

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİSPEPTİK YAKINMALI HASTALARDA
HELICOBACTER PYLORI VARLIĞI, DİRENÇ VE
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

EBRU DEMİRAY GÜRBÜZ

MİKROBİYOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970082

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİSPEPTİK YAKINMALI HASTALARDA
HELICOBACTER PYLORI VARLIĞI, DİRENÇ VE
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MİKROBİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

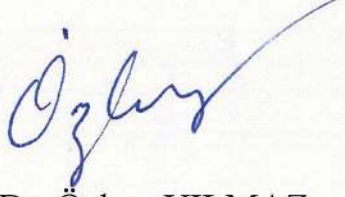
EBRU DEMİRAY GÜRBÜZ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Özlem YILMAZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2006.KB.SAG.042 sayı ile desteklenmiştir)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970082

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora programı öğrencisi Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ “**Dispeptik yakınmalı hastalarda *Helicobacter pylori* varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değerlendirilmesi**” konulu Doktora tezini 18.01.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



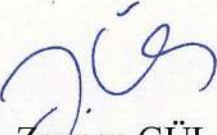
Prof. Dr. Özlem YILMAZ
BAŞKAN



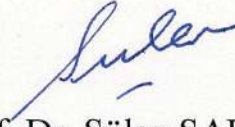
Prof. Dr. Hale AKPINAR
ÜYE



Prof. Dr. Funda TIHMINLIOĞLU
ÜYE



Prof. Dr. Zeynep GÜLAY
ÜYE



Prof. Dr. Sölen SARIOĞLU
ÜYE



Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ
ÜYE

Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Cem ERGON
YEDEK ÜYE

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen; engin bilgi birikimi, yakın ilgi ve önerileri ile bana daima yol gösteren; geleceğe yönelik bilimsel bakış açısı kazandıran; sonsuz destek ve katkılarını gördüğüm; yetişmemde büyük emeği geçen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle ilgili her konuda tüm bilimsel paylaşımı ve desteği için New York Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıp ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalları, NYUSM, New York, Amerika'dan Sayın Assoc. Prof. Dr. Guillermo I. PEREZ-PEREZ ve Asalia OLÍVARES'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

FEMS bursu ile gittiğim Campylobacter ve Helicobacter Referans Laboratuvarı, Bordeaux, Fransa'da tezimin en temel basamaklarını öğrenme olanağını bana tanıyan Sayın Prof. Dr. Francis MEGRAUD'ya ve laboratuvar çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Klaritromisinin elektron mikroskopunda analizi ve agar dilüsyon yönteminin uygulanmasında 109M128 TÜBİTAK Doktora tez projesi kapsamında gerekli olanakları sağladığı için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Fakültesi Dekanı ve Kimya Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Funda TIHMINLIOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatımda gösterdiği destek ve katkılardan dolayı Anabilim Dalı Başkanım Sayın Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR'a ve tıbbi mikrobiyoloji kavramını bana kazandırdıkları için bölüm hocalarıma; tez jüri başkanım Sayın Prof. Dr. Özlem YILMAZ'a, tez jüri üyelerim Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan, Sayın Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'a, Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Hale AKPINAR'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Sülen SARIOĞLU'na, Tıbbi Bilişim ve Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a tez aşamalarında bana gösterdikleri katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez hasta seçimindeki katkılarından dolayı Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. İlkey ŞİMŞEK'e, Prof. Dr. Hale AKPINAR'a, Doç. Dr. Müjde SOYTÜRK'e, Uzm. Dr. Can GÖNEN'e ve yardımlarını esirgemeyen tüm Endoskopi Ünitesi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Epifloresan mikroskobu konusunda bana alt yapı olanaklarından yararlanma fırsatını sağlayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Sayın Araş. Gör. Sait TÜMER ve Sayın Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Real-time PCR çalışmalarımı gerçekleştirmem ve LightCycler cihazını kullanmam için araştırma laboratuvarlarının alt yapı olanaklarından yararlanma fırsatını sağlayan GENMAR firması yetkilileri ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Doktora projesi 2006.KB.SAG.042 nolu proje ile destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca Yurt içi Doktora Bursu ile bana destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanları Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca benim için hiçbir fedakrlıktan kaçınmayan, çalışma aşkımı ve abamı destekleyen, sevgileriyle daima bana g veren babam Sedat DEMİRAY ve annem Seher DEMİRAY'a; kalbimi her gün yeniden umutla ve mutlulukla dolduran eşim Serkan GÜRBÜZ ve yaşam kaynağım biricik oğlum Arda GÜRBÜZ'e sonsuz teşekkürlerimle...

Saygılarımla

Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR.....	xi
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Tarihçe	8
2.2. <i>Helicobacter</i> Ailesi	11
2.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Yapısı ve Mikrobiyolojik Özellikleri	11
2.3.1. Bakterinin Yapısı.....	11
2.3.2. Fenotipik İdentifikasyon.....	19
2.4. Epidemiyoloji ve Prevalans	20
2.5. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu ve Patogenez	23
2.5.1. Asidik Ortamda Yaşama	23
2.5.2. Kolonizasyon ve Tutunma	25
2.5.2.1. Adezyon Molekülleri	26
2.5.2.2. Diğer Faktörler.....	31
2.5.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Konak Hücreye Tip IV Sekresyon Sistemi ve Diğer Yolaklarla Girişi.....	32
2.5.4. Hücre İçi Sinyal Yolaklarının Başlangıcı.....	34
2.5.4.1. Peptidoglikan ve İndüklediği Sinyal Yolakları.....	34
2.5.4.2. Lipopolisakkarit (LPS) ve İndüklediği Sinyal Yolakları.....	35
2.5.4.3. Sitotoksin ilişkili gen A (CagA) Proteini ve İndüklediği Sinyal Yolakları.....	36
2.5.4.4. Vakuol oluşturan sitotoksin A (VacA) Proteini ve İndüklediği Sinyal Yolakları.....	45
2.5.5. Konak Hücre Yanıtı.....	54
2.5.6. Otoimmünite.....	64

2.6. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	68
2.6.1. İnvaziv Yöntemler	68
2.6.1.1. Endoskopi.....	68
2.6.1.2. Hızlı Üreaz Testi (HUT).....	69
2.6.1.3. Histopatolojik İnceleme.....	70
2.6.1.4. Kültür.....	72
2.6.1.5. Moleküler Tanı Yöntemleri	74
2.6.1.5.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR).....	74
2.6.1.5.2. Real-time Polimeraz Zincir Tepkimesi (Real-time PCR).....	74
2.6.1.5.3. Dual Priming Oligonükleotid Polimeraz Zincir Tepkimesi (DPO-PCR).....	75
2.6.1.5.4. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) Yöntemi.....	76
2.6.1.6. Moleküler Genotiplendirme.....	76
2.6.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler	76
2.6.2.1. Üre Nefes Testi (UBT) (¹³ C ve ¹⁴ C UBT).....	76
2.6.2.2. Serolojik Yöntemler	77
2.6.2.2.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	77
2.6.2.2.2. Westernblot	78
2.6.2.3. Dışkı Örneklerinde Kullanılan Yöntemler	79
2.6.2.3.1. Dışkı Kültürü	79
2.6.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri	79
2.6.2.3.3. Dışkı PCR	81
2.6.2.3.4. Dışkı Nested PCR.....	81
2.6.2.3.5. Dışkı Real Time PCR.....	82
2.6.2.3.6. Dışkı Genotiplendirme.....	82
2.6.2.4. Diğer Örnekler İçin Kullanılan Tanı Yöntemleri.....	82
2.6.2.4.1. İdrar Antikor Testleri.....	82
2.6.2.4.2. Tükürük Antikor Testleri.....	83
2.7. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Tedavisi.....	83
2.7.1. Tedavide Kullanılan Ajanlar.....	83
2.8. Antimikrobiyal Direnç	85
2.8.1. Antimikrobiyal Direncin Prevalansı.....	85

2.8.2. Antimikrobiyal Direnç ve Klinik Etki.....	86
2.8.3. Antimikrobiyal Direncin Moleküler Mekanizması.....	87
2.8.3.1. Metronidazol Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	87
2.8.3.2. Tetrasiklin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	88
2.8.3.3. Amoksisilin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	89
2.8.3.4. Florokinolon Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	89
2.8.3.5. Rifampisin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	90
2.8.3.6. Klaritromisin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması.....	90
2.8.4. Klaritromisin Direnci Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	94
2.8.4.1. Fenotipik Yöntemler.....	94
2.8.4.1.1. Agar Dilüsyon	94
2.8.4.1.2. Broth Dilüsyon.....	94
2.8.4.1.3. Disk Difüzyon.....	95
2.8.4.1.4. Gradyent Difüzyon (E-test).....	95
2.8.4.2. Genotipik Yöntemler.....	95
2.8.4.2.1. PCR-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)... ..	95
2.8.4.2.2. PCR-Oligonükleotid Ligasyon Testi (OLA).....	95
2.8.4.2.3. PCR-DNA Enzim İmmun Testi (DEIA).....	96
2.8.4.2.4. PCR-Line Prob Testi (PCR-LİPA).....	96
2.8.4.2.5. PCR-Preferential Homodubleks Formasyon Testi (PCR -PHFA).....	96
2.8.4.2.6. 3' Mismatched Ters Primer PCR (3M-PCR).....	96
2.8.4.2.7. Real-Time PCR Hibridizasyon Testi.....	96
2.8.4.2.8. Biprob Real-time PCR.....	97
2.8.4.2.9. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) analizi.....	97
2.8.4.2.10. Tek Kanal Multipleks PCR.....	97
2.8.4.2.11. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) Yöntemi.....	97
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	102
3.1. Araştırmanın Tipi.....	102
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	102
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	102
3.4. Çalışma Materyali.....	103

3.4.1. Biyopsi Örneklerinin Alınması.....	103
3.4.2. Formalin Fikse Parafine Gömülü Biyopsi Kesitlerinin Alınması.....	103
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	103
3.6. Veri Toplama Araçları.....	104
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri.....	104
3.6.2. Biyopsi Örneklerinin Hızlı Üreaz Testi (HUT) ile İncelenmesi.....	107
3.6.3. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi.....	108
3.6.4. Hastaların <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu yönünden değerlendirilmesi	108
3.6.5. Biyopsi Örneklerinin Kültürü.....	108
3.6.5.1. Besiyeri Hazırlığı.....	108
3.6.5.1.1. Transport Besiyerinin Hazırlanması.....	108
3.6.5.1.2. Kültür Besiyerlerinin Hazırlanması.....	109
3.6.5.1.3. Stok Besiyerinin Hazırlanması.....	110
3.6.5.2. Kültür Protokolü.....	110
3.6.5.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	112
3.6.5.3.1. Agar Dilüsyon Yöntemi.....	112
3.6.5.3.2. Gradyent Difüzyon (E-test) Yöntemi.....	114
3.6.5.3.3. Disk Difüzyon Yöntemi.....	115
3.6.6. Biyopsi Örneklerinin ve İzole Edilen <i>Helicobacter pylori</i> Koloni Örneklerinin FISH Yöntemi ile İncelenmesi	116
3.6.6.1. Biyopsi Örneklerinden İzole Edilen <i>Helicobacter pylori</i> Koloni Örneklerinin FISH Yöntemi ile İncelenmesi.....	116
3.6.6.1.1. Örneklerin Hazırlanması.....	116
3.6.6.1.2. Dehidrasyon.....	116
3.6.6.2 Formalin Fikse Parafine Gömülü Biyopsi Örneklerinin FISH Yöntemi ile İncelenmesi.....	116
3.6.6.2.1. Örneklerin Hazırlanması.....	116
3.6.6.2.2. Deparafinizasyon.....	116
3.6.6.3. Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması.....	117
3.6.6.4. FISH Yönteminin Uygulanması.....	117
3.6.6.4.1. BACTfish <i>H. pylori</i> Combi Kit Uygulaması.....	117

3.6.6.4.1.1. Test Reaktiflerinin Hazırlanması	117
3.6.6.4.1.2. Hibridizasyon	118
3.6.6.4.1.3. Görüntü Analizi ve Değerlendirme	118
3.6.7. Biyopsi ve Koloni Örneklerinin Real-time PCR Yöntemi ile	
İncelenmesi.....	119
3.6.7.1. Örneklerin Hazırlanması.....	119
3.6.7.2. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinden Total DNA	
Ekstraksiyonu.....	120
3.6.7.2.1. QIAamp DNA Mini Kit Uygulaması.....	120
3.6.7.3. <i>Helicobacter pylori</i> DNA'sının Koloniden Ekstraksiyonu.....	121
3.6.7.3.1. Wizard Genomik DNA Pürifikasyon Kiti Uygulaması.....	121
3.6.7.3.2. High Pure Template Hazırlama Kiti Uygulaması.....	122
3.6.7.4. Andiatec® <i>Helicobacter pylori</i> (Clarithromycin resistance) PCR	
kiti ile Real-time PCR Yönteminin Uygulanması.....	123
3.6.7.4.1. Test Reaktiflerinin Hazırlanması.....	123
3.6.7.4.2. Amplifikasyon için Real-time PCR Karışımının Hazırlanması	123
3.6.7.4.3. Real-time PCR Programı.....	124
3.6.7.4.4. Real-time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	124
3.6.8.5. <i>in house</i> Real-time PCR Yönteminin Uygulanması.....	124
3.6.8.5.1. Primerlerin Hazırlanması.....	124
3.6.8.5.2. Probların Hazırlanması.....	124
3.6.8.5.3. Pozitif Kontrollerin Hazırlanması.....	125
3.6.8.5.4. Amplifikasyon için Real-time PCR Karışımının Hazırlanması	127
3.6.8.5.5. Real-time PCR Programı.....	128
3.6.8.5.6. Real-time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	128
3.6.9. <i>Helicobacter pylori</i> varlığı, <i>cagA</i> ve <i>vacA</i> PCR Uygulaması	128
3.6.9.1. Test Reaktiflerinin Hazırlanmaları.....	128
3.6.9.2. DNA'nın Çoğaltılması (Amplifikasyon).....	129
3.6.9.2.1. Amplifikasyon için PCR Karışımının Hazırlanması.....	129
3.6.9.2.2. Termal Cycler PCR Programı.....	131
3.6.9.2.3. Agaroz Jel Hazırlama.....	132
3.6.9.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	132

3.6.9.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	132
3.7. Araştırma Planı.....	133
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	133
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	134
3.10. Etik Kurul Onayı.....	134
4. BULGULAR	135
4.1. Demografik Bulgular.....	135
4.2. Endoskopik Bulgular.....	135
4.3. Hızlı Üreaz Testi (HUT) Bulguları.....	136
4.4. Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine Göre Histopatolojik Bulgular.....	136
4.5. Kültür Bulguları.....	137
4.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Bulguları.....	139
4.7. Hastaların <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Yönünden Değerlendirilmesi...	141
4.8. FISH Bulguları.....	142
4.9. Andiatec ® <i>Helicobacter pylori</i> (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile Real-time PCR bulguları.....	149
4.10. <i>in house</i> Real-time PCR Bulguları.....	152
4.11. HPU PCR Bulguları.....	156
4.12. <i>cagA</i> PCR Bulguları.....	158
4.13. <i>vacA</i> PCR Bulguları.....	161
5. TARTIŞMA	165
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	173
7. KAYNAKLAR	175
8. EKLER.....	204
8.1. Hasta Bilgilendirme ve Rıza Formu.....	204
8.2. Hasta Gözlem Formu.....	206
8.3. Etik Kurul Onayı.....	208
8.4. Özgeçmiş.....	212

