

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİSPEPTİK HASTALARDA ELISA VE
WESTERN BLOT YÖNTEMLERİ İLE
HELICOBACTER PYLORI'NİN ANTİJENİK
VARYASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

NESLİHAN BEKMEN

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİSPEPTİK HASTALARDA ELİSA VE
WESTERN BLOT YÖNTEMLERİ İLE
HELICOBACTER PYLORI'NİN ANTİJENİK
VARYASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NESLİHAN BEKMEN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Özlem YILMAZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2007.KB.SAG.035 proje numarası ile desteklenmiştir)

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince emeğini, ilgisini ve desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Y. Hakan ABACIOĞLU'na ve tüm hocalarıma, Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. İlkay ŞİMŞEK'e ve Doç Dr. Müjde SOYTÜRK'e, Uzm. Dr. Can GÖNEN'e, tezimin istatistiksel analizindeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a ve Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç Dr. Müge DEMİRBİLEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen ekip arkadaşlarım Araş. Gör. Bil. Uzm. Ebru DEMİRAY'a, Bil. Uzm. Daryoush Davoudi OSKOUEI'ye, Meryem GÜVENİR'e, Dr. Devrim DÖLEK'e ve Araş. Gör. Bil. Uzm. Sait TÜMER'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman manevi destekleri ile hayatımın her aşamasında yanımda olan sevgili annem ve babama sonsuz saygı ve teşekkürlerimle...

Saygılarımla

Neslihan BEKMEN

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	ii
RESİM LİSTESİ	iii
KISALTMALAR	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	6
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Tarihçe	7
4.2. <i>Helicobacter</i> Ailesi	9
4.3. <i>H. pylori</i> 'nin Yapı ve Mikrobiyolojik Özellikleri	9
4.3.1. Bakteri Morfolojisi	9
4.3.2. Tanımlanması ve Biyokimyasal özellikleri.....	12
4.3.3. Solunum ve Metabolizması.....	13
4.4. Epidemiyoloji, Prevalans, Bulaş Yolları	13
4.5. <i>H. pylori</i> Enfeksiyonunun Patogenezi	15
4.5.1. Histopatolojik Değişiklikler	16
4.5.1.1. Virulans Faktörleri	17
4.5.1.1.1. Patogeneizde Rol Oynayan Diğer Faktörler	18
4.5.1.1.2. Mide Mukozal Bariyerinin Bozulması.....	20
4.5.1.2. Kolonizasyon Faktörleri	22
4.5.1.2.1. Hareket	22
4.5.1.2.2. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz	23
4.5.1.2.3. Isı Şok Protein Homologları	23
4.6. <i>H. pylori</i> ile İlişkili Hastalıklar	23
4.6.1. İlişkili Olduğu Düşünülen Diğer Hastalıklar ve Sendromlar.....	24
4.7. <i>H. pylori</i> Tanısında Kullanılan Yöntemler	24
4.7.1. İnvaziv Yöntemler	25
4.7.1.1. Biyopsi Üreaz Testi.	25
4.7.1.2. Histopatolojik İnceleme	25
4.7.1.3. Kültür	26
4.7.1.4. Moleküler Tanı Yöntemleri	27

4.7.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler	28
4.7.2.1. Üre Nefes Testi (UBT).....	28
4.7.2.2. Serolojik Yöntemler	28
4.7.2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
4.7.2.2.2. Western blot	30
4.7.2.3. Dışkı Örnekleri Kullanılan Tanı Yöntemleri	30
4.7.2.3.1. Dışkı Kültürü	30
4.7.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri	31
4.7.2.3.3. Dışkı PCR	31
4.7.2.3.4. Dışkı Real Time PCR	32
4.7.2.4. Diğer Örnekler İçin Kullanılan Tanı Yöntemleri.....	32
4.7.2.4.1. İdrar Antikor Testleri.....	32
4.7.2.4.2. Tükürük antikor Testleri.....	33
4.8. <i>H. pylori</i> Enfeksiyonunda Tedavi.....	33
4.8.1. Tedavide Kullanılan Ajanlar.....	33
5. GEREÇ VE YÖNTEM	34
5.1. Çalışma Grubu	34
5.2. Biyopsi Örneklerinin Alınması.....	36
5.2.1. Hızlı Üreaz Testi	36
5.2.2. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi.....	37
5.3. Serum Örneklerinin Alınması, Saklanması	37
5.3.1. Hasta Örneklerine Yöntemlerin Uygulanması.....	37
i. Anti- <i>H. pylori</i> IgG ELISA.....	37
ii. Anti- <i>H. pylori</i> CagA ELISA.....	38
iii. Anti- <i>H. pylori</i> IgG Western blot	39
iv. <i>H. pylori</i> IgA/IgG ELISA.....	43
5.4. İdrar Örneklerinin Alınması, Saklanması.....	44
5.4.1. Hasta Örneklerine Yöntemlerin Uygulanması.....	44
i. Anti- <i>H. pylori</i> IgG URINELISA.....	44
ii. RAPIRUN.....	45
5.5. Kültür Optimizasyonu	46
5.5.1. Kültür Besiyerleri	46
5.5.2. Transport Besiyeri	49
5.5.3. Stok Besiyeri (% 20 Gliserollü)	50

5.5.4. Karbol Fuksin Boyasın Hazırlanması	50
5.5.5. <i>H. pylori</i> Kontrol Standart Suş	50
5.5.6. <i>H. pylori</i> Suşları Üzerine Stok Besiyerlerinin Etkinliğinin Araştırılması	51
5.5.7. Koloniden Bakteri DNA'sının Ekstraksiyonu	53
5.5.8. Parafine Gömülü Dokudan Bakteri DNA'sının Ekstraksiyonu	54
5.5.9. Ekstraksiyonu Yapılan Örneklerin Jelde Yürütülmesi	56
5.6. İstatistiksel Analizler	57
6. BULGULAR	58
6.1. Demografik Bulgular	58
6.2. HUT ve Histopatolojik Bulgular	58
6.3. Anti- <i>H. pylori</i> IgG ELISA Sonuçları	62
6.4. Anti- <i>H. pylori</i> CagA IgG ELISA Sonuçları	63
6.5. <i>H. pylori</i> IgA/IgG ELISA Sonuçları	64
6.6. Anti- <i>H. pylori</i> IgG Western blot Sonuçları	65
6.7. Anti- <i>H. pylori</i> IgG URINELISA Sonuçları	76
6.8. RAPIRUN Sonuçları	76
6.9. Kültür Standardizasyonu Sonuçları	80
6.10. Stok Kültür Değerlendirilmesi	82
6.11. <i>H. pylori</i> DNA Ekstraksiyon Sonuçları	82
7. TARTIŞMA	83
8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	92
9. KAYNAKLAR	93
10.EK	110
10.1. Hasta Bilgilendirme ve Rıza Formu	110
10.2. Çalışma Formu	112
10.3. Etik Kurul Onayı	114
10.4. Tez Başlığı Değişikliği Kararı	116
10.5. EUROIMMUN Hasta Sonuç Raporu	117

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. <i>H. pylori</i> 'nin virülans faktörleri	17
Tablo 2. <i>H. pylori</i> enfeksiyonu tanı testleri.....	24
Tablo 3. <i>H. pylori</i> enfeksiyonunda tedavi.....	34
Tablo 4. Roma III çalışma grubuna göre fonksiyonel dispepsi ve altgruplarının tanımları.....	35
Tablo 5. Western blot yöntemi ile saptanan bant paternleri ve özellikleri	41
Tablo 6. <i>H. pylori</i> 'ye özgün antijenlerin sınıflandırılması	41
Tablo 7. Anti- <i>H. pylori</i> IgG Western blot değerlendirme kriterleri	42
Tablo 8. Antrum ve korpus HUT, antrum ve korpus histopatolojik inceleme sonuçları	59
Tablo 9. Western blot yöntemi ile anti- <i>H. pylori</i> IgG olumlu 95 hastada <i>H. pylori</i> antijenlerine karşı oluşan antikorların dağılımı	69
Tablo 10. Anti- <i>H. pylori</i> IgG Western blot belirsiz saptanan 16 hastada <i>H. pylori</i> antijenlerine karşı oluşan antikorların dağılımı	71
Tablo 11. Anti- <i>H. pylori</i> IgG Western blot yöntemiyle saptanan özgül ve özgül olmayan <i>H. pylori</i> antijenlerine karşı oluşan antikorların histopatolojik olarak olumlu ve olumsuz hastalardaki dağılımı	72
Tablo 12. Toplam 136 hastada; anti- <i>H. pylori</i> IgG olumlu 115 hastanın ve Western blot testi ile olumlu ve belirsiz saptanan 111 hastanın anti-CagA IgG antikorlarının histopatolojik bulgularına göre dağılımı	74
Tablo 13. Histopatolojik sonuçlarına göre atrofi, IM, atrofi ve IM, normal hasta gruplarındaki hastalarda bulunan özgül antijenlere karşı oluşan antikorların dağılımı.....	75
Tablo 14. Tüm test sonuçlarının duyarlılık, seçicilik, PPV, NPV, LR.....	77
Tablo 15. Tüm test sonuçlarının hastalara göre dağılımı.....	77

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** *H. pylori*' nin üreaz operonu..... 20
- Şekil 2.** RAPIRUN sonuçlarının değerlendirilmesi **A.** RAPIRUN pozitif sonuç,
B. RAPIRUN negatif sonuç 46
- Şekil 3.** Histopatolojik inceleme ve HUT sonuçlarına göre IgG dağılımı (Anti-*H. pylori* IgG ELISA)..... 63
- Şekil 4.** Histopatolojik inceleme ve HUT sonuçlarına göre IgG dağılımı(*H. pylori* IgA/IgG ELISA).....64
- Şekil 5.** Western blot kontrol stripi..... 65
- Şekil 6.** Anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu hastalarda özgül ve özgül olmayan *H.pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların dağılımı 70
- Şekil 7.** Özgül ve özgül olmayan *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorlarının anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu hastalarda görülme sıklığına göre dağılımı 70
- Şekil 8.** Histopatoloji olumlu ve olumsuz hastalarda anti-*H. pylori* IgG Western blot yöntemi ile saptanan özgül ve özgül olmayan *H. pylori* antijenlerine karşı antikorların dağılımı 73
- Şekil 9.** Histopatolojik inceleme ve HUT sonuçlarına göre Western blot yöntemi ile anti-*H. pylori* IgG antikorların dağılımı..... 73

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Western blot sonuçlar› 1.....	66
Resim 2. Western blot sonuçlar› 2.....	67
Resim 3. Western blot sonuçlar› 3.....	68
Resim 4. NCTC 11637 <i>H. pylori</i> standart suşunun % 7 at kanı içeren Columbia agar besiyerindeki üreyen kolonilerin görüntüsü.....	81
Resim 5. NCTC 11637 <i>H. pylori</i> standart suşunun %10 insan serum içeren Columbia agar besiyerindeki üreyen kolonilerin görüntüsü.....	82
Resim 6. <i>H. pylori</i> NCTC 11637 standart suşunun kolonilerinden ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'nın % 1'lik agaroz jelde görünüşü.	83

KISALTMALAR

<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
MALT	: Gastrik mukoza ilişkili lenfoid doku lenfoması
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>CagA</i>	: Cytotoxin-associated gene (Sitotoksin ile ilişkili gen) A
<i>VacA</i>	: Vacuolating cytotoxin (Vakuol oluşturuvcu sitotoksin) A
HUT	: H ₂ O ₂ üreaz testi
HLO	: <i>Helicobacter</i> like organism
PPV	: Olumlu öngörü değeri
NPV	: Olumsuz öngörü değeri
LR	: Olabilirlik oranı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
IACR	: International Agency for Cancer Research
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Real-time polimeraz zincir tepkimesi
UBT	: Urea breath test (üre nefes testi)
PPI	: Proton pompa inhibitörü
PNL	: Polimorfonükleer lokositler
NIH	: National Institutes of Health
σ^{28}	: Sigma faktör 28
σ^{54}	: Sigma faktör 54
LPS	: Lipopolisakkarit
OMPs	: Dış membran proteinleri
BabA	: Blood-group antigen binding adhesin
HspB	: Isı şok proteini B
Le b	: Lewis b
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
BSA	: Bovine serum albumin
DNase	: Deoksiribonükleaz
Cag PAI	: Cag pathogenicity island (Patojenite adacığı)

IceA	: Induced contact with epithelium A (Epitele yapışmaya neden olan gen A)
dupA	: Duodenal ülse destekleyici gen A
IL	: İnterlökin
ENA-78	:Epitel hücrelerden türeyen nötrofil aktive edici protein 78
GRO-α	: Growth related oncogene-α
IFN-γ	: İnterferon gama
TNF α	: Tümör nekrozis faktör alfa
NF-κB	: 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 cell adhesion molecule-1
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule 1
PAF	: Platellet activating factor
Le_x	: Lewis x antijeni
Le_y	: Lewis y antijeni
kDa	: Kilodalton
mRNA	: Messenger ribonükleik asit
ATPase	: P tip adenozin trifosfat
Hpn	: Histidine-rich protein
INOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
NO	: Nitrik oksit
glr	: Glutamat rasemaz
PG I	: Pepsinojen I
PG II	: Pepsinojen II
Hsp	: Isı şok proteini
HspA	: Isı şok proteini A
IM	: İntestinal metaplazi
H&E	:Hematoksilen-eozin
BHI	: Beyin kalf infüzyon
BSA	: Bovine serum albumin
E-test	: Epsilometer test
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon

CIM	: Current infection marker
RIBA	: Recombinant Immunoblot Assay Strip
EHSG	: Avrupa <i>Helicobacter pylori</i> Çalışma Grubu
MIC	: Minimal inhibitör konsantrasyonu
GIS	: Gastrointestinal sistem
RU	: Rölatif ünite
PBS	: Fosfat buffer saline
FCS	: Fetal kalf serum
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
PEG	: Poly Etilen Glikol
OD	: Optik dansitesi
TBE	: Tris borik EDTA
SPSS	: Statistical package for the social sciences
SD	: Standart deviasyonu
DU	: Duodenal ülser
GU	: Gastrik ülser
GC	: Gastrik kanser

1. ÖZET

Dispeptik hastalarda ELISA ve Western blot yöntemleri ile *Helicobacter pylori*'nin antijenik varyasyonlarının araştırılması

Helicobacter pylori (*H. pylori*) gastrik mukozada kolonize olan spiral, mikroaerofilik, Gram-negatif bir bakteridir. *H. pylori* enfeksiyonu gelişmiş ülkelerde nüfusun % 20-50'inde, gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80-90'ında ortaya çıkan en yaygın kronik bakteriyel enfeksiyondur. *H. pylori* kronik gastrit, duodenal ve gastrik ülser, gastrik adenokarsinoma mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma gibi birçok üst gastrointestinal sistem hastalıklarıyla ilişkilidir ve sınıf 1 karsinogeni olarak sınıflandırılmıştır. Dispeptik hasta serum ve idrar örneklerinde anti-*H. pylori* antikor (IgG, IgA/IgG, CagA IgG) varlığı Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot, URINELISA ve RAPIRUN yöntemleri ile araştırıldı. Ayrıca anti-*H. pylori* pozitif hasta serumlarında Western blot yöntemi ile saptanan virülans faktörlerinden sitotoksin ile ilişkili gen A (CagA), vakuol oluşturucu sitotoksin A (VacA) ve diğer *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların görülme sıklığı ve bu antijenlere karşı oluşan antikorların histopatoloji bulguları ile ilişkisi karşılaştırıldı. Bu hasta grubunda antijenik varyasyonun moleküler düzeyde belirlenmesinde ileri araştırmalar yapılabilmesi amacıyla da altın standart yöntem olan *H. pylori* kültür optimizasyonu yapıldı.

Nisan 2006 ve Temmuz 2008 tarihleri arasında dispeptik yakınmalar nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 136 olgu (102 kadın, 34 erkek yaş ortalaması 46.57 ± 12.63 standart deviasyonu (SD); yaş aralığı 21-78) çalışmaya alındı. Hastalardan alınan dört biyopsi örneğine (iki antrum, iki korpus) hızlı üreaz testi (HUT) ve histopatolojik inceleme uygulandı.

H. pylori enfeksiyonu histopatoloji ve/veya hızlı üreaz testi olumluluğu, *H. pylori* enfeksiyonu negatifliği ise her iki testin olumsuzluğu ile belirlendi. Morfolojik olarak "*Helicobacter-like organisms* (HLO)", gastrik aktivite ve *H. pylori* bakteriyel dansitesi yönünden Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirildi.

Serum ve idrar örneklerinde *H. pylori* antikorları; anti-*H. pylori* IgG ELISA, anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck), *H. pylori* IgA/IgG ELISA (BIOHIT, Finland), anti-*H. pylori* IgG Western blot (EUROIMMUN

Medizinische Labordiagnostika, Lübeck), anti-*H. pylori* IgG URINELISA ve RAPIRUN (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) testleri kullanılarak araştırıldı.

Toplam 136 hastanın; 103'ü (% 75.7) altın standart yöntemlere göre *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 33'ü (%24.3) olumsuz bulundu. 115'i (% 84.5) anti-*H. pylori* IgG ELISA testi ile olumlu, 21'i (% 15.5) olumsuz saptandı. Duyarlılık % 91.1; seçicilik % 34.3, olabilirlik oranı (LR) 0.77, olumlu öngörü değeri (PPV) % 80, olumsuz öngörü değeri (NPV) ise % 57.2 olup, altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlemlendi (p=0.02). 47'si (% 34.6) anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA testi ile olumlu, 89'u (% 65.4) olumsuz saptandı. Duyarlılık % 35.6; seçicilik % 65.7, LR 0.44, PPV % 76.6, NPV ise % 25.9 olup, altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlemlendi (p=0.00). 100'ü (% 73.5) *H. pylori* IgA/IgG ELISA testi ile olumlu, 36'si (% 26.5) olumsuz saptandı. Duyarlılık % 85.2; seçicilik % 60, LR 0.89, PPV % 86, NPV ise % 58.3 olup, altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmedi (p=1). 72'si (% 52.9) anti-*H. pylori* IgG URINELISA testi ile olumlu, 64'ü (% 47.1) olumsuz saptandı. Duyarlılık % 66.3; seçicilik % 85.7, LR 0.71, PPV % 93.1, NPV ise % 46.9 olup, altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlemlendi (p=0.00). 70'i (% 51.4) RAPIRUN testi ile olumlu, 66'si (% 48.6) olumsuz saptandı. Duyarlılık % 65.4; seçicilik % 82.9, LR 0.69, PPV % 91.6, NPV ise % 45.3 olup, altın standart yöntemler ile istatistiksel anlamlı fark gözlemlendi (p=0.00).

Anti-*H. pylori* IgG Western blot testi ile 95'i (% 69.8) olumlu, 25'i (% 18.4) olumsuz, 16'si (% 11.8) belirsiz olarak saptandı. Belirsiz sonuçlar dahil edilmediğinde; duyarlılık % 85.7; seçicilik % 44.8, LR 0.76, PPV % 82.9, NPV ise % 50 bulundu.

H. pylori enfeksiyonu tanısında altın standart yöntem kültürün, *H. pylori* standart suş NCTC 11637 kullanılarak %10 insan serumlu Columbia agar, %7 at kanlı Columbia agar, %7 koyun kanlı Columbia agar besiyerlerinde optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve ileri araştırmalar için deoksiribonükleik asit (DNA) ekstraksiyonu da yapılmıştır.

Çalışmamızda anti-*H. pylori* IgG ELISA testlerinin karşılaştırılmasında duyarlılığın literatür ile uyumlu, seçiciliğin düşük bulunması ve dünyanın farklı bölgelerindeki *H. pylori* izolatlarının antijenik yapıları bölgesel farklılık gösterdiği için serolojik testlerin popülasyonların antijenik özelliklerine göre uyarlanması önerilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori*, ELISA, Western blot, kültür

2. SUMMARY

Investigation of *Helicobacter pylori* antigenic variations by ELISA and Western blot methods in patients with dyspepsia

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a spiral-shaped, microaerophilic, Gram-negative bacteria which colonize gastric mucosal. *H. pylori* infection is one of the most common chronic bacterial infections occurring 20-50 % in developed countries and 80-90 % in developing countries. *H. pylori* is related to a number of upper gastrointestinal diseases, such as chronic gastritis, duodenal and gastric ulcer, gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma and has been classified as a class 1 carcinogen. Anti-*H. pylori* antibodies (IgG, IgA/IgG, CagA IgG) were determined in the sera and urine specimens of patients with dyspepsia by ELISA, Western blot, URINELISA and RAPIRUN methods. Also, the frequency of the antibodies against virulence factors CagA, VacA and other *H. pylori* antigens were detected by Western blot method and their relationship were assessed with histopathology results in anti-*H. pylori* positive patient sera. Moreover, with the aim of making further researches to determine *H. pylori* antigenic variations in molecular level, as gold standard method *H. pylori* culture optimizations were performed.

The study population consisted of 136 adult patients with dyspepsia (102 females, 34 males; mean age, 46.57±12.63 SD years; age range 21 to 78 years) from Outpatient Gastroenterology Service at Dokuz Eylül University Hospital between April 2006 and July 2008. All patients had dyspeptic symptoms and were referred to a diagnostic upper endoscopy. Four biopsy specimens (two antrum, two corpus) were taken from each patient; rapid urease test (RUT) and histopathological examination were applied.

Infection by *H. pylori* was defined as positivity and negativity of histopathology and/or RUT. Morphologic examination of *Helicobacter*-like organisms (HLO), gastritis activity and to grade bacterial density of *H. pylori* were evaluated according to Updated Sydney System.

Sera and urine specimens of these patients were examined by anti-*H. pylori* IgG ELISA, anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck), *H. pylori* IgA/IgG ELISA (BIOHIT, Finland), anti-*H. pylori* IgG Western blot (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck), anti-*H. pylori* IgG URINELISA and RAPIRUN (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) methods.

A hundred three of 136 patients (75.7 %) were diagnosed as positive and 33 (24.3 %) were negative for *H. pylori* infection by the gold standard methods.

115 (84.5 %) were diagnosed positive and 21 (15.5 %) were diagnosed negative by anti-*H. pylori* IgG ELISA method. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV, NPV) and likelihood ratio (LR) were 91.1 %, 34.3 %, 80%, 57.2 % and 0.77, respectively. Statistical difference was found between the results of gold standard methods and anti-*H. pylori* IgG ELISA ($p=0.02$). 47 (34.6 %) were diagnosed positive and 89 (65.4 %) were diagnosed negative by anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA method. The sensitivity, specificity, PPV, NPV and LR were 35.6 %, 65.7 % , 76.6 %, 25.9 % and 0.44, respectively. Statistical difference was found between the results of gold standard methods and anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA ($p=0.00$). 100 (73.5 %) were diagnosed positive and 36 (26.5 %) were diagnosed negative by *H. pylori* IgA/IgG ELISA method. The sensitivity, specificity, PPV, NPV and LR were 85.2 %, 60 % , 86 %, 58.3 % and 0.89, respectively. No statistical difference was found between the results of gold standard methods and *H. pylori* IgA/IgG ELISA ($p=1$). 72 (52.9 %) were diagnosed positive and 64 (47.1 %) were diagnosed negative by anti-*H. pylori* IgG URINELISA method. The sensitivity, specificity, PPV, NPV and LR were 66.3 %, 85.7 % , 93.1 %, 46.9 % and 0.71, respectively. Statistical difference was found between the results of gold standard methods and anti-*H. pylori* IgG URINELISA ($p=0.00$). 70 (51.4 %) were diagnosed positive and 66 (48.6 %) were diagnosed negative by RAPIRUN method. The sensitivity, specificity, PPV, NPV and LR were 65.4 %, 82.9 % , 91.6 %, 45.3 % and 0.69, respectively. Statistical difference was found between the results of gold standard methods and RAPIRUN ($p=0.00$).

Ninety-five (69.8 %) patients were positive, 25 (%18.4) were negative, and 16 were borderline (11.8 %) by anti-*H. pylori* IgG Western blot test. When the borderline results were not included, the sensitivity, specificity, PPV, NPV and LR were 85.7 %, 44.8 %, 82.9 %, 50 % and 0.76, respectively.

The culture is the gold standard method in the diagnosis of *H. pylori* infection. *H. pylori* NCTC 11637 standard strain was used in the optimization of *H. pylori* culture using different culture media (10% human sera Columbia agar, 7% horse blood Columbia agar and 7% sheep blood Columbia agar with different supplements) and the optimization of bacterial DNA extraction was also performed for further molecular analysis of isolated *H. pylori* strains.

In this study, the sensitivity of the anti- *H. pylori* IgG ELISA was in accordance but the the specificity was lower with the other studies on *H. pylori*. We suggest that *H. pylori* strains have a diverse genetic heterogeneity in the world, the serological test kits should be adapted to the most common *H. pylori* strain in that region.

Key words: *Helicobacter pylori*, ELISA, Western blot, culture

2. GİRİŞ VE AMAC:

Helicobacter pylori (*H. pylori*), Gram negatif, flajellalı, spiral yapıda mikroaerofilik bir bakteridir (1-3). Midenin kronik *H. pylori* enfeksiyonu gastroduodenal hastalıkların gelişmesinde temel bir risk faktörüdür. *H. pylori* gastrit, gastrik ve duodenal ülserler, gastrik karsinoma ve MALT lenfoma da major patojen olarak bildirilmekte, ancak fonksiyonel dispepside rolü tartışılmaktadır (4-8) *H. pylori*, “ International Agency for Cancer Research (IACR)” tarafından Sınıf I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (2,9,10).

H. pylori enfeksiyonu ile oluşan gastroduodenal hastalıklar gözönüne alındığında bu bakterinin halk sağlığı açısından önemli bir rolü bulunmaktadır (7,11). İnsandan insana (anneden bebeğe), fekal-oral, oral-oral, gastro-oral (içme suyu kaynağı) bulaş ileri sürülmektedir (12,13). *H. pylori*'nin seroprevalans göstermekte olan ülkelerde % 70-90, gelişmiş ülkelerde % 25-50, ülkemizde ise % 77.5-82 bildirilmektedir(3,14,15). Gelişmiş ülkelerde *H. pylori* ile enfekte olma oranının azalma göstermesi; yaşam standardının yükselmesi, eğitim düzeyinin artması ve hijyen şartlarındaki düzelmeler olarak belirtilmektedir (16-18). *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansının, ülkeler arasında ve aynı ülkedeki populasyon grupları arasında da büyük farklılık gösterdiği bildirilmektedir (17,18).

H. pylori'nin insan mide mukozasında kolonize olmasında bakterinin yüksek hareket özelliği, üreaz enzimi, spesifik mide mukoza hücre reseptörleri olarak tanımlanan yüzey lektinlerinin ekspresyonu bildirilmektedir (2,8). *H. pylori* gastrik mukus salgılayan hücrelerde yerleşir, mukus tabakası altında ya da içinde bulunur ve gastrik epitel hücreleri hedef alır (19,20).

H. pylori enfeksiyonu tanısında endoskopi gerektiren (invaziv) ve gerektirmeyen (invaziv olmayan) metodlar kullanılmaktadır (1,14). İnvaziv metodlar biyopsi temelli olup gastrik dokuda bakterinin varlığını saptayan HUT, kültür, histopatoloji, biyopsi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve real-time PCR (RT-PCR)'dir (5,7,21,22). İnvaziv olmayan testler; idrar antikör testleri (URINELISA, RAPIRUN), dışkı antijen testleri, dışkı PCR, dışkı real-time PCR, seroloji, ¹³C ve ¹⁴C işaretli üre nefes testi (UBT) dir (6,20,23). Kültür ve UBT *H. pylori* enfeksiyonunun saptanmasında altın standart yöntemlerdendir (1,7).

Maastricht 3-2005 Consensus Raporu'na göre, *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda bir çok tedavi protokolü bulunmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu tedavisinde en sıklıkla klaritromisin ve amoksisilin yada metronidazol antibiyotik kombinasyonunda

proton pompa inhibitörü (PPI) temelli 7-14 günlük üçlü tedavi protokolü uygulanmaktadır(24-27).

H. pylori enfeksiyonunun klinik öneminin artması çeşitli tanısal metodların geliştirilmesini ve rutinde uygulanabilirliklerinin araştırılmasını gerekli kılmıştır (1,14,28).

Bu çalışmada, dispeptik hasta serum ve idrar örneklerinde anti-*H. pylori* antikor varlığının ELISA, Western blot, URINELISA ve RAPIRUN yöntemleri ile araştırılması, anti-*H. pylori* pozitif hasta serumlarında virülans faktörlerinden CagA, VacA ve diğer *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların görülme sıklığı ile, bu antijenlere karşı oluşan antikorların histopatoloji bulguları ile karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu hasta grubunda antijenik varyasyonun moleküler düzeyde belirlenmesinde ileri araştırmalar için altın standart yöntem olan *H. pylori* kültür optimizasyonunun yapılması hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

Hayvanlarda spiral bakteriler ilk kez Rappin tarafından 1881'de, Bizzozero tarafından 1893'te (29-31) ve Salomon tarafından 1896'da kedi, köpek ve sığanların midesindeki spiral bakterilerin farelerden geçmiş olabileceği bildirilmiştir (29,31). Jaworski 1899'da Polonya'da gastrik yıkama suyunun sedimentinde spiral mikroorganizmaları tanımlamıştır (30,31).

Balfour 1906'da gastrik ülserli maymun ve köpeklerin, Krienitz ise gastrik kanserli bir hastanın gastrik örneklerinde spiral mikroorganizmaları tanımlamışlardır (16,32). Luck ve Seth midedeki üreaz aktivitesini ve antibiyotik tedavisi ile kaybolduğunu bildirdiler. Ancak gastrik mikroorganizmalar ile ilişki 1984'e kadar kurulamadı. Doenges 1938 yılında, otopsi örneklerinin % 43'ünün midesinde spiral mikroorganizmaları saptadı. Örnekler postmortem toplandığından kontaminasyon riski nedeniyle bu bulgular şüpheyile karşılandı (31,32). 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 (31).

Freedburg ve Baron 1940 yılında midede kıvrımlı mikroorganizmalar olduğunu bildirdi. 1950 yılında Fitzgerald ve Murphy tarafından peptik ülser hastalığı ile mukoza yüzeyindeki üreaz aktivitesi arasında ilişki olduğu gösterildi (32). Palmer 1954'te, insan mide biyopsi

örneklerinde yaptığı incelemede bakteriye rastlamadığından gastrik ortamdaki tüm bakterilerin kontaminant 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 (31).

1959 yılında Liebre ve Le Fevre 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 (32).

1975’de Steer ve Colin-Jones, gastrik mukozada mukus salgılayan hücrelerle ilişkili, en az bir flagella bulunan spiral bakterileri tanımladılar ve bu bakterilere yanıt olarak da polimorfonükleer lökositlerin (PNL) gastrik mukozaya göç ettiklerini öne sürdüler. 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 (16,32-35).

J. Robin Warren ise *Campylobacter jejuni*’ye benzeyen spiral bakterinin mide hastalıklarıyla ilişkisini ve midenin steril olmadığını bildirdi. J. 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 (16,32,36,37).

