Duyarlı/Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
47	+	+	-	-
48	+	+	-	1+ Duyarlı/Dirençli
49	++	++	2+ Duyarlı/Dirençli	2+ Duyarlı/Dirençli
50	+	+	1+ Duyarlı	-
51	-	-	-	-
52	+++	+	-	2+ Duyarlı
53	++	+++	3+ Duyarlı/Dirençli	3+ Dirençli
54	-	-	-	-

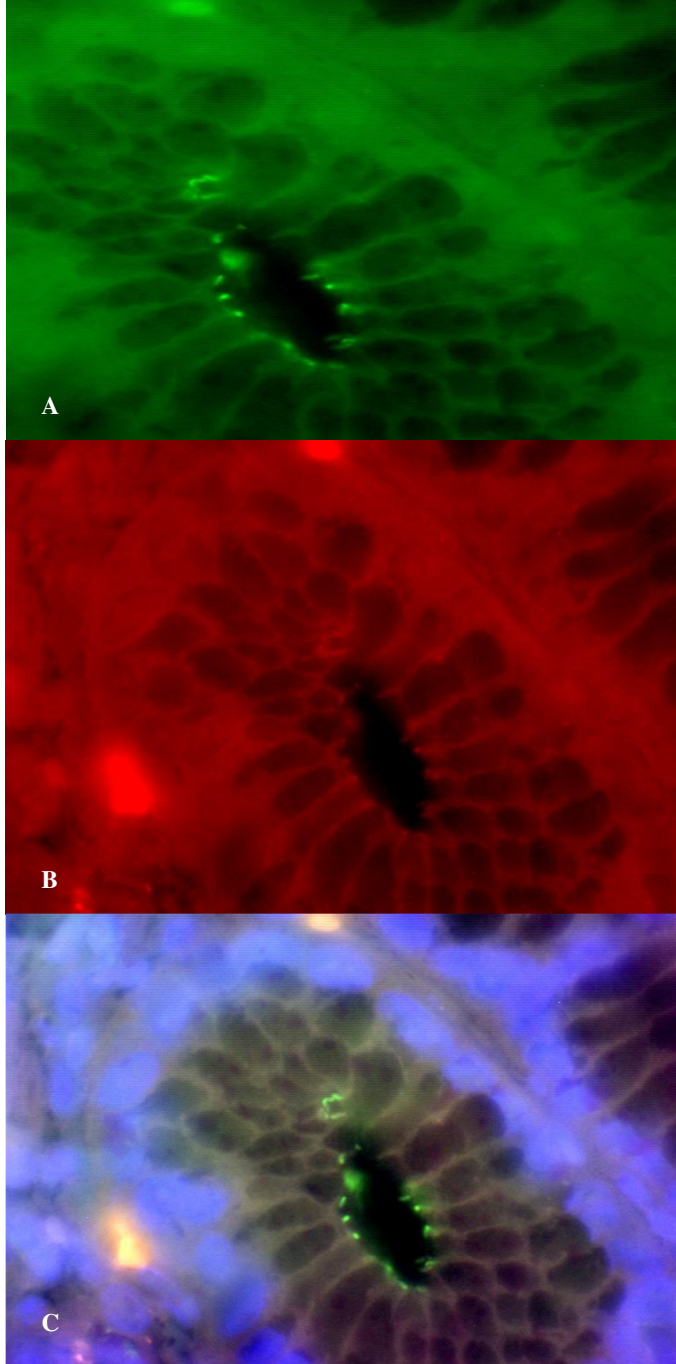
Tablo 11'in devamı



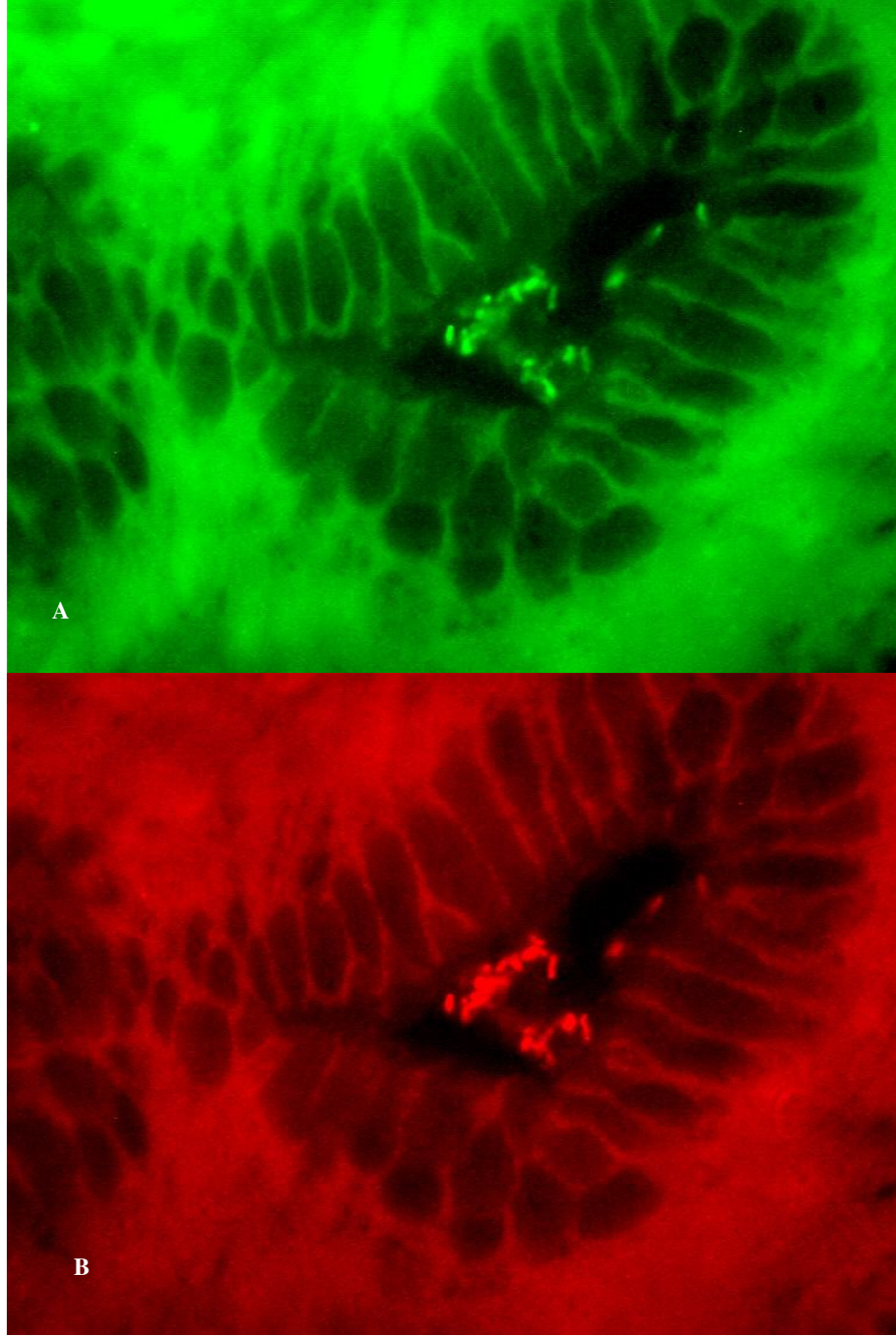
Resim 1. Pozitif kontrol (klaritromisin duyarlı *H. pylori* ATCC 43504)