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. FISH yönteminin epifloresan mikroskopunda değerlendirilmesi.....	119
Tablo 2. Andiatec ® <i>Helicobacter pylori</i> (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile Real-time PCR yönteminde uygulanan LightCycler programı.....	124
Tablo 3. Real-time PCR yönteminde uygulanan LightCycler programı.....	128
Tablo 4. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu açısından 234 hastanın demografik verileri.....	135
Tablo 5. Kültür olumlu 114 hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinin E-test ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması	148
Tablo 6. <i>Helicobacter pylori</i> olumlu 102 antrum biyopsi örneklerinde E-test ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması.....	149
Tablo 7. <i>Helicobacter pylori</i> olumlu 96 korpus biyopsi örneklerinde E-test ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması.....	149
Tablo 8. AnDiaTec® <i>Helicobacter pylori</i> (clarithromycin resistance) PCR kiti Real- time PCR yöntemi ile <i>in house</i> real-time PCR yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.....	151
Tablo 9. Kültür pozitif 114 hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinin E-test ve real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	155
Tablo 10. <i>Helicobacter pylori</i> olumlu 102 antrum biyopsi örneklerinde E-test ve real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	155
Tablo 11. <i>Helicobacter pylori</i> olumlu 96 korpus biyopsi örneklerinde E-test ve real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	156
Tablo 12. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinde <i>cagA</i> pozitifliği ve klaritromisin duyarlılığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	160
Tablo 13. Kültür olumlu 114 hastanın <i>cagA</i> pozitifliği ve <i>vacA</i> s ve m bölgesi genotiplerinin değerlendirilmesi.....	164

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin flajellar organelinin yapısı.....	13
Şekil 2. <i>Helicobacter pylori</i> 26695 standard suşunun dairesel genomunun görünümü..	16
Şekil 3. Kromozomal organizasyon temelinde <i>Helicobacter pylori</i> 26695 ve J99 standard suşlarının genom sekanslarının karşılaştırılması.....	17
Şekil 4. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin global filogenetik dağılımı.....	19
Şekil 5. Kolonizasyon ve tutunmadaki virulans faktörleri	26
Şekil 6. Tip IV Sekresyon Sistemi şematik yapısı ve farklı bakterilerde kodlanan operonlar.....	34
Şekil 7. CagA proteininin EPIYA tekrar bölgesindeki sekans çeşitliliği.....	37
Şekil 8. CagA'nın hücre içine girişi ve indüklediği sinyal yolları.....	39
Şekil 9. CagA ile β -katenin sinyalinin aktivasyonu.....	43
Şekil 10. VacA'nın genotipik çeşitliliği ve yapısı.....	46
Şekil 11. VacA'nın hücre içine girişi ve indüklediği sinyaller.....	49
Şekil 12. VacA'nın mitokondriye girişi.....	52
Şekil 13. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin tanınmasında konak doğal bağışıklık reseptörleri ve sinyal ağları.....	56
Şekil 14. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunda gastrik mukoza hasarının immun patogenezi.....	63
Şekil 15. <i>Helicobacter pylori</i> ilişkili gastrik otoimmünite ve gastrik lenfomada T hücrelerin farklı sitotoksik fonksiyonları.....	67
Şekil 16. Klaritromisin antibiyotikinin kimyasal yapısı.....	90
Şekil 17. 50S ribozomal alt ünitenin domain II'de hairpin 35 ve domain V'te peptidil transferaz bölgesi.....	92
Şekil 18. Klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarının oluşturduğu değişiklikler.....	93
Şekil 19. FISH yöntemi basamakları.....	99
Şekil 20. <i>Helicobacter pylori</i> spesifik oligonükleotid FISH problemleri.....	101
Şekil 21. Stok klaritromisin solüsyonundan seri dilüsyonların hazırlanması ve agar dilüsyon yöntemi uygulanması.....	114
Şekil 22. <i>Helicobacter pylori</i> kolonilerinin %7 At kanlı Columbia Blood Agar besiyerindeki görüntüsü.....	138

Şekil 23. Gradyent difüzyon (E-test) yöntemi ile klaritromisin duyarlılığının saptanması.....	140
Şekil 24. Disk difüzyon yöntemi ile klaritromisin duyarlılığının saptanması.....	141
Şekil 25. Pozitif kontrol (klaritromisin duyarlı <i>Helicobacter pylori</i> NTCC 11637 standart suşu).....	142
Şekil 26. Pozitif kontrol (klaritromisin dirençli <i>Helicobacter pylori</i> hasta suşu).....	143
Şekil 27. Klaritromisin dirençli <i>Helicobacter pylori</i> suşunun görüntülenmesi.....	144
Şekil 28. Korpus kesitinde klaritromisin duyarlı <i>Helicobacter pylori</i> 'nin görüntülenmesi.....	145
Şekil 29. Korpus kesitinde klaritromisin dirençli <i>Helicobacter pylori</i> 'nin görüntülenmesi.....	146
Şekil 30. Antrum kesitinde klaritromisin duyarlı ve dirençli <i>Helicobacter pylori</i> 'nin (karışık populasyon) görüntülenmesi.....	147
Şekil 31. Andiatec ® <i>Helicobacter pylori</i> (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile Real-time PCR pozitif ve negatif kontrol örneklerinin oluşturduğu pikler...	150
Şekil 32. Andiatec ® <i>Helicobacter pylori</i> (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile klaritromisin duyarlı ve klaritromisin dirençli (karışık populasyon) hasta sonucunun değerlendirilmesi.....	152
Şekil 33. Real-time PCR pozitif ve negatif kontrol örneklerinin oluşturduğu pikler...	153
Şekil 34. Real-time PCR yöntemi ile klaritromisin duyarlı ve klaritromisin dirençli (karışık populasyon) hasta sonucunun değerlendirilmesi.....	154
Şekil 35. <i>Helicobacter pylori</i> standart suşlarından izole edilen DNA örneklerinin HPU PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri.....	156
Şekil 36. Gastrik biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen <i>Helicobacter pylori</i> DNA örneklerinin doku HPU PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri.....	157
Şekil 37. <i>Helicobacter pylori</i> klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin HPU PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri...	158
Şekil 38. Gastrik biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen <i>Helicobacter pylori</i> DNA örneklerinin <i>cagA</i> PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri.....	159

Şekil 39. <i>Helicobacter pylori</i> klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin <i>cagA</i> PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri.....	159
Şekil 40. <i>Helicobacter pylori</i> standart suşlarından izole edilen DNA örneklerinin VacA m bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	161
Şekil 41. <i>Helicobacter pylori</i> standart suşlarından izole edilen DNA örneklerinin VacA s bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	161
Şekil 42. <i>Helicobacter pylori</i> klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin VacA m bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	162
Şekil 43. <i>Helicobacter pylori</i> klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin VacA s bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	163

KISALTMALAR

<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
VacA	: Vakuol oluşturan sitotoksin
BabA	: Kan grup antijeni bağlayan adezin
SabA	: Siyalik asit bağlayan adezin
AlpAB	: Aderans ilişkili lipoprotein
OipA	: Dış membran inflamatuvar protein A
HP-NAP	: Nötrofil aktive edici protein
<i>dupA</i>	: Duodenal ülser oluşumunu destekleyen gen
<i>cagPAI</i>	: Cag patojenite adası
<i>cagA</i>	: Sitotoksin ilişkili gen A
T4SS	: Tip IV sekresyon sistemi
IACR	: International Agency for Cancer Research
s	: sinyal bölgesi
m	: orta bölgesi
i	: intermediate bölgesi
d	: delesyon bölgesi
UBT	: Üre nefes testi
PCR	: Polimeraz zincir tepkimesi
HUT	: Hızlı üreaz testi
PPI	: Proton pompa inhibitörü
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
PNL	: Polimorfonükleer lokositler
TIGR	: The Institute for Genomic Research
SOD	: Süperoksit dismutaz
FlgE	: Flajellar kanca proteini
HpaA	: <i>H. pylori</i> adezin A
T3SS	: Tip III sekresyon sistemi
LPS	: Lipopolisakkarit
OMP	: Dış membran proteinleri
Hop gen	: Dış membran ilişkili gen

iceA	: Epitel ile etkileşim tarafından indüklenen gen
Le	: Lewis
bp	: Baz çifti
NikR	: Nikel regülatör protein
TFF1	: Trefoil faktör ailesi
CT	: Sistein-treonin
BabA-H	: Yüksek BabA üreticileri
BabA-L	: Düşük BabA üreticileri
IL	: İnterlökin
IRF1	: İnterferon regülatör faktör 1
FAK	: Fokal adezyon kinaz
AGS	: İnsan gastrik epitelyal gastrik kanser hattı
DAF	: Decay accelerating faktör
CCP	: Kompleman kontrol protein
HpaA	: Fosfotidil etanolamin
TNF	: Tümör nekrozis faktör
tip α	: TNF- α indükleyen protein geni
GGT	: γ -glutamil transpeptidaz
GroEL	: Isı şok protein 60
RGD	: Arg-Gly-Asp
ATPaz	: Adenozin trifosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
Kdo	: 3-deoksi-D-manno-oktulosonik asit
TLR	: Toll benzeri reseptörler
TRIB3	: Sinyal faktör tribbles-3
NO	: Nitrit oksit
EPIYA	: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala
K-Xn-R-X-R	: Lys-Xn-Arg-X-Arg
SFKs	: Src ailesi kinazlar
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
PTP	: Katalitik protein tirozin fosfataz
CM	: CagA multimerizasyon

Csk	: C-terminal Src kinaz
SOS	: Son of sevenless
PLCγ	: Fosfolipaz C- γ
PAR1	: Partitioning-defektif 1
MARK	: Mikrotübül afinite regüle eden kinaz
aPKC	: Atipik protein kinaz C
MAPs	: Mikrotübül ilişkili proteinler
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
APC	: Aksin-adenomatöz polipozis coli
CKI	: Kazein kinaz 1
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
Dvl	: Disheveled
MMP-1	: Metalloproteinaz 1
CRE	: cAMP yanıt elemanları
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
IKK	: I kappa B kinaz
AID	: Aktivasyon indükleyici sitidin deaminaz
SNP	: Tek nükleotid polimorfizm
LFA-1	: Lenfosit fonksiyon ilişkili antijen 1
RPTP	: Protein tirozin fosfataz reseptörü
GTPaz	: Guanin trifosfataz
F-aktin	: Filamentöz aktin
CD2AP	: CD2 ilişkili protein
VAMP7	: Vezikül ilişkili membran protein 7
BFA	: Brefeldin A
NFAT	: Nükleer faktör aktive edici T hücreleri
TOM	: Dış mitokondriyal membran translokazı
PAMPs	: Patojen ilişkili moleküler paternler
CLRs	: C-tip lektin reseptörleri
NLRs	: NOD benzeri reseptörler
RLSs	: RIG benzeri reseptörler
PRRs	: Patern tanıma reseptörleri

IFN-γ	: İnterferon γ
Treg	: Regülatör T hücreleri
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
NIK	: NF- κ B uyaran kinaz
PAK1	: p21 uyaran kinaz 1
MIF	: Migrasyon inhibitör faktör
PI3K/Akt	: Fosfatidil inositol 3-kinaz/protein kinaz B
Tcf/Lef	: T hücre faktör/lenfoid enhancer bağlayan faktör
TRAIL	: TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand
FADD	: Ölüm domainli Fas ilişkili protein
DISC	: TRAIL ölüm indükleyen sinyal kompleksi
TCR-Tg	: T hücre reseptör transjenik
iTreg	: İndüklenmiş otoantijen spesifik Foxp3 ⁺ regülatör T hücreler
FasL	: Fas-ligand
HSP	: Isı şok proteini
NBI	: Dar bantlı görüntüleme
CIM	: Kültür indikasyon ortamı
CFU	: Koloni oluşturan ünite
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DPO	: Dual priming oligonükleotid
DOB	: Delta over baseline
AhpC	: Alkil hidroksiperoksit redüktaz
fdxB	: Ferrodoksin benzeri protein kodlayan gen
frxA	: NADPH flavin nitroredüktaz kodlayan gen
OEP	: Dış membran efflux proteinleri
PBP	: Penisilin bağlayan protein
QRDR	: Kinolon direnç belirleme bölgesi
erm	: Eritromisin ribozomal metilaz
MLS direnci	: Makrolid, linkozamid ve streptogavin direnci
MİK	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
OLA	: Oligonükleotid ligasyon testi

DEIA	: DNA enzim immun testi
LİPA	: Line prob testi
PHFA	: Preferential homodubleks formasyon testi
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
PNA	: Peptik nükleik asit
LNA	: Locked nükleik asit
NSAİD	: Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaç
HLO	: <i>Helicobacter</i> like organisms
DENT	: <i>Helicobacter pylori</i> selective supplement
BHI	: Brain Heart Infusion
CCD	: Charged coupled device
LB	: Luria Buyyon
TBE	: Tris Borik Edta
S	: Duyarlı
R	: Dirençli
S/R	: Duyarlı/Dirençli
WT	: Wild type
NK	: Negatif kontrol
PK	: Pozitif kontrol
M	: Gene ruler
VBNC	: Canlı fakat kültüre edilemeyen form

Dispeptik Yakınlmalı Hastalarda *Helicobacter pylori* Varlığı, Direnç ve Virulans Faktörlerinin Moleküler Yöntemler ile Değerlendirilmesi

Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İzmir

ÖZET

H. pylori'de klaritromisin direncinin tedavi başarısızlığının en önemli nedeni olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda *H. pylori*'yi saptamak ve 23S rRNA geninin A2142G (A2146G), A2142C (A2146C), A2143G (A2147G), A2143C ve A2144G pozisyonlarındaki nokta mutasyonlarına bağlı oluşan klaritromisin direncinin floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi, real-time PCR yöntemi, geleneksel kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testleri ile belirlenmesi, *cagA* gen varlığının ve *vacA* genotiplerinin araştırılması amaçlanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne dispeptik yakınmaları ile başvuran endoskopi endikasyonu konulan 234 (65 E, 169 K; yaş ortalaması 43.8±14.0) hasta çalışmaya alındı. Antrum ve korpus biyopsi örneklerine uygulanan hızlı üreaz testi, histopatoloji ve kültürün en az ikisinin pozitif olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olarak değerlendirildi. *H. pylori* suşlarının *cagA* pozitifliği PCR ile ürün uzunluğu 370-570 bp olarak saptandı. *H. pylori* suşlarının *vacA* genotipleri PCR ile ürün uzunlukları m1 bölgesi için 290 bp, m2 bölgesi için 350 bp, s1 bölgesi için 176 bp, s2 bölgesi için 200 bp olarak saptandı. Dört yüz altmış sekiz antrum ve korpus formalin-fikse-parafine-gömülü biyopsi kesitlerine FISH (BACTfish, Hungary) (23SrRNA gen bölgesinde 2143 ve 2144 pozisyonunda) yöntemi uygulandı. Dört yüz altmış sekiz antrum ve korpus biyopsi örneğinin DNA'ları QIAamp DNA mini kit ile ekstrakte edildi ve Real-time PCR (23SrRNA gen bölgesinde A2142G,A2142C,A2143G üç nokta mutasyonu) yöntemi uygulandı. İzole edilen *H. pylori* suşlarında klaritromisin duyarlılığı E-test ile değerlendirildi. En az iki test pozitifliğinde, 164 (%70.1) hasta *H. pylori* enfeksiyonu olumlu saptandı. Yüz altmış dört hastanın 114 (%69.5)'ü kültür olumlu, 137 (%83.5)'si FISH olumlu, 157 (%95.7)'si real-time PCR olumlu saptandı. Kültür duyarlılığı (%69.5) ve özgüllüğü (%100) ile karşılaştırıldığında, *H. pylori*'nin saptanmasında FISH yönteminin duyarlılığı (%83.5) daha iyi, özgüllüğü ise (%91.4) daha düşük saptandı. Real-time PCR yönteminin ise duyarlılığı %95.7, özgüllüğü %70 saptandı. *H. pylori* olumlu hastalarda antrum ve korpus birlikte değerlendirildiğinde;