1984’de Warren ve Marshall tarafından *Campylobacter pyloridis* olarak isimlendirildi (31,32). 1986’da massif üreaz salgıladığı kanıtlandı (32). 1987’de *Campylobacter pylori* adı aldı (32). 1989’da Goodwin ve arkadaşları bakterinin *Campylobacter* ailesine ait olmadığını gösterip *Helicobacter pylori* adı verdiler (32,38).

1994’de “National Institutes of Health (NIH)” tarafından *H. pylori*’nin peptik ülserin birincil nedeni; “IACR” tarafından sınıf I karsinojen olduğu bildirildi (33,36,39).

2005 yılında da **J. Roben Warren ve Barry Marshall** *H. pylori*’yi, peptik ülser ve gastritteki rolünü göstererek “**Nobel Tıp Ödülü**” almaya hak kazandılar (32,37,40-42).

4.2. *Helicobacter* Ailesi

Helicobacter ailesi (en az 22 tür bu genusta), 0.3-1.0 µm en ve 1.5-10 µm boyda spiral veya k›vr›ml› basilleri içerir. *Helicobacter* türleri Gram-negatif, spor oluşturmeyan basillerdir, uzamış kültürlerde küresel veya kok şekline dönüşürler, hareketli ve genellikle çok sayıda bipolar kılıflı flagellaları vardır (29,37,43). 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 k›lfs›z flagella içerir (29,43). 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 (29,43). *H. heilmannii* (eski ad› *Gastrospirillum hominis*); insan gastrik biyopsi örneklerinde tanımlanmış, kültürde üretilmiştir. İnsanlarda gastritin sık olmayan bir sebebidir, nadir izole edilir (29,37,43). *H. pylori*'ye göre daha uzun ve daha sık k›vr›mlar› olan bir bakteridir (11).

Helicobacter ailesi diğer Gram negatif kıvrımlı basillerden (örneğin *Campylobacter*) enzimatik aktiviteleri, yağ asiti profilleri, üreme özellikleri, nükleik asit hibridizasyon profilleri ve 16S rRNA sekans analizlerine göre ayr›l›r. *Campylobacter jejuni* ve *H. pylori* genomlar›nın sekanslanmas›yla da *Campylobacter* ve *Helicobacter* organizmalar› aras›ndaki farklılıklar kanıtlanmıştır (29,43,44).

4.3. *H. pylori*'nin Yap›s› ve Mikrobiyolojik Özellikleri

4.3.1. Bakterinin Morfolojisi

H. pylori spiral, gastrik biyopsi örneklerinde uçlar› yuvarlak, mikroaerofilik, Gram-negatif bakteridir. Direkt Gram boyal› preparatta spiral veya tipik mart› kanad› ve “U” görünümündedir (45). Katı besiyerindeki kültürlerinde spiral şekli nadir görülür veya hiç görülmez, basile benzer yapıdadır, katı veya sıvı besiyerindeki uzamış kültürlerinde ise kok yapısı daha fazla görülür (16,17,43). Elektron mikroskopunda kok yapısının U şeklinde basil olduğu ve iki kolunun da membranöz bir yapıyla bağlandığı gösterilmiştir. 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 (11,37,43,46).

i. Flajellanın Yapısı

Flajella bakterinin hareketini sağlar (31,44,43,47). Her bir flajellum yaklaşık 30 µm uzunluğunda, 2.5 nm kalınlığındadır (31,48).

Flajellar kılıf fosfolipid, lipopolisakkarit ve proteinden oluşan, bakteriyel dış membrana benzeyen tipik çift katlı bir membran içerir. Flajellar kılıf flajellar filamenti mide asiditesinden korur, flajelline karşı oluşabilecek antikorların bakterinin hareketini engellemesini önler (31,43,44). 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 regülasyonu da farklıdır. Bu iki proteinin konsantrasyonundaki değişikliklerin bakterinin enfeksiyon oluşturması ile persistan kalması gibi farklı durumlara uyumunda etkili olduğu düşünülmektedir (44,47,49-51).

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. *H. pylori*'de LPS yapısının 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 patogeneğinde rol oynar (31,43). Dış membran, *H. pylori* gibi bakteriyel patojenlerde konak koruyucu immunitesinin potansiyel hedefidir ve konak immun yanıtından kaçmasını sağlar (37). Moleküler ağırlığı 31-80 kDa arasında değişen dış membran proteinleri (OMPs) tanımlanmıştır (52). BabA(HopS), SabA(HopP), AlpA(HopC), AlpB(HopB) ve HopZ'i içeren pek çok dış membran proteininin adherans faktörü olduğu ve gastrik doku ile *H. pylori* etkileşiminde rol oynadığı bildirilmiştir (53,54). Üreaz ve ısı şok protein B (HspB) bulunur (43). *H. pylori* OMPs'lerini 32 genden oluşan bir "supergene" ailesi kodlar. Bu OMPs'lerinden bakteriyel adhezini sağlayan olan BabA2 insan kan grup antijeni olan Lewis b (Le b)'ye

bağlanır (55-57). Diğer iki OMPs, AlpA ve B, *H. pylori*' nin gastrik dokuya bağlanmasında gereklidir; AlpA, B ve BabA2 için farklı reseptörler vardır (55,56). AlpAB bir operonda organize olan HopB ve HopC, iki çeşit kanal şekilli membran poruna sahiptir (58). HopA, HopB, HopC, HopD olarak tanımlanan dört porin ailesi dış membranda yer alır, muhtemelen besin içeri alımında etkilidirler, bakterinin kolonizasyonu ve persistansında önemli rol oynarlar (59). HopE porin molekülü de tanımlanmıştır (43). HopZ vital adezin proteindir. HopZ primer olarak bakteri yüzeyinde yerleşir. HopZ geni belirgin olarak *H. pylori* yoğunluğu ve kolonizasyon yeteneği ile ilişkilidir (58). *In vitro* olarak epitel hücrelerde interlökin-8 (IL-8) salınımını artırır ve *in vivo* olarak gastrik inflamasyonu artırır; 34 ku OMP geninin kodladığı dış enflamatuvar protein olarak oipA ve proinflamatuvar ürün olarak HopH (HP0638) tanımlanmıştır (58,54,60). Bunlar, en fazla bilinen *H. pylori* adhezinlerindendir (18).

iii. Genom Yapısı

H. pylori genomu oldukça küçük, 1.6-1.73 Mb boyutlarında (11,47). *H. pylori* 26695 süşunun genomik sekansı Tomb ve arkadaşları tarafından 1997'de bildirilmiştir (11). Bütün genom 16S, 23S ve 5S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) genlerinin iki kopyasını içerir (37). *H. pylori* genomu süşlar arasında değişkenlik gösterir. Fakat *H. pylori* süşları arasında fenotipik değişiklik azdır. Aynı hastanın antrum, fundus ve korpus'undan izole edilen süşlar aynı genomik yapıyı gösterirler (61,62).

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 yapılarını görülebilmesi için 2-3 gün enkübasyon gerekir. 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 besiyerlerindendir (29,37). Katı besiyerlerinde kullanılacak diğer katkı maddeleri ise yumurta sarısı, kömür, nişasta,

bovine serum albumin (BSA), katalaz 2,3,5-trifenil tetrazolium klorid (40 mg/liter) bildirilmektedir (42). *H. pylori* çevresindeki atmosfer ve kurumaya duyarlıdır ve bu nedenle uygun transport ortamı kullanılmalıdır. Önerilen transport ortamı %20 gliserollü brucella buyyon, %20 gliserollü sistein albimi buyyon ya da Stuart's transport ortamını içerir. *H. pylori* oda ısısında hızla yaşayabilirliğini kaybettiği için, biyopsi örnekleri 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılıp hiç bekletilmeden ekilmelidir. Gastrik biyopsi örneklerinin kültürde üremesi için en az 3-5 gün gereklidir (29,37,43,45). Birçok suş 3-5 günde ürer, bu süre nadiren 7 güne kadar uzar (40,63,64) Kültür negatifliğini kesinleştirmek için 7 ile 10 gün inkübasyon sürdürülmelidir. Subkültür için 2-3 gün enkübasyon önerilmektedir (42).

Diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek için besiyerine antimikrobikalleri içeren katkıları eklenmektedir. Vankomisin ya da teikoplanin Gram pozitif kokları; polimiksin B, nalidiksik asit, kolistin, trimetoprim, ya da sefsulodin Gram negatif basilleri; ve nistatin ya da Amfoterisin B'nin mantarları inhibe etmek amacıyla kullanılmaktadır (42).

Tam kan, serum, maya ekstresi, parçalanmış insan eritrositleri, IsoVitaleX, hemin, siklodekstrin ve kolesterol gibi bazı katkı maddelerinin *H. pylori*'nin suş besiyerinde üremesini artırdığı bildirilmiştir (37,42). Ancak bakterinin sıvı besiyerinde üremesinde inokule edilen bakteri konsantrasyonunun ve suş farklılıklarının da rolü vardır (65).

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 da Gram negatif, küçük, kırık kenarlı ve "U" şeklinde basiller görülür. *H. pylori* suşları sitokrom oksidaz, katalaz ve hızlı üreaz aktivitesi gösterirler (29,43,64). Gram boyama ile genellikle soluk boyanır, karbol fuksin ile zayıf boyama daha belirginleştirici olabilir. Faz-kontrast mikroskopu ile birçok *Helicobacter* suşlarının hareketi görülür. *H. pylori* ve birçok *Helicobacter* türü katalaz pozitifdir. (29). Ayrıca *H. pylori*'nin alkalin fosfataz, gamma glutamil aminopeptidaz, lösin aminopeptidaz, Deoksiribonükleaz (DNase) aktiviteleri pozitif; hızlı H₂S, hippurat hidrolizi, nitrat indirgeme reaksiyonları, indoksil asetat aktivitesi negatiftir (66,67).

4.3.3 Solunum ve Metabolizmas›

H. pylori'nin karşılaştırılan genomik analiziyle pentoz fosfat döngüsü Entner-Doudorof yolu, glikoliz ve Krebs reaksiyon sekansının değişen siklik olmayan şekli gibi önemli katabolik yolların varlığı kanıtlanmıştır (29). *H. pylori*'nin karbonhidratlar› 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* re döngüsü de içerir. Bu sayede fazla nitrojeni bakteriden atabilir (43,46). *H. pylori*'de pentoz fosfat döngüsü Entner-Doudorof yolu, glikoliz ve değişmiş Krebs siklusu olmayan önemli katabolik yolların varlığı gösterilmiştir (29). Aminoasitleri anaerop bakteriler gibi fermentatif yolla metabolize edebilir (43,46). *H. pylori* de solunum zincirinin son halkası olan sitokromlar gösterilmiştir. In vitro üremesi için gerekli olan yüksek CO₂ seviyesi ksven asetil koenzim A karboksilaz enziminin aktivitesiyle karşılanabilmektedir. *H. pylori* hücreleri fosfat granülleri içerir. Bakteri midede dejenere olmuş epitel tabakasındayken dış enerji kaynağı bulunmadığında, yedek enerji kaynağı olarak bunları kullanabilir (43). *H. pylori* arjinin, histidin, izolösin, lösin, metionin, fenilalanin ve valin aminoasitlerini kullanabilir ve bu içerikli besiyerlerinde üreyebilir (37).

4.4. Epidemiyoloji ve Prevalans

H. pylori dünyada yaygın olarak görülen enfeksiyonlardan biridir ve primer olarak 10 yaşından önce kazanıldığı kabul edilmektedir (11,17,43,56) Dünya populasyonunun % 50'si *H. pylori* ile enfektedir, bunlar›n %70'den fazlas› asemptomatiktir, %30 ve daha az› semptomatiktir (56,68). Ancak bulaş yolu kesinlik kazanmamıştır (17,43,69).

Enfeksiyonun prevalans›, ülkeler aras›nda ve ayn› ülkedeki populasyon gruplar› aras›nda büyük farklılık gösterir (18,17,37). Enfeksiyonun prevalans› sosyoekonomik düzeyle yakından ilişkilidir. Düşük sosyoekonomik şartlardaki etnik gruplarda prevalans yüksek bildirilmektedir (17,18,37,41,43). Ayrıca sosyoekonomik düzeyi düşük ailelerin çocuklarında enfeksiyon genellikle hayat›n birinci y›l›nda al›nmaktadır (70). *H. pylori* seroprevalans› gelişmekte olan lkelerde % 70-90, gelişmiş lkelerde % 25-50, ülkemizde ise %82.5 olarak bildirilmiştir (35-37,43,71). Gelişmiş lkelerde *H. pylori* ile enfekte olma oran›n›n azalma göstermesi; yaşam standardının yükselmesi, eğitim düzeyinin artması ve hijyen şartlarındaki

düzelme bildirilmektedir (16-18). Yaş enfeksiyonunun prevalansı ile ilişkili en önemli değişkendir. Enfeksiyon oranı 1950'den önce doğarlarda daha yüksektir (16). Prevalans çocuklarda ~%10, 50 yaşındaki bireylerde ~%50 oranında olup yaşla birlikte artış gösterir (72). Ancak yaş ile birlikte *H. pylori* prevalansındaki artış söz konusu erişkin popülasyonun çocuklukta enfekte olduğu zaman dilimindeki daha yüksek bulaş oranını yansıtmaktadır (16-18,69,73). Gelişmekte olan ülkelerde 20 yaşına kadar enfekte olma oranı % 80, gelişmiş ülkelerde ise % 10'dur. Vietnam, Tayland, Peru, Türkiye gibi ülkeler *H. pylori* prevalansında gelişmekte olan, ABD, Fransa, Finlandiya, Hollanda gibi ülkeler ise gelişmiş ülkeler arasındadır (35). İzmir'de ilkököl öğrencilerinde *H. pylori* seroprevalansının % 23.8 olduğu, bu oranın yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir (31).

Enfeksiyonun kadın ve erkeklerde aynı oranda veya erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir (38,43,74).

H. pylori insanda enfeksiyona neden olmasına karşın, *H. pylori*'ye benzer mikroorganizmalar maymun, domuz ve kedilerden de soyutlanmış ancak bu hayvanlarla temas enfeksiyonunun prevalansını açıklayamamaktadır. İnsandan insana (anneden bebeğe), fekal-oral, oral-oral, gastro-oral (içme suyu kaynağı) bulaş yolları sürdürülmektedir (13,31,69). İnsandan insana bulaş birincil bulaş olmakla birlikte fekal-oral bulaş en önemli bulaş yoludur (43). 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 da desteklemektedir (69,75). *Helicobacter* türleri çevresel kaynaklardan kültüre edilememesine karşın, moleküler ve immunolojik yöntemler yeraltı sularında ve şehir suyunda *Helicobacter* DNA'sının saptanması için kullanılabilir (69,76). Ancak bakteri dış ortam şartlarına son derece dayanıksızdır. Enfeksiyonunun prevalansı, fekal-oral yolla bulaşan diğer bir mikroorganizma olan Hepatit A virüsü ile yakın bir paralellik göstermektedir (31). Ancak, *H. pylori* ve Hepatit A virüsü'nün prevalansları arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır (69,77).

Oral-oral bulaş yolunda öpme veya annenin çocuğa gıdayı önce kendi ağzından çiğneyip yumuşatarak vermesi ile ilişki bildirilmiştir (11,16). *H. pylori* tükürük ve dental plakta da izole edilmiştir (11,16,38,72). Özellikle kalabalık ailelerde kusmuk, tükürük ve dışkıdan da enfeksiyonun direkt bulaş yollarından olduğu bildirilmektedir (34).

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. Diğer bir geçiş yolu da uygun sterilizasyonu yapılmamış endoskoplardan bulaştır. Ev hayvanlarından geçiş gösterilememiştir (17,43,78).

H. pylori enfeksiyonu prevalansı gastrointestinal endoskopiştler ve diş hekimlerinde yüksek bulunmuştur (11).

Geliřmiř ölkelerde, başarılı *H. pylori* enfeksiyonu tedavi sonras› reenfeksiyon riski dūřüktür; ancak gelişmekte olan ölkelerde bu araştırılmaktadır (75).

4.5. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Patogenez

Gastrik mukoza bakteriyal enfeksiyonlara karşı iyi korunmuş bir bölgedir ancak *H. pylori* buraya iyi uyum sağlar (18). *H. pylori* dūřük pH’ya oldukça duyarlıdır. Bu nedenle *H. pylori* mide lümenine kolonize olmaz, gastrik mukozay› kaplayan mün tabakas›na 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 mutant›n hayvan modellerinde kolonize olmadığı gösterilmiş ve üreazın *H. pylori* kolonizasyonunun ilk evresinde önemli olduğu kabul edilmiştir (18,47,73).

Midede, bakteriler hücre yüzeyine (Le b antijeni ve LPS ekspresyonu aracılığıyla) tutunarak, üreaz, cagA gen ürünleri ve antibakteriyel ürünler üreterek gastrik mukozaya kolonize olur (38).

Gastrik mukoza hücreleri taraf›ndan mide içine karbonat ve üre salg›lan›r. Üreaz enzimi amonyak ve CO₂ üretmek için gastrik hücrelerden salg›lanan üreyi hidrolize ederek *H. pylori*’nin çevresinde mide asidini nötrale eden amonyak tabakası oluşturur. Üreazın hücre içerisinden mi dışarıya salındığı ya da diğer ölen *H. pylori*’lerin parçalanmasıyla mı açığa çıktığı araştırılmaktadır. *H. pylori*’nin üreyi alıp, amonyağı dışarı verdiği ya da parçalanan *H.*

pylori'deki üreaz enziminin hayatta kalan *H. pylori*'nin etrafını kapladığı düşünülmektedir (18,36,38,47).

Mukus sürekli olarak üretilerek mide lümeni içine salınır. *H. pylori*, mukozal hücreden salgılanan ve şekillenen yeni mûsin tabakası içinde flajeli sayesinde tribüson şeklinde hareketiyle kazarak ilerleyebilmektedir. Enfekte birey ya da hayvandan alınan örneklerde, bakterilerin çoğu mukozal hücrelerin tarafına değil mûsin tabakasına yerleştiği bildirilmiştir (47). *H. pylori* mide epitel yüzeyindeki mukus tabakasında yaşayarak gastrik asiditeden korunmakta, bir kısmı gastrik epitele yapışmaktadır. Doku içine invaze olmamaktadır (31). *H. pylori* sülfatlanmış mûsin şekerlerine ve epitel hücreye bağlanmasına izin veren adezinler üretir. Epitel hücrelerin yüzeyinde bulunan bir karbohidrat antijeni olan Le 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 (18,47,73).

H. pylori midede uzun süreli yangıya neden olur, ancak kolonize olduğu kişilerin düşük bir kısmında peptik ülser veya gastrik kanser gelişir. *H. pylori* suşları arasındaki fenotipik ve genotipik farklılıklar konak yangısal cevabın ve klinik sonucu etkilemektedir (79). 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 (17,47). *H. pylori*'nin midede kolonize olabilen tek mikroorganizma olması ve gastrik mukus salgılayan hücrelerde yerleşme özelliği nedeni ile hem doğal hemde kazanılmış bağışık yanıt mekanizmalarından kaçması gerekmektedir. Enfeksiyon varlığında oluşan yanıtın enfeksiyonu yok etmekte etkili olmadığı makrofajlardan kaçması, enflasyonun ortaya çıktığı gastrik mukozada mast hücrelerinin aktivasyonu rol oynayabilir ve *H. pylori*'nin hayatta kalması açısından çok önemlidir. *H. pylori*'nin ciddi hastalıklara neden olmasında ise VacA ve cagPAI rol oynamaktadır (80).

4.5.1. Histopatolojik Değişiklikler

H. pylori, kronik yüzeysel gastrit nedenidir (43,81). 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 (18,82). Yangının derecesi değişkendir (43).

4.5.1.1. Virülans Faktörleri

Tablo 1. *H. pylori*'nin virülans faktörleri *

Katalaz	Midede ve fagositler içinde vakuollerde yaşayabilmeyi sağlar
Üreaz	Midede pH'yı alkalileştirerek asitten korunma ve yaşayabilmeyi sağlar
Fosfolipaz	Mukusun sindirilmesi ve ıslaklığının artışı
Proteaz	Mukusun sindirilmesi ve eriyebilirliğin artması
VacA	Epitel hücrelerde vakuol oluşturması
Cag A	Sitotoksin oluşumundan sorumlu
Isı şok proteinleri	Otoimmunitede rol oynar
CagPAI (Patojenite adacığı)	Tip IV bakteriyal salgı mekanizması kodlar ve CagA'nın hedef hücrenin içine girmesini sağlar
BabA	Konak mide epitel hücrelerine yapışmayı sağlar ve mide epitel hücrelerinde Lewis kan grubu antijeni ile reaksiyona girer
IceA (epitele yapışmaya neden olan gen A)	Konak mide epitel hücrelerine yapışmayı sağlar
<i>dupA</i> (Duodenal ülser destekleyici gen A)	Duodenal ülser ile ilişkilidir

*35,46,83. kaynaktan alınmıştır.

4.5.1.1.1. Patogenezde rol oynayan diğer faktörler

Gastrointestinal sistem epitel hücrelerinden interlökin (IL)-8, epitel hücrelerden türeyen nötrofil aktive edici protein-78 (ENA-78), Growth related oncogene- α (GRO- α) gibi doğal direnç mekanizmasını düzenleyen kemokinler ile IL-6, IL-7, IL-15, gibi antijene özgün yanıttta düzenleyici rolü olan sitokinler de salgılanır (18). Epitel hücreleri birçok sitokin için reseptörler içerir. Aktive olmuş mukozal hücrelerden salınan sitokinler epitel fonksiyonunda değişiklikler yapabilir. Interferon-gamma (IFN- γ) epitel hücresinde MHC sınıf II ekspresyonunu artırır (31). Patojen gastrik epitel yüzeyindeki MHC sınıf II moloküllerine bağlanır ve apoptozu indükler (82).

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 IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 ve tümör nekrozis faktör α (TNF α) salgılanması artar. Özellikle IL-8 potansiyel bir nötrofil kemotaksis aktivatörüdür. CagPAI içeren *H. pylori* suşlarının içermeyenlere göre daha kuvvetli IL-8 salgılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (18,41,73,82).

Çeşitli *cag* genlerinin kodladığı ürünler, tip IV sekresyon sistemlerinin komponentlerine benzerlik gösterir. 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 (79). 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 (18). Diğer kemokinler olan GRO- α ve ENA-78 de artar ve bunlar da IL-8 salgılanmasını artırır. IL-8'in lamina propriyadaki proteoglikanlara bağlanması sonucunda PNL'lerin epitele doğru kemotaksisi görülür. Mide epitel hücreleri tarafından sentezlenen kemokinler, proteoglikan iskelete bağlanarak PNL'lerin toplandığı yere doğru yönelirler (31).

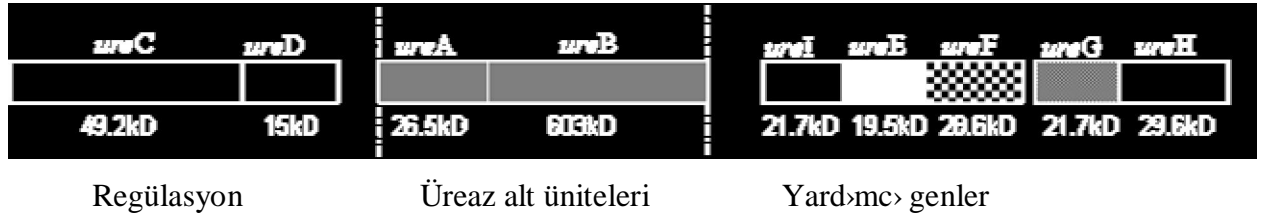
H. pylori nötrofil adherans faktör (HP-NAP), nötrofil CD 11b/CD 18 ekspresyonunu ve endotel hücrelerine nötrofil yapışmasını artıran 150 kDa'luk bir proteindir (43). *H. pylori* ile endotel hücrelerinin stimülasyonu adhezyon molekülleri olan vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) ve E-selektin yanı sıra IL-8'in de salgılanması ile nötrofillerin göçüne katkıda bulunur (79).

Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF) ise ülserojenik etkisi olan bir fosfolipid mediatördür. Lyso-PAF sağlıklı kişilerde gastrine yanıt olarak mide mukoza hücrelerince üretilir. PAF özgül parietal hücre reseptörleri aracılığıyla gastrik asit sekresyonunu uyarır. *H. pylori* ülserojenik olmayan Lyso-PAF'ı PAF'a metabolize edebilir; böylece asit sekresyonunu artırarak direk ve indirek mekanizmayla mukozal hasar artırır (43).

H. pylori LPS'ini mucus ve mukozal reseptörleri arasındaki ilişkiyi bozarak gastrik mucus tabakasını hasara uğratar, bazal membranındaki epitel hücresi reseptörleri ile etkileşir ve pepsin aktivasyonuna neden olur (31). *H. pylori* LPS'ini enterobakterial LPS'e göre daha düşük düzeyde immunojenik aktiviteye sahiptir. Daha düşük düzeyde konak yanıtına neden olması *H. pylori* enfeksiyonlarının diğer patojenlere göre daha uzun sürme nedeni olabilir. LPS antijenik yapısı konağın Lewis^x (Le^x) ve Lewis^y (Le^y) kan grupları ile benzerdir (84). Le kan grup antijen sisteminde; Tip 1 antijenler Le^a ve Le^b'dir. Tip 2 antijenler ise Le^x ve Le^y'dir. Bunlar ABO kan gruplarıyla ilişkili olup eritrosit yüzeyinin yanısıra gastrik mukozada da eksprese edilir (85).

H. pylori'nin ürettiği 550 kilodalton (kDa) ağırlığında nikel içeren multimerik bir enzim olan üreaz, üreinin amonyak ve karbonik aside hidrolizi reaksiyonunu katalizler. Oluşan amonyak mide asidini nötralize ederek bakterinin kolonizasyonuna yardımcı olur (37,43,79,86,87). Üreaz operonu *H. pylori* kromozomunun 34 kb kısmına lokalizedir. Üre operonu, ÜreA ve ÜreB olan iki yapısal alt üniteyi, ÜreC ve ÜreD olan iki regülatör alt üniteyi kodlar. Ayrıca ÜreI, ÜreE, ÜreF, ÜreG, ÜreH olan beş yardımcı proteini kodlar (43,79,86,88). Regülatör genler *ureC* ve *ureD* bir mesajcı ribonükleik asit (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 1) (88). *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 proteindir (79,89). 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 (75). *ureI* H⁺ kapalı üre kanalını kodlar (86,87,90). "ABC transporter", "P-tip adenosin trifosfat (ATPase)",

"Hpn (histidine-rich protein)" ve HspA, nikel iyon transportunu etkileyebilen ve üreaz aktivitesini artırabilen diğer proteinlerdir (79,86). Bu proteinler NixA'nın değiştiği bölgelerde NixA için yedek sistem gibi rol oynar (86). İndüklenebilir nitrik oksit sentazın up-regülasyonu ve nitrik oksit salınımının *ureA* ekspresyonuyla ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür. Buna göre üreazın sadece amonyum üretiminde değil, yangıda da rolü olabileceği düşünülmektedir (79).



Şekil 1. *H. pylori*'nin üreaz operonu*

*86. kaynaktan alınmıştır.

4.5.1.1.2. Mide Mukozal Bariyerinin Bozulması

Musnaz, mukus tabakasının yapısını ve akışkanlığını bozarak *H. pylori*'nin epitel tabakasına kolayca geçişini sağlar (43,91).

Fosfolipaz, mukus hücrelerinin apikal membranındaki koruyucu fosfolipiten zengin tabakayı bozar (43). Fosfolipaz A2 ve C, membran fosfolipidlerini parçalar, mide mukozasının hidrofobik özelliğini azaltır; mukus tabakası incelik, depolimerizasyon ve desülfasyon sonucu yapısı değişir (43,66,92). Etkinlikleri bizmut tuzları tarafından inhibe edilebilir (43).

H. pylori enfeksiyonu mide epitel hücrelerinde indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (INOS) ekspresyonu yüksek miktarda nitrik oksit (NO) sentezi ile sonuçlanarak doku hasarına ve immün yanıtta neden olur (43,91). *H. pylori* eradikasyonu ile insan gastrik epitel hücrelerinde INOS azalmaktadır (43).

i. Vakuol Oluşturucu Sitotoksin (VacA)

H. pylori suşlarının yaklaşık %50'si tarafından üretilir. *vacA* geni tarafından kodlanan epitel hücrelerinde intrasellüler vakuol oluşturan bir toksindir (82). 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. Bu toksinin küçük parçası p37 apoptozdan sorumlu iken, büyük parça p58 küçük parça ile birlikte vakuol oluşturmaktan sorumludur. Asidik şartlarda vakuol oluşturucu aktivitesi artar. *vacA* geni yap› olarak *Haemophilus influenza* ve *Neisseria gonorrhoea*'nın IgA proteazlarına benzer (31,36,37,43,79). VacA toksini, kendisini epitel hücre zar› içine sokar ve voltaj bağımlı bir kanal oluşturur (18,92). Vakuoller H⁺/ATPaz aracılığıyla asitlendirilir. Vakuollerin içine katyon akışı vakuollerin şişmesine neden olur (47).

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) bölgesi m1 ve m2 allelik tiplerini içerir. *cagA* ve *vacA* s1 arasında yakın ilişki vardır. Çünkü birçok s1 suşu *cagA* pozitifdir; klinik yans›mas› da daha şiddetli olmaktadır (37,73,84). Gastrik epitel hasar› *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 yang› s2'den daha şiddetlidir. Ayrıca s1a alleleline sahip suşlar s1b'den daha fazla seviyede yangıya neden olur (31).

ii. Sitotoksin İle İlişkili Gen (CagA)

Baz› *H. pylori* suşları 31 geni olan 40 kbp'lık *cag* PAI içerir. *cag* PAI, Tip IV sekresyon sistemi özelliği gösterir (31,51,84). 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 (31). Hayvan modellerinde *cag* patojenite adasına sahip olan suşların olmayanlara göre daha virulan olduğu gösterilmiştir (51). 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 ve kronik yangıda rolü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *cag* PAI içeren suşlarda temas sonrası yalancı ayak oluşumunun indüklenmesi, konak proteinlerin tirozin fosforilasyonu, hücre iskeletinde oluşan değişiklik *in vitro* olarak gösterilmiştir (31). *cag* PAI'de konaktaki sitokin üretimine katkıda bulunan *picB*, *picC* olarak isimlendirilen iki gen bulunmuştur. *picB* geni taşıyan suşların, *cagA* genini de bulundurdıkları bildirilmiştir. *cagA* ve *picB* genini beraber taşıyan suşların, mide mukozasından IL-8 üretimini arttırdıkları gösterilmiştir (31,92). *cagA*, bakteriyel yapışmayı izleyerek Src-bağımlı tirozin fosforilasyonu ve aktive olmuş bir ökaryotik fosfatazın (SHP-2) yol açtığı konak hücre proteinlerindeki değişiklikler yoluyla konak hücre içine girer (79). 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 (93).

iceA geni, *iceA1* ve *iceA2* olarak iki tip içerir. *iceA1* geni, *H. pylori*'nin epitele yapışmasına neden olan bir genidir ve epitele teması ile uyarılır (31,94). Ayrıca, *H. pylori* enfeksiyonu mide asidini arttıran peptid yapılı gastrin hormonunun ekspresyonunu artırır; asidi azaltan somatostatin hormonunun ekspresyonunu baskılar. Bu etkisi gastrik yangı varlığında görülür (31,43). *H. pylori* ile enfekte kişilerde gastrin düzeyinde artış olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunda antrumda gastrin sekrete eden G hücreleri yoğun olarak bulunmaktadır. Antrumda yerleşen bakterinin üreaz enzimiyle amonyak üretimine yol açıp G hücrelerinin stimüle edilmesiyle hipergastrinemi oluşmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonunda serum pepsinojen I (PGI) ve pepsinojen II (PGII) düzeyinin arttığı, PGI/PGII oranının azaldığı gösterilmiştir. Başarılı eradikasyon tedavisi sonrası ise PGI ve PGII düzeylerinde azalma olduğu belirtilmektedir (95,96).