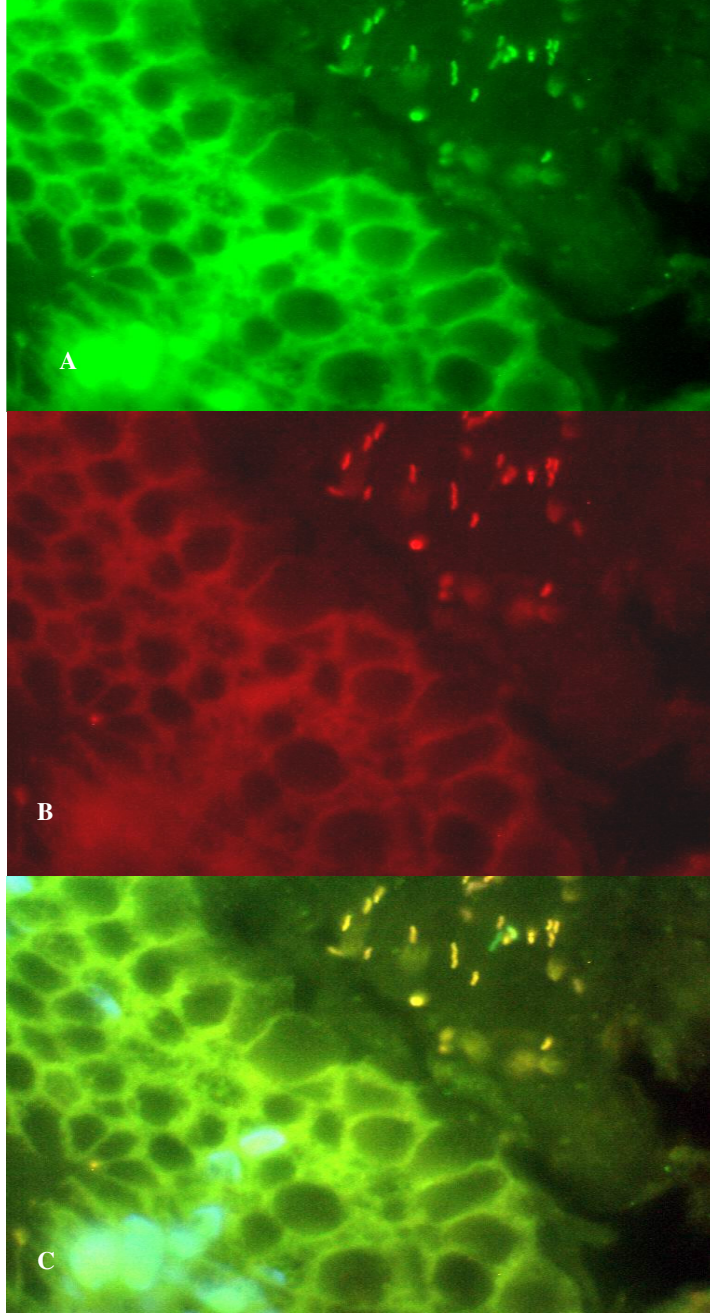
Resim 2. Pozitif kontrol (klaritromisin dirençli *H. pylori*)



Resim 3. Antrum kesitinde klaritromisin duyarlı *H. pylori* **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile (kırmızı floresan: klaritromisin direnci negatif) **C.** FITC/Rhodamin/DAPI triple band filtre görüntülenme (yeşil floresan: klaritromisin duyarlı *H. pylori*, mavi floresan: DAPI) (objektif büyütme:100x)



Resim 4. Antrum kesitinde klaritromisin dirençli *H. pylori* **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile görüntülenme (kırmızı floresan: klaritromisin direnci) (Objektif büyütme: 100x)



Resim 5. Antrum kesitinde *H. pylori*'nin görüntülenmesi (karışık populasyon) **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile (kırmızı floresan: klaritromisin direnci) **C.** FITC/Rhodamin/DAPI triple band filtre ile görüntülenme (sarı floresan: klaritromisin dirençli *H. pylori*, yeşil floresan: klaritromisin duyarlı *H. pylori*) (objektif büyütme:100x)

7. TARTIŞMA

H. pylori mide veya duodenumda ülser, gastrik kanser ve gastrik lenfomaya neden olan kronik, persistan enfeksiyon etkenidir (96,152). Ülserin bulunmadığı dispepsi (nonülser veya fonksiyonel dispepsi) ve gastrointestinal sistem dışı hematolojik (idiyopatik trombositopenik purpura); dermatolojik (rozasea); nörolojik (migren) ve kardiyovasküler (aterom) sistem hastalıkları ile de ilişkili olduğu bildirilmektedir (27,31,88,107). *H. pylori* enfeksiyonu tanısında, tanısal testler arasında tek bir altın standart yöntem yoktur; tüm testlerin sınırlılığı nedeniyle doğru tanı testi seçiminde birçok faktör göz önünde tutulmalıdır (91,94).

Temel tanı testi en az riskte, ekonomik koşullara uygun, yüksek doğrulukta sonuç verebilecek yüksek performanslı ve kolay uygulanabilir olmalıdır (153).

H. pylori'nin kolonizasyonunun saptanmasında endoskopi gerektiren invaziv ve endoskopinin gerekmediği invaziv olmayan yöntemler kullanılır (107).

Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu'nun Maastricht 2-2000 Konsensus Bildirisi'nde; gastroözofagal reflü hastalığı semptomları baskın olmayan, NSAID kullanımı öyküsü ve alarm semptomları bulunmayan 45 yaş altı persistan dispepsili erişken hastanın birinci basamak tanısında 'test ve tedavi' yaklaşımı önerilmiştir. Açıklanamayan kilo kaybı, disfaji, yineleyen kusma, GIS kanaması veya anemi, malabsorbsiyon gibi bulgular endoskopik incelemeyi gerektiren alarm semptomlarıdır (86). Bir tarama testi ile *H. pylori* kolonizasyonu saptanmış hastanın tedavi edilmesi ve birinci basamak tanıda invaziv olmayan yöntemlerin kullanılması önerilmektedir (86,107). *Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında kullanılacak en iyi yöntem, hangi testlerin en güvenilir olduğu konusunda çalışmalar sürdürülmektedir (154).

Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu'nun Maastricht 3-2005 Konsensus Bildirisi'nde de; GORD hastalığı olan, NSAID kullanan ve alarm semptomu olan kişilerin tedavi edilmesi önerilmiştir. UBT dışındaki non-invaziv testler önemli olup, kanamalı ülser, gastrik atrofi, MALToma ve yeni PPI ve antibiyotik kullanımında tanı testi olarak seroloji kullanılmalıdır. Ne hasta başı testlerde nede idrar ve tükürükte *H. pylori* antikorlarının saptanmasının *H. pylori* enfeksiyonu kontrolünde rolü olmadığı bildirilmiştir. 'Test ve tedavi' stratejisinde, *H. pylori* tanısında dışkı testi, UBT ile aynı düzeyde kabul edilmektedir. İnvaziv testler göz önüne alındığında, tedavi öncesi ya da noninvaziv testler uygulanmayan hastalarda endoskopi sonrası HUT pozitifliği tedaviyi başlatmak için yeterlidir. Birinci basamak tedavide

klaritromisin temelli tedaviyi kullanmadan önce klaritromisin duyarlılık testi için kültürün önemi tartışmalıdır. İki tedavi başarısızlığı ve de coğrafik bölgede veya popülasyonda %15-20'den daha fazla primer klaritromisin direnci varsa, kültür önerilmekte ve primer antibiyotik direncinin farklı referans laboratuvarlarında izlenmesi gerekmektedir (87). Sınıf I karsinojen olarak kabul edilen *H. pylori* enfeksiyonunda tanı ve direnç son derece önemlidir. Aynı zamanda seçilen tanısal yöntemin uygulaması kolay, hasta uyumu açısından ideal ve her yaş grubuna uygulanabilir olmalıdır.

Çalışmamızda, retrospektif olarak gastrik dokudan *H. pylori*'nin ve eş zamanlı olarak rRNA hedefli floresansla işaretlenmiş oligonükleotit problemleri ile klaritromisin direnç genotipinin saptanmasında FISH tekniği uygulandı. Bu teknik kültürün yapılamadığı durumlarda en uygun tanı ve duyarlılık testinin uygulanabilirliğini araştırmak amacı ile invaziv bir test olan FISH'in duyarlılık, seçicilik ve olabilirlik oranları alınarak altın standard kabul edilen invaziv yöntemlerden üreaz testi ve histopatolojik inceleme ile karşılaştırıldı. Çalışma grubu olarak dispeptik yakınmaları nedeniyle 3 yıl önce Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniğine başvuran, *H. pylori* tedavisi almamış ve tüm dışlama kriterlerine göre değerlendirilen, endoskopi endikasyonu konulan erişkin hastaların mide biyopsi örnekleri retrospektif olarak çalışmaya alındı.

Çalışmamızda 54 hastadan 45'i (%83.3) *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, dokuzu (%16.7) olumsuz olarak saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu olumluluğu HUT ve histopatoloji sonuçlarının her ikisinin olumluluğu, *H. pylori* enfeksiyonu olumsuzluğu ise HUT ve histopatolojinin olumsuzluğu ile değerlendirildi. Hızlı üreaz testinin yalancı negatifliği ve deneyimli gastroenteroloji uzmanına gereksinim duyulması ve kültürün geç sonuç vermesi, aynı zamanda klaritromisinin çocukluk çağı boyu çok yaygın kullanımı ve direnç gelişiminin kolay saptanamaması bazı dezavantajlarıdır.

Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80 - 90'ı bu bakteri ile enfekte ve % 80'i 20 yaşına kadar enfekte olmaktadır (57). Türkiye'deki epidemiyolojik araştırmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir (50,57,59,65).

FISH formalinle fikse edilmiş parafin bloklu doku biyopsi örneklerinde *H. pylori* enfeksiyonu tanısında ve genotipik klaritromisin direncinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (3,4,7,15,139). Genotipik yöntemlerden biri olan PCR tekniğinden farklı olarak; FISH metodu direk formalin fiske doku kesitlerine uygulanabilen, nükleik asit preparasyonu gerektirmeyen, inhibisyona eğilimli olmayan ve doku örneği içinde *H. pylori*'nin yarı kantitatif

görüntülenmesini sağlayan bir tekniktir. Ayrıca bu teknik PCR temelli sistemlerle karşılaştırıldığında karışık populasyon ve tek bir *H. pylori* suşu dokuda gözlenebilir (4).

Çalışmamızda, *H. pylori* 16S rRNA spesifik oligonükleotid Hpy-1 probu ile, 23S rRNA'da tanımlanan üç nokta mutasyonları ile oluşan klaritromisin direnci ClaR1, ClaR2 ve ClaR3 problemleri ile saptandı.

Park ve arkadaşları formalinle fikse edilmiş parafin bloklu 50 gastrik biyopsi örneğinde ISH metodunu uygulamışlardır. Standart yöntem olarak serolojik test ve histokimyasal boyalar ile 40'ı *H. pylori* olumlu, ISH ile 38'i *H. pylori* olumlu bulunmuştur. *H. pylori*'yi saptamak için 5S rRNA ve 16S rRNA için spesifik problemler kullanılmış ve *H. pylori*'nin 16S rRNA'ya komplementer probu iyi saptayabildiği ancak 5S rRNA'nın iyi bir hedef olmadığı saptanmıştır. ISH duyarlılığının (%95) immunohistokimyadan daha yüksek (%90) fakat histokimyadan (%100) daha düşük olduğu bildirilmiştir. rRNA sekanslarını kullanan ISH yönteminin rutin histokimyasal boyalarla görülebilen ancak kültüre edilemeyen organizmaların saptanmasında için yararlı olabileceği bildirilmiştir (1).

H. pylori enfeksiyonunda üçlü tedavide kullanılan temel antibiyotik klaritromisine karşı direnç, kültürü yapılmış *H. pylori*'ye antimikrobiyal duyarlılık testleri uygulanarak saptanabilmektedir. Ancak kültür çeşitli dezavantajlara sahiptir. *H. pylori* kültürü, uygulanabilmesi için uygun laboratuvar olanaklarının sağlanmasını ve invaziv bir yöntem olan endoskopi uygulanmasını gerektirmektedir. Ancak *H. pylori* geç ve güç üreyen nazlı bir bakteri olduğundan kültür zaman alıcıdır ve rutin uygulamada her zaman yaygın kullanım alanı bulunmamaktadır. Ayrıca, *H. pylori* kültürünün duyarlılığı %100 değildir ve antimikrobiyal duyarlılık testleri de uygulanamayabilir (155).

Rüssmann ve arkadaşları dispeptik hastalardan elde edilen 201 gastrik biyopsi örneğinde kültür ile FISH tekniğini karşılaştırmışlardır. FISH ile 63 biyopsi örneğinde *H. pylori* saptanırken, kültürle bunların 49'unda *H. pylori* izole edilmiş ve klaritromisin duyarlılığı incelenmiştir. 37 biyopsi örneği klaritromisin duyarlı, 8'i makrolid dirençli, 4'ü ise duyarlı ve dirençli saptanmıştır. 14 biyopsi örneği FISH olumlu kültür olumsuz; 4 biyopsi örneği ise sadece kültür ile olumlu bulunmuştur. Bu uyumsuzluk kültürün laboratuvara gönderilme sınırlılıklarından ve biyopsi materyalindeki *H. pylori* stabilitesinden kaynaklanabilir. Genotipik klaritromisin direnç analizinin, fenotipik yöntemlerden E-test ile karşılaştırıldığında %100 uyumlu olduğu bildirilmiştir (3).