FISH ile klaritromisin direnci %20.2, E-test ile %28.0, real-time PCR ile %34.4 olarak saptandı. E-test ile, FISH arasındaki uyum %89.5, real-time PCR arasındaki uyum ise %75.4 saptandı. *H. pylori* kültür olumlu 114 hastadan 53 (%46.5)'ü *cagA* olumlu saptandı. Klaritromisin direnci ile *cagA* pozitifliği arasında ilişki saptanmadı. Yirmi-dokuz (%25.4) hastada *vacA* m1s1 genotipi (21 CagA+); bir (%0.9) hastada m1s2 genotipi; 40 (%35.1) hastada m2s2 genotipi (4 CagA+), 35 (%30.7) hastada m2s1 genotipi (25 CagA+), 9 hastada ise miks suş saptandı ve *vacA* genotipleri ile klaritromisin duyarlılığı arasında bir ilişki saptanmadı. *vacA* m1s1 ve m2s1 genotipi CagA pozitifliği ile, *vacA* m2s2 genotipi ise CagA negatifliği ile ilişkili saptandı. Sonuç olarak, FISH yöntemi geleneksel kültür yöntemi ile karşılaştırıldığında *H. pylori*'nin saptanmasında duyarlılığı belirgin şekilde arttırmaktadır. FISH dispeptik yakınmalı hastaların tanı ve tedavisinin belirlenmesinde hızlı karar verilmesi gerekliliği açısından kullanışlı, güvenilir ve yüksek duyarlılığa sahip bir tekniktir.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori*, FISH yöntemi, Real-time PCR, Klaritromisin direnci

Evaluation of the *Helicobacter pylori*, resistance and virulence factors by molecular methods in patients with dyspepsia

ABSTRACT

Clarithromycin resistance in *H.pylori* is considered an important cause for treatment failure. We aimed to detect *H. pylori* and determine clarithromycin resistance which is due to A2142G (A2146G), A2142C (A2146C), A2143G (A2147G), A2143C and A2144G point mutations in 23S rRNA gene by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), real-time PCR, conventional culture and antimicrobial susceptibility testing and also to identify *cagA* positivity and *vacA* genotypes. Two-hundred-thirty-four patients with dyspepsia (65M, 169F; mean age 43.8±14.0 years) admitted to Gastroenterology Outpatient Clinic at Dokuz Eylül University Hospital were taken into the study. The diagnosis of *H. pylori* infection was defined as positive for at least two positive results with rapid urease test, histopathology and culture which were applied to antrum and corpus biopsy specimens. *H. pylori cagA* positive PCR products ranging 370-570 bp were amplified. *H. pylori vacA* genotypes PCR products; 290 bp for m1 region, 350 bp for m2 region, 176 bp for s1 region, 200 bp for s2 region were amplified. Formalin fixed paraffin embedded 468 antrum and corpus tissue sections were applied FISH (BACTfish, Hungary) (2143 and 2144 positions in 23SrRNA gene) method. DNA of 468 antrum and corpus biopsy specimens were extracted by QIAamp DNA mini kit and Real-time PCR (A2142G,A2142C,A2143G three point mutations in 23SrRNA gene) methods were applied to them. E-test was used to assess clarithromycin susceptibility in the isolated *H. pylori* strains. One-hundred-sixty-four (70.1%) patients were *H. pylori* positive according to at least two positivity. One-hundred-fourteen (69.5%) of 164 patients were culture positive, and 137 (83.5%) were positive by FISH, 157 (95.7%) were positive by real-time PCR. The sensitivity of FISH (83.5%) was significantly better, but not the specificity (91.4%) for detection of *H. pylori*, when compared with culture sensitivity (69.5%) and specificity (100%). The sensitivity and specificity of real-time PCR was 95.7%, 70%, respectively. Among *H. pylori*-positive patients, FISH detected clarithromycin resistance in 20.2%, E-test in 28.0%, real-time PCR in 34.4% of samples considering both antrum and corpus. The concordance between E-test and FISH was 89.5%. The concordance between E-test and real-time PCR was 75.4%. Among *H. pylori*-culture positive patients; 53 (46.5%) were *cagA* positive and no correlation was found between *cagA* positivity and clarithromycin

resistance. m1s1 genotypes of *vacA* is in 29 (25.4%) patients (21 *cagA*+); m1s2 genotypes in 1 (0.9%) patient; m2s2 genotypes in 40 (35.1%) patients (4 *cagA*+); m2s1 genotypes in 35 (30.7%) patients (25 *cagA*+) were detected. Nine patients have mixed genotype strains. No relationship between *vacA* genotypes and clarithromycin susceptibility were found. As expected, *vacA* m1s1 and m2s1 were associated with CagA positivity and *vacA* m2s2 was associated with CagA negativity. As a conclusion, FISH significantly increases the sensitivity to detect *H. pylori* in the clinical microbiology laboratory when compared with traditional culture techniques. FISH technique is a reliable and highly sensitive method, especially useful when a quick decision is necessary for the management of diagnosis and treatment for patient with dyspepsia.

Key words: *Helicobacter pylori*, FISH method, Real-time PCR, Clarithromycin resistance

1. GİRİŞ VE AMAC

Helicobacter pylori (*H. pylori*) dünya popülasyonunun yarısından fazlasını enfekte eden ve insan midesine kolonize olan Gram negatif ve mikraerofilik bir bakteridir (1-6). *H. pylori* demir eksikliği anemisi, vitamin B12 eksikliği, gastrik ülser, gastrik kanser ve gastrik MALT lenfoma gibi komplikasyonlarla ilişkili atrofik gastrite geçebilen gastroduodenal enflamasyona neden olmaktadır (7-11). Gelişmekte olan ülkelerde prevalans % 80-90 iken, gelişmiş ülkelerde % 25-50'dir. İnsandan insana bulaş birincil bulaş yoludur. Fekal-oral, oral-oral ve gastro-oral bulaş da bildirilmektedir (12, 13).

H. pylori'nin patogenezi vakuol oluşturan sitotoksin A (VacA), kan grup antijeni bağlayan adezin (BabA), siyalik asit bağlayan adezin (SabA), aderans ile ilişkili lipoprotein (AlpA ve AlpB), dış inflamatuvar protein A (OipA), nötrofil-aktif edici protein (HP-NAP), duodenal-ülser oluşumunu destekleyen gen (*dupA*), *cag* patojenite adası (*cag* PAI) ile ilişkilidir. *H. pylori*'nin adezyon molekülleri (BabA, SabA, Oip A, AlpA ve Alp B) ile gastrik mukozaya aderansı, insan gastrik mukozasında uzun süreli kalıcı kalmasında ve başlangıç kolonizasyonunda önemlidir (14-16). Sitotoksin-ilişkili gen A (*cagA*) tip IV sekresyon sistemi (T4SS) komponentlerini içeren *cagPAI* içerisinde 40-kb DNA segmenti olarak lokalize halde bulunur. *cagA* geninin kodladığı ~120–145 kDa'luk CagA proteininin T4SS ile gastrik epitel hücreye translokasyonu gerçekleşir (17-20). *H. pylori* International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından Sınıf I karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır. *H. pylori* *cagA* gen özelliğine göre *cagA*-pozitif ve *cagA*-negatif suşlar, olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. *cagA*-pozitif suşların gastrik mukozaya zarar verme yeteneğinin daha fazla olduğu bildirilmektedir (21). VacA proteini 140 kDa'luk protoksin benzeyen ve salgılandığında 88 kDa olgun forma dönüşen oligomerik bir toksindir (22-24). VacA yapısında sinyal (s) bölge (s1 ve s2), orta (m) bölge (m1 ve m2), intermediate (i) bölge (i1 ve i2) ve delesyon (d) bölge (d1 ve d2) içermekte olup bunlar vakuolizasyon aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır (25).

H. pylori enfeksiyonu tanısında invaziv olmayan yöntemler; ¹³C- ve ¹⁴C- üre nefes testi (UBT), dışkı antijen testleri (poliklonal antikor ve monoklonal antikor), dışkı polimeraz zincir tepkimesi (PCR), dışkı Real-time PCR ve immunolojik testler (serum, tükürük ve idrar örneklerinden)'dir. İnvaziv yöntemler ise biyopsi temelli olup, hızlı üreaz testi (HUT), histopatoloji, kültür, biyopsi PCR ve real-time PCR'dır (5). *H. pylori* enfeksiyonu tanısında kültür ve UBT altın standart yöntemlerdir (1).

Maastricht III 2005 konsensus raporuna göre; *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda önerilen standart birinci basamak tedavi protokolü klaritromisin ve amoksisilin ya da metronidazol antibiyotikleri ile birlikte proton pompa inhibitörü (PPI) ya da ranitidin bizmut sitrat temelli üçlü tedavidir (26). Klaritromisin, *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda en önemli antibakteriyal ajandır. Ancak klaritromisin direnci *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyon tedavi başarısını azaltmaktadır. Klaritromisin direnci, coğrafik bölgeye göre değişmekle birlikte Asyada %18.9; Malezya'da %2.1, Japonya'da %40.7; Avrupada %10-45'tir. Direnç oranlarında güney ve kuzey Avrupa'da coğrafik bölgelerde büyük farklılıklar görülmektedir. Örneğin, klaritromisin direnci İsveç'te %1.5, Hollanda'da %0.8, ülkemizde ise %38.5 oranında olduğu bildirilmektedir (27).

H. pylori'de klaritromisin direnci, 50S alt üniteye yer alan ve 23S rRNA geni tarafından kodlanan 23S ribozomal alt ünitelerdeki peptidil transferaz bölgesini kodlayan *rrl* genindeki nokta mutasyonları sonucu oluşmaktadır. Bu nokta mutasyonları A2146G (A2142G), A2147G (A2143G) pozisyonlarındaki adeninin guanin ile yer değiştirdiği ve A2146C (A2142C) pozisyonundaki adeninin sitozinle yer değiştirdiği mutasyonlardır (2, 10, 11, 22, 28-32). Ender mutasyonlar; A2115G, G2141A, T2117C, T2182C, C2195T, G1939A, T1942C, G2224A, A2245T, C2611A, A2143C, A2144C, T2289C ve C2288T'dir (3, 33-39). A2142C, A2142G, A2142T, A2143G, A2143C, C1939A ve T1942C domain V'te bulunurken T2717C ise domain VI'da bulunmaktadır (40).

Maastricht III 2005 Konsensus raporuna göre toplumun veya popülasyonun klaritromisin direnci %15-20'den yüksek ise ve iki tedavi başarısızlığından sonra kültür yapılması önerilmektedir (26). *H. pylori* kültürü ve antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulama sırasındaki teknik zorluklar ve *H. pylori*'nin zor üreyen bir bakteri olması nedeniyle, antimikrobiyal duyarlılığın saptanmasında *H. pylori*'nin kültürde üretilmesine gereksinim bulunmayan real-time PCR gibi moleküler testler uygulanmaktadır. Real-time PCR gastrik biyopsi örneklerinden direk olarak 23S rRNA geninin amplifikasyonu ile hem *H. pylori*'nin hem klaritromisin duyarlılığının saptanmasında pratik bir yöntemdir (5).

Bu moleküler testlerden bir diğeri ise *H. pylori* ve klaritromisin duyarlılığının saptanmasında kullanılan floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemidir. FISH yöntemi ribozomal RNA'nın çoklu kopyaları ile oligonükleotidlerinin tanımlanmasının spesifik DNA-DNA hibridizasyonuna bağlıdır (16S rRNA, 23S rRNA). Floresanla işaretlenmiş *H. pylori* 16S ve 23S rRNA'sına spesifik oligonükleotidler, *H. pylori* bakteri hücrelerine penetre olur ve

hedef sekansa bağlanır. *H. pylori* rRNA'sının FISH metodu ile saptanması; kültürden bağımsız, oldukça duyarlı, gastrik doku kesitlerinde, gastrik biyopsi örneklerinde ve izole edilen *H. pylori* suşlarında patojenin ve klaritromisin direncinin saptanmasında güvenilir, spesifik, kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu bildirilmektedir (2, 6, 29).

Bu çalışmanın amacı, *H. pylori* saptanmasında altın standart yöntem olan kültür yönteminin uygulanması ve klaritromisin duyarlılığının fenotipik yöntemlerle saptanması ve genotipik yöntemler olan FISH ve real-time PCR teknikleriyle direkt gastrik dokudan (antrum ve korpus) ve antrum ve korpustan izole edilen *H. pylori* kolonilerinden eş zamanlı olarak rRNA hedefli floresansla işaretlenmiş oligonükleotit problemleri ile klaritromisin direnç genotipinin saptanarak karşılaştırılmasıdır. Ayrıca *cagA* virulans faktörünün saptanması ile erken gastrik kanser riskinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, gastrik biyopsi örnekleri klaritromisin direncinin görülme sıklığı, hastanemizdeki yaygın mutasyon tipleri yönünden değerlendirilmesi ve çalışma grubumuzda görülen klaritromisin direnç tipi/tiplerinin, histopatolojik bulgular, virulans faktörleri aralarında ilişki olup olmadığının da araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Spesifik insan patojeni *H. pylori* hpSahul ve hspMaori olarak iki ayrı suş ile yaklaşık 60,000 yıl önce Afrika'dan insanların pasifiğe iki prehistorik göçü ile yayılmıştır. Bu göçlerden birinin Yeni Gine ve Avusturalya'ya, diğerinin ise Polinezya adalarından Melanezya'ya doğru uzandığı, hpSahul'un 31,000 ve 37,000 yıl önce arkeolojik çalışmalarla *H. pylori*'nin Asya popülasyonundan ayrıldığı bildirilmiştir (41).

Hayvanlarda gastrik spiral bakteriler ilk kez Rappin tarafından 1881'de ve Bizzozero tarafından 1893'te bildirildi. 1896'da Salomon spiral bakterileri kedi, köpek ve Norveç sıçanların midesinde gözlemlendi. İnsanlarda ise ilk kez 1906 yılında Krienitz tarafından bildirildi. 1899'da, Jaworski insanlardan aldığı gastrik yıkama suyunun sedimentinde spiral mikroorganizmaları tanımladı. Ancak bu buluşu sadece Polonya'da yayınlandığı için fazla dikkat çekmedi (42).

Balfour 1906'da maymun ve köpeklerin gastrik ülser örneklerinde, Krienitz gastrik kanserli bir hastanın gastrik örneklerinde spiral mikroorganizmaları tanımladı (43). Luck ve Seth midedeki üreaz aktivitesini tanımladılar ve antibiyotik tedavisi ile kaybolduğunu bildirdiler, ancak gastrik mikroorganizmalar ile arasındaki ilişki 1984'e kadar kurulamadı. 1938 yılında Doenges, otopsi örneklerinin %43'ünün midesinde spiral mikroorganizmaları saptadı. Örnekler postmortem toplanmış olması ve kontaminasyon riski nedeniyle bu bulgular şüpheyile karşılandı. İki yıl sonra mide ülserli ve kanserli hastaların cerrahi örneklerinde de spiroket tesbit edildi. Bu son çalışma, mikroorganizmanın bir postmortem kontaminant olmadığını ve gastrik bir patojen olduğunu destekledi (44).

Freedburg ve Barron, 1940 yılında midede kıvrımlı mikroorganizmalar olduğunu bildirdi. Fitzgerald ve Murphy, 1950 yılında peptik ülser hastalığı ile mukoza yüzeyindeki üreaz aktivitesi arasında ilişki olduğunu gösterdi (45). 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 (44).

Liebre ve Le fevre, 1959 yılında tetrasiklin tedavisinden sonra midede üreaz aktivitesinin kaybolduğunu ve bu enzimin bakteri kaynaklı olabileceğini bildirdiler. 1968

yılında Delluva germ-free hayvanlarda midede üreaz bulunmadığını ve bu enzimin bakteri kaynaklı olduğunu saptadı (45).