4.5.1.2. Kolonizasyon Faktörleri

4.5.1.2.1. 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 (31). Bu sebeple *H. pylori* mide lümeninde kolonize olamaz; ancak gastrik mukozayı kaplayan mucus tabakasında oldukça iyi kolonize olur. Mukus mide asidinden kaynaklanan protonların difüzyonuna direnç gösterir. Çünkü sulfatidile polisakkaritler nedeniyle negatif yüklüdür. Mukus mukozal yüzeyi kaplayan alkali bir tampon olarak görev alır. Bu rolü ile aside duyarlı olan mukozal hücreleri korur. *H. pylori* mucus tabakasında yaşayabilir ve hareketlidir ve kemotaksis özelliğini gösterebilir (51).

4.5.1.2.2. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz

H. pylori katalaz ve süperoksit dismutazın üretimiyle hücre içi ölümden ve fagositozdan korunur (97).

4.5.1.2.3. 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 (98). *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 gen olup fonksiyonel üreaz molekülüne nikel bağlanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (43). HspA ve HspB proteinlerinin, üreaz ile beraber salınması deneysel olarak üreaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (92).

4.6. *H. pylori* ile İlişkili Hastalıklar

H. pylori enfeksiyonu klinik yansıması değişkendir; mikrobiyal ve konak faktörlerinden etkilenir (18).

H. pylori ile enfekte bireylerde hayat boyu devam eden ve genellikle asemptomatik seyreden yüzeysel aktif kronik gastrit oluşmaktadır. Kronik gastrit ise gastrik kanser gelişiminde risk faktörlerindedir (92). *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansının yüksek olduğu ülkelerde gastrik kanser oranı da yüksek gözlenmiştir (16-18,30,36-38,44,52).

Mide ülserinin >%80'inin *H. pylori* ile ilişkili olduğu, *H. pylori*'nin kolonizasyonuna bağlı olarak duodenal ülserin geliştiği bildirilmektedir (16,17,31,38).

Mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomalı hastaların % 72-98' inin de *H. pylori* ile enfekte olduğu belirtilmektedir (18,82).

4.6.1. İlişkili Olduğu Düşünülen Diğer Hastalıklar ve Sendromlar

H. pylori'nin kardiovasküler hastalıklar ve pernisiyöz anemiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (11,16,31,38). Gerçek otoimmün pernisiyöz anemi korpus atrofisi ile, ancak *H. pylori* ile ilişkili pernisiyöz anemi antrum ve korpus atrofisi ile ilişkilendirilmiştir (16). *H. pylori*'nin demir eksikliği anemisine neden olduğu bildirilmektedir. *H. pylori*'nin korpusu tuttuğu gastritte kobalamin absorpsiyonu için gereken intrinsik faktörün sekresyonu azaldığından B12 vitamin eksikliği gelişebileceği bildirilmektedir (72). *H. pylori*'nin gıda alerjisi, kısa boy, tiroid hastalığı, kronik ürtiker, baş ağrısı, diabet ve Raynaud's fenomeni ile zayıf ilişkili olduğu düşünülmektedir (16).

4.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler

H. pylori tanısında endoskopi gerektiren invaziv ve endoskopi gerektirmeyen invaziv olmayan yöntemler kullanılmaktadır (11,99). Bu yöntemler çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Tablo 2) (100).

Tablo 2. *H. pylori* enfeksiyonu tanı testleri *

	Avantajlar	Dezavantajlar
İnvaziv olmayan		
Serum ELISA	Ucuz	Takip için kullanışlı değil
UBT	Takip için kullanışlı	Pahalı, asit baskılayıcı tedavide hastalarda yalancı negatif sonuç verebilir.
Dışkı Antijen Testi	Ucuz, takip için kullanışlı	Laboratuvar uygun değilse monoklonal antikorlar kullanılmamalıdır
Tam Kan testi	Ucuz, hızlı	Serum ELISA'dan daha az kesin

İdrar ve tükürük Testleri	Epidemiyolojik çalışmalar için uygundur	<i>H. pylori</i> spesifik antikorların belirlenmesinde bir rolü yoktur
İnvaziv (endoskopik)		
Histoloji	Patolojinin görülmesi	Düşük düzeyde enfeksiyonlar kaçırabilir
HUT	Hızlı, pozitifliği tedavi öncesinde elverişlidir	Yanlış pozitif olabilir
Kültür	<i>H. pylori</i> varlığı altın standart, antibiyotik duyarlılık testi	Maksimum duyarlılıkta değildir; rutin için uygun değildir, 4-7 güne ihtiyaç duyar

* 100. kaynaktan alınmıştır.

4.7.1. İnvaziv Yöntemler

4.7.1.1. Biyopsi Üreaz Testi

Mide biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin üreaz enziminin varlığını saptayan bir testtir. Üreaz temelli testlerin duyarlılığı midedeki bakteri yoğunluğu ile ilişkilidir (43,101). *H. pylori*'nin üreaz enzimi üreli besiyerindeki üreyi bikarbonata ve amonyaka parçalar. Amonyak iyonları pH'ı artırır ve pH indikatörü fenol kırmızı'nın rengi sarıdan kırmızıya da pembeye değişir (31,42,47). Jel temelli testler (CLOtest, HpFast), kağıt temelli testler (PyloriTek, prontoDry HpOne) ve sıvı temelli testler (CPtest, EndoscHp) gibi birçok ticari üreaz testleri (42,99,101,102) ile laboratuvarlarda hazırlanan konsantre (% 10'luk) üre içeren hızlı üreaz testi kullanılmaktadır (31). Testler biyopsi örneğindeki *H. pylori* sayısına bağlı olarak, 0 -15 dakikada hızlı sonuç verirler ancak 1 ile 24 saat içinde de sonuç alınabilmektedir. PPI ya da bizmut bileşenleri gibi üreaz aktivitesini etkileyen ilaç tedavisi ya da antimikrobiyal ajanların kullanılması hızlı üreaz testlerinin duyarlılıklarını etkileyebileceği bildirilmiştir (11).

4.7.1.2. Histopatolojik İnceleme

H. pylori'nin yamalı tarzda kolonize olmasından dolayı hem antrumdan hemde korpustan iki örnek alınması önerilmektedir. Biyopsi örnekleri %10'luk tamponlanmış

formalin içinde oda sıcaklığında laboratuvara gönderilmektedir. *H. pylori* ile korpus ve antrum biyopsi örneklerindeki bakteriler 0-3 arasında semikantitatif olarak gastrik mukozanın histolojik özellikleri (inflamasyon, atrofi, intestinal metaplazi (IM)) de Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirildiği bildirilmektedir (42,103).

Bakteri mukus içinde, yüzey epiteline tutunmuş olarak, sıklıkla da kriptin içine doğru derinlerde bulunur (43). *H. pylori* ile kolonize biopsiden direkt sürüntü Gram boyama hızlanmasında kullanılabilir. Warthin-Starry gümüş boyası, modifiye Giemsa ya da Genta boyası, Hematoksilin-eozin (H&E), Diff-Quik, Diff-3, Alcian mavisi ve akridin oranj gibi özgün boyama yöntemleri kullanılmaktadır (31,43,99,103). *H. pylori*'nin histolojik tanısında düşük maliyetli olan Giemsa boyama Warthin-Starry boyamaya göre tercih edilir (94,101). Ayrıca rutinde kullanılan H&E boyama ile *H. pylori* gösterilebilir (16,27,90). Ancak bakteri sayısı az olduğunda ve lümeninde doku artıkları varsa H&E boyama yanlış değerlendirmelere yol açabilir (43).

Monoklonal veya poliklonal floresan anti-*H. pylori* antikorlarının kullanıldığı özgüllüğü yüksek immunohistokimyasal boyama da uygulanabilir. Ancak bu boyama laboratuvar maliyetini artırır (31,94,103).

4.7.1.3. Kültür

H. pylori tanısında kullanılan kültür altın standart yöntemlerden biridir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerine olanak sağlar ve kültürle elde edilen suş tiplendirme yöntemlerinde, ileri araştırmalarda kullanılabilir (31,43,68). Ancak *H. pylori* kültürde yavaş üreyen bir bakteridir (11,68). İnkubasyon süresi 3-7 gündür. Diğer bakteriler gibi, kültürde üreyebilmesi için canlı olması gerekmektedir (31). Kültürün duyarlılığını düşürdüğü için, endoskopi öncesi 4 hafta içinde hastaların antibiyotik ya da özellikle PPI gibi antisekretuar ilaçlar kullanmaması önerilmektedir (42,101). *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için gerekli olan biyopsi örneklerinin sayısı önemlidir. Antrumdan alınan tek biyopsi örneği iyi duyarlılık verir ancak güvenilir tanı için yeterli değildir. *H. pylori* yamalı tarzda dağılıma sahip olduğundan bakterinin tanı şansını arttırmak için korpusdan iki, antrumdan iki biyopsi örneği alınması önerilmektedir (42). Normal tuzlu su, % 20 glikoz içeren Stuart's transport besiyeri, Portagerm pylori (bioMérieux, France) ve çikolata agar slant gibi transport besiyerleri kullanılmaktadır. Stuart's besiyerinin içerisinde biyopsi materyalinin 4°C'de 24 saat saklanabileceği

bildirilmektedir (99,103). Biyopsi örneği 24 saatten uzun süre saklanacaksa -70°C veya -80°C nitrojen kullanılmasıdır (31).

H. pylori'yi kültürde üretebilmek için çeşitli seçici ve seçici olmayan besiyerleri mevcuttur (43). At kanı, at serumu veya koyun kanı eklenmiş beyin kalf infüzyon (BHI) agar, brucella agar, Tryptone Soya agar, Columbia agar, Wilkins Chalgren agar ve Skirrow's agar kültürde kullanılması önerilen besiyerlerindedir (29,42,65,104). Ayrıca besiyerleri *H. pylori*'nin gelişimini artırıcı çeşitli besinlerde (vitaminler ve oligoelementler gibi...) içermelidir. Katı besiyerlerinde kullanılacak diğer katkı maddeleri olarak yumurta sarısı, kömür, nişasta, bovine serum albumin (BSA), katalaz, 2,3,5-trifenil tetrazolium klorid (40 mg/liter) bildirilmektedir (42). 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 (42,65,104). Optimal kültür sıcaklığı 37°C 'dir. Optimal koşullar altında birincil kültür için 2-4 gün optimumdur. Kültürün negatif olması durumunda, sonuçların negatif olduğunu kesinleştirmek için 7 ile 12 gün inkübasyon önerilmektedir. Kültür kuruluk, hava ile temas ve sıcaklık gibi koşullardan etkilenir. Tüm fenotipik ve genotipik identifikasyon testleri gerçekleştirildiğinden kültürün duyarlılığı %95, özgüllüğü %100'dür (42).

H. pylori için rutin antimikrobiyal duyarlılık testi önerilmemektedir. Metranidazol ve klaritromisin ile tedavi sonrası düşük eradikasyon oranları antimikrobiyal direnç ile ilişkilidir. Antimikrobiyal duyarlılık testi disk difüzyon, Epsilometer test (E test), agar dilüsyon gibi yöntemler kullanılarak yapılabilir. *H. pylori* duyarlılık testlerinde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından klaritromisin antibiyotiği için agar dilüsyon yöntemi önerilmektedir (99,103,105).

4.7.1.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

H. pylori tanısında biyopsi ve dışkı PCR ile RT-PCR, Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi, DNA enzim immün assay ve moleküler tiplendirme yöntemleri gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır (11,68,99,101-107).

4.7.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler

4.7.2.1. Üre Nefes Testi (UBT)

UBT *H. pylori* ile enfekte bireylerin midesinde üreaz aktivasyonunun varlığını belirleyen altın standart yöntemlerden biridir. Ağız yoluyla alınan ^{13}C veya ^{14}C işaretli üre, *H. pylori* ile enfekte kişilerde bakterinin üreaz enzimi ile parçalanır. Mukus tabakasında ortaya çıkan üre hidroliziyle amonyak ve işaretli CO_2 oluşur. Oluşan işaretli CO_2 'in solunum havasında tespit edilmesi esasına dayanır. Duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek tanı testi olmasının yanı sıra; eradikasyon tedavisinin izleminde de kullanılmaktadır. Diğer bir gastrik *Helicobacter* olan *H. heilmannii* yalancı olumlu sonuçlara neden olabilir. Antibiyotik tedavisi, bizmut tuzlarının kullanımı veya PPI kullanımı ise yalancı olumsuz sonuçlara neden olabilir (42,99,101,105). Ülserden ya da gastrik biyopsi örneklerinin alınmasından dolayı bir kanama varsa, yalancı olumsuz sonuçlar ortaya çıkabilir. Bir çalışmada, yüksek konsantrasyonda sitrik asidin verildiği yerde, omeprazol ya da pantoprazol kullanıldığında lansoprazol ya da esomeprazol kullanılmadığında, yalancı olumsuz sonuçların ortadan kalktığı bildirilmiştir (42,102). UBT'nin yalancı olumsuzluğunun önemli bir nedeninin de atrofi olduğu bildirilmiştir (108).

4.7.2.2. Serolojik Yöntemler

4.7.2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

H. pylori enfeksiyonu humoral 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 antikorların saptamaya yönelik tanısal testler geliştirilmiştir (42,101). Akut *H. pylori* enfeksiyonunda nadiren IgM antikorları ortaya çıkar, çoğunlukla IgA yükselir (42,103). Tedavi edilmeyen vakalarda IgA/IgG 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. Kronik gastritli hastalarda IgG ve IgA'nın gastrit aktivitesini saptamadaki rolü bildirilmektedir (43,109-111).

H. pylori'ye özgül antikorların saptanmasında kullanılan 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 s stabil antijenler gibi hücre parçaları; üreaz ve 120 kDa antijen gibi zenginleştirilmiş antijenlerdir (43). *cagA* veya *vacA*'ya karşı antikor saptamaya yönelik yeni serolojik testler geliştirilmiştir (99,103). Bu testler *cagA* proteini gibi özgün saflaştırılmış veya rekombinant antijenleri kullanır (31). Serolojik yöntemler epidemiyolojik çalışmalarda tarama testi olarak kullanırlılığı bildirilmektedir (43).

Serolojik testlerin avantajları özel ekipman ya da tekniklere gerek olmaması ve çoğunlukla hastane ya da klinik laboratuvarlarda gerçekleştirilmesidir. Serolojik testlerin en önemli dezavantajı aktif enfeksiyon ve *H. pylori*'ye önceden maruz kalmak arasında ayrım yapamamasıdır. Antikor seviyeleri *H. pylori* enfeksiyonu için tek bir tedavi almış olan hastaların kanında uzun süre kalabilir. İşte bu nedenle, *H. pylori*'nin başarı ile tedavi edildiği hasta sayısı bir popülasyonda artıyorsa, seroloji ile yanlış pozitif test prevalansının arttığı bildirilmiştir (101).

Atrofik gastritin teşhisinde serolojide yeni yaklaşımlar olarak Gastropanel önerilmektedir. Bu testlerde antral mukozanın belirleyicisi olarak gastrin-17 serum seviyesi, korpus mukozasının belirleyicisi olarak PG I, PG I/II oranının serum seviyesi ölçülür (103,106).

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 (99). Helisal, FlexSure, Hp Check, Stat Simple, Accustat, BM test ve Pyloriset Screen gibi testlerin ortalama duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %90 ve %82'dir. Doktorlar tarafından gerçekleştirilen bu testlerden biri ile ELISA karşılaştırıldığında doğrulukları %95 bulunmuştur (42).

4.7.2.2.2. Western blot

Western blot özgül antijenlerin jel elektroforezi ile ayrılup, nitroselüloz membran filtre striplere transfer edilerek hasta serumunda *H. pylori*'ye karşı oluşan sıvısal bağışık yanıtta bakterinin çeşitli antijenlerine karşı oluşan antikor yanıtını gösteren bir "İmmunoblotlama" yöntemidir (101). Bu antijenler CagA antijeni, UreA ve UreB, HspA ve HspB, flagellin alt üniteleri, katalaz, lipopolisakkarit, "current infection marker (CIM)" ve OMP gibi antijenlerdir. *H. pylori* suşları arasındaki farklılıkların yanısıra bakteri ile enfekte kişilerdeki bağışık yanıtta da farklılıklar görülür. *H. pylori* tam hücre lizatlarının kullanıldığı Western blot, bakteriyal antijenlere karşı oluşan antikor profili hakkında daha detaylı bilgi edinmemizi sağlar (105,112). HelicoBlot 2.0 ve Recombinant Immunoblot Assay Strip (RIBA) gibi son çalışmalarda iyi duyarlılık ve özgüllük gösteren Western blot ticari kitleri geliştirilmiştir (99). HelicoBlot 2.1 CIM'ı içerir (103).

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. Bu yüzden *H. pylori*, *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Salmonella spp* veya *Vibrio cholerae* gibi diğer kültürde kolay üretilen enterik bakterilerden farklıdır (113). 1992'de Thomas ve arkadaşlarının, Gambiya'da malnütrisyonlu bebeklerin dışkılarından ve erişkinlerin diyareli dışkılarından yaptıkları kültürde *H. pylori* üretilmiştir (42,114). 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. 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 (23,31).

4.7.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri

H. pylori' yi dışkı örneklerinden saptanmasında ELISA, immunokromatografik (kart ve strip) testler kullanılmaktadır (11,31,101). Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu (EHSg) *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavi öncesi tanısında monoklonal dışkı antijen testleri veya UBT'yi tavsiye etmektedir. Eradikasyon tedavisinin etkinliğinin izleminde ise UBT'ye alternatiftir (99,105,115,116). Antimikrobiyal tedavi tamamlandıktan sonraki 4 hafta içinde uygulandığında, eradikasyon tedavisinin kontrolünün yanı sıra kronik enfeksiyonun saptanmasında da duyarlılığı ve spesifikliğı yüksektir (31,101,103). Poliklonal ve monoklonal anti-*H. pylori* dışkı antijen testleri kullanılmaktadır. Poliklonal anti-*H. pylori* dışkı antijen testleri daha önceleri yaygın olarak tedavi öncesinde *H. pylori* enfeksiyonu tanısında kullanılmış ancak son zamanlarda monoklonal antikor testleri kullanılmaktadır (99,101). Yeni geliştirilen monoklonal antikorun kullanıldığı bazı dışkı antijen testlerinin UBT'ye alternatif olduğu bildirilmektedir (23,116,117). ELISA FemtoLab *H. pylori* (Connex) Amplified-IDEA-HpStAR (Dako, Glostrup, Denmark) ve Rapid HpStar (Oxoid), Simple *H. pylori* test (Operan SDA, Zaragoza, Spain) ve Immunocard STAT! HpSA test (Meridian Bioscience Europe, Milan, Italy) monoklonal dışkı antijen testlerindedir. Bu testler ofis dışkı testi olarak hızlı ve basit testlerdir ancak doğruluğı standart laboratuvar ELISA'dan daha düşüktür (42,102,103,106). Gastrik kanamalı hastalarda, poliklonal antikor ve hızlı monoklonal immunokromatografik antijen testlerinde kandan dolayı düşük duyarlılık belirlenmiştir ve bu testlerde pozitiflik için önerilen spektrofotometrik cut-off noktasından dolayı düşük sonuçlar saptanmıştır (102,103).

4.7.2.3.3. Dışkı PCR

Moleküler testler *H. pylori* tanısında klinik örneklerden nükleik asitlerin saptanması esasına dayanır (117). *H. pylori* için farklı genomik bölgelere yönelik PCR testleri tanımlanmıştır (20). 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 yanlış negatif sonuçlar alınabilir (117). *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 (118). Dışkı örnekleri DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu çok zor gerçekleştirilen örneklerdir. QIAamp DNA Stool Mini Kit PCR koşulları altında DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır ve duyarlılığı %98 olarak saptanmıştır (103). İnsan dışkısı PCR inhibitörleri içermektedir. Bu inhibitörler hedef DNA amplifikasyonundan önce örnekten uzaklaştırılmalıdır. PCR inhibisyonunun dışkı süspansiyonunun dilüsyonu ile ortadan kaldırılabileceği ileri sürülmüştür. Ancak bu yöntemle testin duyarlılığı azalmaktadır. Çünkü dilüe örnekte daha az bakteri vardır. PCR amplifikasyonu için dışkıdan DNA'yı saflaştırmada çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (117). Dışkıda *H. pylori* varlığı kolay uygulanabilen kısa sürede sonuç veren yeni bir noninvaziv yöntem olan “basit dışkı PCR” metodu ile saptanabilmektedir (119). Klaritromisin duyarlılığını test etmek amacıyla da kullanılabilmektedir (103).

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 problemlerdir (42,103,120). Dışkı real-time PCR yöntemi tarafından klaritromisin direncinin belirlenmesi gelecekte *H. pylori* ve eradikasyon tedavisinin yönetimi için önemli bir invazif olmayan test olabileceği bildirilmektedir (103).

4.7.2.4. Diğer Örnekler İçin Kullanılan Tanı Yöntemleri

4.7.2.4.1. İdrar Antikor Testleri

İdrarda *H. pylori*'ye karşı IgG antikorlarını saptamak için kullanılan immunokromatografi ve ELISA prensibine dayanan iki tip idrar antikor testi vardır (16,121-124). İdrar temelli ELISA testleri non invaziv, örnek toplanmasının basit, yüksek duyarlılık

ve özgüllüğe sahip olmas› nedeniyle avantajlıdır (115,116). Ayrıca direk uygulanabilmekte ve 20 dakika kadar kısa bir sürede sonuç verilebilmektedir. İdrar temelli immünotestler tarama için uygundur ve geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalar *H. pylori* enfeksiyonunun prevalans›na etkiler (121). İdrar temelli ELISA kiti URINELISA ve immünotkromatografik yöntem RAPIRUN'nın klinik olarak kullanılabilircek yeterli doğruluğa sahip olduğu ispatlanmıştır. URINELISA invaziv olmayan ve örnek toplamas› basit bir testtir. RAPIRUN çok basit ve hızlı olarak gerçekleştirilen bir testtir (103).

4.7.2.4.2 Tükürük Antikor Testleri

Tükürük testi Helisal Assay testinin duyarlılık ve spesifikliği çok düşüktür (16). *H. pylori*'nin klinik tanısı için uygun bir test olmamasına rağmen, noninvaziv, ucuz ve kolay uygulanabilen bir test olduğu düşünülmektedir (31).

4.8. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunda Tedavi

H. pylori enfeksiyonu eradikasyonunda birçok tedavi protokolü uygulanmakta ancak eradikasyon tedavisi başarısızlığı da gözlenebilmektedir. Bu nedenle *H. pylori* enfeksiyonunun kolaylıkla eradike edilemediği için farklı antimikrobiyallerin kullanım›na gereksinim duyulduğu bildirilmektedir (31,16).

Tedavi başarısızlığının bazı nedenleri hastanın tedaviye uyumsuzluğu, antibiyotiğe dirençli *H. pylori* varlığı, zayıf etki ya da antibiyotik konsantrasyonudur (47). PPI ve amoksisilini içeren ikili tedavi sigara içmek gibi eksternal faktörlere de duyarlıdır. *H. pylori*'de antibiyotiklere karşı direnç kromozomal ilişkilidir ve izolatların yarısında plazmid bulunmasına rağmen, plazmid aracılı değildir (31).

4.8.1. Tedavide Kullanılan Ajanlar

H. pylori ile ilişkili hastalıkların tedavisinde antisekretuar ajanlardan H₂ reseptör antagonistleri ve PPI kullanılmaktadır (16).

İki ya da daha fazla antibiyotiğin birlikte kullanılması, eradikasyon başarısını artırır ve dirençli suşların oluşma riskini azaltır (31) (Tablo 3).

Klaritromisin, amoksisilin, metranidazol, tetrasiklin ve bizmut ise kullanılan antimikrobiyal ajanlardandır (16,31).

Tablo 3. *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

*30. kaynaktan alınmıştır

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu

Nisan 2006-Temmuz 2008 tarihleri arasında dispeptik yakınmalar nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 136 olgu (102 kadın, 34 erkek; yaş ortalaması 46.57 ± 12.63 SD; yaş aralığı 21-78) çalışmaya alındı. Dispeptik hastalar Roma III Kriteri'ne göre belirlendi (125,126) (Tablo 4). Yakın zamanda kan transfüzyonu 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 tuzlar ve sukralfat kullanan hastalar dışlama kriterleri nedeniyle çalışmaya alınmadı.

Endoskopi endikasyonu konulan hastalarla bizzat konuşulup çalışma hakkında bilgi verildi. Çalışmaya katılmayı kabul eden hastalara tüm bu açıklamaları içeren "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutulup imzalatıldı. Öncelikli olarak endoskopi randevular alındı. Endoskopiden önce *H. pylori* tedavisine yönelik hiçbir ilaç kullanmamaları gerektiği belirtildi. İşlemden önce ve işlem sırasında endoskopide uyulması gereken kuralları içeren bilgilendirme kağıdı da endoskopi ünitesinden hastalara temin edildi. Endoskopi olacaklar tarih ve çalışma için dikkat etmeleri gereken kurallar sözel anlatımın yanı sıra bu kağıdın arkasına da not edildi. Hastalara ulaşabilecekleri cep telefonu da verildi. Çalışmanın kapsamı hakkında verilen bu bilgilerin yanısıra, hastalar endoskopi işlemi hakkında da aydınlatıldı. Her hastaya bir numara verilerek "Gönüllü Bilgilendirme Formu", endoskopi raporu, patoloji raporları ve çalışma formları bir dosyada toplandı (EK 10.1, EK 10.2).

Tablo 4. Roma III çalışma grubuna göre fonksiyonel dispepsi ve altgrupların tanımları

<p>Fonksiyonel dispepsi tanımı</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 12 ay içinde en az 12 hafta aralıklı ya da aralıksız olarak aşağıdakilerin varlığı▪ Üst abdomende sürekli ya da tekrarlayıcı ağrı ya da rahatsızlık, huzursuzluk varlığı▪ Bu semptomları açıklayacak organik neden olmaması▪ Defekasyonla rahatlama olmaması, dışkı sayısı ve formu ile ilişkisi olmaması
<p>Dispepsi altgrupları</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Ülser benzeri dispepsi<ul style="list-style-type: none">▪ Üst abdomendeki ağrı predominanttır▪ Dismotilite benzeri dispepsi<ul style="list-style-type: none">▪ Üst abdomende huzursuzluk predominanttır. Bu huzursuzluk, üst abdomende dolgunluk, erken doyma, şişkinlik, geğirme ve bulantıyı içerir▪ Tanımlanamayan dispepsi<ul style="list-style-type: none">▪ Yukarıdakiler gibi tanımlanamayan tiptir

*125. kaynaktan alınmıştır

i. Etik Kurul Onayı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu 11 Ocak 2007 tarih ve 08/01/2007 numaralı toplantısında, 278/2006 protokol numaralı "Dispeptik ve kanamalı hastalarda ELISA ve Westernblot yöntemleriyle *Helicobacter pylori*'nin antijenik varyasyonlarının araştırılması" isimli yüksek lisans tezi araştırma

projesinin uygulanması onay›, 12.01.2007 tarih ve 06 say›lı yaz› ile Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne bildirilmiştir (EK 10.3). 24.06.2008 tarihli Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu toplantısında alınan kararla tez başlığı “*Dispeptik hastalarda ELISA ve Westernblot yöntemleriyle Helicobacter pylori'nin antijenik varyasyonlarının araştırılması*” olarak isim değişikliğini içeren yeni Etik Kurul onayı alınmıştır. (EK 10.4)

5.2. Biyopsi Örneklerinin Alınması

Çalışmaya katılan hastalara, en az 8 saatlik açlıktan sonra Fujinon SN 2 GN20 A003 veya SN 1 GN20 A923 marka videoendoskopi ile üst gastro intestinal sistem (GIS) endoskopisi yapıldı. Endoskopi öncesi, endoskopi sırasında ve sonrasında hastalara bizzat refakat edildi. Endoskopi öncesinde %10'luk Xylocain pump sprey ile farinkse lokal anestezi uygulandı. Endoskopi sırasında mide antrum ve korpusundan dörder olmak üzere toplam sekiz biyopsi örneği alındı. Bir korpus ve bir antrum biyopsi örneğine endoskopi sırasında HUT uygulandı. Bir korpus ve bir antrum örneği histopatolojik açıdan incelenmek üzere Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Diğer iki korpus ve iki antrum örneğine ise kültür yöntemi uygulanması için Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ulaştırıldı.

5.2.1. Hızlı Üreaz Testi (HUT)

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 %01'lik fenol kırmızısı solüsyonu eklendi. Karışımın renginde sarıdan pembeye değişimin görülmesi pozitif, sarı rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi.

i. Endoskoplara Sterilizasyonu:

Endoskoplara önce mekanik olarak temizlendi; su ile yıkandı, fırçalandı. Daha sonra %2'lik glutaraldehit içeren Fujinon Choyang otomatik yıkama makinesi ile 20 dakika yıkama yapıldı. Su ile durulanıp kurutularak bir sonraki hasta için hazırlandı.

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 "HLO" incelenmesi istemi ile Patoloji Anabilim Dalı'na hızla ulaştırıldı.

Yüz otuz altı hastanın antrum ve korpus toplam 272 biyopsi örneği gastrointestinal patoloji ile ilgili patoloji uzmanı tarafından H&E, Alcian blue ve Giemsa boyaları ile boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon E600) morfolojik olarak "HLO" yönünden incelendi. Gastrik aktivite açısından; yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2), ve şiddetli (grade 3), *H. pylori* bakteriyal dansitesi ve *H. pylori*'nin yanı sıra IM, PNL, lenfositler ve atrofi Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirildi (127).

Alınan dört biyopsi örneğinden bir korpus ve bir antruma uygulanan histopatolojik inceleme ve/veya HUT en az biri pozitif olgular *H. pylori* enfeksiyonu pozitif; tümünün olumsuz olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu negatif kabul edildi.

5.3. Serum Örneklerinin Alınması, Saklanması

Endoskopi ile eş zamanlı olarak her hastadan 10ml venöz kan örneği alındı, santrifüjlendi. Ayrılan serum örnekleri 1.5 ml'lik steril burgulu kapaklı santrifüj tüplerine (Axygen SCT-150-C) üç adet olmak üzere paylaştırıldı. - 20 °C'de çalışılana kadar saklandı.