H. pylori'de makrolid direnç gelişmesi antibiyotik eradikasyon tedavisinin başarısızlığının en önemli nedenidir. Makrolidlere direncin mekanizması özellikle klaritromisin direnci 23S rRNA'da üç belirgin mutasyona dayanır ve antibiyotiğin bakteriyal ribozoma bağlanmasındaki azalmayla sonuçlanır (4). Ribozoma bağlanan makrolid aminoasitler arasında peptid bağı oluşumunu engeller ve bu sayede protein sentezini durdurur. Direnç gelişiminde antibiyotiğin azalan bağlanması söz konusu olduğundan azda olsa bir protein sentezi gerçekleşebildiği bildirilmektedir. Buda bizim sonuçlarımızdaki duyarlı ve dirençli suşların varlığını açıklayabileceği kanısına varılmıştır.

Trebesius ve arkadaşları gastrik dokuda *Helicobacter pylori* ve eş zamanlı olarak klaritromisin direnç genotipini saptamada rRNA temelli tam hücre hibridizasyon metodunu geliştirmişlerdir. 27 gastrik biyopsi örneğinde 17 *H. pylori* infeksiyonunu histoloji ve FISH ile saptanmış, bunların 5'inde klaritromisin dirençli suş bulunmuştur. 35 *H. pylori* izolatu ise ClaR1-3, ClaWT ve Hpy-1 kullanılarak araştırılmıştır. 20 izolat E-test ile klaritromisin dirençli, 15 izolat ise duyarlı bulunmuştur. 6 izolat A2143G, 12 izolat A2144G ve 2 izolatta A2143C nokta mutasyonu saptanmıştır. 35 *H. pylori* izolatından fenotipik ve genotipik klaritromisin direncinin %100 uyumlu olduğu, türe spesifik prob içeren oligonükleotid karışımında diğer *Helicobacter* türleri arasında çapraz hibridizasyon gözlenmediği bildirilmiştir (4).

Feydt-Schmidt ve arkadaşları çocuklarda gastrik biyopsi örneklerinde klaritromisin direncini saptamada FISH ve E-test yöntemlerini karşılaştırmışlardır. 66 *H. pylori* olumsuz biyopsi örneklerinin tümü kültür ve FISH yöntemleri ile olumsuz, 83 *H. pylori* ile enfekte çocukta, kültür ile 75'inde (%90), E-test ile 71'inde (%86) FISH ile 77'sinde (%93) *H. pylori* saptanmıştır. 11 çocukta (%13) karışık populasyon gözlenerek uygulanan metotlar arasında farklılık bulunmuştur. Önceden tedavi edilmeyen 73 çocuğun 16'sında klaritromisin dirençli izolatlar identifiye edilmiştir. 83 çocuğun 58'inde E-test ve FISH klaritromisin duyarlılığı açısından uyumlu bulunmuş, 53 çocukta klaritromisin duyarlı suş 5'inde ise klaritromisin dirençli suş saptanmıştır. 3 hastada E-test ve FISH uyumsuzluğuyla karışık populasyon varlığı gösterilmiştir. Kültür ve FISH yöntemlerinin *H. pylori* enfeksiyonu varlığını saptamada % 100 seçicilikte olduğunu ve *H. pylori* ile enfekte hastalarda bakterinin identifikasyonunun başarı oranının kültürle %90, FISH ile %93 olduğunu bildirmişlerdir (14).

Rüssmann ve arkadaşları ise kültüre edilmiş *H. pylori*'de genotipik klaritromisin direncini saptamak için FISH yöntemini kullanmışlardır. 109 izolatın 75'i ClaWT probu ile,

34'ü ise ClaR1, ClaR2 ya da ClaR3 problemleriyle hibridize olmuştur. 12 suşta A2143G nokta mutasyonu, 20 suşta A2144G nokta mutasyonu ve 2 suşta A2143C nokta mutasyonu bulunmuştur. FISH ile belirlenen 75 klaritromisin duyarlı *H. pylori* izolatının tümü fenotipik testlerden E-test ve disk difüzyon yöntemleri kullanılarak makrolid duyarlılığı gösterilmiştir (15).

H. pylori'nin basiller ve kokoid formunu saptayabilen FISH metodu, %10 formalin ile fikse edilmemiş direk biyopsi örneklerine, *H. pylori* kültüründen izole edilen kolonilere ve parafin bloklu dokulara da uygulanabilmektedir (4).

Rüssmann ve arkadaşları 100 pediatrik hastanın parafin gömülü ve şok dondurulmuş gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori*'yi saptamak için FISH metodunun duyarlılığını ve spesifikliğini retrospektif olarak değerlendirmişlerdir. 54 hasta *H. pylori* olumlu 46 hasta olumsuz olarak bulunmuştur. 46 olumsuz hastanın tümü FISH metodu ile uyumlu bulunmuştur. *H. pylori* ile enfekte 54 hastanın, şok dondurulmuş biyopsi örneklerinin 50'sinde (%93.1) ve deparafinize biyopsi örneklerinin 51'inde (%94.7) FISH metodu ile *H. pylori* saptanmıştır. Her iki FISH uygulamasıyla 37 hastanın klaritromisin duyarlı suş ile, 5 hastanın klaritromisin dirençli suş ile ve 5'inin de klaritromisin dirençli ve duyarlı suş ile enfekte olduğu bulunmuştur. *H. pylori*'nin saptanması ve genotipik makrolid duyarlılığının belirlenmesi için 4 yıl ya da daha önceki deparafinize gastrik biyopsi örneklerinde FISH yönteminin uygulanmasının, taze hazırlanmış ve şok dondurulmuş biyopsi örneklerine uygulanması kadar duyarlı olduğu bildirilmiştir (21).

Can ve arkadaşları 117 dispeptik hastanın formalin fikse, parafin gömülü antrum biyopsi örneklerinde *H. pylori* enfeksiyonunu saptamak ve klaritromisin direncini belirlemek için uyguladıkları FISH yöntemini kültür ve histopatoloji ile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Histopatoloji ve FISH ile 70 hasta *H. pylori* olumlu, 47 hasta *H. pylori* olumsuz bulunmuştur. 70 *H. pylori* olumlu hastanın 46'sı kültürle *H. pylori* olumlu, 24'ü *H. pylori* olumsuz, 47 *H. pylori* olumsuz hastanın 1'i kültürle *H. pylori* olumlu saptandığı bildirilmiştir. Histopatoloji altın standard olarak değerlendirildiğinde kültür %65.71 ve FISH %100 duyarlılığa sahip olduğu saptanmıştır. 11 hastanın klaritromisin dirençli *H. pylori* suşu, 35 hastanın klaritromisin duyarlı *H. pylori* suşu içerdiği bildirilmiştir (156).