Steer ve Colin-Jones 1975’de, gastrik mukozada mukus salgılayan hücrelerle ilişkili, en az bir flagellası bulunan spiral bakterileri tanımladılar. Bu bakterilere yanıt olarak da polimorfonükleer lökositlerin (PNL) gastrik mukozaya göç ettiklerini öne sürdüler. Endoskopik biyopsi örnekleri kültüre alındı. Ancak kültürde spiral bakteriler değil, sadece *Pseudomonas aeruginosa* üretildi. Dört yıl sonra Fung ve arkadaşları kronik gastritli hastaların gastrik mukozalarında histolojik ve yapısal olarak bakteriyi gösterdiler. Ancak mukozal lezyonlarla ilişkisi saptanamadı (45).

J. Robin Warren ise *Campylobacter jejuni*’ye benzeyen spiral bakterinin mide hastalıklarıyla ilişkisini ve midenin steril olmadığını bildirdi. Robin Warren ve Barry Marshall biyopsi örneklerini *Campylobacter* ve nonselektif besiyerinde 48 saat enkübe 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 (44, 46).

1983’te Marshall *H. pylori* enfeksiyonun gastrik kanser ile ilişkisi olabileceğini ileri sürdü. Ancak hiçbir bilim adamı enfeksiyon ile gastrik kanser arasında bu ilişkinin olabileceğine inanmadı (17).

1984’de bakteriyi Warren ve Marshall *Campylobacter pyloridis* olarak isimlendirdi (47).

1986’da bakterinin fazla miktarda üreaz salgıladığı kanıtlandı (44).

1987’de *Campylobacter pylori* adını aldı (43).

1989’da Goodwin ve arkadaşları bakterinin sahip olduğu farklı fonksiyonel ve enzimatik özellikleri nedeniyle *Campylobacter* ailesine ait olmadığını gösterildi ve *Helicobacter pylori* adı verildi (43, 48).

1994’de “National Institute of Health” *H. pylori*’nin peptik ülserin birincil nedeni olduğunu; “IACR” de sınıf I karsinojen olduğunu bildirdi (47, 49-52).

1997 yılında “The Institute for Genomic Research (TIGR)” tarafından *H. pylori*’nin tam genom haritası yayınlamıştır (53).

2005’de J Robin Warren ve Barry Marshall *H. pylori* bakterisini ve onun peptik ülser ve gastritteki rolünü gösterdikleri için Nobel tıp ödülünü aldılar (54).



Press Release: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine
3 October 2005

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet has today decided to award
The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2005
jointly to

Barry J. Marshall and J. Robin Warren
for their discovery of

"the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease"

Inventas vitam juvat excoluisse per artes

"And they who bettered life on earth by new found mastery."
(inventions enhance life which is beautified through art.)



2.2. *Helicobacter* Ailesi

Helicobacter ailesi 24 tür içermektedir (54). Aile, 0.3-1.0 µm genişliğinde ve 1.5-10 µm boyda spiral veya kıvrımlı basiller içermektedir. *Helicobacter* türleri Gram-negatif, spor oluşturmeyen basillerdir, üreme şartları uygun olmadığı zamanlarda ve uzamış kültürlerde küresel veya kok şekline dönüşebilmektedirler. Bu bakteriler hareketlidirler ve genellikle tekli veya çoklu bipolar kılıflı flajelleri vardır. Diğer *Helicobacter* türlerinden farklı olarak *H. pylori* izolatları çoklu monopolar kılıflı flajeli bulunmaktadır. Çeşitli *Helicobacter*'ler (*H. pullorum*, *H. rodentium*, *H. mesocricatorum*, *H. canadensis* ve *H. winthamensis*) *Campylobacter*'ler gibi kılıfsız flajele sahiptirler (42). *Helicobacter* türleri insanlar ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde bulunmaktadır (55). Hem hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunan *Helicobacter* türleri, *H. bizzozeronii*, *H. felis* ve *H. salomonis*, hemde insan-hayvan gastrik patojeni *H. heilmannii* ışık ve transmission elektron mikroskobu altında diğer türlerden ayırıcı spiral morfolojiye sahiptir (42).

Tüm *Helicobacter* türleri oksidaz pozitif ve konvensiyonel metotlarla belirlendiği gibi karbonhidrat yolları ile ilişkili olarak oldukça etkisiz olduğu görülmüştür. Ancak nükleer magnetik rezonans spektroskopisi ve genomik çalışmalar ile *H. pylori*'de karbohidrat katabolik yollarının varlığı gösterilmiştir. *H. pylori*'nin karşılaştırmalı genomik analizi; pentoz-fosfat yanyolu, Entner-Doudoroff yolağı, glikoliz, Krebs reaksiyon sekansının değişmiş siklik olmayan şekli gibi önemli katabolik yolların bulunduğunu desteklemektedir (42).

2.3. *Helicobacter pylori*'nin Yapısı ve Mikrobiyolojik Özellikleri

2.3.1. Bakterinin Yapısı

H. pylori 0.6x3.5 mikron spiral şeklinde, mikroaerofilik, Gram-negatif bir bakteridir (43, 55-57). Katı besiyerindeki kültürlerinde basile benzer yapıda görülür, spiral şekli nadir görülür veya hiç görülmez. Katı veya sıvı besiyerindeki uzamış kültürlerinde ise kok yapısı daha fazla görülür. Elektron mikroskobunda kok yapısının U şeklinde basil olduğu ve iki kolunun da membranöz bir yapıyla bağlandığı görülmüştür. Kok formu metabolik olarak aktiftir ancak, *in vitro* kültürde üretilemez (43, 51). Yaklaşık bir hafta içerisinde *H. pylori* basiller formdan kokoid forma dönüşebilmektedir. Hava atmosfer şartları altında *H. pylori* kültürlerinin %80'i 24 saat içerisinde kokoid forma dönüşmektedir. Bu dönüşüm esnasında

üreaz, katalaz, superoksit dismutaz (SOD) spesifik aktiviteleri azalmaktadır. *H. pylori* %7 O₂ varlığında basil form yapısında gözlenir, aerobik (%21 O₂) yada anaerobik (< %1 O₂) şartlar altında kültüre edildiğinde kokoid forma dönüşmektedir (58). Gastrik biyopsi örneklerinde bakterinin uzunluğu yaklaşık 3.5 µm, genişliği 0.5 µm'dir. Unipolar yerleşimli dört-altı adet flajellası vardır (51, 55). Bu flajellalar kılıfı ile midenin asidik çevresi nedeni ile oluşacak hasardan korunmaktadır (55).

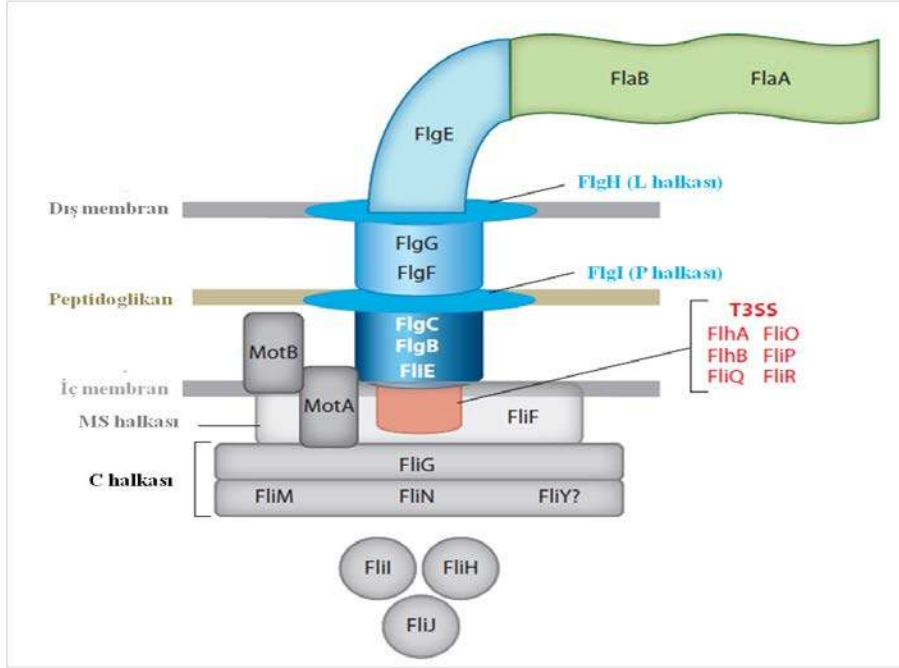
i. Flajellanın Yapısı

H. pylori uzun süre asiditeye maruz kalmamak için, viskoz mukus tabakasının içerisinde flajeli ile tirbüşon benzeri hareketiyle hızlı bir şekilde ilerleyerek gastrik epitel hücreye ulaşmalıdır. Flajellar hareket mukus tabakasından geçiş için gereklidir, hareketsiz bakterilerin midede kolonize olamadığı gösterilmiştir (59, 60). *H. pylori*, bakteri hücresinin tek bir kısmına lokalize üç-yedi kılıflı flajele sahiptir. Her bir flajel birçok farklı protein içeren membranöz kılıf ile sarılmış temel olarak 53 kDa FlaA ve 54 kDa FlaB flajellinden oluşan bir filament içermektedir (61-63). Flajellar kanca proteini (FlgE), bazal gövdede hareket aparatı için filament ile ilişkili esnek bir yapıdır. flgE geni yoksun mutantlarda flajellin üretiminin engellendiği gösterilmiştir (63). Flajel kılıfında *H. pylori* adezin A (HpaA) da bulunmaktadır (61). *H. pylori* fliD proteininin flajellar filamentlerin bir araya gelmesi, hareket ve kolonizasyon için gerekli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, flajel ile ilişkili olan FlgK proteini *H. pylori* hareketinde ve flajel oluşumunda önemli bir role sahip olduğundan, *H. pylori*'nin konaktaki kolonizasyonu ve hareketini inhibe edebilmek için potansiyel hedef olabileceği düşünülmektedir (62, 64).

Flajel aparatının bir araya toplanması için proteinlerin bir kısmı hem Tip II sekresyon sistemi hem de Tip III sekresyon sistemi (T3SS) ile dışarı salınır. Flajelin ekstraselüler bileşenleri T3SS ile merkezi bir kanaldan salınırken; L ve P zinciri ise Sec bağımlı olarak aracılığı ile dışarıya salınır. Dışarıya salınan flajellar aparat tam karakterize edilememiştir fakat *H. pylori*'de homologları bulunan Fli H, Flil, Flp, FlhA, FlhB, FliQ ve FliR gibi çeşitli proteinleri içerdiği düşünülmektedir (63).

Flajel, kanca bazal body kompleksi ve ekstraselüler filament olarak iki ayrı yapıdan oluşmaktadır. Kanca bazal body kompleksi ayrıca üç yapıya ayrılmaktadır: sitoplazma ve iç membranda lokalize bazal kısım, periplazmik çubuk ve ilişkili halka yapısı ve yüzeye lokalize kanca. Flajellar bazal yapı MS halkası, flajellar T3SS, sitoplazmik C halkası ya da switch

kompleksi ve motor bölgesini içermektedir. İç membrandaki MS halkası, halkanın merkez membranı içerisinde fonksiyonel flajellar T3SS (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ ve FliR'yi içeren) ile FliF'nin homomultimeridir (Şekil 1) (60).



Şekil 1. *Helicobacter pylori*'nin flajellar organelinin yapısı (60)

(Flajellar komponentler organizmanın transkripsiyonel regülatör kaskadında kendi genlerinin sınıflandırılmasına dayanarak renkli kodlanmıştır: kırmızı (sınıf 1), mavi (sınıf 2) ve yeşil (sınıf 3). Gri proteinler, flajellar transkripsiyonel hiyerarşi dışında bilinen ya da transkripsiyonu analiz edilmeyen genler tarafından kodlananları içermektedir)

T3SS, iç membranın ötesinde flajelin kısımları olan birçok proteini dışarıya vermektedir. MS halkasının sitoplazmik yüzünde lokalize olan C halkası, flajellar şalter olarak fonksiyon göstermekte ve aynı zamanda sekresyonda yardımcı olmaktadır. *Epsilonproteobacteria* hem FliN hemde FliY içermesine rağmen, bu kompleks FliG, FliM ve FliN ya da FliY içermektedir. Fli G, kemotaksis sistemi girdisine bağlı ya saat yönünde ya da saat yönünün aksine flajelin hareketini sağlayan switch kompleksinin bir eksen etrafında dönen komponentinden sorumludur. FliM ve FliN CheY (CheY-P) kemotaksis yanıt regülatörün fosforillenmiş formuna bağlanmaktadır. CheY-P'nin switch kompleksine bağlanması saat yönünde flajellar harekete neden olmaktadır; CheY-P bağlanmazsa saat yönünün aksi hareket meydana gelmektedir. FliN ayrıca T3SS'den etkili salınmasına yardım eden FliH-FliI kompleksi ile yada substrat-şaperon partner gibi salınma neden olan protein kompleksi ile etkileşimdedir. FliY, FliN ile homoloji göstermektedir ve *H. pylori*'de kısmen

fazla fonksiyona sahip olabilir. Bazal yapının motor komponentleri, flajelin durağan komponenti ve bir proton kanalını oluşturan MotA ve MotB'dir; bu komponentler flajellar hareket için proton akışı ve dönme momenti oluşumu ile ilişkili fonksiyon göstermektedir. İç membranın ötesinde lokalize olan çoğu flajellar protein T3SS, MS halkası ve salınım için switch kompleksine bağlıdır. Flajel içeriden dışarıya MS ve switch kompleks, kanca bazal body kompleks ve ekstrasellüler filamentten oluşmaktadır. FliE, FlgB ve FlgC hallow tüpü oluşturmak için MS halkasının periplazmik yüzeyinde polimerize olan salgılanan ilk çubuk proteinleridir. Ayrıca, olgunlaşmadan salınan flajellar proteinler (merkezden uzak FlgF ve FlgG çubuk proteinleri gibi) bu kanalda birikmektedir ve filizlenen flajellar yapının ucunda polimerize olmaktadır. Uç kısımdaki salgılanma ve polimerizasyon paterni, kanca ve filamentin biyosentezinin başından sonuna kadar sürmektedir (60).