5.3.1. Hasta Örneklerine Yöntemlerin Uygulanması

i. Anti-*H.pylori* IgG ELISA

Anti-*H. pylori* IgG antikorları, *H. pylori* antijeni (strain Lior 1, Brussels) ile kaplanmış mikrotitrasyon kuyucukları içeren ELISA (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck) testi ile araştırıldı.

Serum örnekleri örnek tamponu ile 1:101 oranında (10 µl serum 1.0 ml örnek tamponu) dilüe edildi, karıştırıldı. Kalibrasyon ve kontrol serumları kullanıma hazır olduğundan dilüe edilmedi.

Test Prosedürü:

Kalibrasyon serumları, pozitif ve negatif kontrol, dilüe edilmiş hasta serumları 100'er µl olmak üzere uygun kuyucuklara pipetlendi. Kuyucuklar›n üzeri kapat›larak 30 dk oda ›s››nda inkubasyona b›rak›ld›.

Kuyucuklar üç kez, 300'er µl yıkama tamponu (10X) ile yıkandı.

100 µl enzim konjugat (peroksidazla işaretli anti-insan IgG) her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucuklar›n üzeri kapat›larak 30 dk oda ›s››nda inkubasyona b›rak›ld›.

Yukarıdaki yıkama işlemi aynen tekrarlandı.

100 µl kromojen/substrat solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapat›larak 15 dk oda ›s››nda, karanlıkta inkubasyona b›rak›ld›.

100 µl durdurma solüsyonu (0.5 M sülfürik asit) her kuyucuğa pipetlendi.

Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 30 dk içinde kuyucuklardaki renk yoğunluğu görsel ve 450 nm'de (620 nm referans dalga boyu olmak üzere) daha önceden kit üreticisinin önerdiği şekilde programlanmış olan “Organon Technica Microwell system” ELISA otomatik plak okuyucuda fotometrik olarak okutulup değerlendirildi.

Referans değerlerin eşik değeri (cut-off değeri) 20 rölatif ünite (RU)/ml, bu değerin alt›ndaki sonuçlar negatif, üzerindeki değerler de pozitif kabul edildi. Pozitif ve negatif kontrol serumları her çalışmada internal kontrol olarak kullanıldı.

ii. Anti-H.pylori CagA IgG ELISA

Anti-*H. pylori* CagA IgG antikorlar›, *H. pylori* antijeni (strain Lior 1, Brussels) ile kaplanmış mikrotitrasyon kuyucuklar› içeren ELISA (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck) testi ile araştırıldı.

Serum örnekleri örnek tamponu ile 1:101 oranında (10 µl serum 1.0 ml örnek tamponu) dilüe edildi, karıştırıldı. Kalibrasyon ve kontrol serumları kullanıma hazır olduğundan dilüe edilmedi.

Test Prosedürü:

Kalibrasyon serumları, pozitif ve negatif kontrol, dilüe edilmiş hasta serumları 100'er µl olmak üzere uygun kuyucuklara pipetlendi. Kuyucuklar›n üzeri kapat›larak 30 dakika oda ›s››nda inkubasyona b›rak›ld›.

Kuyucuklar üç kez, 300'er µl yıkama tamponu (10X) ile yıkandı.

100 µl enzim konjugat (peroksidazla işaretli anti-insan IgG) her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Yukarıdaki yıkama işlemi aynen tekrarlandı.

100 µl kromojen/substrat solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 15 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

100 µl durdurma solüsyonu (0.5 M sülfürik asit) her kuyucuğa pipetlendi.

Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika içinde kuyucuklardaki renk yoğunluğu görsel ve 450 nm'de (620 nm referans dalga boyu olmak üzere) daha önceden kit üreticisinin önerdiği şekilde programlanmış olan "Organon Technica Microwell system" ELISA otomatik plak okuyucuda fotometrik olarak okutulup değerlendirildi.

Referans değerlerin eşik değeri (cut-off değeri) 20 RU/ml, bu değer altındaki sonuçlar negatif, üzerindeki de pozitif kabul edildi. Pozitif ve negatif kontrol serumları her çalışmada internal kontrol olarak kullanıldı.

iii. Anti-H. pylori IgG Western Blot

MANUEL:

H. pylori'ye karşı antikorları in-vitro kalitatif olarak saptamak amacıyla test striplerinde *H. pylori*'nin elektroforezle ayrılmış antijen (whole antijen, SDS ekstraktı) ekstraktlarını içeren Western blot (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck) yöntemi kullanıldı.

Serum örnekleri 1:51 oranında (30 µl serum 1.5 ml örnek tamponu) tampon solüsyonu ile dilüe edildi. Tampon solüsyonu 1:10 oranında distile su ile, enzim konjugat 1:10 oranında tampon solüsyonu ile dilüe edildi, substrat solüsyonu kullanıma hazır olduğundan dilüe edilmedi.

Tek kullanımlı, kanallı inkübasyon treyi numaralandırıldı ve her bir kanala 1.5 ml tampon solüsyonu konuldu. Test stripleri her kanala yerleştirildi. 15 dakika oda sıcaklığında otomatik çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra tüm sıvı aspire edildi.

Her bir kanala 1.5 ml dilüe edilmiş serum örnekleri konularak oda ısısında 30 dk inkübe edildi.

Tüm kanallardaki s>v> aspire edilip her bir kanal 1.5 ml tampon solüsyonu ile 3x5 dakika çalkalanarak y>kand>.

1.5 ml dilüe enzim konjugat (alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş anti-insan IgG) her bir kanala pipetlendi, oda »s>s>nda 30 dakika inkube edildi.

Tüm kanallardaki s>v> aspire edildi ve her bir kanal 1.5 ml tampon solüsyonu ile 3x5 dakika çalkalanarak y>kand>.

1.5 ml substrat solusyonu inkubasyon treyindeki kanallara pipetlendi. 10 dakika oda »s>nda inkube edildi.

Tüm kanallardaki s>v> aspire edildi ve her strip 3 kez distile su ile y>kand>.

Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması: Stripler değerlendirme ve saklama kağıtlarına yerleştirildi. Elde edilen bant paternleri ve özellikleri kontrol stripleri ile değerlendirildi.

Euroblot Master Cihaz> Kullan>larak Yap>lan Western blot:

H. pylori'ye karşı antikorları in-vitro kalitatif olarak saptamak amac> ile test striplerinde *H. pylori*'nin elektroforezle ayrılmış antijen (whole antijen, SDS ekstraktı) ekstraktlarını içeren Western blot (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck) yöntemi kullan>ld>.

Son 14 hastan>n Western blot yöntemi EUROIMMUN Model: Euroblot Master (Seri No: 0207-1043) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Cihazda A, B, C, D, E, F şeklinde kanallar bulunmaktaydı ve her kanalın ucunda bir şişe bulunmaktaydı. Şişelerin hepsi ilk önce distile sudan geçirildi.

Tampon solüsyonu 1:10 oran>nda distile su ile dile edildikten sonra cihazın A şişesine konuldu, enzim konjugat 1:10 oran>nda tampon solüsyonu ile dilüe edildikten sonra cihaz>n C şişesine konuldu, substrat solüsyonu kullan>ma hazır olduğundan dilüe edilmeden direkt olarak cihazın E şişesine konuldu. Cihazın F şişesine distile su konulduktan cihaz çalışacağımız testin moduna uygun olarak prosedürüne göre ayarlandı. Cihaz ayarları yap>ld>ktan sonra tek kullan>ml>, kanall> inkübasyon treyi numaraland>r>ld> ve cihaza yerleştirildi. Çalışma başlatıldı. Bu aşamadan sonraki tüm basamaklar manuel çalışma ile ayn>yd>.

Tablo 5. Western blot yöntemi ile saptanan bant paternleri ve özellikleri *

Bant	Antijen	Özgülük
120 kDa	CagA, p120	Sitotoksin A ile ilişkili protein, yüksek düzeyde özgül
95 kDa	VacA, p95	Vakuolizan sitotoksin A, yüksek düzeyde özgül
75 kDa	p75	Özgül değil
67 kDa	FSH, p67	Flajellar kılıf proteini, diğer bakterilerle çapraz reaksiyon verdiği için özgül değil
66 kDa	UreB, p66	Ağır üreaz subünitesi, diğer bakterilerin üreazlarıyla çapraz reaksiyon verdiği için özgül değil
57 kDa	HSP homolog, p57	Isı şok protein homoloğu, özgül değil
54 kDa	Flagellin, p54	Flagellin, diğer bakterilerin flagellaları ile çapraz reaksiyon verdiği için özgül değil
50 kDa	p50	Özgül değil
41 kDa	p41	Özgül değil
33 kDa	p33	Olası özgül
30 kDa	OMP, p30	Dış membran proteini. Türe özgül
29 kDa	UreA, p29	Hafif üreaz alt ünitesi, yüksek düzeyde özgül
26 kDa	p26	Yüksek düzeyde özgül
19 kDa	OMP, p19	Dış membran proteini. Türe özgül
17 kDa	p17	Olası özgül

*EUROIMMUN (Medizinische Labordiagnostika, Lübeck)

H. pylori antijenleri test prosedürüne göre genel olarak üç sınıfa ayrıldı (Tablo 6).

Tablo 6. *H. pylori*'ye özgün antijenlerin sınıflandırılması *

Sınıf	Antijenler
1	Çapraz-reaksiyon ve tanımlanamayan antijenler ile molekül ağırlığı 41 kDa, 50 kDa, 54 kDa, 57 kDa, 67kDa ve 75 kDa olanlar
2	Molekül ağırlığı 66 kDa (üreaz B) olan antijen
3	Türe özgül ve yüksek düzeyde özgül antijenler: molekül ağırlıkları 17 kDa, 19 kDa, 26 kDa, 29 kDa, 30 kDa, 33 kDa, 95 kDa ve 120 kDa

*EUROIMMUN (Medizinische Labordiagnostika, Lübeck)

IgG Antikor Sonuçlarının Değerlendirilmesi:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarlar› Doku Tiplendirme Laboratuvar›nda bulunan bilgisayardaki EUROIMMUN EuroLineScan Versiyon 3.1.25 software programı kullanılarak önce kontrol stripi bilgisayara bağlı tarayıcı (scanner) ile bilgisayara tanıtıldı› daha sonrada hasta numaralar› ve strip numaralar› bilgisayara girildikten sonra yeşil renkli kağıda tüm stripler sırasıyla yapıştırıldı ve yeniden bilgisayara bağlı tarayıcı (scanner) ile bilgisayara yüklendi. Tüm hasta sonuçları kontrol stripine göre karşılaştırılarak; pozitif, negatif ve belirsiz sonuç değerlendirilmesi otomatize olarak yapıldı ve her bir hastanın antijenik dağılım profilide bilgisayar çıktısı olarak alındı. Ayrıca sonuçlar prospektüste yazan prosedürüne uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi manuel olarakta değerlendirildi.

H. pylori Western blot sonuçlar› test prosedürüne göre negatif, belirsiz veya pozitif olarak üç sınıfta gösterildi (Tablo 7).

Tablo 7. Western blot değerlendirme kriterleri*

Sonuçlar	Özellikleri
Negatif	Antijen band› yok veya kategori 1 ve 2'den baz› antijen bantlar›nın zayıf yoğunluğu veya kategori 3' den bir tek zayıf antijen bandı (değerlendirme protokolünde sınıf 3'deki antijenler gri gösterilmiştir)
Belirsiz	Sınıf 3'den diğerlerinden ayrılabilen bir antijen bandı veya sınıf 3' ten en az iki zayıf antijen bandı (değerlendirme protokolünde sınıf 3' deki antijenler gri gösterilmiştir)
Pozitif	Sınıf 3' den diğerlerinden ayrılabilen en az iki antijen bandı (değerlendirme protokolünde sınıf 3' deki antijenler gri gösterilmiştir)

*EUROIMMUN (Medizinische Labordiagnostika, Lübeck)

iv. H. pylori IgA/IgG ELISA:

Anti-*H. pylori* IgA ve IgG antikorları, saflaştırılmış *H. pylori* bakteriyel antijeni (strain Lior 1, Brussels) ile kaplanmış kuyucukları içeren *H. pylori* IgA/IgG ELISA (BIOHIT, Finland) testi ile araştırıldı.

Serum örnekleri örnek dilüsyon tamponu ile 1:200 oranında (5 µl+995 µl) dilüe edildi, karıştırıldı. Kalibrasyon ve kontrol serumları kullanıma hazır olduğundan dilüe edilmedi.

Yıkama tamponu (10X) 1:10 (örnek;100ml+900ml) oranında distile su ile dilüe edildi, karıştırıldı.

Konjugant 1:100 (örnek; 40 µl+ 3960 µl) oranında dilüsyon tamponu ile dilüe edildi, karıştırıldı.

Test Prosedürü:

Kalibratörler 1-4 (CAL-1-CAL-4), pozitif kontrol ve dilüe edilmiş serumlar dublike olarak 100'er µl olmak üzere kuyucuklara pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 30 dakika 37°C'de inkubasyona bırakıldı.

Kuyucuklar üç kez, 350'şer µl dilüe edilmiş yıkama tamponu (10X) ile yıkandı. 100 µl dilüe edilen konjugat solüsyonu (Horseradish peroksidaz işaretli anti-insan IgG ve IgA kombinasyonu) her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 30 dakika 37°C'de inkubasyona bırakıldı.

Birinci basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.

100 µl substrat solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkubasyona bırakıldı (İnkübasyon süresi substrat solüsyonu ilk kuyucuğa pipetlendikten sonra başlar).

100 µl durdurma solüsyonu (0.1 M sülfürik asit) her kuyucuğa pipetlendi.

Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika içinde kuyucuklardaki renk yoğunluğu görsel ve 450 nm'de "Organon Technica Microwell system" ELISA otomatik plak okuyucusunda fotometrik olarak okutuldu.

Değerlendirme:

H. pylori IgA/IgG ELISA (BIOHIT, Finland) absorbans değerleri >30 EIU (enzim immun ünitesi) ise pozitif <30 EIU ise negatif olarak değerlendirildi.

5.4. İdrar Örneklerinin Alınması, Saklanması

Endoskopi ile eş zamanlı olarak idrar örnekleri alındı. Her hastadan alınan 35-50 ml idrar örnekleri steril idrar kapları içerisinde +4°C'de çalışılana dek saklandı.

5.4.1. Hasta Örneklerine Yöntemlerin Uygulanması

i. Anti-H. pylori IgG URINELISA:

Anti-*H. pylori* IgG antikorları, *H. pylori* antijeni ile kaplanmış mikrotitrasyon kuyucukları içeren ELISA (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) testi ile idrarda araştırıldı.

Test prosedürü:

Bütün reaktifler ve idrar örnekleri 20-30°C'ye getirildi.

Yıkama solüsyonu hazırlandı.

Antijen kaplı mikrokuyucuklu plağın bulunduğu alimünyum kaplı poşeti açıldı ve test için gereken kadar kuyucuk alındı. Gerekmeyen kuyucuklar yalnızca kurutucu madde içeren alimünyum poşetin içine yeniden koyuldu ve 2-8°C'de saklandı.

Verileri ve plak haritasını kullanarak test örnekleri ve kontrol için kuyucukların pozisyonu doğrulandı.

Balon oluşumuna izin vermemek için yavaşça karıştırıldıktan sonra, plaktaki her bir kuyucuğa 25µL Tris tamponu eklendi.

3 negatif kontrol, 2 pozitif kontrol ve idrar örnekleri her bir kuyucuğa 100µL eklendi.

Plak bandı ile plak kapatıldı, birkaç saniye tray mixer kullanılarak karıştırıldı ve sonra karıştırmadan 60 dakika 37°C'de plak inkübe edildi.

Konjugat solüsyonunun gereken miktarı hazırlandı.

Sıçramaya izin vermeden plaktan bant uzaklaştırıldı. Plaktaki kuyucuklar tamamen sıvı aspirasyonundan sonra, çoklu kanallı pipet ile yıkama solüsyonu eklendi (100 µL) ve aspire edildi. Üç kez yıkama ve aspirasyon basamağı tekrarlandı. Kağıt havluda hafifçe kurulandı.

Plağın her bir kuyucuğuna 100µL konjugat solüsyonu dağıtıldı.

Plak bandı ile plak kapatıldı ve sonra karıştırmadan 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.

Gereken miktarda substrat solüsyonu hazırlandı.

Sıçramaya izin vermeden plaktan band uzaklaştırıldı. Plaktaki kuyucuklar tamamen sıvı aspirasyonundan sonra, çoklu kanallı pipet ile yıkama solüsyonu eklendi (100 µL) ve aspire edildi. Üç kez yıkama ve aspirasyon basamağı tekrarlandı. Kağıt havluda hafifçe kurulandı.

Plağın her bir kuyucuğuna 100 µL substrat solüsyonu dağıtıldı.

Karıştırmadan 15 dakika 20-30°C'de plak inkübe edildi.

Plağın her bir kuyucuğuna 100 µL durdurma solüsyonu dağıtıldı.

Plak okuyucu kullanılarak 450 nm'de her birinin absorbanı ölçüldü.

ii. RAPIRUN:

H. pylori'ye karşı oluşan IgG antikorları bir immünokromotografik test olan RAPIRUN (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) testi ile idrar örneklerinde araştırıldı.

Test prosedürü:

Aliminyum kaplanmış poşetten kaset test çıkarıldı. Plastik pipet kullanılarak idrar örneklerinin yaklaşık olarak 0.5 ml'si alındı ve örnek diluentini içeren örnek diluent tübüne idrar örneği transfer edildi. Sonra aynı plastik pipet kullanılarak pipetleme ile karıştırıldı (yaklaşık olarak 2 kat dilüsyon).

Aynı plastik pipet kullanılarak dilüe edilen örneğin 0.2-0.3 ml'si alındı ve kaset test üzerindeki örnek penceresine (S) damlatıldı.

20 dakika 15-30°C enkübasyondan sonra görsel olarak test bölgesi ve kontrol bölgesindeki band oluşumu değerlendirildi.

Sonuçların yorumlanması:

1. Eğer kırmızı renkli bant hem test bölgesinde (T) hem de kontrol bölgesinde (C) 20 dakika içerisinde gözleniyorsa, test sonucu anti-*H. pylori* antikorları için pozitif olarak değerlendirildi.
2. Eğer yalnızca kontrol bölgesinde (C) kırmızı renkli bant görülürse, test sonucu anti-*H. pylori* antikorları için negatif olarak değerlendirildi.
3. Eğer kontrol bölgesinde kırmızı renkli bant gözlenmezse, test sonucu geçersiz olarak değerlendirildi (Şekil 2)



Şekil 2. RAPIRUN sonuçlarının değerlendirilmesi **A.** RAPIRUN pozitif sonuç, **B.** RAPIRUN negatif sonuç

5.5. KÜLTÜR OPTİMİZASYONU

5.5.1. Kültür Besiyerleri:

i. *H. pylori* Seçici Besiyeri I (BSA-Kan içermeyen):

- Columbia Agar 8.6 gr/ml
- Aktif Kömür 1 gr. (%0.5)
- BSA 1 gr. (%0.5)
- *H. pylori* antibiyotik supplement 1 vial
- Amfoterisin B 1 mg.
- Distile su 200 ml.

200 ml besiyeri için

200 ml. distile su içerisinde tartılan Columbia agar (Acumedia, Maryland Baltimore) ve aktif kömür (Carbon Medicinale, Galerik Ecza Deposu, İzmir) ilave edildi. İyiçe homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav derecesi 50 °C’ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı ve BSA (Sigma, St. Louis, USA) 5 ml. distile su içerisinde eritildi ve tek kullanımlık filtreler ile besiyerine ilave edildi. Son olarak 2ml steril distile su içerisinde eritilen *H. pylori* Antibiyotik Supplement (Campylobacter Selective Supplement, Merck) besiyerine eklendi ve besiyeri petrilere alev

yanında eşit olarak paylaştırıldı. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için plaklar 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolabında +4 °C’de saklandı.

ii. H. pylori Seçici Besiyeri II (%5’lik Defibrine insan kanı-Çikolatalı besiyeri):

- Columbia Agar 7.74 gr/ml
 - Aktif Kömür 1 gr. (%0.5)
 - Taze insan kanı 10 ml.
 - *H. pylori* antibiyotik supplement 1 vial
 - Amfoterisin B 1 mg.
 - Distile su 190 ml.
- 200 ml besiyeri için**

190 ml distile su içerisine tartılan Columbia agar (Acumedia, Maryland Baltimore) ve aktif kömür (Carbon Medicinale, Galerik Ecza Deposu, İzmir) ilave edildi. İyiye homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav derecesi 50 °C’ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı ve 10 ml insan kanı ve 2 ml steril distile su içerisinde eritilen *H. pylori* Antibiyotik Supplement (Campylobacter Selective Supplement, Merck) besiyerine ilave edildi. Besiyeri benmari içerisinde 80 °C’de 15 dakika bekletilerek kan yavaşça hemoliz edildi. Besiyeri tekrardan 50 °C’ye gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra besiyeri petrilere alev yanında eşit olarak paylaştırıldı. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için plaklar 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolabında +4 °C’de saklandı.

iii. H. pylori Seçici Besiyeri III (%5’lik insan kanı):

- Columbia Agar 7.8 gr/ml
 - Aktif Kömür 1 gr. (%0.5)
 - Taze defibrine insan kanı 10 ml.
 - *H. pylori* antibiyotik supplement 1 vial
 - Amfoterisin B 1 mg.
 - Distile su 190 ml.
- 200 ml besiyeri için**

190 ml. distile su içerisine tartılan Columbia agar (Acumedia, Maryland Baltimore) ve aktif kömür (Carbon Medicinale, Galerik Ecza Deposu, İzmir) ilave edildi. İyiye homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav derecesi 50 °C’ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı ve 10 ml defibrine insan

kan› ve 2 ml steril distile su içerisinde eritilen *H. pylori* Antibiyotik Suplement (Campylobacter Selective Supplement, Merck) besiyerine ilave edildi. Daha sonra besiyeri petrilere alev yanında eşit olarak paylaştırıldı. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için plaklar 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolab›nda +4 °C’de saklandı (128).

iv. H. pylori Seçici Besiyeri IV (İnsan Serumlu):

- Columbia Agar 8.6 gr/ml
 - Aktif Kömür 1 gr. (%0.5)
 - İnsan serumu 20 ml.
 - *H. pylori* antibiyotik supplement 1 vial
 - Amfoterisin B 1 mg.
 - Distile su 180 ml.
- } **200 ml besiyeri için**

180 ml. distile su içerisine tartılan Columbia agar (Acumedia, Maryland Baltimore) ve aktif kömür (Carbon Medicinale, Galerik Ecza Deposu, İzmir) ilave edildi. İyiçe homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav derecesi 50 °C’ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı ve tek kullanımlık filtre ile steril edilen 56 °C’de 30 dakika su banyosunda inaktive edilen 20 ml insan serumu ve 2 ml steril distile su içerisinde eritilen *H. pylori* Antibiyotik Suplement (Campylobacter Selective Supplement, Merck) besiyerine ilave edildi. Daha sonra besiyeri petrilere alev yanında eşit olarak paylaştırıldı. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için plaklar 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolab›nda +4 °C’de saklandı (128).

v. %7 At Kan› Helicobacter pylori Seçici Besiyeri V:

- Columbia Agar 19.5 gr/ml
 - Defibrine at kan› 35 ml.
 - *H. pylori* Selective Supplement (DENT) 1 vial
 - Distile su 465 ml.
- } **500 ml besiyeri için**

465 ml. distile su içerisine 19.5 gr olarak tartılan Columbia agar (Acumedia, Maryland Baltimore) ilave edildi. İyiçe homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav derecesi 50 °C’ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı ve 35 ml steril defibrine at kan› (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) ve 2

ml. steril distile su içerisinde eritilen *H. pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid) besiyerine ilave edildi. Daha sonra besiyeri petrilere alev yanında eşit olarak paylaştırıldı. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için plaklar 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolabında +4 °C’de saklandı.

vi. %7 Koyun Kanlı H. pylori Seçici Besiyeri VI:

- Columbia Agar 19.5 gr/ml
- Defibrine koyun kanı 35 ml.
- *H. pylori* Selective Supplement (DENT) 1 vial
- Distile su 465 ml.

} 500 ml besiyeri için

465 ml. distile su içerisine 19.5 gr olarak tartılan Columbia agar (Acumedia, Maryland Baltimore) ilave edildi. İyiçe homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav derecesi 50 °C’ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı ve 35 ml steril defibrine koyun kanı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) ve 2 ml steril distile su içerisinde eritilen *H. pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid) besiyerine ilave edildi. Daha sonra besiyeri petrilere alev yanında eşit olarak paylaştırıldı. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için plaklar 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolabında +4 °C’de saklandı.

5.5.2. Transport Besiyeri:

İlk önce fosfat buffer saline (PBS) hazırlandı. PBS A ve B solüsyonlarının karışımı ile elde edildi.

Stok A solüsyonu: 0.2 mol/l 3.12 gr Monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{POH}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) solüsyonu 100ml distile su ile karıştırıldı ve stok solüsyon hazırlandı.

Stok B solüsyonu: 0.2 mol/l 1.17 gr dibasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{POH}\cdot 12\text{H}_2\text{O}$) solüsyonu 100 ml distile su ile karıştırıldı ve stok solüsyon hazırlandı.

A solüsyonundan 28 ml ve B solüsyonundan 72 ml karıştırıldı ve üzerine 100 ml distile su ve 1.8 gr NaCl (9gr/l) eklenerek 200 ml PBS (pH=7.2) hazırlandı ve pH’ı pH metre ile kontrol edildi Hazırlanan PBS üzerine 0.8 gr (% 0.4) jelatin eklendi ve 15 dakika 121 °C’de

otoklavda steril edildi. Hazırlanan besiyeri steril ependorflara 1'er ml paylaştırıldı ve +4°C'de saklandı.

5.5.3. Stok Besiyeri (%20 gliserollü):

Son hacim 100ml olacak şekilde önce 30 ml distile su 20 ml gliserol ile karıştırılarak % 40'lik gliserol solüsyonu hazırlandı. Solüsyon 15 dakika 121°C'de otoklavda steril edildi. Başka bir yerde de, 100ml için BHI buyyon tartıldı ve 40 ml distile suda eritildi. Besiyeri 15 dakika 121°C'de otoklavda steril edildi. Hazırlanan bu solüsyonlar birbiri ile karıştırıldı ve üzerine 56 °C'de 30 dakika su banyosunda enkübe edilerek inaktive edilen steril insan serumundan 10 ml eklendi. Hazırlanmış olan stok besiyeri steril ependorflara 1'er ml olacak şekilde paylaştırıldı ve +4°C'de buzdolabında saklandı (129).

5.5.4. Karbol Fuksin Boyasının Hazırlanması:

Tartılan 3 gr bazik fuksin tozu 100 ml %95'lik etanol içerisinde çözüldü. Başka bir yerde ise 45 gr fenol kristali 900 ml distile su içerisinde çözüldü. Ayrı olarak hazırlanan iki solüsyon birbirleri ile karıştırıldı. Hazırlanan boya Watmann süzme kağıdı yardımı ile filtre edildi ve koyu renkli bir şişede ışık almayacak şekilde saklandı (130).

5.5.5. H. pylori Kontrol Standart Suş:

Pozitif kontrol olarak kullanılan standart suş NCTC 11637 kolonileri BHI buyyon ve fetal kalf serum (FCS) içeren suş besiyeri içerisinde süspanse şeklinde ve % 7 koyun kanlı Columbia agara pasajlanmış şekilde Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Müge Demirbilek tarafından temin edildi.

i. Kültür Protokolü:

BHI buyyon ve FCS içeren sıvı besiyeri içerisinde süspanse şekilde ve % 7 koyun kanlı Columbia agara pasajlanmış şekilde laboratuvara gelen NCTC 11637 standart suşunun kolonilerinin pasaj %10 insan serumlu Columbia agar (Oxoid), %7 at kanlı Columbia agar

(Oxoid) ve %7 koyun kanlı Columbia agar (Oxoid) besiyerlerine yapıldı. Ekim yapılan plaklar 3-7 gün 37 °C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroerofilik koşullarda enkübe edildi. Üreyen koloniler tekrardan %10 insan serumlu Columbia agar, %7 at kanlı Columbia agar ve % 7 koyun kanlı Columbia agar besiyerlerine pasajlanarak subkültürleri yapıldı. Ayrıca kolonilerin oksidaz, üreaz, katalaz testlerine bakıldı ve Gram boyama ve modifiye karbol fuksin boyama yapıldı. Subkültürden üreyen koloniler stok besiyeri (% 20 gliserollü BHI buyyon) ile homojenize edilerek -80 °C'de saklandı.

5.5.6. H. pylori Suşları Üzerine Stok Besiyerlerinin Etkinliğinin Araştırılması:

H. pylori suşlarının stoklanması sırasında bakterinin bütünlüğünün korunması için stok besiyeri içerisine % 20 gliserol eklendi. Çalışmamızın bu kısmında % 20 gliserol dışında cryopreservative solusyonların [Dimetil Sulfoksit (DMSO), Poly Etilen Glikol (PEG), sakkaroz gibi] *H. pylori* hücrelerinin bütünlüğünün korunması üzerine etkinliğini araştırıldı (131).

i. %5 DMSO'lu Stok Besiyeri:

20 ml besiyeri için 0.74 gr BHI buyyon tartıldı ve 17 ml distile su ile karıştırıldı ve 15 dakika 121°C'de otolavda steril edildi. Besiyeri soğuduktan sonra 1 ml steril olmayan DMSO ve 2 ml steril insan serumu (30 dakika 56 °C'de inaktive edilen) ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril ependorf tüplere 0.5'şer ml dağıtıldı.

ii. %5 PEG'li Stok Besiyeri:

20 ml besiyeri için 0.74 gr BHI buyyon tartıldı ve 17 ml distile su ile karıştırıldı ve 15 dakika 121°C'de otolavda steril edildi. Besiyeri soğuduktan sonra 1 ml filtre ile steril edilen PEG ve 2 ml steril insan serumu (30 dakika 56 °C'de inaktive edilen) ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril ependorf tüplere 0.5'şer ml dağıtıldı.

iii. %20 Gliserollü Stok Besiyeri:

20 ml besiyeri için 0.74 gr BHI buyyon tartıldı ve 8 ml distile su ile karıştırıldı ve ayrı bir yerde de 6 ml distile su ile 4 ml gliserol karıştırıldı ve 15 dakika 121°C'de otolavda steril edildi. Hazırlanan iki solüsyonda soğuduktan sonra karıştırıldı ve karışımın üzerine 2 ml steril insan serumu (30 dakika 56 °C'de inaktive edilen) ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril ependorf tüplere 0.5'şer ml dağıtıldı.

iv. %20 Gliserollü ve 0.3 M Sakkarozlu Stok Besiyeri:

20 ml besiyeri için 0.74 gr BHI buyyon tartıldı ve 6 ml distile su ile karıştırıldı ve ayrı bir yerde de 6 ml distile su ile 4 ml gliserol karıştırıldı ve 15 dakika 121°C'de otolavda steril edildi. 2 ml distile su içinde 2 gr 0.3 M sakkaroz çözüldü ve 0.45 µm por çaplı filtre ile steril edildi. Hazırlanan üç solüsyonda soğuduktan sonra karıştırıldı ve karışımın üzerine 2 ml steril insan serumu (30 dakika 56 °C'de inaktive edilen) ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril ependorf tüplere 0.5'şer ml dağıtıldı.