Biyopsiye dayalı yöntemlerden olan hızlı üreaz testi, histopatolojik inceleme ve kültür *H. pylori*'nin mide mukozasında yama tarzında dağılımı nedeniyle düşük saptama oranına

sahip yöntemlerdir (159). Çalışmamızda hastalardan hem antrum hem de korpus örneklerinin alınması *H. pylori*'nin saptanma oranını arttırmak için önerilmektedir (160).

Çalışmamızda 54 hastanın 45'i (%83.3) FISH metodu ile olumlu, 9'u (%16.7) olumsuz bulunmuştur. 2 hastada histopatolojik inceleme ile *H. pylori* olumlu bulunurken, FISH yöntemi ile *H. pylori* olumsuz saptanmıştır. Ayrıca 2 hastada FISH ile *H. pylori* olumlu bulunurken, histopatoloji ile *H. pylori* olumsuz bulunmuştur. *H. pylori*'nin yama tarzında dağılımı nedeniyle test sonuçlarındaki bu farklılığın olabileceği düşünüldü.

Jüttner ve arkadaşları 104 formalin fiske dokuda makrolid dirençli *H. pylori* saptamak için "SeaFAST *H. pylori* Combi Kit" kullanarak FISH yöntemini araştırmışlardır. 104 hastanın tümü FISH ile olumlu ve 71'i makrolid dirençli olarak saptanmıştır. Histopatolojik olarak gastrit tanısı almış 53 hastadan elde edilen gastrik biyopsi örnekleri fenotipik direnç testleri ve FISH ile değerlendirilerek tümü *H. pylori* olumlu saptanmış, 36 (%67.9) örnekte klaritromisin dirençli bakteri bildirilmiş ve fenotipik direnç testleri ile uyumun %92.4 olduğu gösterilmiştir. *H. pylori*'nin vejetatif formları mavi floresan veren DAPI boyası ile belirgin hale getirilmektedir (7).

Morris ve arkadaşları parafin gömülü biyopsi örneklerinde *H. pylori* saptanması ve klaritromisine karşı direncin belirlenmesinde seaFAST *H. pylori* Combi Kit ile FISH yöntemini uygulamışlardır. 68 kültür pozitif örneğin 66'sı (%97) FISH ile *H. pylori* olumlu, 2'si olumsuz; 35 kültür olumsuz biyopsinin 33'ü (%94.2) FISH ile olumsuz, 2'si olumlu bulunmuştur. Biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin saptanması için FISH'in duyarlılığı %97 ve seçiciliği %94 olarak bulunmuştur. Agar dilüsyonla klaritromisine karşı dirençli 33 örneğin 32'si FISH ile *H. pylori* olumlu ve bunların 31'i aynı zamanda FISH ile klaritromisin dirençli bildirilmiştir. Agar dilüsyonla klaritromisine karşı duyarlı 35 örneğin, 34'ü FISH ile *H. pylori* olumlu ve 30'u FISH ile klaritromisin duyarlı bulunmuştur. Agar dilüsyon ile FISH karşılaştırıldığında klaritromisin direncinin saptanmasında %88 seçicilik ve %97 duyarlılığa sahip olduğunu göstermişlerdir. 4 izolat, agar dilüsyonla klaritromisin duyarlı FISH ile klaritromisin dirençli saptanmıştır. Bunların 2'si FISH metoduyla dirençli ve duyarlı *H. pylori* karışık popülasyonunu içerdiği bulunmuştur. Bir örnek agar dilüsyon metoduyla *H. pylori* dirençli (MIC, 8.0 µg/ml) FISH ile duyarlı bildirilmiştir. Klaritromisin duyarlı *H. pylori*'nin geniş bir popülasyonu içinde varolan az sayıda klaritromisin dirençli *H. pylori*'nin baskılanabileceğini ve fenotipik metotlarla gösterilemediği için FISH metodunun daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir (139).

H. pylori ile enfekte hastalarda *H. pylori*'nin farklı suşları bir arada bulunabilmektedir (157,158). Çalışmamızda klaritromisin direnci yönünden, 45 hastanın 14'ünün (%31.1) klaritromisin duyarlı, 4'ünün (%8.9) klaritromisin dirençli suş içermesinin yanısıra 27'sinde (%57.5) klaritromisin dirençli ve duyarlı karışık populasyon saptanmıştır. Duyarlılık %95.6, seçicilik %77.8, olumlu öngörü değeri %95.6, olumsuz öngörü değeri %77.8 ve tanı kesinliği %92.6 saptandı ve altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=1.00$, $kappa=0.73$). Çalışmamızın duyarlılığı literatürle uyumlu, ancak FISH ve histopatolojik inceleme sonuçları farklı olan 2 hasta nedeniyle seçiciliği düşük bulunmuştur.

8. SONUCLAR VE ÖNERİLER

H. pylori'nin karakteristik özelliklerinden dolayı *H. pylori* tanısında tek bir yöntem kullanılamamaktadır. Bu nedenle klinik ve tedaviye uygun yöntemler araştırılmalıdır.

H. pylori'nin saptanmasında histopatolojik incelemenin yanısıra eradikasyon tedavisi başarısızlığında FISH yönteminin uygulanması önerilmektedir. Endoskopi endikasyonu konulan hastalardan alınan korpus ve antrum biyopsi örneklerinden hazırlanan bir preparatın histopatolojik incelemeye alınması, bir preparatın ise FISH yöntemiyle incelenmesi gerektiği ve klaritromisin direncinin %20'den yüksek olduğu ancak kültür ve duyarlılık testlerinin yapılamadığı durumlarda FISH yönteminin uygulanmasının sağaltım için yol gösterici olacağı düşünülmüştür.

Formalin ile tespit edilmiş parafine gömülmüş antrum ve korpus biyopsilerinden hazırlanan histolojik kesitlerde FISH metodu *H. pylori*'nin saptanması ve eş zamanlı olarak genotipik klaritromisin direncinin belirlenmesi için altın standartlara göre oldukça hızlı, 3 saat içerisinde uygulanabilen, kültürden bağımsız, fiyat açısından uygun ve güvenilir bir tekniktir. Arşiv materyalinde incelendiğinde yıllar sonra bile klaritromisin direnci hakkında bilgi verebilmektedir. *H. pylori*'nin basiller formu ve kokoid formunu saptayabilen FISH metodu, parafin bloklu dokulara uygulanmasının yanı sıra taze biyopsi örneklerine ve *H. pylori* kültüründen izole edilen kolonilere de uygulanabilmektedir. Bu teknik klinik açıdan önemi nedeniyle, bakteriyal dansiteyi saptayabilme, eradikasyon tedavisinin yönlendirilmesinde ve ayrıca eradikasyon tedavisine başlanmadan önce tedavideki başarısızlığın önlenmesine olanak sağlayabileceğinden dolayı rutin uygulamalarda da kullanılabileceği kanısına varıldı.