FlgI peptidoglikanda P halkası ve FlgH dış membranda L halkası oluşturmaktadır. Bu halkalar çubuğun çevresini oluşturur. Çubuk tamamlandıktan sonra, FlgE ve minör kanca proteinleri sentezlenir. FliK, *Helicobacter* türlerine uygun kanca uzunluğunu oluşturmak için gereken FlgE proteinlerinin doğru sayısını belirlemektedir. Flajellar biyosentez filament biyosentezi ile sonlanmaktadır. *H. pylori*'de filament temel olarak büyük flajellin FlaA ve küçük flajellin FlaB'den oluşmaktadır. FlaA flajelasyon ve hareket için gerekli iken, FlaB türler arasında çeşitlilik göstermektedir (60).

ii. Hücre Duvar Yapısı

Gram negatif hücre duvar yapısı görülür. Dış membranda lipopolisakkarit (LPS) eksprese edilmektedir. *H. pylori* LPS'si diğer Gram negatif bakterilerle karşılaştırıldığında 500 kat daha az endotoksik aktivite göstermektedir (64). Dış membran, *H. pylori* gibi bakteriyel patojenlerde konak koruyucu immunitesinin potansiyel hedefidir ve konak immun yanıtından kaçmasını sağlar. Bu yüzden dış membran aşılı mikroorganizmalara karşı koruma yanıtının uyarılmasında kullanılmıştır (65). Moleküler ağırlığı 31-80 kDa arasında değişen dış membran proteinleri (OMPs) tanımlanmıştır (51). *H. pylori* genomu dış membran proteinlerini kodlayan yaklaşık 30 dış membranla ilişkili gen (Hop gen) paraloğu içerir (66). *H. pylori*'nin birkaç Hop proteinlerinden olan BabA, SabA, OipA, HopZ, iceA (epitel ile temas sonucunda indüklenen), AlpA ve AlpB tutunma (adezyon) faktörleri olarak tanımlanır (14-16). BabA, *H. pylori* insan gastrik epitel hücre yüzeyindeki fukosillenmiş glikokonjugatlar içeren Lewis-b (Le^b)'ye bağlanır (23, 57, 67, 68). Üç *bab* alleli vardır:

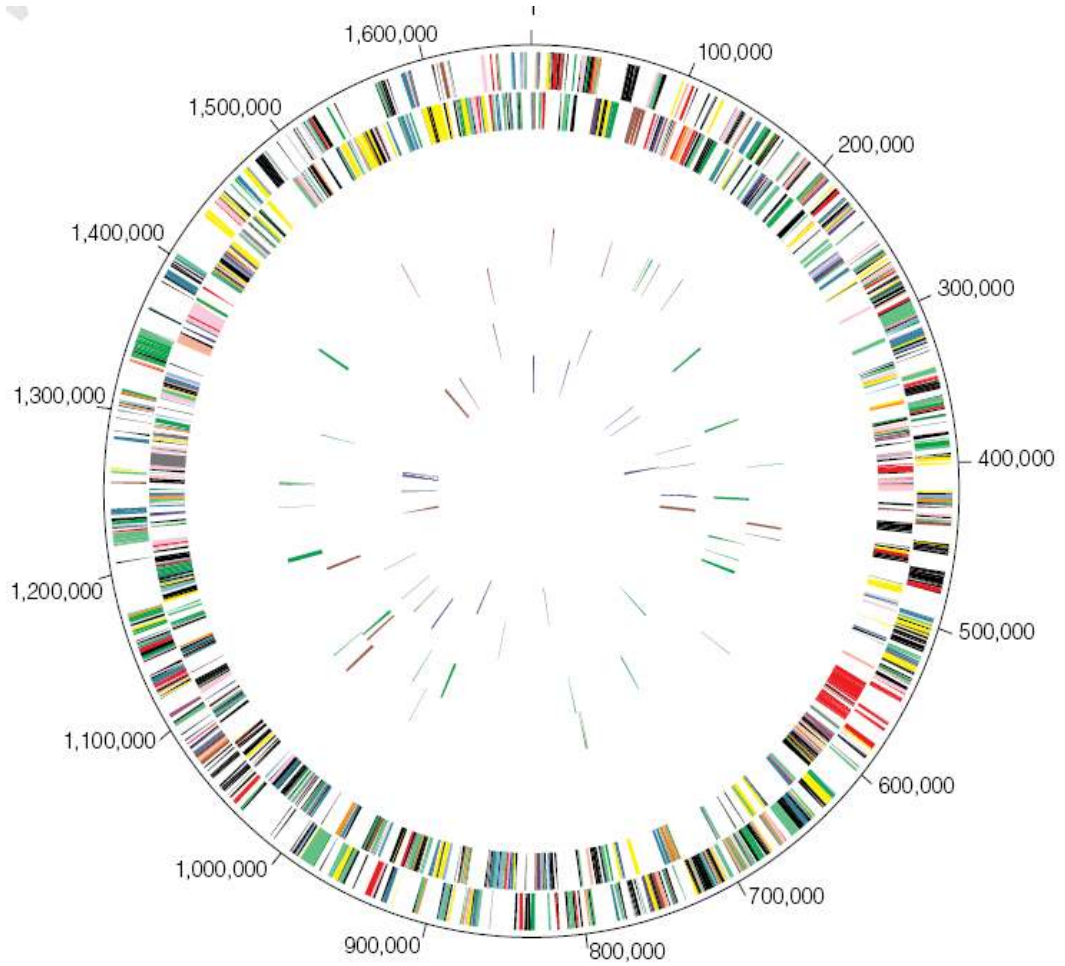
BabA1, *BabA2* ve *BabB*, bunlardan yalnızca *BabA2* insan kan grup antijeni olan Le^b'ye bağlanabilmektedir (16, 57). *SabA*, *H. pylori*'nin alyuvarlara bağlanmasını düzenleyen bakteriyal yüzey proteinidir. Ayrıca, *H. pylori*'nin aderansı için fonksiyonel reseptördür. Sialillenmiş Le^x ve Le^a benzeri glikanlara bağlanma özelliğini göstermektedir (69). *OipA*'nın fonksiyonu hala daha tam olarak bilinmemekle birlikte, *OipA*'nın ekspresyonunun *cagPAI*, *VacAs1* ve *BabA2* virulans faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (23, 70, 71). *HopZ* vital adezin proteinidir ve primer olarak bakteri yüzeyinde yerleşir. *HopZ* geni belirgin olarak *H. pylori* yoğunluğu ve kolonizasyon yeteneği ile ilişkilidir. *HopH* dış inflamatuvar proteini de tanımlanmıştır (72). Diğer iki OMP, *AlpA* ve *B*, *H. pylori*'nin gastrik dokuya bağlanmasında gereklidir; *AlpA*, *AlpB* ve *BabA2* için farklı reseptörler vardır (73). *AlpAB* bir operonda organize olan *HopB* ve *HopC*, iki çeşit kanal şekilli membran poruna sahiptir (72). *HopA*, *HopB*, *HopC*, *HopD* olarak tanımlanan dört porin ailesi dış membranda yer almaktadır, muhtemelen besin up-take'inde etkilidirler ve bakterinin kolonizasyonu ve persistansında önemli rol oynarlar (74). Enfekte bireylerde *Haemophilus influenzae*'nin P2 porinine homoloji gösteren antijenik *HopE* porin molekülü de tanımlanmıştır (51).

Yüzeyde salınan LPS molekülü *H. pylori* patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. *H. pylori* LPS'nin O zinciri yapısal olarak Le^x ve Le^y kan grup antijenlerine benzerlik göstermektedir. Lipid A molekülü, merkez bölgesi ve O antijeni sentezleyen genler identifiye edilmiştir. Fukoziltransferazlara (HP379, HP651) karşı benzerliği az olan iki gen LPS-Lewis antijen moleküler mimikrisinde bir rol oynayabilmektedir. İki glukoziltransferaz (HP208 ve HP619) ve bir fukoziltransferaz (HP379) genleri faz varyasyonuna bağlı olabilmektedir (53).

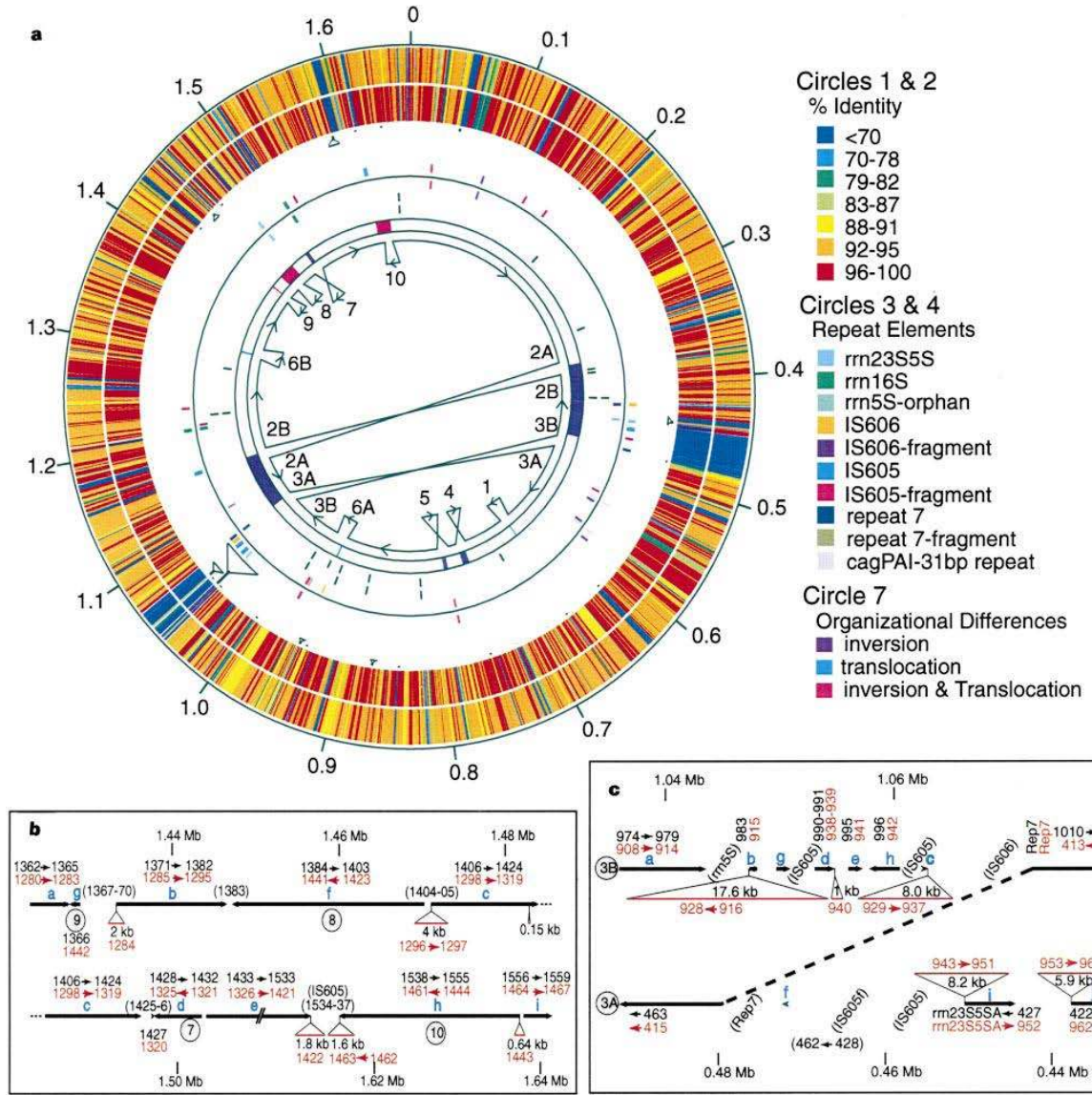
iii. Genom Yapısı

H. pylori genomu metabolik genlerin az bir kısmını içeren oldukça küçük, 1.67 Mb boyutlarındadır (56). *H. pylori* J99 ve 26695 suşlarının tam genom sekansları çıkarılmıştır (75). *H. pylori* 26695 suşu 1.667.867 baz çifti (bp) bulunan 1.590 gen dizisi içerir. G+C içeriği ortalama %39'dur (Şekil 2, Şekil 3) (53). *H. pylori*'nin proteom bileşenleri fonksiyonel olarak aktif genleri, subsellüler proteinler, hastalık ilişkili proteinler ve immunoreaktif proteinlerin identifikasyonu için araştırılmıştır. *H. pylori* genomu yaklaşık 1600 open-reading frame içermektedir. Proteom analizi ile kodlanan eksprese edilmiş proteinlerin 200'den fazlası bulunmuştur. Isı şok protein 60 (GroEL), 50S ribozomal proteinler ve katalazı içeren 30'dan fazla immunojenik protein identifiye edilmiştir (75). *H. pylori* izolatlarının yaklaşık %40'ı

1.5-23.3 kb boyutlarında plazmid içermektedir (51). *H. pylori* kromozomu 16S ve 23S rRNA genlerinden iki kopya içerir (51, 53). *H. pylori* içindeki genetik çeşitlilik diğer birçok bakterinin genetik çeşitliliğinden daha fazla olduğu ve insan popülasyonundaki genetik çeşitlilikten 50 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (52). *H. pylori* genomunda değişik lokalizasyonlarda bulunan genlerce üreaz, flajellin, VacA ve CagA proteinleri sentezlenir (53). Bilinmeyen bir kaynaktan horizontal transfer ile *H. pylori* genomuna dahil olduğu düşünülen *cagA* geninin bir ucunda lokalize olduğu *cag* patojenite adası *cagPAI*'nin yaklaşık 40 kb uzunluğunda bir bölge olduğu bildirilmiştir (52). *H. pylori* genom dizisi trikarboksilik asit döngüsündeki (TCA) enzimler ve çeşitli glukoz oksidize yolların enzimlerini kodlayan genlerin dizilerini içermektedir (76).



Şekil 2. *Helicobacter pylori* 26695 standart suşunun dairesel genomunun görünümü (53)



Şekil 3. Kromozomal organizasyon temelinde *Helicobacter pylori* 26695 ve J99 standart suşlarının genom sekanslarının karşılaştırılması **a.** Genomun geniş görünümü. Dairesel çemberler en dıştaki konsantrik halkadan numaralandırılmaya başlanmıştır. Dairesel çember 1, nükleotid ve dairese çember 2, herbir J99 ve 26695 ortoloğu arasında benzer aminoaside sahiptir. Rölatif yerleşim ve her bir J99-spesifik sekans miktarı hemen ikinci dairese çember içerisinde gösterilmiştir. en geniş J99-spesifik bölge 150 bp'lık iki ayrı segmentten oluşmuştur (**b**). Dairesel çember 3 (26695) ve 4 (J99) rRNA lokalizasyonu, insersiyon sekansı (IS) ve tekrar elementlerini göstermektedir. Dairesel çember 5(26695) ve 6 (J99) *NotI* bölgelerinin lokalizasyonunu gösterir. Dairesel çember 7 26695 ortoloğları ile karşılaştırıldığında J99 genlerinin relatif transkripsiyonel yönünü gösterir. Renksiz olan bölgeler ve translokasyonlar J99 ve 26695'te aynı relatif yönde transkribe edilir. Genlerde inversiyon sonuçları J99'da zıt relatif yönde transkribe edilir. Dairesel çember 8, 26695 genomu yerine J99 genom organizasyonunu gösterir. Gereksinilen inversiyonlar ve/veya translokasyonlar J99 için ardarda numaralandırılmıştır. **b, c.** **a**'daki dairese çember 8'de görülen 7-10 (**b**) ve 3A/3B (**c**) kompleks organizasyonel farklılıklara geniş bir bakış. 26695 ORF'leri bulundukları lokalizasyon ve sırada gösterilmiştir (siyah numaralar).

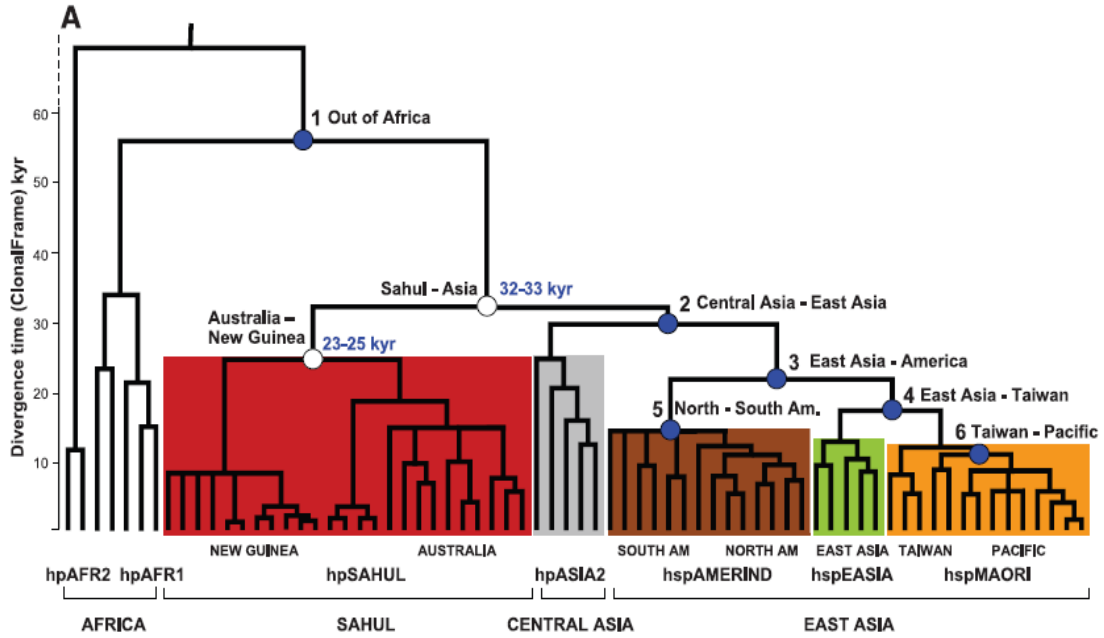
J99 ORF'leri kırmızı numaralar ile gösterilmiştir. Parantez içindeki ORF'ler ve diğer elementler 26695'te bulunur, ancak J99'da bulunmaz. 26695 ile >%90'ın üzerinde benzerlik gösteren J99 segmentlerinin organizasyonu koyu siyah çizgi ile belirtilmiştir. Çerçeveye alınan numaralar **a**'da belirtilen inversiyonlar/translokasyonları gösterir. **a**'daki bölgelerin boyutu megabaz (Mb) olarak gösterilmektedir.