Bakteri Stoklama Protokolü:

72 saat içerisinde üreyen NCTC 11637 kontrol standart suşunun *H. pylori* kolonileri bir öze yardımı ile toplandı ve 20 ml PBS ile McFarland 3 bulanıklığında bakteriyel süspansiyon hazırlandı ve Gram boyama ve Modifiye karbol fuksin boyama yapılarak 15 saniyede kokoid formu olup olmadığı kontrol edilerek hepsinin tipik *H. pylori* basil formu olduğu gözlemlendi. Boyanan preparatlar x100'lük büyütmede ışık mikroskopunda (Olympus) incelendi (130).

Buzdolabında +4°C'de saklanan daha önceden hazırlanan stok besiyerleri oda sıcaklığına getirildi ve stok besiyerlerini içeren bütün ependorflara 100 µl bakteriyel süspansiyondan ilave edildi. Besiyerleri 1 dakika vortekslelendikten sonra bir kısım -20°C'ye bir kısım da -80°C'ye kaldırıldı. Stoklama tarihinden 1 ay sonra stoklanmış *H. pylori* stok besiyerleri eritildi. Stoklanan bakteriyel süspansiyonların her birinden 10'ar µl alındı ve steril ependorf içerisinde bulunan 990 µl steril PBS ile karıştırıldı. Bakteriyel süspansiyon 100 kat dilüe edilmiş oldu ve 100 kat sulandırılmış süspansiyonlardan 10'ar µl alındı ve steril ependorf içerisinde bulunan 990 µl steril PBS ile tekrardan karıştırıldı. Son dilüsyonlardan 10'ar µl

steril pipet yardımıyla alınarak %10 insan serumlu Columbia agar (Oxoid) besiyerine aktarıldı ve ekimi yapıldı. Ekim yapılan plaklar GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak 3gün 37°C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde mikroerofilik ortamda enkübe edildi. Üreyen koloniler kantitatif olarak değerlendirildi (131).

5.5.7. Koloniden Bakteri DNA'sının Ekstraksiyonu

Kültür ile üretilen *H. pylori* standart NCTC 11637 suşu DNA'sı High Pure PCR Template Preparation Kit (Roch Applied Science)'i kullanılarak ekstraksiyonu yapıldı.

i. Örneğin Hazırlanması:

%7 at kanı içeren taze hazırlanmış *H. pylori* Selective Supplement (Oxoid SR 0147E) eklenmiş Columbia agar içeren plakta üremiş *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu bir öze yardımı ile 5 ml PBS içeren steril tüpe toplandı. PBS içerisinde 10^9 sayıda bakteri olacak şekilde süspansiyon edildi. Hazırlanan süspansiyonun optik dansitesi (OD) mikropalak kullanılarak 600 nm'de OD 1 olacak şekilde spektrofotometrede ölçüldü.

ii. Örneklerin Lizisi ve DNA Bağlanması:

1. Hazırlanan bakteri süspansiyonununun 200 µl'si 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 200 µl PBS eklendi. İyice karıştırıldı.
2. Örnek üzerine 5 µl lizozim eklendi. Daha önceden 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika inkübe edildi.
3. Su banyosunun sıcaklığı 70 °C'ye çıkarıldı. Elution Buffer kullanılmaya kadar 70 °C'de su banyosunda bekletildi. 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K karıştırılarak bir karışım (240 µl) hazırlandı. Bu iki maddenin karıştırılmasının nedeni homojenizasyonu tam olarak sağlamaktır. Örnek üzerine hazırlanan karışım eklendi ve 70 °C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildi.
4. Su banyosundan çıkan örnek üzerine 100 µl Isopropanol alkol ilave edildi ve karıştırıldı.
5. Toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş olan saflaştırma kolonuna tüm örnekler eklendi ve kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi.

Safılaştırma kolonunun üzerine 500 µl İnhibitör Removal Buffer ortamdaki DNAase gibi inhibitörleri uzaklaştırmak için eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve safılaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirdi.

Safılaştırma kolonunun üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve safılaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirdi.

Safılaştırma kolonunun üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve safılaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirdi. Safılaştırma tüpünün kapağı kapatılarak kolonun daha iyi kuruması için 10 saniye son hız santrifüj edildi.

Safılaştırma tüpünün altına 1.5 ml hacimli ependorf tüpü yerleştirdi. Safılaştırma tüpünün üzerine 70 °C'de tutulan Elution Buffer'dan 200 µl eklendi ve kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda safılaştırma tüpü atıldı. 1.5 ml ependorf tüpü içinde toplanan örnek ekstrakte edilen DNA'dır.

Ekstrakte edilen DNA örneği +4 °C'de saklandı. Örnek daha sonra uzun süre saklanmak üzere çalışılmaya dek -20 °C' ye kaldırıldı.

5.5.8. Parafine Gömülü Dokudan Bakteri DNA'sının Ekstraksiyonu

Parafine gömülü gastrik dokudan bakteri DNA'sı High Pure PCR Template Preparation Kit (Roch Applied Science)'i kullanarak ekstraksiyonu tarafından yapıldı.

i. Örneğin Hazırlanması:

Daha önceden FISH çalışması yapılan pozitif ya da negatif olduğunu bildiğimiz hastaların antrum ve korpus kesitlerini ependorflar içerisinde Patoloji Anabilim Dalından sağlandı.

- 3+ Duyarlı Antrum ve Korpus gastrik biyopsi örneği (Patoloji No:8291)
- 3+ Dirençli Antrum ve Korpus gastrik biyopsi örneği (Patoloji No:8899)
- Negatif Antrum ve Korpus gastrik biyopsi örneği (Patoloji No:7598)

ii. *Etanol Serilerinin Hazırlanması:*

Kit prosedürünü uygulamaya başlamadan önce dokulardan parafini uzaklaştırmak için kullanılacak olan %100, %80, %60 ve %40 etanol serileri hazırlandı.

%100 etanol serisi için : 1000 µl. etanol ependorf içine koyuldu

%80 etanol serisi için : 800 µl. etanol + 200 µl. double distile su karışımı ependorf içine koyuldu

%60 etanol serisi için : 600 µl. etanol + 400 µl. double distile su karışımı ependorf içine koyuldu

%40 etanol serisi için : 400 µl. etanol + 600 µl. double distile su karışımı ependorf içine koyuldu

iii. *Örneklerin Lizisi ve DNA Bağlanması:*

1. Ependorf içerisine 1000 µl ksilol ilave edildi ve parafine gömülü dokuların bir kısmı ksilol içerisine alındı. Diğer ependorfta kalan dokular üzerinde 1000 µl ksilol ilave edildi. Böylece her hasta için iki adet örnek hazırlanmış oldu. Dokular ksilol içinde 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinden sonra ksilol dokulardan uzaklaştırıldı.
2. Her örnek üzerine 500 µl etanol serileri sıra ile ilave edildi. Örnekler her seride 10'ar saniye bekletildi. Örnekler her seride bekletildikten sonra pipet yardımı ile etanol uzaklaştırıldı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra örneklerin üzerine 500 µl double distile su ilave edildi (Rehidratasyon için) ve 10 saniye bekletildi. Bekleme süresinden sonra su uzaklaştırıldı.
3. Her örnek için 200 µl Tissue Lysis Buffer + 40 µl Proteinaz K karışımı hazırlandı (Mix hazırlanmasının nedeni homojenizasyon için). Hazırlanan mix'ten her örnek üzerine 240 µl ilave edildi. Su banyosu 37 °C'ye ayarlandı ve örnekler 37 °C'de üç saat inkübasyona bırakıldı.
4. Inkübasyon bittikten sonra örneklerin üzerine 20'şer µl Proteinaz K ilave edildi. Su banyosunun derecesi 55 °C'ye ayarlandı ve örnekler bir saat inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 200 µl Binding Buffer eklendi ve iyice karıştırıldı. Su banyosunun derecesi 70 °C'ye ayarlandı ve örnekler on dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonunda örnekler üzerine 100 µl Isopropil alkol ilave edildi ve iyice karıştırıldı.
7. Toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş olan saflaştırma kolonuna tüm örnekler eklendi ve kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi. Saflaştırma kolonunun üzerine 500 µl ortamdaki DNAase gibi inhibitörleri uzaklaştırmak için İnhibitör Removal Buffer eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi. Saflaştırma kolonunun üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi. Saflaştırma kolonunun üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi. Saflaştırma tüpünün kapağı kapatılarak kolonun daha iyi kuruması için 10 saniye son hız santrifüj edildi. Saflaştırma tüpünün altına 1.5 ml hacimli ependorf tüpü yerleştirildi. Saflaştırma tüpünün üzerine 70 °C'de tutulan Elution Buffer'dan 200 µl eklendi ve kapağı kapatılarak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda saflaştırma tüpü atıldı. 1.5 ml ependorf tüpü içinde toplanan örnek ekstrakte edilen DNA'dır. Ekstrakte edilen DNA örneği +4 °C'de saklandı. Örnek daha sonra uzun süre saklanmak üzere çalışılınca dek -20 °C'ye kaldırıldı.

5.5.9. Ekstraksiyonu Yapılan Örneklerin Jelde Yürütülmesi

i. Agaroz Jel Dökülmesi:

%1'lik agaroz jel hazırlandı. 32 ml 0.5ml Tris borik EDTA (TBE) mezürle ölçüldü ve 0.3 gr agaroz tartıldı. 32 ml 0.5ml TBE içerisinde tarttığımız 0.3 gr agaroz çözüldü.

Mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyene kadar ısıtıldı. Agaroz tamamen çözüldükten sonra 1.5 µl Ethidium Bromid ilave edildi. Tanka taraklar yerleştirildi ve agaroz çözeltisinin ılınmasını bekledikten sonra tankın yanından yavaş yavaş ilave edildi. 15 dakika jelin donması için beklendi. Tankın içine solüsyon olarak 0.5ml TBE ilave edildi.

ii. *Örneklerin Jele Yüklenmesi:*

Ekstraksiyonu yapılan örneklerin kısa bir spin yapılarak homojen olarak karışması sağlandı. Örnekler kuyuya yüklenirken 5 µl örnek 1 µl Loading Buffer ile karıştırılarak jeldeki kuyulara yüklendi. Örnekler 75 voltta 30 dakika yürütüldü. 30 dakika yürütmeden sonra bantlar daha iyi açılсын diye 15 dakika daha yürütme yapıldı.

iii. *Jelin Görüntülenmesi:*

Örneklerin yürütülme işlemi bittikten sonra jeldeki bantlar görüntüledi. Jeldeki bantları görüntülemek için Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmant Transilluminator) kullanıldı. Sonuç olarak parafin dokulardan ekstrakte edilen dokularda hiçbir bant gözlenmezken *H. pylori* NCTC 11637 kolonilerinden ekstrakte edilen örneklerin olduğu kuyucukta bant gözlendi. Bu ekstraksiyonu yapılan örnekler amplifikasyonu yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

5.6. İstatistiksel Analizler

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: $a+d/a+b+c+d$

Anti-*H. pylori* IgG ELISA, anti-*H. pylori* CagA (IgG) ELISA, *H. pylori* IgA/IgG ELISA, anti-*H. pylori* IgG Western blot, anti-*H. pylori* IgG URINELISA, anti-*H. pylori* IgG RAPIRUN yöntemleri ile altın standart yöntemlerin karşılaştırılmasında duyarlılık, seçicilik, olumlu ve olumsuz öngörü değeri ve tanısal doğruluk kullanıldı. McNemar Ki-kare ve Pearson Ki-kare testleri uygulandı ve Kappa değeri hesaplandı (SPSS Version 11.0 for Windows).

6. BULGULAR

6.1. Demografik Bulgular

Dispeptik yakınmalar nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 34 erkek (% 25) ve 102 kadın (% 75) toplam 136 olgunun yaş aralığı 18-83 ve SD ise 46.57 ± 12.63 olarak saptandı. Dispepsi tanısına Roma III Kriterlerine göre değerlendirildi.

6.2. HUT ve Histopatolojik Bulgular

Altın standart yöntemler olan invaziv yöntemlere göre olgular, *H. pylori* enfeksiyonu açısından değerlendirildi. Hastaların antrum ve korpus HUT, antrum ve korpus histopatolojik inceleme sonuçları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Antrum ve korpus HUT, antrum ve korpus histopatolojik inceleme sonuçları.

Hasta No	Hızlı Üreaz Testi (HUT)		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	+	+	+	+	+
55	-	-	-	-	-
56	+	+	+	+	+
57	+	-	+	-	+
58	-	-	-	-	-
59	+	+	+	+	+
60	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-
62	+	+	+	-	+
63	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
65	+	-	+	+	+
66	-	-	+	+	+
67	-	-	+	+	+
68	-	-	-	-	-
69	+	+	+	+	+
70	+	-	-	+	+
71	+	-	+	+	+
72	+	-	+	+	+
73	-	+	+	+	+
74	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-
76	+	+	+	+	+
77	-	-	-	-	-
78	+	+	+	+	+
79	+	+	+	+	+
80	-	-	-	-	-
81	+	+	-	-	+
82	-	-	-	-	-
83	+	+	+	+	+
84	-	-	-	-	-
85	-	-	+	+	+
86	+	+	+	+	+

87	+	+	+	+	+
88	-	+	+	+	+
89	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+
91	+	-	+	-	+
92	-	-	+	+	+
93	+	+	-	-	+
94	-	-	+	+	+
95	-	-	-	-	-
96	-	-	-	+	+
97	-	-	-	-	-
98	+	+	+	+	+
99	-	+	+	-	+
100	+	+	+	-	+
101	-	-	-	-	-
102	-	+	+	+	+
103	+	+	+	+	+
104	-	-	-	-	-
105	+	+	+	+	+
106	+	+	+	+	+
107	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-
109	+	+	+	+	+
110	+	+	+	+	+
111	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-
113	+	+	+	-	+
114	-	-	+	+	+
115	+	+	+	+	+
116	+	+	+	+	+
117	+	+	+	+	+
118	+	+	+	+	+
119	-	+	-	+	+
120	+	+	+	+	+
121	-	+	+	+	+
122	+	+	+	+	+
123	+	-	+	+	+
124	+	-	-	+	+
125	+	-	+	+	+
126	-	-	-	-	-
127	-	-	+	-	+
128	+	-	+	-	+
129	+	-	-	-	+
130	+	-	+	+	+
131	-	+	+	+	+
132	+	+	+	+	+

133	-	-	+	+	+
134	-	+	+	+	+
135	-	+	-	-	+
136	-	+	+	-	+

Çalışmadaki 136 hastadan 52 (%38.2)'si antrum ve korpus HUT olumlu, 22 (% 16.2) 'si antrum HUT, 14 (% 10.3)'ü korpus HUT olumlu ve 48 (% 35.3)'i HUT olumsuz saptandı.

136 hastanın histopatolojik antrum ve korpus toplam 272 biyopsi örneği gastrik aktivite açısından; yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2), ve şiddetli (grade 3) olarak Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre *H. pylori*'nin yanı sıra IM, PNL, lenfositler ve atrofi bulguları her biyopsi örneğinde incelendi.

Toplam 272 biyopsi örneğinin 165'i (% 60.7) *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 107'si (% 39.3) olumsuz saptandı. Histopatolojik incelemede 136 hastanın *H. pylori* enfeksiyonu yönünden 72 (% 52.9) 'si antrum ve korpus olumlu, 13 (% 9.6)'ü antrum olumlu, 8 (% 5.9) 'i korpus olumlu ve 43 (%31.6)'ü olumsuz saptandı.

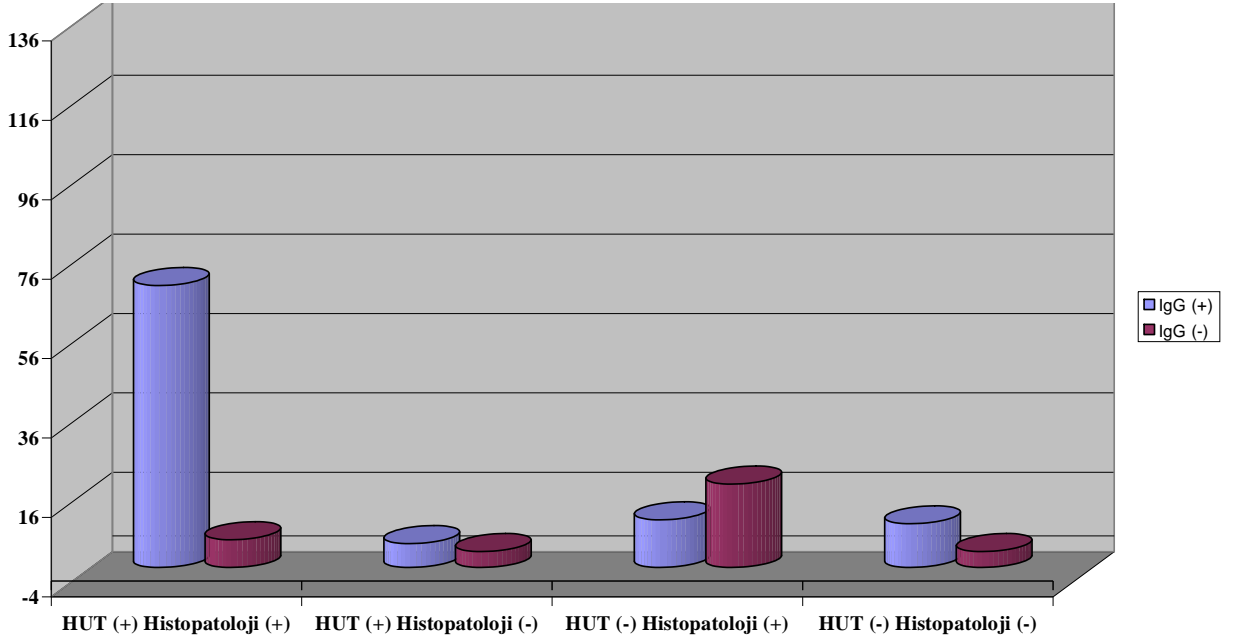
Sonuç olarak 136 hastadan 103'ü (% 75.7) her iki altın standart yönteme göre *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, kalan 33 (% 24.3) hasta *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olarak değerlendirildi.

6.3. Anti-*H. pylori* IgG ELISA Sonuçları

Çalışmaya alınan 136 hastanın 115' i (% 84.5) anti-*H.pylori* IgG ELISA testi ile olumlu, 21' i (% 15.5) olumsuz bulundu. Altın standart yönteme göre, 101 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastada 92'si (% 91.1) anti-*H. pylori* IgG ELISA olumlu, 9'u (% 8.9) anti-*H. pylori* IgG ELISA olumsuz, 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz hastada ise 23'ü (% 65.7) anti-*H. pylori* IgG ELISA olumlu, 12'si (% 34.3) anti-*H. pylori* IgG ELISA olumsuz bulundu (Şekil3).

McNemar Ki-kare testine göre; altın standart yöntemler ile Anti-*H. pylori* IgG ELISA tanıtım yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p=0.02).

Anti-*H. pylori* IgG ELISA testinin duyarlılığı % 91.1; seçiciliği % 34.3, LR 0.77, PPV % 80, NPV % 57.2 bulundu.



Şekil 3. Histopatolojik inceleme ve HUT sonuçlarına göre IgG dağılımı (Anti-*H. pylori* IgG ELISA)

6.4. Anti-*H.pylori* CagA IgG ELISA Sonuçları

Çalışmaya alınan 136 hastanın 47'si (% 34.6) anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA testi ile olumlu, 89'u (% 65.4) olumsuz bulundu. Altın standart yöntemlere göre, 101 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastanın 36'si (% 35.6) anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA olumlu, 65'i (%64.4) anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA olumsuz, *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz 35 hastanın ise 11'i (% 34.4) anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA olumlu, 24'ü (% 68.6) anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA olumsuz bulundu.

McNemar Ki-kare testine göre; altın standart yöntemler ile anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA tanım yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p=0.00).

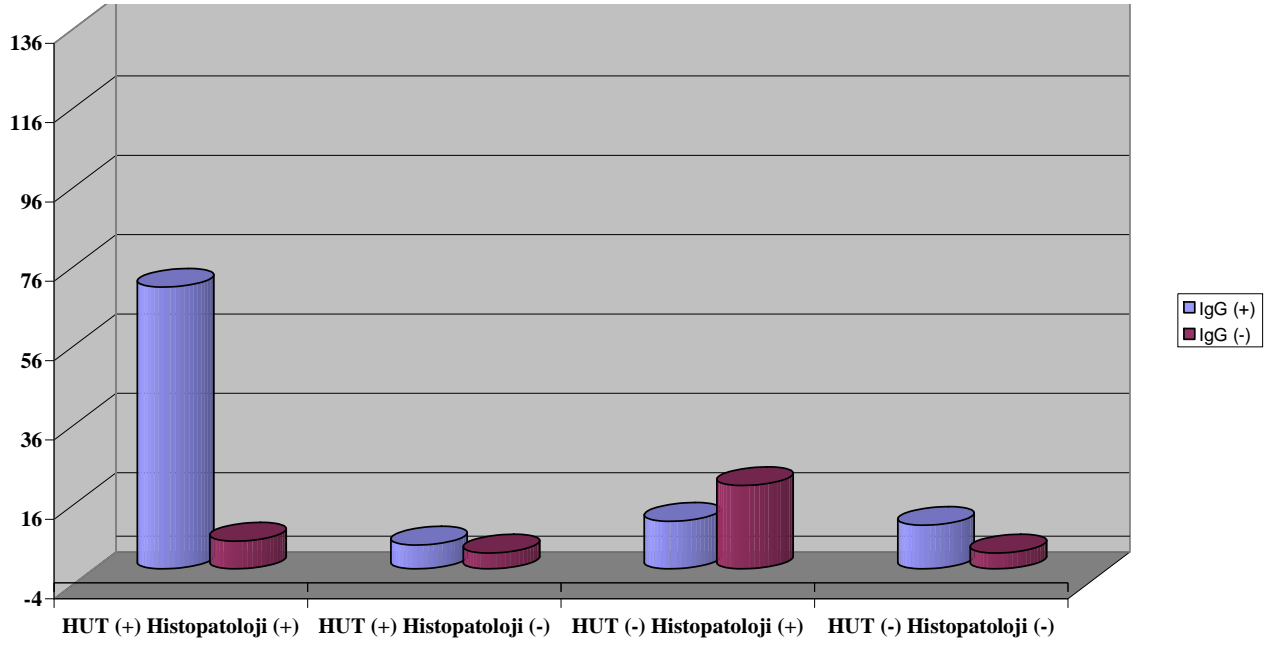
Anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA testinin duyarlılığı % 35.6; seçiciliği %65.7, LR 0.44, PPV % 76.6, NPV % 25.9 bulundu.

6.5. *H. pylori* IgA/IgG ELISA Sonuçları

Çalışmaya alınan 136 hastanın 100' ü (% 73.5) *H. pylori* IgA/IgG ELISA testi ile olumlu, 36'sı (%26.5) olumsuz bulundu. Altın standart yöntemle göre, 101 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastada 86'sı (% 85.2) *H. pylori* IgA/IgG ELISA olumlu, 15'i (% 14.8) *H. pylori* IgA/IgG ELISA olumsuz, 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz hastada ise 14'ü (% 40) *H. pylori* IgA/IgG ELISA olumlu, 21'i (% 60) *H. pylori* IgA/IgG ELISA olumsuz bulundu (Şekil 4).

McNemar Ki-kare testine göre; altın standart yöntemler ile *H. pylori* IgA/IgG ELISA tanımı yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=1$).

H. pylori IgA/IgG ELISA testinin duyarlılığı % 85.2; seçiciliği % 60, LR 0.89, PPV % 86, NPV ise % 58.3 bulundu.

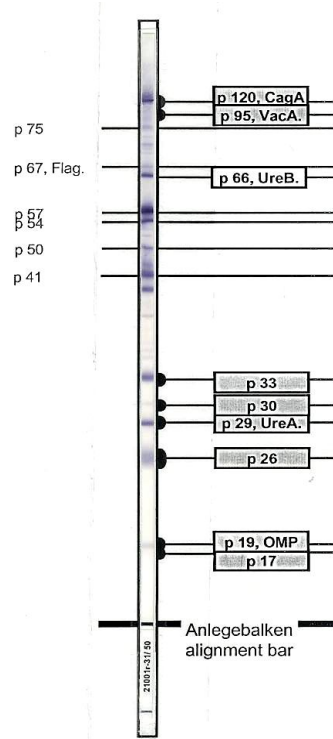


Şekil 4. Histopatolojik inceleme ve HUT sonuçlarına göre IgG dağılımı (*H. pylori* IgA/IgG ELISA)

6.6. Anti-*H. pylori* IgG Western blot Sonuçları

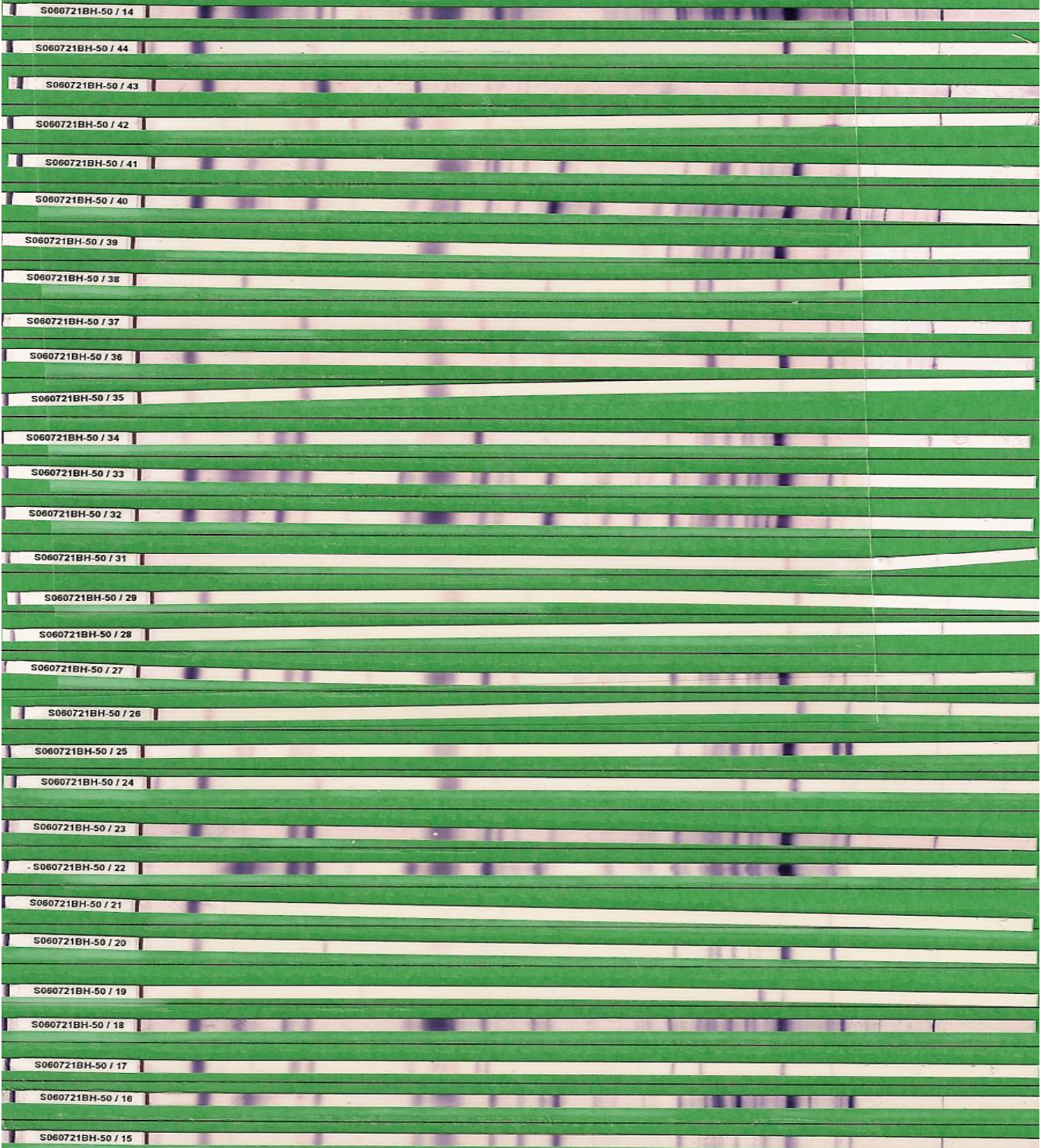
Çalışmaya alınan 136 hastanın 95'i (% 69.8) anti-*H. pylori* IgG Western blot testi ile olumlu, 25'i (% 18.4) olumsuz, 16'sı (% 11.8) belirsiz bulundu.

H. pylori antijenlerinin moleküler ağırlıklarına (kDa) göre dağılımlarının ve Western blot kontrol bandının şematize görünümü aşağıda gösterilmiştir (Tablo 9-10, Şekil 5-7). Ayrıca histopatoloji *H. pylori* enfeksiyonu olumlu 93 ve olumsuz 43 hastada *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların dağılımı da Şekil 8 ve Tablo 11'de gösterilmiştir.