9. KAYNAKLAR

1. Park CS, Kim J. Rapid and easy detection of *Helicobacter pylori* by *in situ* Hybridization. J Korean Med Sci 1999;14: 15-20.
2. Vinette KMB, Gibney KM, Proujansky R, Fawcett PT. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients. BMC Microbiol 2004;4: 5.
3. Rüssmann H, Kempf VAJ, Koletzko S, Heesemann J et al. Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 2001;39: 304-308.
4. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridization. Gut 2000;46: 608-614.
5. Trebesius K, Adler K, Vieth M, Stolte M et al. Specific detection and prevalence of *Helicobacter heilmanii*-like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent *in situ* hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing. J Clin Microbiol 2001; 39: 1510-1516.
6. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. J Med Microbiol 2001;50: 1021-1029.
7. Jüttner S, Vieth M, Miehke S, Schneider-Barchert W et al. Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence *in situ* hybridization in formalin-fixed tissue. Mod Pathol 2004;17: 684-689.
8. Makristathis A, Barousch W, Pasching E, Binder C et al. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. J Clin Microbiol 2000;38: 3710-3714.

9. Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? *Ann Med* 2001;33: 91-97.
10. Ruiz-Bustos E, Ochoa JL, Wadström T, Ascencio F. Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. *J Med Microbiol* 2001;50: 215-222.
11. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10: 720-741.
12. Young KA, Akyon Y, Rampton DS, Barton SGRG et al. Quantitative culture of *Helicobacter pylori* from gastric juice: the potential for transmission. *J Med Microbiol* 2000;49: 343-347.
13. Binder HJ. Should we treated *H. pylori* infection to prevent gastric cancer? *Gastroenterol* 1997;112: 1044-1050.
14. Schmidt AF, Rüssmann H, Lehn N, Fischer A et al. Fluorescence *in situ* hybridization vs. epsilometer test for detection of clarithromycin-susceptible and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains in gastric biopsies from children. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16: 2073-2079.
15. Rüssmann H, Adler K, Haas R, Gebert B et al. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 2001;39: 4142-4144.
16. Graham SK, Graham DY. Contemporary diagnosis and management of *H. pylori*-associated gastrointestinal diseases. Second edition, USA, Handbooks in Health Care Co, 2002; 40-125.

17. ırak MY, Ünal S, Turet S, Dumlu GŞ ve ark. Klaritromisine dirençli ve duyarlı *Helicobacter pylori* suşlarının midedeki dağılımı. 21. Ulusal Gastroenteroloji Haftası 31 Ağustos-5 Eylül 2004, Antalya SB07/9. The Turkish Journal of Gastroenterology 2004;15: 41.
18. Önder GF, Aydın A, Akarca US, Özütemiz Ö ve ark. Ülkemizde *Helicobacter pylori*'nin klaritromisine direncinin real time PCR yöntemi ile araştırılması. 21. Ulusal Gastroenteroloji Haftası 31 Ağustos-5 Eylül 2004, Antalya SB07/5. The Turkish Journal of Gastroenterology 2004;15: 40.
19. Özden A, Bozdayı G, Bağlan P, Azap A ve ark. *Helicobacter pylori*'nin klaritromisine karşı direncinin sıklığı. 21. Ulusal Gastroenteroloji Haftası 31 Ağustos-5 Eylül 2004, Antalya SB07/6. The Turkish Journal of Gastroenterology 2004;15: 40.
20. Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. Aliment Pharmacol Ther 1997;11:43-53
21. Rüssmann H, Schmidt AF, Adler K, Aust D et al. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in shock-frozen gastric biopsy samples by fluorescent *in situ* hybridization. J Clin Microbiol 2003;41: 813-815.
22. Debets-Ossenkopp YJ, Sparrius M, Kusters JG, Kolkman JJ et al. Mechanism of clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 1996;142: 37-42.
23. Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000;38: 830-838.
24. Şen N. *Helicobacter pylori* antijen ve DNA'sının dışkıda, IgG antikorunun serumda saptanması, invaziv ve invaziv olmayan tanı yöntemlerinin karşılaştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık tezi, 2004;10-41.

25. Versalovic J, Fox JG. *Helicobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. Manual of Clinical Microbiology, 8th edition, USA, ASM pres, 2003. p. 915-928.
26. Kusters JG, Kuipers EJ. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*. J Appl Microbiol 2001;90:134-144.
27. Ovalı Ö, Baylan O. Klinik ve mikrobiyolojik açıdan *Helicobacter pylori*. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34: 135-146.
28. Özden A. *Helicobacter pylori*'nin yüzyıllık hikayesi. İşte *Helicobacter pylori*. Ankara, Nurol Matbaacılık: Türk Gastroenteroloji Derneği yayını, 1995;1-3.
29. Heatley RV. *Helicobacter pylori* el kitabı. İkinci Baskı, İstanbul, Blackwell Science, CSA, 1998; 1-35.
30. Fidan I, Türet S. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda patogenez ve tanı. İnfeksiyon Dergisi 1999;13:455-460.
31. Wilson WR, Sande MA. Current Diagnosis&Treatment in Infectious Diseases. International edition, USA, McGraw-Hill & Lange, 2001; 581-586.
32. <http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/press.html>
33. Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A. Practical Medical Microbiology. Fourteenth edition, USA, Churchill Livingstone, 1996; 439-441.
34. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E et al. Curved Gram-negative bacilli and oxidase-positive fermenters. Sixth edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006:392-408.
35. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Third edition, London, Mosby-Year Book, 1998; 255-257.

36. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. Second, USA, ASM press, 2002; 339-351.
37. Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HpsA and M(r)18,000 OMP from *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2003;9:1756-1761.
38. Panthel K, Jechlinger W, Matis A, Rohde M et al. Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates. Infect Immun 2003;71:109-116.
39. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. Microbes Infect 2000;2:55-60.
40. Shao S-H, Wang H, Chai S-G, Liu L-M. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. World J Gastroenterol 2005;11: 3011-3013.
41. Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1995;63:1567-1572.
42. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Eng J Med 2002;347:1175-1186.
43. Appelmelk BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP et al. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. Infect Immun 1996;64:2031-2040.
44. Taylor DE, Eaton M, Chang N, Salama SM. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. J Bacteriol 1992;174: 6800-6806.

45. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388: 539-547.
46. Jiang X, Doyle MP. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2000;38: 1984-1987.
47. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. *Medical microbiology*. Twentieth edition, USA, Appleton & Lange, 1995; 229-230.
48. Popovic-Uroic T, Patton CM, Nicholson MA, Kiehlbauch JA. Evaluation of the indoxyl acetate hydrolysis test for rapid differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* species. *J Clin Microbiol* 1990;28: 2335-2339.
49. Akyön Yılmaz Y. *Helicobacter pylori*. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi* 2004;7.
50. Gürakan F. Helikobakter pilori taraması. *Katkı Pediatri Dergisi* 2000;21:384-387.
51. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and related organisms. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE. editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th edition, New York: C. Livingstone; 2000. p. 2285-2293.
52. Parsonnet J. *Helicobacter pylori*. *Emerg Infect Dis* 1998;12:185-197.
53. Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterol* 1991;100:1495-1501.
54. Özden A, Dumlu Ş, Özkan H, Dönderici Ö et al. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 1994;5: 411-413.

55. Rothenbacher D, Inceoğlu J, Bode G, Brenner H. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in a high-risk population occurs within the first 2 years of life. J Pediatr 2000;136: 744-748.
56. Malaty HM, Kumagai T, Tanaka E, Ota H et al. Evidence from a nine-year birth cohort study in Japan of transmission pathways of *Helicobacter pylori* infection. J Clin Microbiol 2000;38: 1971-1973.
57. Erdem B. *Campylobacter* ve *Helicobacter*. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş. Tümbay E, Mete Ö ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. p. 531-540.
58. Şengül B, Akpınar H, Şimşek İ, Soytürk M et al. Seroprevalance of *Helicobacter pylori* infection in primary school students in İzmir metropolitan districts. 8th United European Gastroenterology Week, 25-30 November 2000;Brussels, p276.
59. Bardhan K. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. Clin Infect Dis 1997;25: 973-978.
60. Moreno Y, Ferrus MA, Alonso JL, Jimenez A et al. Use of fluorescent *in situ* hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. Water Res 2003;37: 2251-2256.
61. Piqueres P, Moreno Y, Alonso JL, Ferrus MA. A combination of direct viable count and fluorescent *in situ* hybridization for estimating *Helicobacter pylori*. Res Microbiol 2006;157: 345-349.
62. Beşışık SF. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu: Epidemiyoloji ve patogenez. Flora 1996;3: 160-166.
63. Karabiber N. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun epidemiyolojik özellikleri. Mikrobiyol Bült 1992;26: 297-300.

64. Blanchard TG, Czinn SJ. *Helicobacter pylori* acquisition and transmission: Where does it all begin? *Gastroenterol* 2001;121: 483-490
65. Malaty HM, Nyren O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8: 8-12.
66. Goodman KJ, Correa P. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* 1995;24: 875-887.
67. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bébéar CM et al. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2724–2728.
68. Lamarque D, Peek Jr RM. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8: 21-30.
69. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 1997;65: 3218-3224.
70. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;7:720-741.
71. Heneghan MA, McCarthy CF, Moran AP. Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host lewis phenotype and inflammatory response. *Infect Immun* 2000;68: 937-941.
72. Appelmelk BJ, Martin SL, Monteiro MA, Clayton CA et al. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect Immun* 1999;67: 5361-5366.

73. Takata T, El-Omar E, Camorlinga M, Thompson SA et al. *Helicobacter pylori* does not require Lewis X or Lewis Y expression to colonize C3H/HeJ mice. *Infect Immun* 2002;70: 3073-3079.
74. <http://www.engr.mun.ca/~bkidney/genetics/urease.html>
75. Akada JK, Shirai M, Takeuchi H, Tsuda M et al. Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol* 2000;36: 1071-1084.
76. Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HLT. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 1997;40: 25-30.
77. Cussac V, Ferrero RL, Labigne A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol* 1992;174: 2466-2473.
78. McGee DJ, May CA, Garner RM, Himpfl JM et al. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol* 1999;8: 2477-2484.
79. Wen Y, Marcus EA, Matrubutham U, Gleeson MA et al. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003;71: 5921-5939.
80. Olczak AA, Olson JW, Maier RJ. Oxidative-stress resistance mutants of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2002;184: 3186-3193.
81. Olczak AA, Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect Immun* 2003;71: 580-583.
82. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998;36: 2597-2603.

83. Saribaşak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. J Clin Microbiol 2004;42: 1648-1651.
84. Phadnis SH, Parlow MH, Levy M, Ilver D et al. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. Infect Immun 1996;64: 905-912.
85. Kadanalı A, Özkurt Z. *Helicobacter pylori* İnfeksiyonu: Epidemiyoloji, Patogenez ve İlişkili hastalıkları. Klimik 2004;17: 146-150.
86. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin APS et al. The European *Helicobacter pylori* Study Group. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002;16: 167-180.
87. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht 3-2005. Business Briefing European Gastroenterology Review 2005. URL:<http://www.helicobacter.org>
88. Adachi K, Kawamura A, Ono M, Masuzaki K et al. Comparative evaluation of urine-based and other minimally invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol 2002;37: 703-708.
89. Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MJ et al. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol 1995;109:136-141.
90. Oyedeji KS, Smith SI, Arigbabu AO, Coker AO et al. Use of direct Gram stain of stomach biopsy as a rapid screening method for detection of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer and gastritis patient. J Basic Microbiol 2002;42: 121-125.
91. Rautelin H, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2003;8: 13-20.

92. Chuanfu L, Ha T, Ferguson DA, Chi DS et al. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 1996;41: 2142-2149.
93. Kadayıfçı A, Savaş MC. Helikobakter pilori: patogenezi, tanı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Güncel Gastroenteroloji* 1997;1: 7-12.
94. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16: 16-23.
95. Menard A, Santos A, Mégraud F. PCR-Restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46: 1156-1157.
96. Nakamura RM. Laboratory tests for the evaluation of *Helicobacter pylori* infections. *J Clin Lab Anal* 2001;15: 301-307.
97. Schabereiter-Gyrtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42: 4512-4518.
98. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2003;41: 397-402.
99. Lascols C, Lamarque D, Costa J-M, Copie-Bergman C et al. Fast and Accurate Quantitative Detection of *Helicobacter pylori* and Identification of Clarithromycin Resistance Mutations in *H. pylori* Isolates from Gastric Biopsy Specimens by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41: 4573-4577.
100. <http://pollux.mpk.med.uni-muenchen.de/alpha1/forschung/FISH.html>

101. <http://www.genetests.org>
102. DNA Enzim Immun Assay. Roche Diagnostics
103. Vakil N, Vaira D. Non-invasive tests for the diagnosis of *H. pylori* infection. Rev Gastroenterol Disord 2004;4: 1-6.
104. Kosunen TU, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1992;339: 893-5.
105. Kato S, Furuyama N, Ozawa K, Ohnuma K et al. Long-term follow-up study of serum Immunoglobulin G and Immunoglobulin A antibodies after *Helicobacter pylori* eradication. Pediatrics 1999;104: 1-5.
106. Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti- *Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H. pylori* infection in patients with precancerous lesions. World J Gastroenterol 2003;9: 755-758.
107. Basset C, Holton J, Ricci C, Gatta L et al. Review article: diagnosis and treatment of *Helicobacter*: a 2002 updated review. Aliment Pharmacol Ther 2003;17: 89-97.
108. Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Vaira D. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect 2003;9: 489-496.
109. Herbrink P, Van Doorn LJ. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:164-173.
110. Dore MP, Osata MS, Malaty HM, Graham DY. Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients. Helicobacter 2000;5: 165-168.

111. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet 1992;340: 1194-1195.
112. Graham DY, Osato MS. *H. pylori* in the pathogenesis of duodenal ulcer: Interaction between duodenal acid load, bile and *H. pylori*. Am J Gastroenterol 2000;95: 87-91.
113. Trevasani L, Sartori S, Ruina M, Caselli M et al. *Helicobacter pylori* stool antigen test clinical evaluation and cost analysis of a new enzyme immunoassay. Dig Dis Sci 1999;44: 2303-2306.
114. Makristathis A, Barousch W, Pasching E, Binder C et al. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. J Clin Microbiol 2000;38: 3710-3714.
115. Gisbert JP, Trapero M, Calvet X, Mendoza J et al. Evaluation of three different tests for the detection of stool antigens to diagnose *Helicobacter pylori* infection patients with upper gastrointestinal bleeding. Aliment Pharmacol Ther 2004;19: 923-929.
116. Weiss J, Mecca J, Da Silva E, Gassner D. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. J Clin Microbiol 1994;32: 1663-1668.
117. Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. J Microbiol Methods 2001;45: 89-94.
118. Sen N, Yilmaz O, Simsek I, Küpelioglu AA, Ellidokuz H. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. Helicobacter 2005;10: 353-9.
119. Yilmaz O, Prouzet-Mauléon, Sen N, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in stool specimens by Real-Time

PCR. XVIIIth International Workshop Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter* of the European Helicobacter Study Group, 12-14 October 2005, Kopenhagen, Denmark, 10.25. *Helicobacter* 2005;10:52

120. Kabir S. Review article: clinic-based testing for *Helicobacter pylori* infection by enzyme immunoassay of faeces, urine and saliva. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17: 1345-1354.

121. Yamamoto T, Tamura M, Ishii T, Anjiki H et al. Urinary antibody titers to *Helicobacter pylori* and an Impact of Clinical characteristics. *J Clin Gastroenterol* 2003;36: 329-331.

122. Shimizu T, Yarita Y, Haruna H, Kaneko K et al. Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies in children. *J Pediatr Child Health* 2003;39: 606-610.

123. Leodolter A, Vaira D, Bazzoli F, Schütze K et al. European multicentre validation trial of two new non-invasive tests for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18: 927-931.

124. Graham DY, Reddy S. Rapid detection of anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine using immunochromatography. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15: 699-702.

125. Yamamoto S, Uemura N, Okamoto S, Yamaguchi S et al. A new rapid test for detecting anti-*Helicobacter pylori* antibody excreted into urine. *Helicobacter* 2000;5: 160-164.

126. Cockburn M, Collett J, Cox B. Validation of the saliva-based *H. pylori* test, heliSAL, and its use in prevalence surveys. *Epidemiol Infect* 2001; 126: 191-196.

127. Gerrits MM. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Erasmus MC, Netherlands* 2004; 21-28.

128. Alarcon T, Domingo D, Prieto N, Lopez-Brea M. Clarithromycin resistance stability in *Helicobacter pylori*: influence of the MIC and type of mutation in the 23S rRNA. J Antimicrob Chemotherapy 2000;46: 613-616.
129. Şimşek H, Balaban YH, Güneş D, Hasçelik G ve ark. Alarming clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* in turkish population. Helicobacter 2005;10: 360-361.
130. Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori*'de antibiyotik direnci ve direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler. Mikrobiyol Bült 2005;39: 399-409.
131. Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004;53: 1374-1384.
132. Hiyama H, Tanaka S, Masuda H, Shima H et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and metronidazole determined by 23S ribosomal RNA and *rdxA* gene analyses in Hiroshima, Japan. J Gastroenterol Hepatol 2003;18: 1202–1207.
133. Alarcon T, Domingo D, Lopez-Brea M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Ag 1999;12: 19–26.
134. http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/macresp_illus.html
135. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Grify MV et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40: 477-480.
136. Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T et al. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. Antimicrob Agents Chemother 1997;41: 2621–2628.
137. Van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F et al. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of

mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;5: 1500–1504.

138. Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. *Drug Resist Updat* 2001;4: 178-186.

139. Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG, Bruden DL et al. Evaluation of seaFAST, a rapid Fluorescent *In Situ* Hybridization Test, for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. *J Clin Microbiol* 2005;43: 3494-3496.

140. Xia HX, Fan XG, Talley NJ. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J Gastroenterol* 1999;5: 263-266.

141. Stone GG, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J et al. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 712–714.

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

143. Simala-Grant JL, Taylor DE. Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS* 2004;112: 886-97.

144. Qureshi WA, Graham DY. Antibiotic-resistant *H. pylori* infection and its treatment. *Curr Pharm Des* 2000;6: 1537-1544.

145. Temizkan G, Arda N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İst. Üniv. BİYOGEN Yayın No. 2, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2004; 121-138.

146. <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/fish.html>

147. <http://www.genome.gov/10000206>
148. <http://members.aol.com/chrominfo/fishinfo.htm>
149. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A et al. Molecular biology of the gene. Fifth edition, San Francisco, Pearson Education Inc. 2004; 692.
150. http://www.chlamydiae.com/restricted/docs/Methods/tech_insituhybrid.asp
151. Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. Third edition, UK, Oxford University Press, 2004; 48-54.
152. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Zuna I et al. Serum antibodies against *Helicobacter pylori* proteins VacA and CagA are associated with increased risk for gastric adenocarcinoma. Dig Dis Sci 1997;42:1652-1659.
153. Dirican A. Tamı testi performanslarının değerlendirilmesi ve kıyaslanması. Cerrahpaşa J Med 2001;32:25-30.
154. Andersen LP, Kiilerick S, Pedersen G, Thoreson AC et al. An analysis of seven different methods to diagnose *Helicobacter pylori* infections. Scand J Gastroenterol 1998;33: 24-30
155. Gisbert JP, Pajares JM. *Helicobacter pylori* “rescue” therapy after failure of two eradication treatments. Helicobacter 2005;10: 363-372.
156. Can F, Yilmaz Z, Demirbilek M, Bilezikci B 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: 569-573.

157. Masuda H, Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S et al. Necessity of multiple gastric biopsies from different sites for detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains. Scand J Gastroenterol 2003;9: 942-946.
158. Nakamura RM. Laboratory tests for the evaluation of *Helicobacter pylori* infections. J Clin Lab Anal 2001;15: 301-307.
159. Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS, Berg DE et al. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1995;33: 918-923.
160. Kim JJ, Kim JG, Kwon DH. Mixed infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. Helicobacter 2003;8: 202-206.

10. EK 1