Alm RA, Ling LSL, Moir DT, King BL ve arkadaşlarına ait olan şekil Meryem Güvenir'in yüksek lisans tezinden alınmıştır (77, 78)

iv. Filogenetik Dağılımı

Genetik olarak birbirinden uzak insan ve *H. pylori* popülasyonu arasındaki çakışma ile *H. pylori*'nin insan göçlerinden başlangıcından önce en az 100000 yıl önce erkeğin midesinde bulunduğu hipotezi düşünülmektedir (56).

H. pylori oldukça geniş bir kıtasal alana yayılmıştır. Afrikalılar hpAfrica1 ve hpAfrica2 *H. pylori* popülasyonu ile enfekte, Asyalılar hpAsia2 ve HpEastAsia *H. pylori* popülasyonu ile enfekte, Avrupalılar ise hpEurope ile enfektelidir. Yerli inhabitant arasında *H. pylori* genotiplerinin dağılımı Pasifik boyunca göçlerin anlaşılmasını sağlamaktadır. Pasifik göçü iki ayrı göç dalgası ile olmuştur. İlki, Yeni Gine ve Avustralyaya erken göç ile birlikte hpSahul, ikincisi ise Pasifik boyunca Tayvandan hspMaori'nin dağılımıdır. Doğu Asya, Melanezya ve Yeni Gine kıyılarında örneklenmemiş adalarda hpSahul ve hspMaori hala bir arada bulunabilmektedir. Avustralyada aborjinlerin %28'inde Yeni Gine'deki İskoçyalıların %89'unda hpSahul biyocoğrafik grubu bulunmuştur. hspMaori ise, Polinezya Yeni Zelanda ve Filipinler ve Japonyalı üç bireyden izole edilen hpEastAsia'nın altpopülasyonudur. hspMaori yalnızca Polinezyadan ziyade bütün Avustronezya yayılımının belirleyicisidir. Yakın zamandaki insan seyahatleri ile ilişkili olarak, yerli inhabitantta kalan özgün haplotipler hpEurope, hspEAsia ve hpAfrica1'dir (Şekil 4) (41).



Şekil 4. *Helicobacter pylori*'nin global filogenetik dağılımı (41)

2.3.2. Fenotipik İdentifikasyon

Gastrik biyopsi örnekleri seçici agar plaklarında 3-4 gün sonra küçük, dairesel, düz koloniler oluşturması *H. pylori*'nin identifikasyonu için önemlidir. Hemolitik aktivite göstermez ancak 4°C'de birkaç gün sonra görülebildiği bildirilmiştir. Kültüre edilmiş bakterinin mikroskopik incelenmesi, biyopsi örneğinde bulunan bakteriden farklı bir morfoloji gösterebilmekte ve spiral ya da hareketli olmayan fakat düz ya da kıvrımlı basil şeklinde görülmektedir. Spiral şekil ya da hareket besiyerinin viskozitesi ile direkt ilişkilidir. Kültüre edilmiş bakterinin identifikasyonu için sitokrom oksidaz, katalaz, üreaz, γ -glutamil transpeptidaz, lösin aminopeptidaz, alkalik fosfataz, aminopeptidazlar ve esterasezlar (C₄-C₁₂) enzimlerinin varlığı test edilmektedir. *H. pylori* katalaz, sitokrom oksidaz enzimine sahiptir ancak *H. pylori*'nin katalaz negatif mutantlarında bulunmaz. Üreaz identifikasyon için en önemli enzimdir. Midenin asidik ortamında yaşamını sürdürebilmesi için bol miktarda üreaz enzimi üretmektedir. *H. pylori* toplam protein içeriğinin %6'sı üreazdır. Üreaz, γ -glutamil transpeptidaz ve alkalik fosfataz pozitif, nitrat redüktaz ve hippurikaz negatif olması ile *H. pylori* identifikasyonu sağlanabilir. *H. pylori* 2,3,5,-trifeniltetrazolyum klorid (0.4 ve 1 mg/l), sodyum selenit (%0.1) ve glisin (%1) içeren ancak glukoz (%8) ve sodyum klorid (%3.5) içermeyen ortamda üreyebilmektedir. *H. pylori* bazı istisnalar dışında sefalotine

duyarlı fakat nalidiksik asite dirençlidir (79). *H. pylori in vitro* olarak biyofilm oluşturabilmektedir (80). *H. pylori* karbohidrat tek kaynağı olarak glukozu kullanmaktadır. *H. pylori* nitrojen kaynağı olarak üre, amonyak, alanin, serin ve glutamin gibi substratlar kullanmaktadır (53).

2.4. Epidemiyoloji ve Prevalans

H. pylori dünya popülasyonunun yarısından fazlasında görülen enfeksiyonlardan biridir ve primer olarak çocukluk çağında kazanılmaktadır (55-57, 81). Enfeksiyonun prevalansı, ülkeler arasında ve aynı ülkedeki popülasyon grupları arasında büyük farklılık göstermektedir (32). Gelişmekte olan ülkelerde prevalans %90, gelişmiş ülkelerde %25'dir (57, 82). Düşük eğitim düzeyi, düşük sosyoekonomik düzey, kalabalık yaşam, etnik ve genetik yatkınlık enfeksiyon için risk faktörlerini oluşturmaktadır (81, 83). Hastalığın prevalansı, yaş ve düşük sosyoekonomik durumun artışı ile pozitif korelasyon göstermektedir, fakat çalışılan spesifik hasta popülasyonu ve coğrafya ile değişmektedir (84). Avusturalya'da Japon çocuklarında %4, Afrikalı mülteci çocuklarında %82; Avusturalyalı laboratuvar hastalarında, Malezyalı kan donörlerinde, Çinli ve Japon okul çocuklarında ise %15 ya da daha düşük prevalans bildirilmiştir. İsrail çocuk bakım merkezlerinde ve Türkiye'de açıkça tanımlanmamış yetişkin bireylerde prevalans %24-25, İtalyan köylülerinde (ortalama yaş=59) %58, kuzey İsveç topluluklarındaki bireylerde (ortalama yaş=52) ise %34 olarak bulunmuştur. Arnavutluk, Mısır, İran, Türkiye ve Çin'deki gruplarda ise %60 ve üzeri prevalans bildirilmiştir (85).

Yaş enfeksiyonun prevalansı ile ilişkili en önemli değişkendir. Bir yaştan altındaki çocuklarda seropozitiflik oranı %20, 10 yaşındaki çocuklarda ise seropozitiflik oranı %50 olarak bildirilmektedir. Adolesan dönemde, enfeksiyonun prevalansı artış göstermekte ve 20 yaş popülasyonunun %70'inin enfekte olduğu bildirilmektedir (81). Belirgin enfeksiyon kaybı oranları dört yaşındaki çocuklarda %1.3, yedi yaşındaki çocuklarda %2, 10 yaşındaki çocuklarda ise sıfır olarak bildirilmiş, çocuklarda insidansın yaşla birlikte azaldığı, dört yaşındaki çocuklarda %2.6, yedi yaşındaki çocuklarda %1.3, 10 yaşındaki çocuklarda ise %0.65 olduğu gösterilmiştir (85). Ancak yaş ile birlikte *H. pylori* prevalansındaki artış "doğumsal kohort etkisi", sürekli maruz kalma, düşük düzeyde de olsa erişkin çağında kazanılan enfeksiyon ile açıklanabilir. Doğumsal kohort etkisi; söz konusu erişkin popülasyonun çocuklukta enfekte olduğu zaman dilimindeki daha yüksek bulaş oranını yansıtmaktadır. Yaşla birlikte artışı en iyi bu görüş açıklamaktadır (43, 86-89). Doğumsal

kohort etkisi bugünün çocuklarında nadirdir (56). Enfeksiyonun kadın ve erkeklerde aynı oranda görüldüğü (90), bazı çalışmalarda ise enfeksiyonun erkeklerde daha sık görüldüğü belirtilmiştir (91).

Direkt bireyden bireye bulaş oral-oral, fekal-oral ya da gastro-oral bulaş ya da uygun olarak temizlenmemiş endoskopik aletler ile (55, 56, 85). İnsandan insana geçiş enfekte sekresyonlarla temas aracılığı ile gerçekleşmektedir (84).

Su, insan sindirim sistemi dışında *H. pylori*'nin yaşamını sürdürebildiği en iyi çalışılmış ekosistemlerden biridir. Canlı olup olmadığı bilinmediğinden potansiyel çevresel rezervuarlarda DNA'sının gösterilmesine rağmen organizma için bulaş yolu olduğu tartışmalıdır. Çevresel rezervuarlardan organizmanın kültürü önemlidir. İnsan sindirim sistemi dışında *H. pylori* deniz zooplanktonundan kültüre edildiği bildirilmiştir. Bu çevresel suş klinik suşlara göre daha yapısal bir yolda biyofilm oluşturabilmektedir. Su sistemlerinde ve reaktör simule klorlanmamış su dağıtım sistemleri modelinde biyofilm oluşturmaktadır. Bir diğer mikroçevre protozoaların hücre içi habitatları olan su, *H. pylori* canlı kalabilmesini desteklemektedir. Ancak, nehir suyu örneklerinde *Helicobacter* türleri ve *Acanthamoeba* mekansal dağılımı çalışılmış ve bu iki mikroorganizma arasında açık bir ilişki saptanamamıştır (85). Nehir suyunda, deniz suyu, yeraltı suları, lağım suyu ve içme suyu gibi çevresel örneklerde üretilmesi zor olduğundan *H. pylori* varlığı PCR ile gösterilmiştir (92).

Bir diğer bulaş yolu oral-oral (öpme, annenin çocuğa gıdayı önce kendi ağzından çiğneyip yumuşatarak vermesi) bulaş yoludur (43, 93). *H. pylori* tükürük, kusmuk ve dental plakta da izole edilmiştir (56, 94). Bazılarında *H. pylori* mide kolonizasyonu gösterilemeyen gastrik biyopsi hastalarının %17'sinin oral kavitesinde saptanmıştır. Organizmanın olağan dışı lokalizasyonda olması geçişin ilgili yolak ile meydana geldiğinin açık bir kanıtı değildir. Tonsiller *H. pylori* için ekstra-gastroduodenal rezervuar olarak önerilmektedir fakat yapılan bir çalışma tonsillerin alınmasının *H. pylori* bulaş riskini etkilemediği gözlenmiştir (85).

Seksüel geçiş bildirilmemiştir. Eşler arasında suş değişikliği olmamaktadır ve enfeksiyon enfekte olmayan partnere nadiren geçer. Aile *H. pylori* bulaşında merkezi oluşturmaktadır. Sıklıkla çocuklar ebeveynlerinden birinin suşu ile enfekte olmaktadır. Çocuklar evden ayrıldıklarında hatta kendi ailelerini kurduklarında bile kronik olarak aynı suşu taşımaktadırlar (56). Çinli çocuklarda annenin eğitim eksikliği, İrandaki yetişkinlerde annenin ve babanın eğitim eksikliği ile *H. pylori* enfeksiyonu arasında ilişki bulunmuştur. Ancak Türkiye'deki üniversite öğrencilerinde ise ailelerin eğitim düzeyleri, aile üyelerinin

sayısı ve gelir düzeyinin *H. pylori* statüsü ile az miktarda ilişkili olduğu gözlenmiştir. Direkt bireyden bireye temas ile aile içi geçişin temel geçiş modu olduğu düşünülmektedir. Alman popülasyonunda çocukluk çağında *H. pylori* kazanılmasında, anne, baba ve kardeşlerden geçiş olup olmadığı araştırılmış ve kardeşlerin enfeksiyon statüsünün geniş ailelerin yaygın olduğu toplumlarda önemi olduğu gözüktüğü ve annenin enfeksiyon statüsünün ev halkının hijyeni ve diğer risk faktörleri ile diğer aile üyelerine göre daha güçlü ilişkili olabildiği bildirilmiştir (85). Bir başka çalışmada ise, *H. pylori* suşları ile yapılan makroarray çalışmasında, üç ayrı ailenin tüm bireylerinin sahip olduğu suşlar karşılaştırılmış ve enfeksiyonun taşınmasında annenin etkisinin çok az ya da hiç olmadığı gösterilmiştir (95). Genotipik metotlar kullanılarak, aile üyelerinin *H. pylori* suşlarının arasındaki ilişki incelenmiş ve Japonya’da çalışma popülasyonunun %69’unda, Bangladeş’de çalışma popülasyonunun %46’sında, Peru’da çalışma popülasyonunun %30’unda anne ve çocuk suşları arasındaki eşleşme gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar farklı yaşam şartları ve yaş spesifik enfeksiyon paternlerinin bir sonucu olarak gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde anneden çocuğa geçişin değiştiğini göstermektedir. Güney Afrika, İngiltere, Birleşik Eyaletler, Kore ve Kolombiya’da da benzer sonuçlar elde edilmiş ve aileler içindeki suşların çeşitliliğinin kentsel bölgelere göre kırsal bölgelerde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (85).

H. pylori’nin bilinen tek rezervuarı insandır. Su, evcil kediler ve karasineğin *H. pylori*’nin diğer rezervuarları olduğu düşünülmektedir (83). Diğer iki olası insan dışı rezervuarlar hayvanların sindirim sistemi ve gıdalardır. Çiğ sütte *H. pylori glmM* geni varlığı araştırılmış ve örneklerin %34.7’sinde *glmM* geni amplifiye edilmiştir. Kedi tükürük ve dışkılarında *Helicobacter* türleri bulunmasına rağmen, *H. pylori* saptanmamıştır. Bu çevrelerde *H. pylori*’nin fizyolojik olarak bulunması, *H. pylori* geçişinde dış rezervuarların rolünü açıklamak için yeterli değildir (85). Ayrıca vektör geçişi olduğu düşünülmektedir, bu biyolojik olarak mümkündür çünkü karasineğin orta bağırsağı uygun pH (3.1)’ya sahiptir ve bu nedenle *H. pylori* enfeksiyonu için etiyolojik bir çevre sağlayabilmektedir (83). Shangdong’un kıyı bölgesinde ve Çin’de normal erişkin bireydeki seroprevalans %35.9 bildirilmiştir. Ayrıca, 2011 yılındaki çalışmalarda *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı Uganda’da %63, Buenos Aires-Arjantin’de %24.7, Portekiz’de %31.6, Etopya’da %41 bildirilmiştir (96).

Güney Afrika’da (Afrikalı enigma), Güney ve Güneydoğu Asya’da (Asyalı enigma) *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı yüksek iken, gastrik kanser insidansı düşüktür (54).