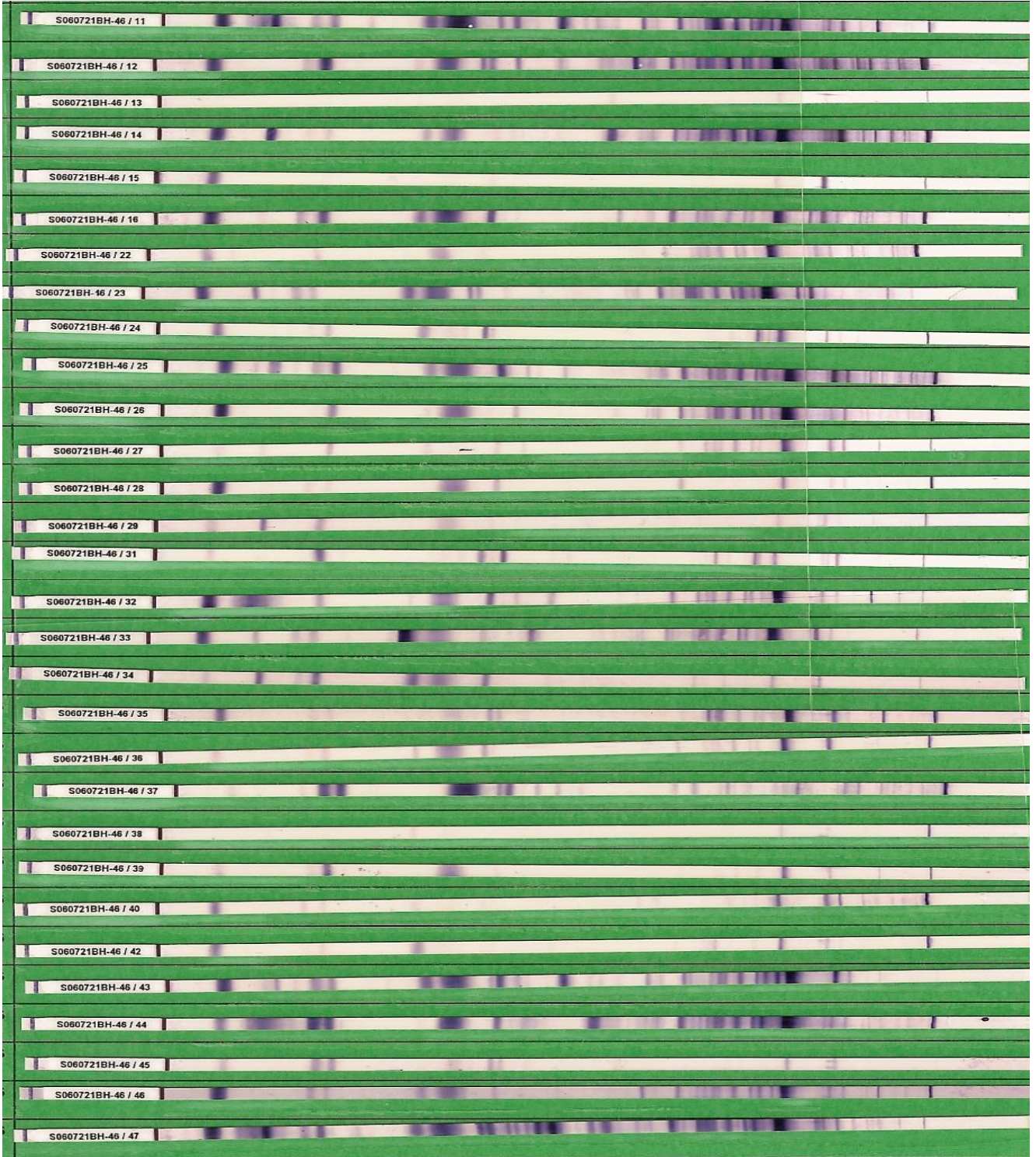


Şekil 5. Western blot kontrol bandı (EUROIMMUN)

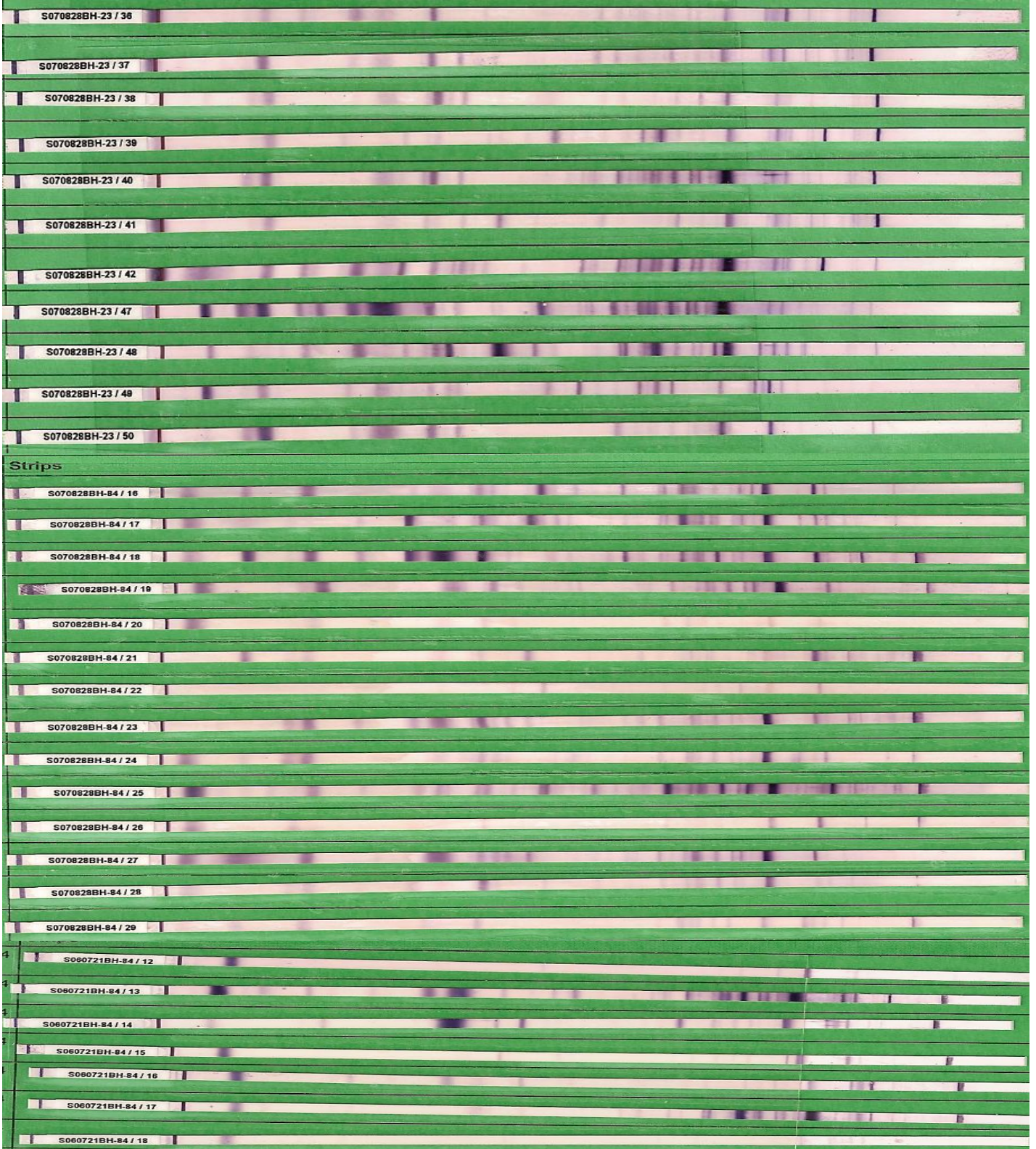
Strips



Resim 1. Western blot sonuçlar› 1



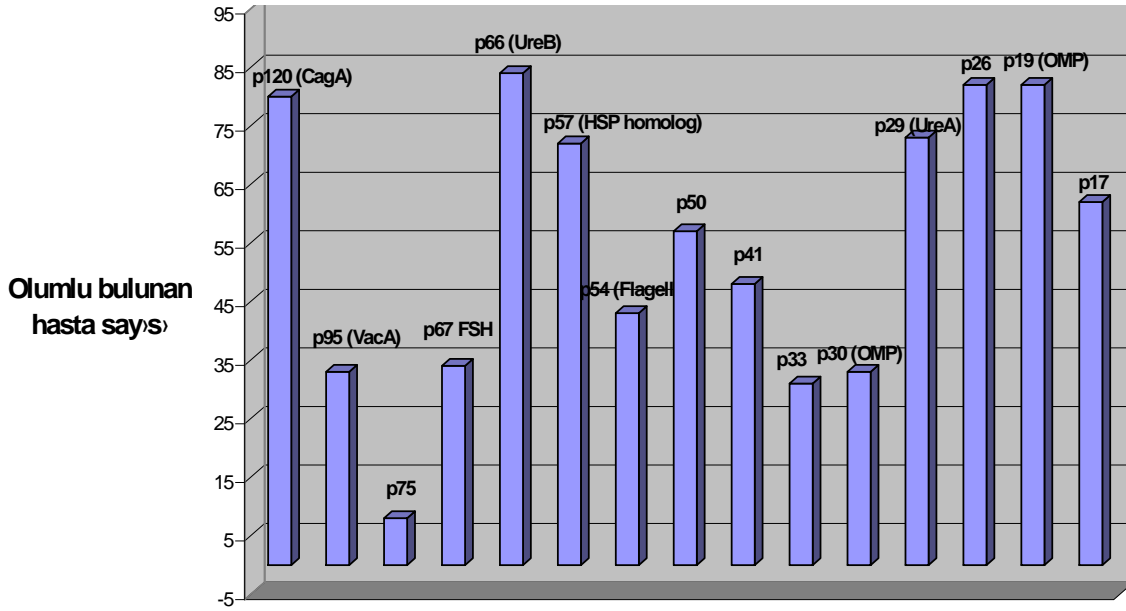
Resim 2. Western blot sonuçlar› 2



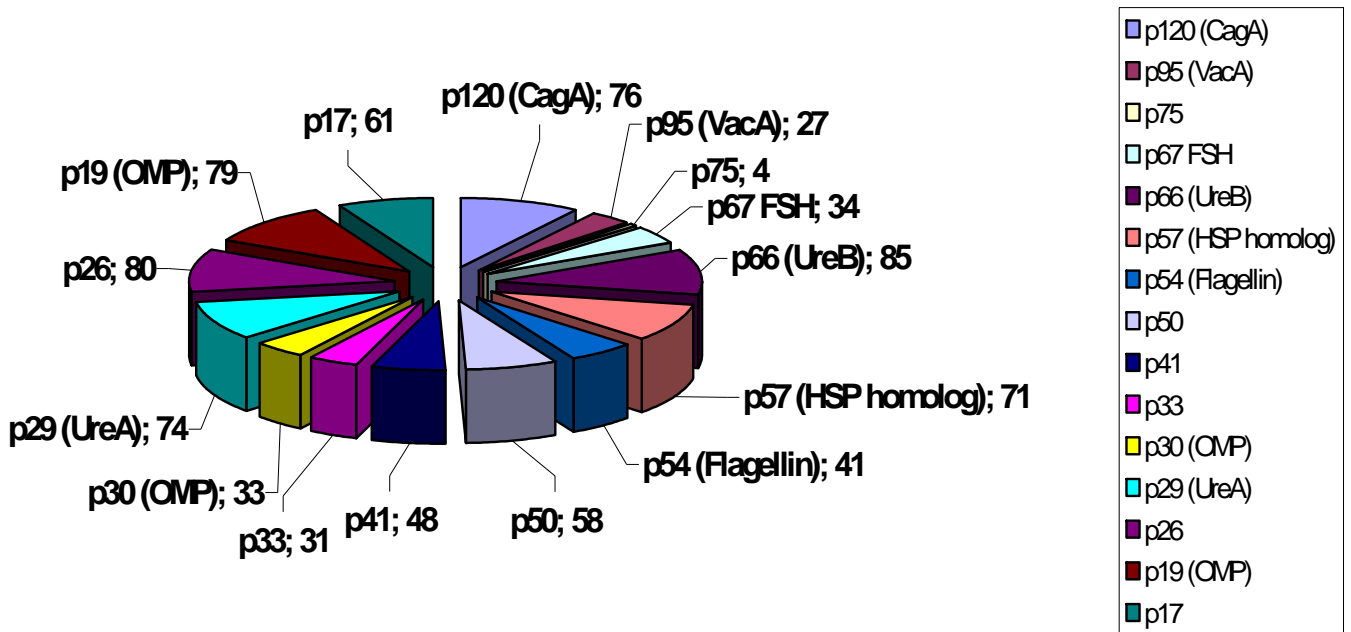
Resim 3. Western blot sonuçları 3

Tablo 9. Western blot yöntemi ile anti-*H. pylori* IgG olumlu 95 hastada *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların dağılımı

Antijen	Hasta sayısı (n=95)	%
p120 (CagA)	76	80
p95 (VacA)	28	29.5
p75	4	4.2
p67 (FSH)	34	35.8
p66 (UreB)	85	89.5
p57 (HSP homolog)	71	74.8
p54 (Flagellin)	41	43.2
p50	58	61.1
p41	48	50.5
p33	31	32.6
p30 (OMP)	33	34.7
p29 (UreA)	74	77.8
p26	80	84.2
p19 (OMP)	79	83.2
p17	61	64.2



Şekil 6. Anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu hastalarda özgül ve özgül olmayan *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların dağılımı (n=95)



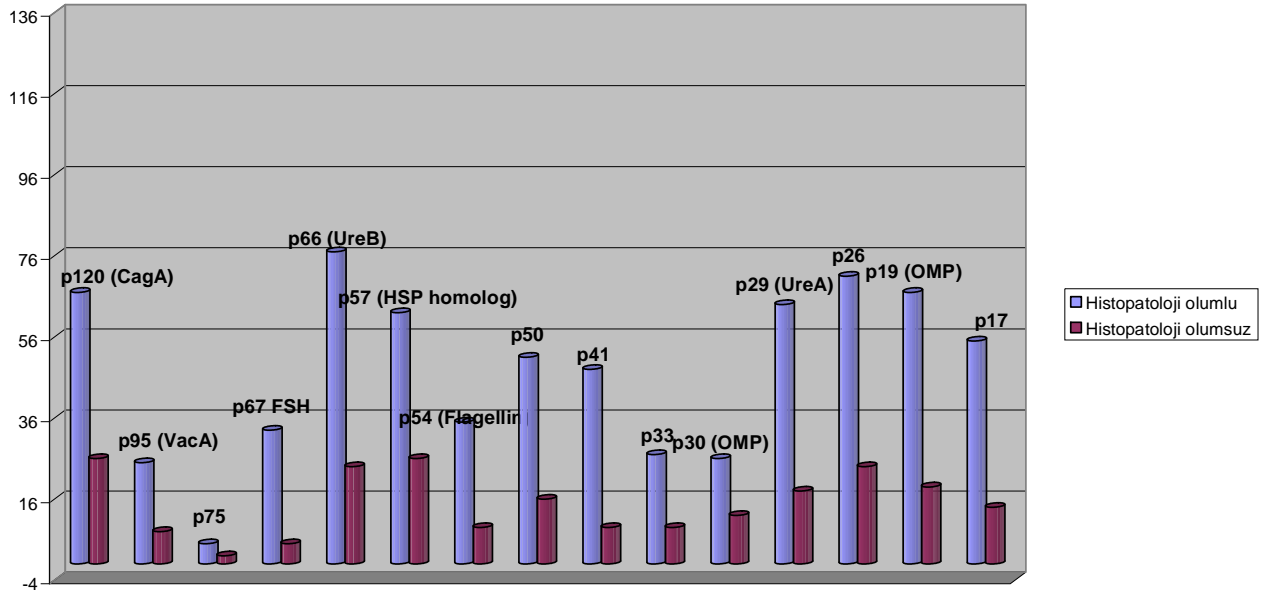
Şekil 7. Özgül ve özgül olmayan *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorlarının anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu hastalarda görülme sıklığına göre dağılımı (n=95)

Tablo 10. Anti-*H. pylori* IgG Western blot belirsiz saptanan 16 hastada *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların dağılımı

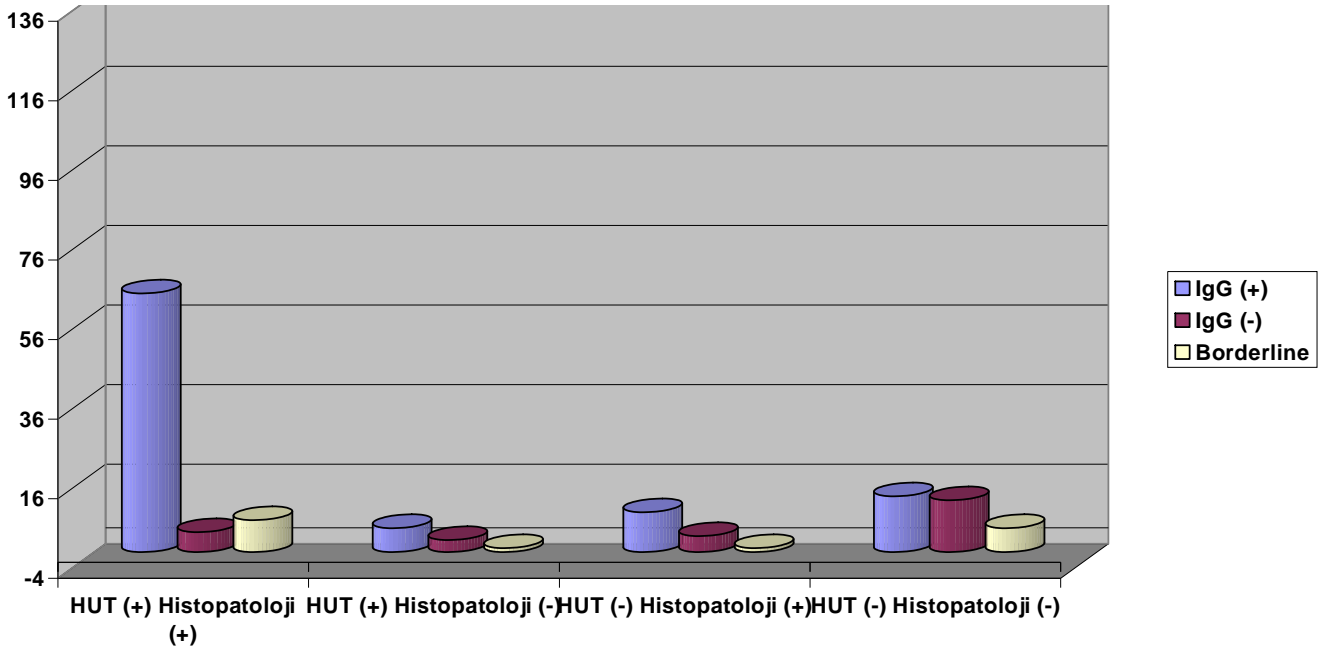
Antijen	Hasta sayıs› (n=16)	%
p120 (CagA)	12	75
p95 (VacA)	4	25
p75	2	12.5
p67 (FSH)	4	25
p66 (UreB)	11	68.8
p57 (HSP homolog)	11	68.8
p54 (Flagellin)	5	31.3
p50	6	37.5
p41	5	31.3
p33	4	25
p30 (OMP)	5	31.3
p29 (UreA)	8	50
p26	10	62.5
p19 (OMP)	6	37.5
p17	6	37.5

Tablo 11. Anti-*H. pylori* IgG Western blot yöntemiyle saptanan özgül ve özgül olmayan *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların histopatoloji olumlu ve olumsuz hastalardaki dağılımı

Antijen	Histopatoloji olumlu (n=93) %	Histopatoloji olumsuz (n=43) %
p120 (CagA)	62 (%66.6)	26 (%78.8)
p95 (VacA)	24 (%25.8)	8 (%24.3)
p75	4 (%4.3)	2 (% 6.1)
p67 (FSH)	33 (%32.1)	5 (%15.2)
p66 (UreB)	72 (%77.4)	24 (%72.7)
p57 (HSP homolog)	59 (%63.4)	23 (%53.5)
p54 (Flagellin)	37 (%39.8)	9 (%27.3)
p50	48 (%51.6)	16 (%48.5)
p41	44 (%47.3)	9 (%27.3)
p33	26 (%27.9)	9 (%27.3)
p30 (OMP)	26 (%25.2)	12 (%36.4)
p29 (UreA)	64 (%62.2)	18 (%54.5)
p26	68 (%73.2)	22 (%51.2)
p19 (OMP)	66 (%70.9)	19 (%57.6)
p17	53 (%56.9)	14 (%42.4)



Şekil 8. Histopatoloji olumlu ve olumsuz hastalarda anti-*H. pylori* IgG Western blot yöntemi ile saptanan özgül ve özgül olmayan *H. pylori* antijenlerine karşı antikorların dağılımı (n=136)



Şekil 9. Histopatolojik inceleme ve HUT sonuçlarına göre Western blot yöntemi ile anti-*H. pylori* IgG antikorlarının dağılımı (n=136)

Tablo 12. Toplam 136 hastada; anti-*H. pylori* IgG olumlu 115 hastanın ve Western blot testi ile olumlu ve belirsiz saptanan 111 hastanın anti-CagA IgG antikorlarının histopatoloji bulgularına göre dağılımı

n=136	Atrofi	IM	Atrofi + IM	Normal
Anti-<i>H. pylori</i> CagA IgG ELISA (+) (n=115/47)	9 (%19.2)	7 (%14.9)	2 (%4.3)	29 (%61.7)
Anti-<i>H. pylori</i> CagA IgG ELISA (-) (n=115/89)	10 (%11.3)	18 (%20.3)	6 (%6.8)	55 (%61.8)
Western blot Anti-<i>H. pylori</i> CagA IgG (+) (n=111/88)	15 (%17.1)	14 (%15.9)	6 (%6.8)	53 (%60.3)
Western blot Anti-<i>H. pylori</i> CagA IgG (-) (n=111/23)	3 (%13.1)	5 (%21.8)	1 (%4.4)	14 (%60.9)

Dispeptik hasta grubumuzda korpus ve antrum Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilen histopatolojik sonuçları (atrofi, IM, atrofi ve IM, normal) ile Western blot yöntemi ile değerlendirilen *H. pylori* antijenlerinin dağılımları arasındaki ilişkide incelenmiştir. Pearson Ki-kare testine göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde histopatolojik sonuçlar ve antijenik dağılımlar arasında bir ilişki bulunamamıştır (Tablo13).

Tablo 13. Histopatoloji sonuçlarına göre atrofi, IM, atrofi ve IM, normal hasta gruplarındaki hastalarda bulunan özgül antijenlere karşı oluşan antikorların dağılımı (antrum ve korpus birlikte tek bir hastanın toplam sonucu olarak değerlendirilmiştir)

Antijen	Atrofi (n=18)	IM (n=19)	Atrofi + IM (n=7)	Normal (n=67)
P120 (CagA)	15 (%83.3)	14 (%73.6)	6 (%85.7)	53 (%79.1)
P95 (VacA)	5 (%27.7)	3 (%15.7)	4 (%57.1)	20 (%29.8)
P66 (UreB)	12 (%66.6)	17 (%89.5)	7 (%100)	60 (%89.6)
P30 (OMP)	6 (%33.3)	6 (%31.6)	3 (%42.9)	21 (%31.3)
P29 (UreA)	13 (%72.2)	13 (%68.4)	5 (%71.4)	51 (%76.1)
P19 (OMP)	15 (%83.3)	15 (%78.9)	6 (%85.7)	49 (%73.1)

i. Belirsiz Sonuçlar Olumlu Kabul Edildiğinde;

Altın standart yöntemlere göre, 101 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastada 88' i (% 87.2) anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu, 13'ü (% 12.8) olumsuz, 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz hastada ise 22' si (% 62.9) anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu, 13'ü (% 37.1) olumsuz bulundu.

Anti-*H. pylori* IgG Western blot testinin duyarlılığı % 87.2; seçiciliği % 86.6, LR 0.74, PPV % 80, NPV % 50 bulundu (p=0.175).

ii. Belirsiz Sonuçlar Olumsuz Kabul Edildiğinde;

Altın standart yöntemlere göre, 101 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastada 78'i (% 77.2) anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu, 23'ü (% 22.8) olumsuz, 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz hastada ise 16' s (% 45.7) anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu, 19'u (% 54.3) olumsuz bulundu.

Anti-*H. pylori* IgG Western blot testinin duyarlılığı % 77.2; seçiciliği % 54.3, LR 0.71, PPV % 82.9, NPV % 45.2 bulundu (p=0.337).

iii. *Belirsiz Sonuçlar Dahil Edilmediğinde;*

Altın standart yöntemle göre, 91 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastada 78'i (% 85.7) anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu, 13'ü (% 14.3) olumsuz, 29 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz hastada ise 16'si (% 55.2) anti-*H. pylori* IgG Western blot olumlu, 13'ü (% 44.8) olumsuz bulundu.

Anti-*H. pylori* IgG Western blot testinin duyarlılığı % 85.7; seçiciliği % 44.8, LR 0.76, PPV % 82.9, NPV % 50 bulundu (p=0.711).

6.7. Anti-*H. pylori* IgG URINELISA Sonuçları

Çalışmaya alınan 136 hastanın 72'si (% 52.9) Anti-*H. pylori* IgG URINELISA testi ile olumlu, 64'ü (% 47.1) olumsuz bulundu. Altın standart yöntemle göre, 101 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastada 67'si (% 66.3) anti-*H. pylori* IgG URINELISA olumlu, 34'ü (% 33.6) olumsuz, 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz hastada ise 5'i (% 14.3) anti-*H. pylori* IgG URINELISA olumlu, 30'u (% 85.7) olumsuz bulundu.

McNemar Ki-kare testine göre; Anti-*H. pylori* IgG URINELISA testinin duyarlılığı % 66.3, seçiciliği % 85.7, LR 0.71, PPV % 93.1, NPV % 46.9 bulundu. Altın standart yöntemler ile anti-*H. pylori* IgG URINELISA yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p=0.00).

6.8. RAPIRUN Sonuçları

Çalışmaya alınan 136 hastanın 70'i (% 51.4) RAPIRUN testi ile olumlu, 66'si (% 48.6) olumsuz bulundu. Altın standart yöntemle göre, 101 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastada 66'si (% 65.3) RAPIRUN olumlu, 35'i (% 34.7) olumsuz, 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz hastada ise 6'si (% 17.1) RAPIRUN olumlu, 29'u (% 82.9) olumsuz bulundu.

McNemar Ki-kare testine göre; RAPIRUN testinin duyarlılığı % 65.4; seçiciliği % 82.9, LR 0.69, PPV % 91.6, NPV % 45.3 bulundu. Altın standart yöntemler ile RAPIRUN yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p=0.00).

Tablo 14. Tüm test sonuçlarının duyarlılık, seçicilik, PPV, NPV, LR

	Anti- <i>H.pylori</i> IgG ELISA %	Anti- <i>H.</i> <i>pylori</i> CagA ELISA %	<i>H. pylori</i> IgA/IgG ELISA %	Western blot* %	Anti- <i>H.</i> <i>pylori</i> IgG URINELISA %	Anti- <i>H.</i> <i>pylori</i> IgG RAPIRUN %
Duyarlılık	91.1	35.6	85.2	85.7	66.3	65.4
Seçicilik	34.3	65.7	60	44.8	85.7	82.9
PPV	80	76.6	86	82.9	93.1	91.6
NPV	57.2	25.9	58.3	50	46.9	45.3
LR	0.77	0.44	0.89	0.76	0.71	0.69

*Belirsiz sonuçlar dahil edilmedi.

Tablo 15. Tüm test sonuçlarının hastalara göre dağılımı

No	Altın Standart	Anti- <i>H. pylori</i> IgG ELISA	Anti- <i>H. pylori</i> CagA IgG ELISA	Anti- <i>H. pylori</i> IgA/IgG ELISA	Anti- <i>H. pylori</i> IgG Western blot	Anti- <i>H. pylori</i> IgG URINELISA	RAPIRUN
1	+	+	-	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	-	+
4	-	+	+	-	+	-	-
5	+	+	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	-	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	-	-	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	-	+	+	+	+
14	+	-	-	-	-	-	-
15	+	+	-	+	+	+	+
16	+	+	-	-	Borderline	-	-

17	-	+	-	-	Borderline	-	+
18	+	+	+	+	Borderline	-	-
19	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	Borderline	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+
22	-	+	-	+	+	-	-
23	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	-	+	+	+	+
25	-	+	-	+	Borderline	+	+
26	-	+	-	-	+	-	-
27	+	-	-	+	-	-	-
28	+	+	-	+	-	-	-
29	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	-	+	+	+	+
32	-	+	-	+	+	-	-
33	-	-	-	+	-	-	-
34	+	+	-	+	+	+	+
35	+	+	-	+	+	+	+
36	+	+	+	-	Borderline	+	-
37	-	-	-	-	-	-	-
38	+	+	-	+	+	+	+
39	-	+	+	-	+	-	-
40	+	+	-	+	+	-	-
41	+	+	+	+	+	-	-
42	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	-	+	+	+	+
44	+	+	-	+	+	+	+
45	-	-	+	-	-	-	-
46	+	+	-	+	+	+	+
47	-	+	+	+	+	+	-
48	+	+	-	+	+	-	-
49	-	+	-	-	+	-	-
50	+	+	-	+	+	-	+
51	+	+	-	+	+	+	+
52	+	+	-	+	+	+	+
53	+	+	-	+	+	+	+
54	+	+	-	+	+	-	-
55	-	+	+	-	+	-	-
56	+	+	-	+	+	+	+
57	+	+	+	-	Borderline	-	-
58	-	+	-	-	+	-	-

59	+	+	-	+	+	-	-
60	-	-	+	-	-	-	-
61	+	+	-	-	+	+	+
62	+	+	-	+	+	+	+
63	+	+	-	+	+	+	+
64	+	+	-	+	+	-	-
65	+	+	-	+	+	+	+
66	+	+	-	+	+	+	+
67	+	+	-	+	Borderline	+	-
68	+	-	-	-	-	-	-
69	+	+	-	+	+	+	+
70	+	+	+	+	+	+	+
71	+	+	+	+	-	+	+
72	+	+	-	+	+	+	-
73	+	+	-	+	+	+	+
74	-	+	+	+	+	+	+
75	-	-	-	-	-	-	-
76	+	+	-	+	+	+	+
77	-	+	-	+	+	-	-
78	+	+	-	+	+	+	+
79	+	+	-	+	+	+	+
80	+	-	-	-	-	-	-
81	+	+	-	+	+	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-
83	+	+	-	-	+	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-
85	+	+	-	+	+	+	+
86	+	+	-	+	+	+	+
87	+	+	-	+	+	+	+
88	+	+	-	+	+	+	+
89	+	+	-	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	-	+
91	+	+	-	+	Borderline	+	+
92	+	-	-	-	-	+	-
93	+	+	-	+	+	+	+
94	+	+	+	+	+	+	+
95	-	-	-	-	-	-	-
96	+	+	+	+	+	+	+
97	-	+	-	+	+	-	-
98	+	+	+	+	+	+	+
99	+	+	+	-	+	-	-
100	+	+	-	+	+	+	+
101	-	+	-	-	Borderline	-	-
102	+	+	-	+	+	+	+

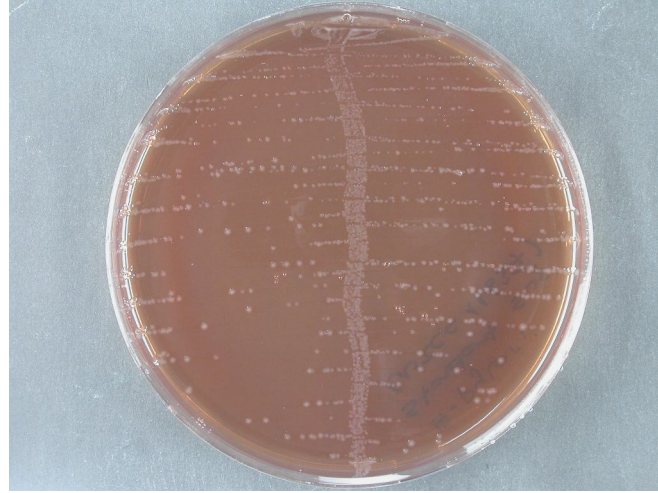
103	+	+	+	+	+	+	+
104	-	+	-	+	Borderline	-	-
105	+	+	+	+	+	+	+
106	+	+	+	+	+	-	-
107	-	+	+	+	Borderline	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-
109	+	+	+	-	+	-	-
110	+	+	+	+	+	-	-
111	-	+	-	-	Borderline	-	-
112	-	-	-	-	-	-	-
113	+	+	-	+	Borderline	-	+
114	+	+	+	+	+	+	+
115	+	+	+	+	+	+	+
116	+	+	-	+	-	+	+
117	+	+	+	+	+	-	+
118	+	+	+	+	+	+	+
119	+	+	+	+	+	-	-
120	+	+	-	+	-	-	-
121	+	+	+	+	+	-	-
122	+	+	-	+	+	+	+
123	+	+	-	+	+	+	+
124	+	+	-	+	+	+	+
125	+	+	-	+	+	+	+
126	-	+	+	+	+	-	-
127	+	-	-	-	-	-	-
128	+	+	+	+	+	+	+
129	+	-	-	-	-	-	-
130	+	+	+	+	+	-	-
131	+	-	-	-	-	-	-
132	+	+	-	+	Borderline	+	+
133	+	-	-	-	-	-	-
134	+	+	-	+	Borderline	-	-
135	+	-	-	-	-	-	-
136	+	-	-	-	-	-	-

6.9. Kültür Standardizasyonu Sonuçları

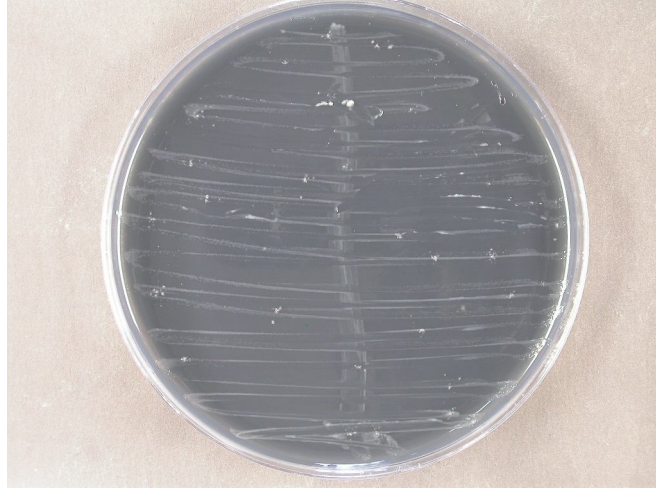
H. pylori kültürü optimizasyon ve standardizasyon çalışmalarında NCTC 11637 *H. pylori* standart suşu kontrol olarak kullanıldı. *H. pylori* kültür optimizasyon çalışmasında çeşitli antimikrobikler içeren % 10 insan serumlu Columbia agar, % 7 at kanlı Columbia agar, % 7 koyun kanlı Columbia agar besiyerleri kullanılmıştır. Kullanılan üç besiyerinde de

üreme saptanmış ve besiyeri standardizasyonu elde edilmiştir. *H. pylori* kültürü için en iyi izolasyonu sağlayan besiyerlerinin performansları kalitatif olarak eşzamanlı değerlendirildi. ayrıca koloni morfolojisi büyüklüğü araştırılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. *H. pylori* standart suşu NCTC 11637 %10 insan serumlu ve %7 at kanı içeren besiyerlerinde üreyen kolonilerde tipik ve daha büyük koloni morfolojisi gözlemlendi. Klinik izolatların üretilmesinde %7 koyun kanlı besiyeri yerine önerildi. Ayrıca insan serumunun daha ucuz ve klinik laboratuvarlarda kolay edinebilirliği maliyet açısından kullanılabilirliği görüşüne varıldı.

NCTC 11637 *H. pylori* standart suşu kolonilerinin pasajı antibiyotik supplement içeren %10 insan serumlu Columbia agar (Oxoid), %7 at kanlı Columbia agar ve %7 koyun kanlı Columbia agar besiyerlerine yapılmıştır. Pasaj sonrasında üreyen kolonilerden steril serum fizyolojik su içerisinde McFarland 3 bulanıklığında olacak şekilde süspansiyon hazırlanıp aynı besiyerlerine pasajları yapılmış ve *H. pylori* kültürü için en iyi izolasyonunu sağlayan besiyerlerinin performansı araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında %7 koyun kanlı Columbia agar besiyerinde üreyen kolonilerin sayısının daha az olduğu ancak % 7 at kanlı ve % 10 insan serumlu Columbia agar besiyerinde üreyen kolonilerin sayılarının aynı olduğu bulunmuştur ve *H. pylori* kültürü için yapılan optimizasyon çalışması başarılı olmuştur.



Resim 4. NCTC 11637 *H. pylori* standart suşunun % 7 at kanı içeren Columbia agar besiyerindeki üreyen kolonilerin görüntüsü



Resim 5. NCTC 11637 *H. pylori* standart suşunun % 10 insan serum içeren Columbia agar besiyerindeki üreyen kolonilerin görüntüsü

6.10. Stok kültür değerlendirilmesi

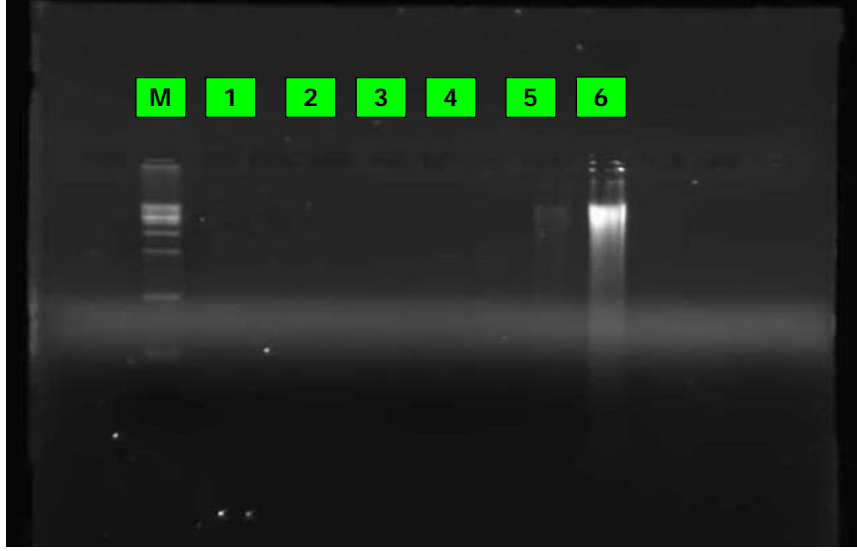
-80°C’de stok besiyerinde saklanan NCTC 11637 standart *H. pylori* suşunun yeniden canlandırılma oranları -20°C’de stok besiyerinde saklanan NCTC 11637 standart *H. pylori* suşuna göre üreme oranı ve kolonilerin kantitatif olarak sayımı yüksek bulundu. 1 ay sonrası elde ettiğimiz üreme oranıyla zaman faktörünün önemi de saptandı.

6.11. *H. pylori* DNA Ekstraksiyon Sonuçları

H. pylori standart suş NCTC 11637 %7 at kanı içeren besiyerindeki üreyen kolonilerinden elde edilen 2×10^8 bakteri/ml 10^9 CFU (~ McFarland 2) DNA’sı High Pure PCR Template Preparation Kit (Roch Applied Science) kullanılarak ekstraksiyonu yapıldı. Örnekler hazırlanan %1 agaroz jele yüklendi ve 75 voltta 30 dakika yürütüldü. Elde edilen ürün jelde görüntülediğinde bant gözlemlendi. Ekstraksiyonu yapılan ürünün amplifikasyon basamağı projemizden malzeme alınımı olmadığı için yapılamadı. Ekstrakte edilen *H. pylori* standart suş NCTC 11637 DNA’sı ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

Daha önceden FISH çalışması yapılan *H. pylori* enfeksiyonu pozitif ve negatif 3 hastanın parafine gömülü antrum ve korpus biyopsi kesitlerinden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roch Applied Science)’i kullanılarak *H. pylori* DNA’sı ekstraksiyonu için kit içeriğinde belirtilen prosedür uygulandı. Örnekler hazırlanan %1 agaroz jele yüklendi ve 75

volta 30 dakika yürütüldü. Ancak ekstrakte edilen ürün jelde görüntülediğinde hiçbir bant gözlenmedi. Bu kit kullanılarak parafine gömülü gastrik dokudan *H. pylori* bakteri DNA'sı ekstraksiyonunda başarısız olundu (Resim 6).



Resim 6. *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun kolonilerinden ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'nın % 1'lik agaroz jelde görünüşü.

M: DNA Marker

Kuyucuklar 1-4: parafin bloktan antrum korpus biyopsi kesitlerinden elde edilen DNA'yı içermektedir

Pozitif kontrol NCTC 11637'nin standart suşu, 5: 10^4 , 6: 10^8 bakteri/ml

7. TARTIŞMA

H. pylori mide veya duodenumda ülser, gastrik kanser ve gastrik lenfomaya neden olan kronik bir enfeksiyondur (68,132). *H. pylori*'nin kolonizasyonunun saptanmasında endoskopi gerektiren invaziv ve endoskopinin gerekmediği invaziv olmayan yöntemler kullanılır (133). *H. pylori* enfeksiyonu tanısında, tanısal testler arasında tek bir altın standart yöntem yoktur; tüm testlerin sınırlılıkları vardır (106). Doğru tanısal testi seçmek kolay değildir ve seçiminde birçok faktör göz önünde tutulmalıdır (99). Temel tanı testleri en az riskle ve ekonomik koşullara uygun, yüksek doğrulukta sonuç verebilecek yüksek performanslı olmaları önerilmektedir (134).

Birinci basamak tanıda invaziv olmayan yöntemler önerilmektedir. Açıklanamayan kilo kaybı, disfaji, yineleyen kusma, gastrointestinal sistem (GIS) kanaması veya anemi, malabsorbsiyon gibi bulgular endoskopik incelemeyi gerektiren alarm semptomlarıdır (115).

1997 Asya Pasifik Konsensus Konferansı Raporu'nda da, *H. pylori* rutin testleri ve tedavisi NSAID'li başlangıç tedavisinden önce önerilmemektedir, ancak daha önce peptik ülser hikayesi olan hastalarda, *H. pylori*'nin enfeksiyonunun test ve tedavisi önerilmektedir. *H. pylori* için serolojik testlerin Asya Pasifik bölgesinde birinci basamak doktorlar ve uzmanlar için uygun olduğu, ancak *H. pylori* enfeksiyonunu tedavisinin belirlenmesi için uygun olmadığı bildirilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunu belirlemede tedavi öncesi ve sonrasında UBT önerilmektedir. Biyopsi HUT'un, endoskopi sırasında ilk seçilen test olduğu ancak negatif sonuç vermesi durumunda *H. pylori* enfeksiyonunun histopatolojik açıdan incelenmesi gerektiği bildirilmektedir. Kültür *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında ve antibiyotik direncin belirlenmesinde altın standart yöntemdir ve agar dilüsyon yöntemi kullanılması önerilmektedir (135).

Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu'nun Maastricht 3-2005 Konsensus Bildirisi'nde; GORD hastalığı olan, NSAID kullanan ve alarm semptomu olan kişilerin tedavi edilmesi gerektiği önerilmiştir. UBT dışındaki invaziv olmayan testler önemli olup, kanamalı ülser, gastrik atrofi, MALT lenfoma ve yeni PPI ve antibiyotik kullanımında tanı testi olarak seroloji kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Hasta başı testlerinin, idrar ve tükürükte *H. pylori* antikollarının saptanmasının *H. pylori* enfeksiyonu kontrolünde rolü olmadığı bildirilmiştir. 'Test ve tedavi' stratejisinde, *H. pylori* tanısında dışkı testinin, UBT ile aynı düzeyde olduğu kabul edilmiştir. İnvaziv testler göz önüne alındığında, tedavi öncesi ya da invaziv olmayan testler uygulanmayan hastalarda endoskopi sonrası HUT pozitifliğinin tedaviyi başlatmak için yeterli olduğu bildirilmiştir. 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. Ayrıca birinci basamak tanıda serolojinin terk edilmesi gerektiği ve bu testlerin sadece tarama amaçlı kullanılabilecek testler olduğu bildirilmiştir (116).

Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80-90'ı *H. pylori* ile enfektedir ve % 80'i 20 yaşına kadar enfekte olmaktadır (35). Türkiye'deki epidemiyolojik araştırmalarda da benzer sonuçlar 18 ve 20 yaş üzerinde %82.5 olarak bildirilmiştir (35,71,78).

Serolojik çalışmalarda en sık kullanılan yöntem ELISA'dır. *H. pylori*'ye karşı oluşan IgM antikorları serumda sadece kısa bir süre bulunduğundan tanınma değeri azdır. IgG antikorlarının duyarlılık ve seçiciliği IgA antikorlarına göre daha fazladır. Bu yüzden çalışmamızda serolojik tanıda IgG ELISA ve Western blot testleri kullanılmıştır. Serolojik testler, hızlı, basit, ucuz ve invaziv olmayan yöntemlerdir. Ayrıca serolojik testler bizmut bileşenleri, PPI veya antibiyotik alımı ile *H. pylori* enfeksiyonunun baskılandığı durumlarda bakteriyel yoğunluğa bağlı olan üreaza dayalı testlerden daha az yanlıdır. Başarılı tedavi ile IgG cevabı azalır, tekrarlayan enfeksiyonlarda yükselir (112).

Çalışmamızda; invaziv olmayan tanınma testler altın standart kabul edilen histopatoloji ve HUT ile karşılaştırıldı. Dispeptik hasta serum ve idrar örneklerinde anti-*H. pylori* IgG antikor varlığı ELISA, Western blot, URINELISA ve RAPIRUN yöntemleri ile araştırıldı, anti-*H. pylori* IgG pozitif hasta serumlarında ise virülans faktörlerinden CagA, VacA ve diğer *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan antikorların görülme sıklığı ile histopatoloji bulguları karşılaştırıldı. Ayrıca bu hasta grubunda antijenik varyasyonun moleküler düzeyde belirlenmesinde ileri araştırmalar için altın standart yöntem olan *H. pylori* kültür optimizasyonu yapıldı.

Çalışmamızda 136 hastanın *H. pylori* enfeksiyonu yönünden 52 (%38.2)'si antrum ve korpus HUT olumlu, 22 (% 16.2) 'si antrum HUT, 14 (% 10.3)'ü korpus HUT olumlu, histopatolojik incelemede ise 72 (% 52.9) 'si antrum ve korpus olumlu, 13 (% 9.6)'ü antrum olumlu, 8 (% 5.9) 'i korpus olumlu saptandı. Böylece, altın standart olarak kabul ettiğimiz bu yöntemlere göre, 103 (% 75.7) hasta *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 33 (% 24.3)'ü olumsuz olarak değerlendirildi.

Van de Wouw ve arkadaşları farklı ELISA kitlerini referans metodlarla karşılaştırdıklarında duyarlılığı % 81-100, seçiciliği % 79-86, PPV % 95-96, NPV % 52-100 arasında bulmuşlardır (21).

Xia ve arkadaşlarının *H. pylori*'ye karşı oluşan IgG antikorlarını saptayan üç farklı ELISA kitini değerlendirdikleri çalışmalarında; ¹³C UBT, histoloji ve HUT testlerinden en az ikisinin pozitifliğinde hastaları enfekte kabul etmişler ve üç testinde negatif olduğu durumda *H. pylori* enfeksiyonu negatif olarak, testlerden birinin pozitifliğinde ise belirsiz olarak kabul

etmişlerdir. Bu referans yöntemlerle kıyaslandığında IgG ELISA'ların duyarlılığı % 81.5-96.2, seçiciliği ise % 78.6-98.2 arasında bulunmuştur (136).

Leung ve arkadaşlarının ticari serolojik testlerin performansının farklı popülasyonlardaki *H. pylori* suşlarında değerlendirdikleri çalışmada; ¹³C UBT, histoloji ve HUT en az ikisinin pozitifliğinde hastalar enfekte kabul etmişler, IgG ELISA'nın duyarlılığı % 80, seçiciliği ise % 96 bulunmuştur (137).

Locatelli ve arkadaşlarının *H. pylori*'ye karşı oluşan IgG ve IgA antikorlarını serumda ve IgA antikorlarını duodenal sıvıda saptayan çalışmalarında; histoloji ve HUT ikisinin pozitifliğinde hastaları enfekte kabul etmişlerdir. Altın standart yöntemlerle karşılaştırıldıklarında serum IgG seviyelerinin duyarlılığı % 64, seçiciliği ise % 83.7; serum IgA seviyelerinin duyarlılığı % 72, seçiciliği ise % 65.9 saptanmıştır. Serolojik testler birlikte değerlendirildiklerinde duyarlılığı % 86.6, seçiciliği ise % 74.2 bulunmuştur. Altın standart yöntemlerle karşılaştırıldığında, duodenal sıvıda IgA için duyarlılık, seçicilik ve yalancı pozitifliği farklı cutoff değerleri de ROC eğrisi ile belirlenmiştir. Duodenal sıvıdaki anti-*H. pylori* IgA antikorlarının belirlenmesi için ELISA'da elde edilen değerler analiz edildiğinde, *H. pylori* enfeksiyonlu ya da enfeksiyonsuz hastalar arasında önemli bir fark (p=0.43) gözlenmemiştir (138).

Yılmaz ve arkadaşları histopatoloji ve HUT pozitif olduğunda *H. pylori* enfeksiyonunu pozitif olarak değerlendirmişler ve IgG ELISA test duyarlılığı % 87.5, seçiciliği ise % 50; IgA ELISA test duyarlılığı % 54.2, seçiciliği ise % 87.5; anti-CagA IgG ELISA test duyarlılığı % 54.2, seçiciliği ise % 75; anti-CagA IgA ELISA test duyarlılığı %33.3, seçiciliği ise %87.5 bulunmuştur. Buna göre, IgA saptayan ELISA kitlerinin klinik olarak yararsız olduğunu; IgG saptayan kitlerinin Avrupa suşlarındaki antijenik özellikleri temel almasından dolayı klinik olarak makul olmadığı ve ayrıca yaşadıkları bölgenin hem Asya hem de Batı ülkelerinin etkinliği altında kozmopolitan bir bölge olmasından dolayı ortak suşların Avrupa'dakilerden önemli ölçüde farklı olabileceği sonucuna varmışlardır (139).

Çalışmamızda anti-*H. pylori* IgG ELISA, anti-*H. pylori* IgA/IgG ELISA ve anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA testlerinin duyarlılıkları ve spesifiklikleri sırasıyla % 91.1, % 34.3; % 85.2, % 60; % 35.6, % 65.7 bulunmuştur. Ayrıca; *H. pylori* enfeksiyonu tanısında altın standart yöntemler ile anti-*H. pylori* IgG ELISA ve anti-*H. pylori* CagA ELISA sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiş (p>0.05); anti-*H. pylori* IgA/IgG ELISA da ise gözlenmemiştir (p>0.05). Ayrıca, anti-*H. pylori* IgG ELISA ve anti-*H. pylori*

IgA/IgG ELISA testlerinin birbirleri ile istatistiksel olarak uyumlu bulunmuş ($k=0.586$) ve bu iki ELISA testinin birbiri yerine kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anti-*H. pylori* IgG antikor varlığının konak bakteri ile karşılaştığından itibaren kanda saptanmasından dolayı uzun süre yüksek kalan antikor titresinden dolayı aktif ve geçirilmiş enfeksiyon ayrımı yapılamayacağı düşünülmektedir. Kit üreticisi tarafından önerilen eşik değerde seçilen populasyon veya yaş dağılımı da rol oynayabilir. Batı ülkelerinde yüksek performans gösteren birçok serolojik testin Asya'daki populasyonlarda aynı sonucu vermediği bildirilmiştir. Dhar ve arkadaşları iki farklı serolojik testin performanslarını Ortadoğu populasyonunda değerlendirdikleri çalışmalarında *H. pylori* enfeksiyonu varlığı ile serolojik sonuçlar arasında ilişkiyi zayıf bulmuşlardır (140). Bodhidatta ve arkadaşları yerli *H. pylori* izolatlarından hazırladıkları serolojik yöntemin duyarlılık ve seçiciliğini ticari teste oranla daha yüksek bulmuşlardır (141). Dünyanın farklı bölgelerindeki *H. pylori* izolatlarının antijenik yapıları bölgesel farklılık gösterdiği için serolojik testler de populasyonlarının antijenik özelliklerine göre uyarlanmalıdır. Serolojik testlerdeki antijen hazırlanması da önemli bir problemdir.

Anti-*H. pylori* antikorlarının ve farklı *H. pylori* antijenlerine karşı bireysel serolojik yanıtla sadece tanıda değil, CagA ve VacA gibi virülans faktörlerine karşı antikorların saptanmasında da kullanılan bir diğer yöntem ise "immunoblotting" tekniğidir (105). Anti-CagA antikorlarının saptanması, hastanın cagA-pozitif veya cagA-negatif bir suşla enfekte olduğunu, peptik ülser hastalığı ve gastrik karsinom riskini gösterebildiği bildirilmektedir (112).

Sezikli ve arkadaşları çeşitli gastroduodenal hastalıklı hasta grubunda *H. pylori* CagA ve VacA'nın serum antikorlarının sıklığını Western blot testi ile araştırdıkları çalışmalarında anti-CagA antikor sıklığını %85.5; anti-VacA antikor sıklığını %70.2 olarak bulmuşlardır. Hem anti-CagA hem de anti-VacA antikorlarının pozitifliğini duodenal ülser (DU), gastrik ülser (GU) ve gastrik kanserli (GC) hastalarda non-ülser dispepsi ve asemptomatik hastalara göre daha yüksek olarak saptamışlardır. Buna göre, bölgelerinde *H. pylori*'nin CagA ve VacA proteinleri ve DU, GU ve GC arasında önemli ölçüde bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (142).

Erzin ve arkadaşları Türk hastalarda *H. pylori* VacA ve CagA'sına karşı oluşan serum antikor profillerinin Western blot testi ile araştırdıkları çalışmalarında; kültür tek başına pozitif olduğunda ya da hem HUT hem de histopatolojinin ikisinin pozitif olduğu durumlarda

H. pylori'yi pozitif olarak kabul etmişlerdir. CagA antijeninin seropozitiflik oranını % 85, VacA seropozitiflik oranını ise % 33 olarak bulmuşlardır. Çalışılan dispepsili Türk hastalarda hiçbir virulans faktörünün DU gelişimiyle ilişkili olmadığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca, çalışmadaki dispeptik hasta grubunda CagA ve VacA pozitif *H. pylori* suşlarının aynı sıklıkta gözlemlendiğini saptamışlardır (143).

Monteiro ve arkadaşları invaziv ve invaziv olmayan testleri karşılaştırdıkları çalışmalarında immunoblotlama yönteminin duyarlılığını % 95.6, özgüllüğünü % 92.6, PPV % 91.5, NPV ise % 96.2 bulmuşlardır. Seçiciliğin düşük bulunma nedeni ya daha önceki *H. pylori* enfeksiyonunun "serolojik skar"ı veya diğer bir gastrik helicobacter olan *Helicobacter heilmannii* gibi benzer antijenik yapıya sahip *Helicobacter* türü ile enfeksiyon olabileceğini belirtmişlerdir (144).

Bizim çalışmamızda ise hastaların % 66.9'unun *cagA*-pozitif suşlarla enfekte olduğu, Western blot olumlu bulunan 95 hastanın da 76'sı (% 80) CagA, 28'i (% 29.5) VacA pozitif saptandı. Çalışmadaki 136 hastanın 95'i (% 69.8) anti-*H. pylori* IgG Western blot testi ile olumlu, 25'i (%18.4) olumsuz, 16'sı (% 11.8) belirsiz bulundu. Belirsiz sonuçlar olumlu kabul edildiğinde; anti-*H. pylori* IgG Western blot testinin duyarlılığı % 87.2; seçiciliği % 86.6, LR 0.74, PPV % 80, NPV ise % 50 bulundu. Belirsiz sonuçlar olumsuz kabul edildiğinde ise duyarlılığı % 77.2 ve seçiciliği % 54.3 LR 0.71, PPV % 82.9, NPV ise % 45.2 bulundu. Belirsiz sonuçlar dahil edilmediğinde; anti-*H.pylori* IgG Western blot testinin duyarlılığı % 85.7; seçiciliği % 44.8, LR 0.76, PPV % 82.9, NPV ise % 50 olarak diğer çalışmalara göre daha düşük saptandı.

H. pylori suşlarındaki bölgesel genetik farklılıklar ve antijenik varyasyonlar nedeniyle tanı kriteri olarak belirlenen bantların da farklı olması gerektiği bildirilmektedir (126). Özellikle, anti-*H. pylori* IgG (ELISA) olumlu 115 hastada anti-CagA olumlu 47 hastanın 9 (%19.2)'unda atrofi, 7 (%14.9)'sinde IM, 2 (%4.3)'sinde atrofi ve IM ve 29 (%61.7)'unda normal mukoza, Western blot testi olumlu ve belirsiz 111 hastada ise anti-CagA IgG antikoları olumlu 88 hastanın 15 (%17.1)'inde atrofi, 14 (%15.9)'ünde IM, 6 (%6.8)'sında atrofi ve IM ve 53 (%60.3)'ünde normal mukoza saptanmıştır. Western blot testi ile olumlu 95 ve 16 belirsiz saptanan toplam 111 hastada özgül *H. pylori* antijenlerine karşı oluşan her bir bantın görülme sıklığı; p120 kDa (88; %79.3), p95 kDa (32; %28.8), p33 kDa (35; %31.5), p30 kDa (38; %34.3), p29 kDa (82; %73.9), p26 kDa (90; %81.1), p19 kDa (85; %76.6), p17 kDa (67; %60.4) dur. 17 kDa, 19 kDa, 26 kDa, 29 kDa, 30 kDa, 33 kDa, 95 kDa

ve 120 kDa molekül ağırlığındaki bu protein bantlarından en az ikisinin varlığında antrum ve korpusta atrofi, IM, atrofi ve IM histopatoloji sonuçları arasındaki ilişki Pearson Ki-kare testine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

İdrarda *H. pylori*'ye karşı IgG antikorların saptamak için ELISA ve immunokromatografik testler kullanılmaktadır (16,111-114). İdrar temelli ELISA testleri non invaziv, örnek toplanmasının basit, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle avantajlıdır (115,116).

Leodolter ve arkadaşları idrarda anti-*H. pylori* IgG antikorların belirlemek için iki invaziv olmayan idrar ELISA (URINELISA) ve hızlı idrar testlerinin (RAPIRUN) karşılaştırıldığı çalışmalarında, kültür pozitif ya da HUT ve histopatolojinin pozitifliğinde *H. pylori* enfeksiyonu pozitif değerlendirilmiş ve URINELISA'nın duyarlılığı % 89.4, seçiciliğini ise % 68; RAPIRUN'nın duyarlılığı % 82.4, seçiciliğini ise % 83.3 olarak bildirilmiştir. İdrarda *H. pylori*'ye karşı oluşan IgG antikorlarının belirlenmesinin epidemiyolojik araştırmalar için özellikle tarama testi olarak yararlı olabileceği ve doğruluklarının diğer serum temelli ELISA testleri kadar olduğu belirtilmiştir (145).

Kuo ve arkadaşları idrarda URINELISA testinin klinik yararını ve tanıdaki doğruluğunu kültür, HUT, histopatolojik inceleme, ¹³C UBT ile araştırmışlardır. Kültürün tek başına ve ya HUT, histopatoloji ve ¹³C UBT en az ikisinin pozitifliğinde *H. pylori* enfeksiyonunu pozitif olarak kabul etmişlerdir. İdrardaki IgG antikorlarının duyarlılığını % 91.7, seçiciliğini ise % 90.8 olarak saptamışlardır. Buna göre, URINELISA'nın hem Asya hem de Avrupa toplumlarında *H. pylori* enfeksiyonunun belirlenmesinde yüksek kararlılığa sahip, ucuz kolay uygulanabilen ilk basamak tarama testi olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (146).

Demiray ve arkadaşları idrarda *H. pylori* antikorların belirleyen URINELISA ve RAPIRUN ile serumda *H. pylori* antikorların belirleyen anti-*H. pylori* IgG ELISA ve anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA kitlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, URINELISA'nın duyarlılığını % 70.9, seçiciliğini ise % 86.2; RAPIRUN'nın duyarlılığını % 69.6, seçiciliği ise % 82.8; anti-*H. pylori* IgG ELISA'nın duyarlılığını % 96.2, seçiciliğini ise % 37.9 ve anti-*H. pylori* CagA IgG ELISA'nın duyarlılığını % 35.4, seçiciliğini ise % 72.4 olarak bulmuşlardır. Buna göre idrar antikor testlerinin serolojik testlere alternatif olabileceğini bildirmişlerdir (147).

Çalışmamızda anti-*H. pylori* IgG URINELISA testinin duyarlılığı % 66.3, seçiciliği ise % 85.7; RAPIRUN testinin duyarlılığı % 65.4, seçiciliği ise % 82.9 olup, literatürle uyumlu

olarak saptanmıştır. Buna göre, *H. pylori*'ye karşı oluşan IgG antikorlarının idrarda belirlenmesinin epidemiyolojik araştırmalar için özellikle tarama testi olarak yararlı olabileceği ve serolojik testlere alternatif olabileceği kanısına varılmıştır.

Ayrıca alışmamızda kullandığımız Anti-*H. pylori* IgG URINELISA ve RAPIRUN testleri istatistiksel olarak birbirleri ile uyumlu bulunmuş ($k=0.852$) ve bu iki idrar testinin birbirini yerine kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

H. pylori tanısında kullanılan kültür altın standart yöntemlerden biridir. İki önemli avantajı vardır: Antimikrobiyal duyarlılık testlerine olanak sağlar ve kültürle elde edilen suş tiplendirme yöntemlerinde ileri araştırmalarda kullanılabılır (31,43,68).

H. pylori'yi kültürde üretebilmek için çeşitli seçici ve seçici olmayan besiyerleri kullanılmaktadır (43). At kanı, at serumu veya koyun kanı eklenmiş BHI agar, Brucella agar, Tryptone Soya agar, Columbia agar, Wilkins Chalgren agar ve Skirrow's agar kültürde kullanılması önerilen besiyerlerindedir (29,42,65,104). Ayrıca besiyerleri *H. pylori*'nin gelişimini arttırıcı çeşitli besinlerde (vitaminler ve oligoelementler vb.) içermelidir. Katı besiyerlerinde kullanılabilir diğer katkı maddeleri olarak yumurta sarısı, kömür, nişasta, BSA, katalaz, 2,3,5-trifenil tetrazolium klorid (40 mg/litre) bildirilmektedir (42).

Paik ve arkadaşları *H. pylori* kültürü için kullanılan seçici besiyerlerinin karşılaştırdıkları çalışmalarında, %10 taze insan serumu kullanılan besiyeri ile %5 koyun kanı kullanılan besiyerinde elde ettikleri sonuçlar arasında fark bulmamışlardır. Buna göre gastrik biyopsiden *H. pylori* kültürü için hayvan kanı yerine klinik laboratuvarlarda kolayca bulunabilen taze insan serumunun kullanılabilirliğini önermişlerdir (128). Çalışmamızda, gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin en iyi izolasyonunu sağlayan besiyerlerinin performansı araştırılarak optimizasyonunun sağlanması için %7 at kanı Columbia agar, %7 koyun kanı Columbia agar ve %10 taze insan serumlu Columbia agar besiyerleri kullanılmıştır. Bu amaçla *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kullanılmıştır. Kullanılan üç besiyerinde de elde edilen sonuçlar arasında fark bulunmamıştır. Buna göre bizde Paik ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi, klinik laboratuvarlarda daha kolay bulunduğu, maliyeti daha ucuz olduğu için taze insan serumunun gastrik biyopsiden *H. pylori* kültürünün yapılmasında at ve koyun kanı yerine kullanılabilirliği ancak insan serumunda rol oynayabilecek olan anti-*H. pylori* antikorlarının ve serumdaki inhibitörlerin göz önünde bulundurulması ve bu nedenle insan serumlu besiyerleri ile birlikte at kanı besiyerlerinde

kullanılması gerektiği kanısına varıldı. Bu nedenle kullandığımız insan serumları 56 °C’de 30 dakika komplemanın inaktive edilmesi sağlandı.