Afrika’da *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı yüksek olmasına rağmen, peptik ülser hastalığı ve gastrik kanserin nadir olduğu bildirilmiştir. Afrika’da *H. pylori* ilişkili hastalıkların düşük prevalans göstermesi olası nedeninin; endemik yüksek parazitik salgının T yardımcı hücre (Th) 2 baskın yanıtına neden olduğu ve bu yanıtın da *H. pylori* enfeksiyonuna sahip bireyleri peptik ülser ve gastrik kanser gelişiminden korumakta olduğu bildirilmektedir (97). Kostarika’da *H. pylori* enfeksiyonu insidansı sabit iken, gastrik kanser insidansı %61 ile %140 arasında değişmektedir. Seçimde yanlı davranma, sağlık hizmetlerine erişimin ekstrem şekilde kısıtlı olması, kısa bir yaşam beklentisi ile Afrikalı enigma açıklanabilir. Ancak, Kostarika’da yaşam süresi (78 yıl) oldukça uzundur ve çoğu Kostarika’lı sağlık hizmetlerine ulaşabilmektedir. Yiyecek, kimyasallara maruz kalma ve *H. pylori* enfeksiyonu gibi çeşitli faktörlerin gastrik kanser prevalansı ile ilişkisi araştırılmıştır. Ancak, “Kostarikalı enigma” ile ilişkili olarak tam açıklığa kavuşmuş bilgi bulunmamaktadır (54).

2.5. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Patogenez

H. pylori ile enfekte bireylerin çoğu asemptomatik olup ancak enfekte olan bireylerin %10’unda gastrik ya da duodenal ülser gelişmektedir. Enfeksiyonda bakteriyal faktörler, konak faktörleri ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (35).

2.5.1. Asidik Ortamda Yaşama

H. pylori’nin düşük pH’ya sahip mide ortamında yaşamını sürdürebilmesi *H. pylori* enfeksiyonu için önemlidir. Hızlı hareket özelliği ve kendi etrafında yaşayabileceği pH ortamını sağlayan üreaz enzimi sayesinde asiditeden etkilenmeden mukus tabakasına ulaşmayı başardığı bildirilmektedir (48, 98). Enfeksiyonun gnotobiotik domuz modelinde, üreaz ve flajel genlerini taşımayan knockout mutantların kolonizasyonunda eksiklik olduğu gösterilmiştir (56). Kollajenazın da kolonizasyonda direkt bir rolü olduğu bildirilmiştir Proteazların bu tipinin hücreler arası matriksi parçaladığı bilinmektedir. *H. pylori*’de bakterinin kolonize olduğu bölgede hücreler arası matriks bulunmadığından kollejenazın bu rolü oynaması olanaksızdır. Bu nedenle, kollajenazın bakterinin hareketine olanak tanıyacak şekilde mukus tabakayı parçaladığı düşünülmektedir. Sonuçta kolonizasyon esnasında, flajel bakterinin hareketi için, üreaz enzimi asidik pH’yı tamponlamak için, kollajenaz ise mukusu gevşetmek için gereklidir (99). Üreaza ilaveten iki alifatik amidaz (AmiE, AmiF) ve rocF tarafından kodlanan arginazın *H. pylori*’nin aside karşı direncinde etkili olduğu bildirilmiştir

(64, 100, 101). *H. pylori* regülatörleri nikel regülatör proteini (NikR), Fur proteini ve HP0164/0165-HP0166 iki komponent sistemi asit adaptasyonu ile ilişkilidir (101). Uzun süreli kültürlerde *H. pylori* üremesi ile biyofilm oluşması yüksek ekzopolisakkarit üretimi ile ilişkilidir. *H. pylori* tarafından ekzopolisakkarit üretimi *in vivo* olarak mide asidine karşı bakterinin korunmasında önemli bir rol oynayabildiği bildirilmiştir (58). *H. pylori*'nin immün tanınmadan kaçabilmesi için plazminojen gibi konak proteinleri ile bakterinin kaplanması sonucu antijenik bir saklanma şekli oluşturabildiği ya da yüzey komponentlerinin faz varyasyonu ve antijenik varyasyonunun gerçekleşebildiği mekanizmalar bildirilmektedir (35).

H. pylori'nin gastrik mukozada yaşayabilmesi, üreaz enzimi üretebilme yeteneğine bağlıdır. Bu enzim üreyi karbondioksit ve amonyağa parçalamakta ve bu sayede *H. pylori* midenin asidik gastrik çevresindeki ortamın asiditesini azaltmaktadır (84, 102). Bu enzim gastrik mukus viskozitesini değiştirmeye çalışarak bakteriyal harekete yardımcı olmaktadır (84).

Üreaz enzimi *H. pylori*'nin hem yüzeyinde hemde sitozolünde bulunmaktadır (35, 59, 63). Üreaz enzimi aynı zamanda epitel hücrelerin CD74 molekülüne karşı bir adezin olarak iş görmektedir (35). Üreaz enziminin biyosentezi için UreA ve UreB yapısal genleri, UreC ve UreD yardımcı genleri ve nikel gereksinim duyan UreEFGHI genleri gereklidir (47, 98, 101). Üreaz top benzeri supramoleküler bir yapı oluşturan dört α/β trimerin birleşmesi ile UreA (26.5 kDa) ve UreB (61.7 kDa) alt ünitelerinden oluşan nikel içeren heksadimerdir (100, 102, 103). Üreaz kompleksi multifonksiyonel özelliktedir ve bu proteinin yüzey özellikleri *H. pylori*'nin kolonizasyonu ve hayatta kalması için çok önemlidir (102). Üreaz, sitozolde ısı şok proteini HspB ile birlikte akümüle olur ve sentezlenir. Bu proteinler bakterinin lizisi ile sitozolden salınır ve canlı bakterinin yüzeyine adsorbe olur. Bu üreazın yüzey ekspresyonunun kabul edilen tek mekanizmasıdır (59, 100). Erken log fazında üreazın sitoplazma içerisinde, log fazı sonunda ise enzimin yüzeyde ya da ekstrasellüler olarak bulunduğu ve her iki durumda da enzimin aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Üreazın %30'u *in vivo* olarak *H. pylori* yüzeyi ile ilişkilidir (104). İnternal üreazın, asidik pH'da protein sentezini stimüle etmek için ve periplazmik pH ve membran potansiyelinin artışı aracılığı ile gastrik asiditeye karşı korunmak için eksternal pH tarafından regüle edildiği gösterilmiştir (100, 101). *In vitro* olarak *H. pylori* üre varlığında pH 1'de birkaç saat hayatta kalabilmektedir. Bakteriyal sitoplazmada üreaz aktivitesi proton kapılı üre kanalı UreI tarafından regüle edilmektedir. Asidik pH'da, UreI aktive olmakta ve en fazla amonyak ve

CO₂'ün üretimine izin verecek şekilde sitoplazma içerisine üre difüzyonu en az 300 kat artmaktadır. UreI nötral pH'da aktive değildir, böylece *H. pylori*'ye karşı öldürücü olan alkalinizasyondan (pH > 8) kaçmaktadır (100).

H. pylori üreaz aktivitesi amonyak üretimi ile hücrelerde toksisiteye neden olabilir. Amonyak, *H. pylori* ilişkili gastrik adenokarsinoma neden olan karsinojenik ajanların oluşmasında nötrofil myeloperoksidaz tarafından salınan reaktif ara ürünlerle etkileşebilir (59). Üreaz aktivitesinin ürünü olan amonyağın asimilasyonu glutamin sentaz enzimi ile gerçekleşmekte ve α -ketoglutarat glutamat sentaz enziminden ziyade glutamat dehidrogenaz tarafından glutamata dönüştürülmektedir (53).

Üreaz ekspresyonu kofaktör olarak nikel tarafından regüle edilmektedir. *Escherichia coli* NikR'nin ortoloğu olan HP1338 proteini, *H. pylori*'de üreaz ekspresyonunun nikel duyarlı indüksiyonunu düzenlemektedir. HP1338 geninde mutasyon olduğunda *H. pylori*'nin büyümesini baskılamaktadır ve üreaz enzim aktivitesini, üreaz alt ünitelerin ekspresyonunda nikel indüksiyonunun artışı önlenmektedir (105).

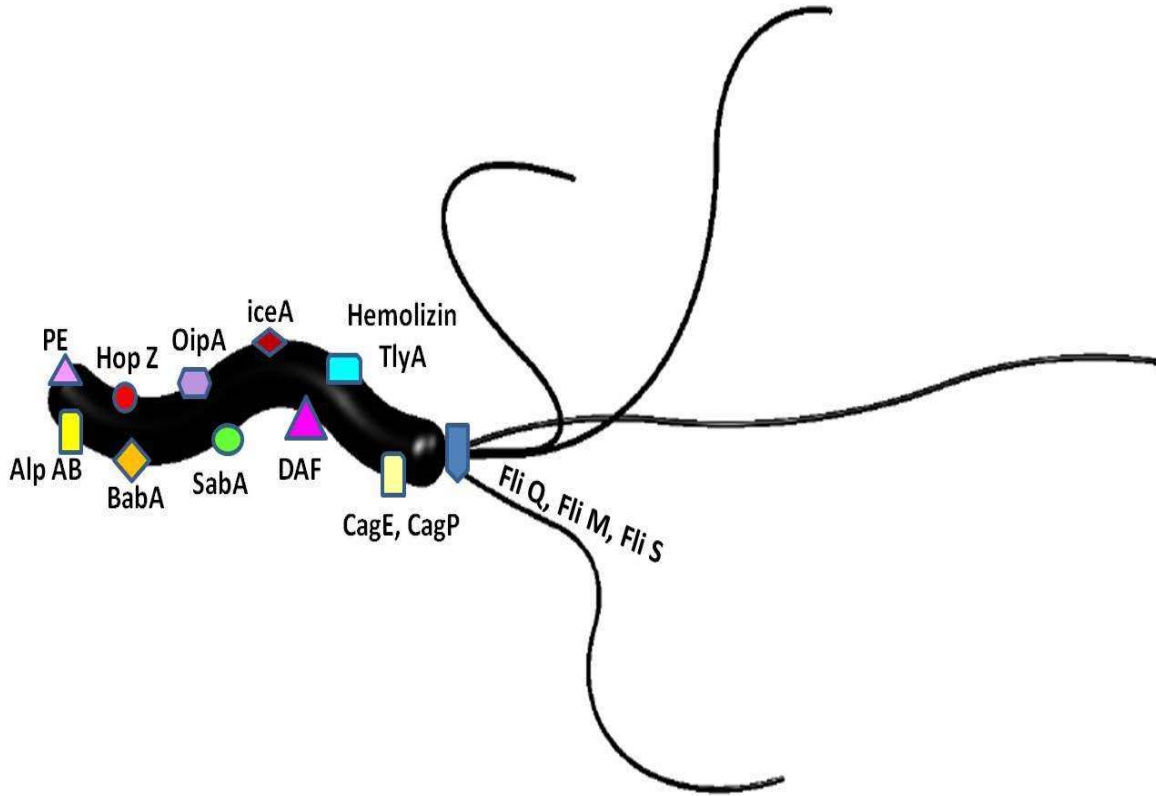
Üreaz enziminin etkinliğini azaltan PPI gibi inhibitörler olmasının yanı sıra, üreaz enziminin aktivitesini durduran flurofamid ve asetohidroksamik asit dışında farklı inhibitörler de bulunmaktadır (104). *Chamomilla recutita* yağ ekstratı, nonfermentatif *Camellia sinensis* ekstratı ve elma kabuğu polifenollerinin ekstraktının *H. pylori*'nin üreaz enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (106-108). Flurofamid hücre membranına ya hiç difüze olmaz ya da yavaşça difüze olur. Bakteri yüzeyindeki veya ekstraselüler üreaz aktivitesi 10 dakikada flurofamid (1 μ M) ile inhibe edilir. *H. pylori* membranına difüze olabilme yeteneğindeki asetohidroksamik asit (7mM) ise 10 dakikada hücrelerdeki tüm üreaz aktivitesini inhibe edebilmektedir (104). Fare monoklonal antikoru L2'nin *H. pylori*'nin üreaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Antiüreaz antikorları oluşumunun üreaz enzimatik aktivitesini inhibe ettiğinden, bu gibi antijenik peptitlerin *H. pylori*'ye karşı aşı stratejilerinde kullanılabileceği düşünülmektedir (105).

2.5.2. Kolonizasyon ve Tutunma

Gastrik epitel hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilen membran bağlı müsin *H. pylori*'ye karşı koruyucu bir bariyer oluşturmaktadır (109). Mukozanın kronik kolonizasyonu için sabit bir bakteri kaynağı, sonradan oluşan hücresel bağlanmalar ve patolojik değişikliklerin oluşumu gerekmektedir. Kolonizasyon epitelin mukus ile kaplı

yüzeyine doğru *H. pylori*'nin aktif hareketi ile karakterizedir. *H. pylori*'nin kolonizasyon yoğunluğu epitel hücrelerin MUC5AC ekspresyon oranı ile eşleşmektedir (35).

H. pylori'nin insan midesindeki kolonizasyonundaki yeni genler hayvan modellerinde tüm-genom mikroarray ve transpozan mutant çalışmaları temeline dayanarak tanımlanmış ve üreaz aktivitesi, kemotaksis, hareketlilik gibi bilinen genlerin yanında α -ketoglutarat permeaz, UDP-glukoz4-epimeraz ve fonksiyonları bilinmeyen genlerin oluşturduğu yeni faktörler de bildirilmiştir (110). *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelere tutunmasının efektör moleküllerin girişini kolaylaştırdığı ve enfeksiyonun oluşması için gerekli olduğu düşünülmektedir. *H. pylori*'nin birkaç Hop proteinlerinden olan BabA, SabA, OipA, HopZ, iceA, AlpA ve AlpB tutunma (adezyon) faktörleri olarak tanımlanır (Şekil 5) (14-16).