H. pylori hücre duvarında bulunan metoksi yağ asitleri fazla içerdiğinden dolayı bu özellik bakteriye aside direnç kazandı. Bunun sonucu olarak Gram negatif bakteriler fuksin ile kolayca boyanırken *H. pylori* bu özelliğinde dolayı karbol fuksin ile daha etkili bir şekilde boyandığı bildirilmektedir (148). Çalışmamızda, NCTC 11637 standart *H. pylori* suşunun kolonilerinin tipik morfolojisini görebilmek için hazırlanan preparatlar Gram boyası ve modifiye karbol fuksin ile boyanarak incelenmiştir. Preparatlar modifiye karbol fuksin ile boyandığında morfolojiler daha net gözlemlenmiştir ve literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Ayrıca, -80°C’de stok besiyerinde saklanan NCTC 11637 standart *H. pylori* suşunun yeniden canlandırılma oranları -20°C’de stok besiyerinde saklanan NCTC 11637 standart *H. pylori* suşuna göre üreme oranı ve kolonilerin kantitatif olarak sayımı yüksek bulundu. 1 ay sonrası elde ettiğimiz üreme oranıyla zaman faktörünün önemi de saptandı. Genelde rutin olarak kullanılan yalnızca gliserol içeren stok besiyerlerine göre sakkaroz içeren stok besiyerinin daha fazla üreme ile canlandırılma oranına sahip olduğu saptandı. Sakkaroz hipertonic bir ortam sağladığı için *H. pylori* bakteri hücresinin suyunu azaltarak ortamdaki dondurma sırasında buz kristallerinin daha az olmasını sağlaması nedeni ile daha koruyucu olabildiği belirlendi.

8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, anti-*H. pylori* IgG ELISA testlerinin karşılaştırılmasında duyarlılığın literatür ile uyumlu, seçiciliğin düşük bulunması ve dünyanın farklı bölgelerindeki *H. pylori* izolatlarının antijenik yapıları bölgesel farklılık gösterdiği için serolojik testlerin popülasyonların antijenik özelliklerine göre uyarlanmasının önerilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Western blot yöntemi ile saptanan *H. pylori* antijenlerinin dispeptik hasta grubumuzda anlamlı bir fark göstermediği ancak diğer GIS yakınmalı ve *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, gastrik kanserli hastalarda da özellikle CagA ve VacA antijen varlığının anlamlı olup olmayacağını araştırılması kanısına varıldı.

URINELISA ve RAPIRUN testlerinin non invaziv bir yöntem olarak erişkin hastaların yanı sıra pediatrik hastalarda da tarama testi olarak serolojinin yerine kullanılabilirliği kanısına varıldı.

Ayrıca, *H. pylori* kültürü için klinik laboratuvarlarda daha kolay bulunduğu, maliyeti daha ucuz olduğu için taze insan serumunun gastrik biyopsiden *H. pylori* kültürünün yapılmasında at ve koyun kanı yerine kullanılabilmesi ancak bazı anti-*H. pylori* antikorlar ve serum faktörleri nedeni ile at kanlı besiyeri ile birlikte kullanılması gerekliliği, Gram boyama yönteminin yanı sıra modifiye karbol fuksin boyama yönteminin kullanılmasının daha yararlı olacağı, sakkaroz ve gliserollü stok besiyerlerinin gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* kolonilerinin -80 °C'de başarı ile saklanıp canlandırılabilmesi kanısına varıldı.

9. KAYNAKLAR

1. Vinette KMB, Gibney KM, Proujansky R. and Fawcett PT. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. BMC Microbiol 2004;4:5.
2. Mao Y-F, Yan J, Li L-M, Li S-P. Construction of hpaA gene from a clinical isolate of *Helicobacter pylori* and identification of fusion protein. World J Gastroenterol 2003;9(7):1529-1536.
3. Mao Y-F, Yan J. Construction of prokaryotic expression system of ureB gene from a clinical *Helicobacter pylori* strain and identification of the recombinant protein immunity. World J Gastroenterol 2004;10(7):977-984.
4. Kamali-Sarvetani E, Bazargani A, Masoudian M, Lankarani K et al. Association of *H. pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. World J Gastroenterol 2006;12(32):5205-5210.
5. Attallah AM, Ismail H, Ibrahim GG, Abdel-Raouf M et al. Use of a Novel Enzyme Immunoassay Based on Detection of Circulating Antigen in Serum for Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. Clin Diagn Lab Immunol 2004;775-779.
6. Talley NJ, Newell DG, Ormand JE, Carpenter H. A et al. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori*: Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. J Clin Microbiol 1991;29(8):1635-1639.
7. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by PCR: Comparison with Other Invasive Techniques and Detection of cagA Gene in Gastric Biopsy Specimens. J Clin Microbiol 1995;33(10):2752-2756.

8. Schumann C, Triantafyllou K, Raschea FM, Morricce A et al. Serum antibody positivity for distinct *Helicobacter pylori* antigens in benign and malignant gastroduodenal disease. *Int J Med Microbiol* 2006; 296 (2006) 223–228.
9. Vaira D, Holton J, Menegatti M, Ricci C et al. New immunological assays for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1999;45:123–127.
10. Palestro G, Pellicano R, Fronda GR, Valente G et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and intestinal metaplasia in subjects who had undergone surgery for gastric adenocarcinoma in Northwest Italy. *World J Gastroenterol* 2005;11(45):7131-7135.
11. Wallis-Crespo MC, Crespo A. *Helicobacter Pylori* Infection In Pediatric Population: Epidemiology, Pathophysiology, And Therapy. *Fetal Pediatr Pathol* 2004; 23: 11-28.
12. Lehours P, Yilmaz O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007;12(Suppl 1):1-3.
13. Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G et al. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000;49:349-353.
14. Hoang TTH, Wheeldon T-U, Bengtsson C, Phung DC et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Helicobacter pylori* Needs Adjustment for the Population Investigated. *J Clin Microbiol* 2004;42(2): 627–630.
15. Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U et al. Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(30):10646-10651.
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. Akyön Y, İlmaz Y. *Helicobacter pylori*: Bakteriyolojik özellikleri ve Antibiyotik Direnci. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 21 Eylül 2004.
18. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. N Engl J Med 2002; 347(15):1175-1186.
19. Giannini EG, Bilardi C, Dulbecco P, Mamone M et al. Can *Helicobacter pylori* Eradication Regimens be Shortened in clinical Practice? An Open-label, Randomized, Pilot Study of 4 and 7-day Triple Therapy With Rabeprazole, High-dose Levofloxacin, and Tinidazole. J Clin Gastroenterol 2006;40:515-520.
20. Weiss J, Mecca J, Silva ED, and Gassner D. Comparison of PCR and Other Diagnostic Techniques for Detection of *Helicobacter pylori* Infection in Dyspeptic Patients. J Clin Microbiol 1994;32(7):1663-1668.
21. Wouw BAM, Boer WA, Jansz AR, Roymans RTJM et al. Comparison of Three Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Biopsy-Dependent Diagnosis for Detecting *Helicobacter pylori* Infection. J Clin Microbiol 1996;34(1): 94-97.
22. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F et al. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. World J Gastroenterol 2004;10(13):1958-1960.
23. 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;37:10-3714.
24. Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D et al. Primary Levofloxacin Resistance and *gyrA/B* Mutations Among *Helicobacter pylori* in Japan. Helicobacter 2006;11:243-249.

25. Graham DY., Abudayyeh S, El-Zimaity HMT, Hoffman J et al. Sequential therapy using high-dose esomeprazole-amoxicillin followed by gatifloxacin for *H. pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2006.
26. Sharara AI, Chaar HF, Aoun E, Abdul-Baki H et al. Efficacy and Safety of Rabeprazole, amoxicillin, and Gatifloxacin After Treatment Failure of Initial *Helicobacter pylori* Eradication. *Helicobacter* 2006;11:231-236.
27. Marzio L, Coraggio D, Capodicasa S, Grossi L et al. Role of the Preliminary Susceptibility testing for Initial and After Failed Therapy of *Helicobacter pylori* Infection with Levofloxacin, Amoxicillin, and Esomeprazole. *Helicobacter* 2006;11:237-242.
28. Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MJ et al. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1995;109:136-141.
29. Versalovic J, Fox JG. *Helicobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition, USA, ASM press, 2003. p. 915-928.
30. http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori.
31. Demiray E. *Helicobacter pylori* ve Klaritromisin Direncinin Parafin Bloklarda Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi ile Belirlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yüksek lisans tezi, 2006;7-52.
32. Özden A. *Helicobacter pylori*'nin yüzyıllık hikayesi. İşte *Helicobacter pylori*. Ankara, Nürol Matbaacılık: Türk Gastroenteroloji Derneği yayını, 1995;1-3.
33. Akyön Yılmaz Y. *Helicobacter pylori* Sempozyumu kitapçığı. Ankara Üniversitesi tıp Fakültesi 2003;1-6.

34. Suzuki H, Hata T, Marshall BJ. *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. J Gastroenterol 2007; 42:1-15.
35. 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;531-540.
36. Radosz-Komoniewska H, Bek T, Jozwiak J and Martirosian. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect 2005;11:602-610.
37. Kusters JG, van Vliet AHM and Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clin Microbiol 2006; 19(3):449-490.
38. Lacy BE and Rosemore J. *Helicobacter pylori*: Ulcers and More: The Beginning of an Era. J Nutr 2001; 131:2789S-2793S.
39. Höcker M, Hohenberger. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big Picture. Lancet 2003; 362:1231-1233.
40. <http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/press.html>.
41. Velin D, Michetti. Immunology of *Helicobacter pylori* Infection. Digestion 2006; 73:116-123.
42. Megraud F and Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clin Microbiol 2007; 20(2):280-322.
43. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;10: 720-741.
44. O'Toole PW, Lane MC; Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. Microbes and Infection 2000:1207-1214.

45. Winn Wasshington, Allen S, Jandan W, Koneman E et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Baltimore,MD 21201, Philadelphia,PA 19106, USA, 2006;403-408.
46. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases., 5th edition, USA, Philadelphia,Pennsylvania, 2000. p.2285-2291.
47. Ottemann KM and Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* Uses Motility for Initial Colonization and To Attain Robust Infection. Infect Immun 2002; 70(4):1984-1990.
48. 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.
49. Josenhans C, Suerbaum S. Flagella and motility of *Helicobacter pylori*. In: Moran AP, O'Morain CA eds. Pathogenesis and host response in *Helicobacter pylori* infections. Homburg Normed Verlag: Internarnational Medical Publishers. 1997;6-15.
50. Skene C, Young A, Every A and Sutton P. *Helicobacter pylori* flagella: antigenic profile and protective immunity. FEMS Immunol Med Microbiol 2007;50;249-256.
51. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. Second, USA, ASM press, 2002; 339-351.
52. Dossumbekova A, Prinz C, Gerhard M, Brenner L et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation. Gut 2006; 55:1360-1361.
53. Lu H, Wu JY, Beswick EJ, Ohno T et al. Functional and Intracellular Signaling Differences Associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB Adhesin from Western and East Asian Strains. J Biol Chem 2007; 282(9):6242-6254.

54. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and Bacterial Pathogenicity: Genetic and Functional Genomic Analysis of *hopH* Gene Polymorphism. *J Infect Dis* 2006; 194:1346-1355.
55. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and Infection* 2000:55-60.
56. Das JC and Paul N. Epidemiology and Pathophysiology of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Indian J Pediatr* 2007; 74:287-290.
57. Colbeck JC, Hansen LM, Fong JM and Solnick JV. Genotypic Profile of the Outer Membrane Proteins BabA and BabB in Clinical Isolates of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2006; 74(7):4375-4378.
58. Shao S-H, Wang H, Chai S-G, Liu L-M. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. *World J Gastroenterol* 2005; 11(20):3011-3013.
59. Doig P, Exner MM, Hancock REW and Trust TJ. Isolation and Characterization of a Conserved Porin Protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1995; 177(19):5447-5452.
60. Cover TL. Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Gastroduodenal Disease. *J Infect Dis* 2006; 194:1343-1345.
61. 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.
62. Björkholm B, Salama NR. Genomics of *Helicobacter pylori* 2003. *Helicobacter* 2003;(Suppl. 1):1-7.

63. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Eleventh Edition, USA, 2002;479-481.
64. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Medical microbiology. Twenty-second edition, USA, Appleton & Lange, 2001; 240-241.
65. Jiang X, Doyle MP. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2000;38: 1984-1987.
66. 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.
67. Altındaş M, Özdemir M. *Helicobacter pylori* ve Tanı. Kocatepe Tıp Dergisi 2003; 2:1-12.
68. Nakamura RM. Laboratory Tests for the Evaluation of *Helicobacter pylori* Infections. J Clin Lab Anal 2001; 15:301-307.
69. Özden A, Dumlu Ş, Özkan H, Dönderici Ö et al. Transmission of *Helicobacter pylori*. Gastroenteroloji 1994;5:411-413.
70. 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.
71. Gülersoy Özyaydın AN, Türkyılmaz AS, Çalı Ş, Hancıoğlu A. Türkiye Helikobakter pilori prevalans araştırması. Marmara Sağlık Eğitim ve Araştırma Vakfı 2003 araştırma raporu 2007; Eray Basım Hiz. Ltd. Şti. İstanbul.
72. Heatley RV. *Helicobacter pylori* el kitabı. İkinci Baskı, İstanbul, Blackwell Science, CSA, 1998; 1-35.

- 73.** Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clin Sci 2006; 110:305-314.
- 74.** Windsor HM, Abioye-Kuteyl EA, Leber JM, Morrow SD et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Indigenous Western Australians: comparison between urban and remote rural population. MJA 2005; 182:210-213.
- 75.** Mitchell H and Mégraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2002; 7(Suplement 1):8-16.
- 76.** Kikuchi S and Dore MP. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2005; 10(Suplement 1):1-4.
- 77.** Perez-Perez GI, Rothenbacher D and Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2004; 9(Suplement 1):1-6.
- 78.** Malaty HM and Nyren O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2003; 8(Suplement 1):8-12.
- 79.** Lamarque D, Peek Jr RM. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2003;8: 21-30.
- 80.** Demiray E, Bekmen N. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Fagositoz. Mikrobiol Bül 2008;42:177-184.
- 81.** Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Medical microbiology. Twenty-third edition, USA, Appleton & Lange, 2004; 275-276.
- 82.** Saltoğlu N. *Helicobacter pylori*. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D ed. Gram-Negatif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi,2004;345-356.

83. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21(2):237-259.
84. Olivares D and Gisbert JP. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98(5):374-386.
85. 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.
86. Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori* infeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi. *Türk Mikrobiyol Cem Der* 2007; 37(2):112-117.
87. 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.
88. Cussac V, Ferrero RL, Labigne A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Eschreichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol* 1992;174: 2466-2473.
89. McGee DJ, May CA, Garner RM, Himplsl JM et al. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol* 1999;8: 2477-2484.
90. Wen Y, Marcus EA, Matrubutham U, Gleeson MA et al. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003;71: 5921-5939.
91. Fidan I, Türet S. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda patogenez ve tanı. *İnfeksiyon Dergisi* 1999;13:455-460.
92. Ovalı Ö, Baylan O. Klinik ve mikrobiyolojik açıdan *Helicobacter pylori*. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004;34: 135-146.

93. Sarıbaşak H, Salih BA, Yamaoka Y et al. Analysis of *Helicobacter pylori* Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkey. J Clin Microbiol 2004; 42(4):1648-1651.
94. Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? Ann Med 2001;33: 91-97.
95. Sipponen P, Harkönen M, Alanko A, Suoaniemi O. Diagnosis of Atrophic Gastritis from a Serum Sample. Clin Lab 2002;48:505-515.
96. Sipponen P, Suoaniemi O, Harkönen M. Role of Pepsinogen assays as surrogate markers of gastritis dynamics in population. Helicobacter pylori 2002;12:127-132.
97. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayash> GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Third edition, London, Mosby-Year Book, 1998; 255-257.
98. 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.
99. Vaira D, Gatta L, Ricci C et al. Review article: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16(Suppl. 1):16-23.
100. Wilson WR, Sande MA. Current Diagnosis&Treatment in Infectious Diseases. International edition, USA, McGraw-Hill & Lange, 2001; 581-586.
101. Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2007;21(2):299-313.
102. Krogfelt KA, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2005;10(Suppl.1):5-13.

- 103.** Yılmaz Ö. Progress in developing accurate tests for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* *Helicobacter pylori* infection. *Expert opinion* 2007;1(4):531-540.
- 104.** Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. *Medical microbiology*. Twentieth edition, USA, Appleton & Lange, 1995; 229-230.
- 105.** Rautelin H, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8: 13-20.
- 106.** Makristahis A, Hirschi AM, Lehours P et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004;9 (Suppl.):7-14.
- 107.** Yılmaz Ö, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence *in situ* hybridization method in Diagnosis of *H. pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *H. pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13(5):671-675.
- 108.** Yalınay Cirak M, Akyön Y and Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007;12(Suppl.):4-9.
- 109.** 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.
- 110.** 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.
- 111.** 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.

- 112.** 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.
- 113.** 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.
- 114.** Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992;340: 1194-1195.
- 115.** 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.
- 116.** 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](http://www.helicobacter.org)
- 117.** Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J Med Microbiol* 2001;50: 1021-1029.
- 118.** Monteiro L, Gras N, Mégraud F. Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. *J Clin Microbiol* 2001;3778-3780.
- 119.** 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.

- 120.** 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, Copenhagen, Denmark, 10.25. *Helicobacter* 2005;10:52.
- 121.** 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.
- 122.** Yamamoto T, Tamura M, Ishii T, Anjiki H et al. Urinary antibody titers to *Helicobacter pylori* and an Impact of Clinical cracteristics. *J Clin Gastroenterol* 2003;36: 329-331.
- 123.** 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.
- 124.** Graham DY, Reddy S. Rapid detection of anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine using immunochromatography. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15: 699-702.
- 125.** Şimşek İ. Asit ile İlgili Sindirim Sistemi Hastalıkları. İzmir, 2008;127-137.
- 126.** Drossman DA. Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis* 2006;7(4):181-185.
- 127.** Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis:The updated Sydney system. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J surg Pathol* 1996;20:1161-81.
- 128.** Paik IK, Kim YS, Shin WC, Lee JH. Comparison of Selective Media for Culture of *Helicobacter pylori*. *Korean J Clin Microbiol* 2001;4(1):11-15.

- 129.** Merrell DS, Thompson LJ, Kim CC, Mitchell H et al. Growth Phase-Dependent Response of *Helicobacter pylori* to Iron Starvation.. Infect Immun 2003;71(11):6510-6525.
- 130.** McNulty CA, Wyatt JJ. Helicobacter pylori. J Clin Pathol 1999;52:338-344.
- 131.** El-Shewy HM, Kendall Jr. WF, Darrabie M, Collins BH et al. Polyvinyl Pyrrolidone: A novel Cryoprotectant in Islet Cell Cryopreservation. Cell Transplantation 2004;13(3):237-243.
- 132.** 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.
- 133.** Basset C, Holton J, Ricci C, Gatta L, Tampieri A, Perna F, Miglioli M, Vaira D. Review article: diagnosis and treatment of *Helicobacter*: a 2002 updated review. Aliment Pharmacol Ther 2003;17 Suppl 2:89-97.
- 134.** Dirican A. Tanı testi performanslarının değerlendirilmesi ve kıyaslanması. Cerrahpaşa J Med 2001;32:25-30.
- 135.** Lam SK, Talley NJ. Report of the 1997 Asia Pacific Consensus Conference on the management of *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol and Hepatol 1998;13:1-12.
- 136.** Xia HH-X, Wong BCY, Wong WM, Tang VSY et al. Optimal serological tests for the detection of *Helicobacter pylori* infection in the Chinese population. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:521-526.
- 137.** Leung WK, Chow TP, Ng EKw, Chan FKL et al. Validation of a new immunoblot assay for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* in the Asian population. Aliment Pharmacol Ther 2001;15:423-428.

- 138.** Locatelli A, Catapani WR, Junior CRG, Silva CBP et al. Detection of anti-*Helicobacter pylori* antibodies in serum and duodenal fluid in peptic gastroduodenal disease. *World J Gastroenterol* 2004;10(20):2997-3000. Locatelli A, Catapani WR, Junior CRG, Silva CBP et al. Detection of anti-*Helicobacter pylori* antibodies in serum and duodenal fluid in peptic gastroduodenal disease. *World J Gastroenterol* 2004;10(20):2997-3000.
- 139.** Yılmaz Ö, Şen N, Küpelioglu AA, Şimşek İ. Detection of *H. pylori* infection by ELISA and Western blot techniques and evaluation of anti-CagA seropositivity in adult Turkish dyspeptic patients. *World J Gastroenterol* 2006;12(33):5375-5378.
- 140.** Dhar R, Mustafa AS, Dhar PM, Khan MS et al. Evaluation and comparison of two immunodiagnostic assays for *Helicobacter pylori* antibodies with culture results. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:1-6.
- 141.** Bodhidatta L, Hoge CW, Churnratanakul S, Nirdnoy W et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a developing country: comparison of two ELISAs and a seroprevalence study. *J Infect Dis* 1993;168:1549-1553.
- 142.** Sezgin M, Gulster S, Apan TZ, Aksoy A et al. Frequencies of serum antibodies to *Helicobacter pylori* CagA and VacA in a Turkish population with various gastroduodenal diseases. *J Clin Pract* 2006;60(10):1239-1243.
- 143.** Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, Aslan M et al. Analysis of serum antibody profile against *H. pylori* VacA and CagA antigens in Turkish patients with duodenal ulcer. *World J Gastroenterol* 2006;12(42):6869-6873.
- 144.** Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, Bergey B et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol* 2001;96:353-8.

- 145.** Leodolter A, Vaira D, Bazzoli F, Schütze K et al. European multicentere 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.
- 146.** Kuo F-C, Wang S-W, Wu I-C, Yu F-J et al. Evaluation of urine ELISA test for detecting *Helicobacter pylori* infection in Taiwan: a prospective study. *World J Gastroenterol* 2005;11(35):5545-5548.
- 147.** Demiray E, Gönen C, Bekmen N, Dölek D et al. An evaluation of urine based and serum anti- *Helicobacter pylori* antibody tests for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Turkish adult patients with dyspepsia. European helicobacter study group (EHSG) XXth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation. September 20-22, 2007, İstanbul, Turkey, P109. *Helicobacter* 2007;12:445.
- 148.** Inamoto Y, Hamanaka S, Hamanaka Y, Nagate T et al. Lipid composition and fatty acid analysis of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 1995; 30(3):315-318.

10. EK

10.1

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Değerli Hastamız,

Sizin muayeneniz ve değerlendirilmeniz sonucunda doktorunuz tarafından endoskopi yapılması gerekli bulunmuştur. Mide mukozasına yerleşen *Helicobacter pylori* adındaki bakterinin gastrit, mide ülseri ve mide kanseri ile ilişkisi kanıtlanmıştır. Bu bakterinin varlığı hızlı üreaz testi, histopatolojik inceleme, üre nefes testi, kültür, moleküler yöntemler, dışkı antijen testi ve serolojik testler gibi çeşitli yöntemlerle saptanabilmektedir. Katılacağınız çalışmada endoskopi yapılmasını gerektiren ve gerektirmeyen yöntemlerin *Helicobacter pylori* tanısındaki etkinliği araştırılacaktır.

Yukarıda bahsedilen bakterinin varlığı, endoskopi sırasında rutin olarak alınan biyopsi örneğine hızlı üreaz testinin uygulanmasıyla sizde de araştırılacaktır. Endoskopi sırasında yapılacak bu testle midenizde bakterinin var olduğu saptanırsa çalışmamız için midenizden 4 adet daha biyopsi alınacak ve bu biyopsiler de bakterinin araştırılması için kültür ve moleküler yöntemler uygulanarak ileri incelemeleri yapılacaktır. Ayrıca, sizden endoskopi sonrasında bir defalık alınacak kan örneğinde *Helicobacter pylori*'nin laboratuvar tanısında kullanılan serolojik testlerden ELISA ve Westernblot testleri uygulanacaktır. Bu işlemler size herhangi bir zarar vermemektedir. Testlerin sonuçları kontrol ve tedavi altında olduğunuz bölüme bildirilecektir. Bu konuda elde edilen bilgiler sizin tedavinizin yönlendirilmesinde de kullanılacaktır.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Gönüllü olarak bu çalışmada yer alan tüm hastaların kişisel bilgileri gizli tutulacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları sizden veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluştan

talep edilmeyecektir. Eğer çalışmaya katılmayı kabul ediyorsanız ilgili bölümü imzalamanız gerekmektedir.

Gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren yukarıdaki metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik laboratuvar araştırmasına kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Ad :

Soyad :

Adresi :

Telefon(Ev/Cep):

Tarih :

İmza :

Araştırma Sorumlusu

Ad Soyad :

Telefon :

Adres :

İmza :

Tanımlık Eden Araştırmacı

Ad Soyad :

Telefon :

Adres :

İmza :

İrtibat Kurulabilecek Telefon Numaraları

Neslihan Bekmen

0232-412-45-01

0554-370-53-61

10.2

ÇALIŞMA FORMU

Ad Soyad : **Tarih** :
Yaş : **Protokol No** :
Cinsiyet : **Patoloji No** :
Adres : **Telefon** :

- **Hasta çalışma kriterlerine** **Uygun** **Uygun değil**

Dışlama kriterleri göz önüne alınarak dışlanan, dispeptik yakınmalı ve kanamalı endoskopi endikasyonu konulan hastalar çalışmaya alınacaktır. Dışlama kriterleri; Koagülopati, gebelik, laktasyon, malignensiler, gastrik cerrahi geçirenler, son 6 ay içinde *Helicobacter pylori* eradikasyon tedavisi alanlar, son 1 ay içinde antibiyotik, anti sekretuar ilaç, bizmut tuzlar, sukralfat kullanan hastalar.

- **Gönüllü bilgilendirme formu verildi mi?** **Evet** **Hayır**

- **Mide biyopsisi alındı mı?** **Antrum** **Korpus**

- **Hızlı Üreaz Testi**

Antrum (+) (-)

Korpus (+) (-)

Hastalardan alınan biyopsi örnekleri histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderilecektir. HLO sonuçları takip edilecektir.

▪ **Histopatolojik incelemede HLO**

Antrum

(+)

(-)

Korpus

(+)

(-)

▪ **Kan örneği alındı mı?**

Evet

Hayır

10.3

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI : 07
TOPLANTI GÜNÜ : Salı

TOPLANTI TARİHİ : 13.02.2007
TOPLANTI SAATİ : 11.00

KARAR 12/ Enstitümüz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencisi Neslihan BEKMEN'in, tez danışmanı Doç.Dr. Özlem YILMAZ tarafından 23.01.2007 tarihli yazı ile önerilen ve Etik Kurul onayı alınan tez konusunun aşağıdaki şekilde kabulüne mevcudun oy birliği ile karar verildi.

Tez konusu : 'Dispeptik ve Kanama Hastalarda ELISA ve Westerblot Yöntemleriyle Helicobacter Pylori'nin Antijenik Varyasyonlarının Araştırılması'

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 12.01.2007/06

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Elif AKALIN
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Yunus Karşlı

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri

Özge İÇCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 11 Ocak 2007 tarih ve 08/01/2007 no.lu toplantısında, 278/2006 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Neslihan BEKMEN'in sorumlu olduğu "**Dispeptik ve kanamalı hastalarda ELISA ve Westernblot yöntemleriyle Helicobacter pylori'nin antijenik varyasyonlarının araştırılması**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

10.4

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI : 18
GÜNÜ : Salı
TOPLANTI TARİHİ : 24.06.2008
SAATİ : 11.00


TOPLANTI
TOPLANTI

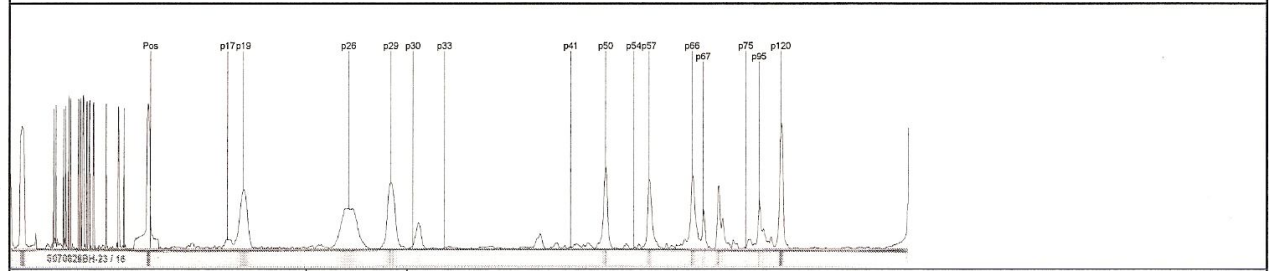
KARAR 08/ Enstitümüz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji yüksek lisans programı öğrencisi Neslihan BEKMEN'in, tez danışmanı Prof.Dr. Özlem YILMAZ tarafından 23/06/2008 tarihli yazı ile önerilen ve Etik Kurul onayı alınan **tez başlığı değişikliğinin** aşağıdaki şekilde kabulüne mevcutun oy birliği ile karar verildi.
Tez konusu : 'Dispeptik Hastalarda ELISA ve Westernblot Yöntemleriyle Helicobacter Pylori'nin Antijenik Varyasyonlarının Araştırılması'

IMMUNOLOJI LABORATUARI

Patients ID's: sultan demirci
 name: sultan demirci
 Lab number: 9
 Number: 1

Test: Helicobacter pylori IgG
 Strip No.: 16
 Date of receipt: 11.06.2008
 Results from: 11.06.2008

EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG  Automatic evaluation of test strips using the EUROLinScan software



Molecular weight	char	o	(+)	+
p120, CagA	+	[strong staining bar]		
p 95, VacA	+	[strong staining bar]		
p 75	o	[no staining]		
p 67, Flag.	+	[strong staining bar]		
p 66, UreB	+	[strong staining bar]		
p 57	+	[strong staining bar]		
p 54	o	[no staining]		
p 50	+	[strong staining bar]		
p 41	o	[no staining]		
p 33	o	[no staining]		
p 30	o	[no staining]		
p 29, UreA	+	[strong staining bar]		
p 26	+	[strong staining bar]		
p 19, OMP	+	[strong staining bar]		
p 17	o	[no staining]		
Positioning mark	o	[no staining]		

Class	Explanation
o	no staining
(+)	weak staining
+	strong staining

Test	Result
Helicobacter pylori IgG	positive

Signature: _____