Şekil 5. Kolonizasyon ve tutunmadaki virulans faktörleri

2.5.2.1. Adezyon Molekülleri

Kan grup antijen bağlayan adezin (BabA), insan gastrik epitel hücre yüzeyindeki fukosillenmiş glikokonjugatlar içeren Le^b (α -1,3/4 difukosillenmiş)'ye *H. pylori*'nin bağlanmasına aracılık eden 75-kDa'luk bir adezyon molekülüdür (23, 55-57, 67, 68, 111,

112). BabA eksprese eden suşlar gastrik epitel hücrelere daha sıkı adhere olmaktadır ve bu BabA ekspresyonu hastalık şiddetini etkileyebildiğini göstermektedir (55, 113). *H. pylori* J99 suşunda BabA eksprese edilirken, *H. pylori* 26695 suşunda eksprese edilmediği bildirilmiştir (114). Üç *bab* alleli vardır: *BabA1*, *BabA2* ve *BabB*, bunlardan yalnızca *BabA2* Le^b'ye bağlanabilmektedir (16, 57, 115-117). *babA1* translasyonel başlangıç kodonunu içeren 10 bp delesyona sahiptir, bunun dışında *babA1* ve *babA2* hemen hemen aynı allellerdir (57). *BabA1* tamamlanmayan bir sinyal peptidinden dolayı sessizdir (116). Yalnızca *babA2* alleli aktif bir adezin kodlayabilmektedir (113). *BabA2*'nin ülser ve gastrik karsinoma için yüksek risk oluşturduğu ve *vacAs1* ve *cagA* genotipiyle güçlü ilişkisi olduğu gösterilmiştir (16). *babA2* ekspresyon paterni antrum ve korpus arasında farklılık göstermektedir. Antrumda daha yüksek olması *bab* adezin geninin yarı kararlı olduğunun göstergesidir. *babA* geni konak çevresindeki değişikliklere adapte olabilmektedir (116). Gastrik mukozayı kaplayan mukus jel tabakasını oluşturan gastrik mukoza hücreleri müsin salgılar (68). Gastrik yüzey mukus hücreleri MUC5AC müsinini, bez mukoza hücreleri ise MUC6 ve MUC5A müsinini eksprese eder (64, 68, 69, 100, 118). *H. pylori* enfeksiyonlu midede ise MUC5AC'nin yanı sıra MUC2 ve MUC5B salgılanır. Müsinlerin moleküler ağırlığının %50'den fazlasını karbohidratlar oluşturur ve her bir müsin 100 farklı oligosakkarit yapısı taşıyabilir. Karbohidrat yapılar hücre yüzeyini kaplar ve patojen mikroorganizmalar için reseptör olarak rol oynar (118). *H. pylori*'nin aglütininin gp340 ve tükürük müsinini MUC5B ile bağlanması BabA ile ilişkilidir (66). *H. pylori* MUC5AC' ye nötral pH'da bağlanır. Oral kavite rezervuardır. *H. pylori*'ye immun yanıtta tükürük ve mukus önemli rol oynar. Tükürük miktarı azalması ve ekzokrin bezlerin otoimmun parçalanmasının gözlemlendiği primer Sjögren Sendromunda *H. pylori* prevalansında artış bildirilmiştir (118). Gastrik prekanseröz lezyonlarda ve gastrik karsinomada MUC5AC ve MUC6 ekspresyonu değişmektedir (66). Trefoil faktörler gastrointestinal mukozanın tamirinde gereklidir. MUC5AC küçük sisteince zengin proteinlerin bir üyesi olan trefoil faktör ailesi (TFF1) ile birlikte eksprese olmaktadır (66, 100). TFF1 ile *H. pylori* lipopolisakkaritinin merkez oligosakkarit kısmının bağlanması için optimum pH 5-6'dır. pH'daki bir artış mukus yenilenmesi ile yeri değişen bakterinin lümen yakınında uygun olmayan bağlanmasına neden olabilir. Aktif kronik gastriti olan özellikle CagA pozitif suş ile enfekte olan hastalarda TFF2 ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (66). Protein üretimi *BabB* geninin 5' ucunda sistein-treonin (CT) dinükleotid tekrarları sayısına bağlı olarak switch on-fonksiyonel, switch off- nonfonksiyonel faz varyasyonu ile gerçekleşir

(68, 119). Backström ve arkadaşları Le^b bağlanamayan suşların genellikle *babB* lokusu içine rekombinasyonu ile aktive olabilen sessiz *babA* gen sekanslarını bildirmişler ve çoğu suşun Le^b 'ye ek olarak A- Le^b ve B- Le^b 'ye bağlanabilen “generalist” suş olduğu halde özellikle Güney Amerika Kızılderilileri arasında predominant birkaç suşun ise sadece Le^b 'ye bağlanabilen “specialist” suş olduğunu göstermişlerdir (120). BabA duodenal ülser ve gastrik kanser gibi hastalıklarla ilişkili olabilmektedir (84). BabA pozitif izolatlar yüksek BabA üreticileri (BabA-H, izolatların >%80'den fazlası) ve düşük BabA üreticileri (BabA-L, izolatların %20'si) olarak ikiye ayrılmaktadırlar. BabA-L ile enfekte bireylerde gastrik atrofi ve kanser gibi daha kötü klinik yaklaşıma neden olmaktadır (64).

Sialik asit bağlayan adezin (SabA) (HP0725), eritrositler, nötrofiller, ekstraselüler matriks proteini laminin ve inflame gastrik dokuda eksprese edilen siyalillenmiş glikokonjugatlara *H. pylori*'nin bağlanmasını düzenlemektedir (100). Ayrıca, *H. pylori*'nin aderansı için fonksiyonel reseptördür. Sialillenmiş Le^x ve Le^a benzeri glikanlar ile bağlanmasında kullanılan epitop NeuAc α 2-3Gal olarak karakterize edilmiştir. *H. pylori* NAP sialik asit bağlama özelliğini göstermektedir (69). SabA gangliosidlere ve ekstrasellüler matrix proteini laminine bağlanma ile de ilişkilidir (121, 122). Tükürük müsinini MUC7 ile *H. pylori*'nin bağlanması SabA ile ilişkilidir. SabA aynı zamanda polimerik Ig reseptörünün salgısal komponenti ve IgA zincirine (S-IgA-Hc) bağlanmak için bulunmaktadır. Bu etkileşim sindirim sistemi boyunca bakterinin yüzey ya da adeziv özelliklerini düzenleyebilmektedir (66). *sabA*'nın ekspresyonunun genin 5' bölgesinde yer alan CT tekrarlayan motif içerisinde “kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması” aracılığı ile faz varyasyonu ile düzenlendiği bildirilmektedir (64, 66, 121). *sabAB* 5' ucu yakınlarında çoklu T ve CT tekrarlarında *sabA* allelleri 26695 suşu klonlarının %25'inde bulunduğu bildirilmiştir. Kromozomal replikasyon sırasında meydana gelen bu mekanizma bakterinin adaptasyonuna fakat aynı zamanda konak immun yanıtından kaçmasına olanak tanıyan konakta SabA ekspresyonu için seçici bir baskıyı göstermektedir. *sabA* transkripsiyonu *in vitro* olarak aside yanıt veren ArsRS iki komponentli sinyal transdüksiyonu aracılığı ile baskılanır (66). *sabA* ekspresyonu pH 5'te azalır, intestinal metaplazi ve gastrik atrofide yükselir. SabA membran bağlanmasında görevli sialil –di- $Le^{x/a}$ glikosfingolipidlere bağlanma ile selektin mimikrisi yapar. SabA “on”, HopZ “off” ve *iceA1* alleli mevcut olduğu durumda MALT lenfoma riski artışı bildirilmiştir (121). Unemo ve arkadaşları SabA adezinlerinin insan nötrofillerinin opsonik olmayan aktivasyonda reseptör bağlayıcı ve oksidatif patlama arasındaki bağlantının

G protein bağlayıcı sinyal yolağı ve fosfatidilinositol-3 kinazın downstream aktivasyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (123). SabB, SabA'nın paraloğudur. SabA ya da SabB “switch off” ise aderans, kolonizasyon yeteneğı, bakteriyal dansite ve inflamasyonun indüklenmesinin azaldığı bildirilmiştir (23). de Jonge ve arkadaşları Hollandalı hastalarda *sabA*'nın değil, *sabB* geninin kapalı olduğu durumlar da gastrik ülserle değil duodenal ülser ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle enfeksiyonun seyrinde bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (119). Ayrıca, 96 hastada (dokuz gastrik kanser, 28 duodenal ülser, 21 gastrik ülser, dokuz lenfoma, 29 gastrit) 7 ± 3 CT tekrarının SabA veya SabB “on” statüsü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (120, 121).

Dış membran inflamatuvar proteini (OipA) (HopH) (HP0638), peptik ülser ya da kansere neden olan gastrik mukozanın farklı patolojik zararı ve bakteriyal adezyona neden olan geniş bir dış membran protein ailesinin üyesidir ve genlerin fonksiyonel statüsünü etkileyen genin 5' bölgesinde farklı sayıda CT dinükleotidleri ile çoklu değişken basit sekans tekrarları ve faz-faryasyon genleri tarafından kodlanmaktadır (124). Bütün *H. pylori* suşlarında bulunmakta fakat ekspresyonunda suşlar arası varyasyon bildirilmektedir. Gastrik epitel hücrelere bağlanmada rol oynayan spesifik reseptörler henüz tanımlanmamıştır. OipA'nın 5' ucunda “kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması” ve çerçeve kayması mutasyonları olmaktadır (23). Gastrik epitel hücrelerin interlekin 8 (IL-8) üretimini stimüle edici rol oynar (124, 125) ve OipA protein üretimi *oipA* geninin sinyal sekansında CT dinükleotid tekrar sayılarına bağlı olarak “on” ya da “off” olabilmektedir (124). IL-8 üretimine etkisinin yanı sıra IL-6, RANTES ve metalloproteinaz 1 üretiminde rol oynar (23). OipA'nın fonksiyonu hala daha tam olarak bilinmemekle birlikte, OipA'nın ekspresyonunun *cagPAI*, *VacAs1* ve *BabA2* virulans faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (23, 70, 71). *sabA*'da olduğu gibi, genin 5' bölgesinde yer alan CT tekrarlayan motifleri “kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması” ile regüle edildiğı bildirilmektedir (121). OipA'nın, STAT 1 fosforilasyonu ve interferon regülatör faktör 1 (IRF1) yolağı ile IL-8 sekresyonunu arttırdığı bildirilmektedir (25, 70, 71, 112). Epidermal büyüme faktör reseptörü, 10 fosforilasyon bölgesi içermektedir. OipA, fokal adezyon kinaz (FAK) fosforilasyonunda CagA'dan farklı (tirozin 407) olarak tirozin 397, 576, 577, 861, 925 fosforilasyonuna neden olmaktadır. OipA'nın ve *cagA*'nın IL-8 promotorunun tam aktivasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (25, 70, 112). Gerbillerde *OipA*-negatif suşların gastrik-kanseri uyarma yeteneklerinin azaldığı saptanmıştır (110). OipA proteinini

kodlayan HP0638'e sahip Batı suşlarında altı, 5+2 ve dokuz CT tekrar paterninin dominant olduğu, HP0638 "off" olanda ise yedi ve sekiz CT tekrar paterni olduğu; Doğu Asya suşlarında ise ≤ 5 CT tekrarı içerdiği bildirilmiştir (126).

Aderans-ilişkili lipoprotein A (AlpAB) gastrik kolonizasyon için efektör bir proteindir. AlpA tipik lipoprotein sinyal sekansı, AlpB ise karakteristik standart sinyal sekansı taşır. Konakla *H. pylori* arasındaki bağlanmada rol alan reseptör tam olarak tanımlanamamıştır (127). AlpAB, enfeksiyonun ilk üç ayında insan gastrik dokusunda *in vivo* transkribe edilir ve enfeksiyonun erken aşamasında rol oynar bu nedenle profilaktik aşı için önemli olabileceği düşünülmektedir (128). Lu ve arkadaşları alpAB'nin C57B/6 farelerinin midelerinden zayıf kolonize olan tüm *alpA/alpB*'den yoksun mutantların hücresel bağışıklıkta gelişmiş olabileceğini ve alt mukozal seviye proinflamatuvar efektörleri olan KC ve IL-6 ile etkileşimlerini ve *alpAB*'nin delesyonunun Batısal olmayan Doğu Asya suşlarında insan gastrik epitelyal gastrik kanser hattı (AGS) hücrelerinde enfeksiyon sonucu IL-8 uyarımını azalttığını bildirmişlerdir (129). *alpA/B* genlerinin delesyonu durumunda ise farelerin midelerinde *H. pylori* bağlanması ve kolonizasyonunda da azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (110).

Diğer bir adezyon molekülü **epitel ile etkileşim tarafından indüklenen gen (*iceA*)**'dir. *H. pylori* ve insan epitel hücresi arasındaki ilişki ile *iceA1* ekspresyonu upregüle olur (16, 55, 57). *iceA1* ve *iceA2* genin allelik varyantıdır. Peptik ülser ile ilişkili olan *iceA1* pozitif suşta IL-8 üretimi artmaktadır (16, 81, 113). *iceA1* ekspresyonu konak mukozal yanıt ile ilişkilidir ve *iceA2* ekspresyonunun tekrarlayan protein yapısına sahip gen ile etkilenebildiği bildirilmiştir (16). *iceA1* geni ile *Neisseria lactamica*'nın CTAG spesifik tip II restriksiyon endonükleazı *nlaIII*'ü kodlayan *nlaIIIR* ile belirgin homoloji gösterdiği bulunmuştur (55, 57, 113). *H. pylori* DNA'sının metilasyonu *H. pylori*'nin indüklediği yanıtların regülasyonunda önemli olabileceği düşünülmektedir. *H. pylori* DNA metilasyon paterni suşlar arasında değişiklik göstermektedir. *hpyIM*, CATG-spesifik metiltransferazdır ve *iceA* geni bunun hemen yukarısında bulunmaktadır. *hpyIM* gen transkripsiyonunun regülasyonu *iceA1* ve *iceA2* geni taşıyan suşlar arasında belirgin olarak değişiklik göstermektedir. *iceA1* içeren suş daha yüksek *hpyIM* transkripsiyon düzeyine sahiptir (105).

Kompleman intrinsik regülatörü olan **decay akselere edici faktör (DAF) (CD55)**, epitel hücreyi kompleman aracılı lizisten koruyan bir protein ve aynı zamanda da patojenler için reseptördür. Dört sürekli, 60 aminoasit uzunluğunda tekrarlayan kompleman kontrol

protein tekrarı (CCP) içeren 70 kDa'luk bir glikoproteindir (24). Glikosilfosfolipidilinositol kök ile membrana bağımlıdır (24, 67). *H. pylori* için reseptör olarak gereksinilen DAF proteininin gösterilmesi için rekombinant hücre modelinden yararlanılmıştır. Biyolojik olarak uygun mikrobiyal gastrik epitel hücre etkileşim modelinde *H. pylori*'nin DAF ekspresyonunu indüklediği ve knockout farelerde bu etkileşimin başından sonuna kadar kullanıldığı bulunmuştur (24). Sağlıklı insan gastrointestinal sistem mukozasında epitelden hücre membran kompleman regülatör glikoproteinlerinin eksprese edildiği, bunların epitel ve glandular hasara karşı korumadığı ancak intestinal metaplazide DAF eksprese edildiği ve parietal hücreleri zayıfta olsa koruduğu gösterilmiştir (130).

Ayrıca **HopZ** mutantında gastrik epitele bağlanmayı azalttığı ve gastrik dokuya *H. pylori* tropizmini düzenlediği bildirilmektedir (131). *HopZ* geninin 5' bölgesinde yer alan CT tekrarlayan motif içerisinde "kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması" ile regüle edildiği gösterilmiştir (121).

hopQ'daki mutasyonların AGS gastrik epitel hücrelerine *H. pylori*'nin aderansını, CagA'nın konak hücrelere translokasyonunu ve hücresel değişiklikleri arttırması **HopQ**'nun bakteriyal aderans için önemli olduğunu göstermektedir. *hopQ* tip I genotipi tip II genotipine göre daha yüksek atrofi skoru ile ilişkilidir ve gastroduodenal hastalıklar için bir marker olarak önerilmektedir (66).

2.5.2.2. Diğer Faktörler

Fosfatidiletanolamin (PE) (HpaA) 19.6 kDa korunmuş bir protein olup *H. pylori* katalazının PE reseptörüne bağlandığı ancak adezin olup olmadığı tartışmalıdır (127). **α - β -karbonik anhidrazlar** çinko içeren bir metalloenzimdir ve karbondioksitin bikarbonata dönüşmesinde rol oynar. Çevreye karşı adaptasyonda önemli olduğu ancak kolonizasyondaki rolü bildirilmemiştir (132). **Hemolizin TlyA (Hp1086)** por oluşturan sitolizin ortologudur ve mutasyon olduğunda aderans ve hemolitik aktivite azalmaktadır. *cagPAI* genlerindeki özellikle **CagE**, **CagP** mutasyonunda aderans azalma gözlenmektedir. CagP'nin fonksiyonu belli değildir ancak cagE IL-8 indüksiyonunu sağlamaktadır (131). Gastrik karsinoma hücre hattında tanımlanan **GlcNAc transferazın (b3GnT5)** *cagPAI*-bağımlı yüksek ekspresyonu yüksek *H. pylori* aderansı ile ilişkilidir (66). Flajellar biyosentetik protein fonksiyonu gösteren **FliQ** ve **FliS**, flajellar motor switch protein fonksiyonu gösteren **FliM**'de herhangi bir mutasyon olursa aderans azalma gözlenmektedir (131). **HorB (HP0127) proteini**, *horB*

geni tarafından kodlanan diğerk bir dış membran proteini ailesi üyesinin inaktivasyonu bakteri kolonizasyonunun ve farelerde LPS O-zinciri ve Lewis antijenlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (110, 133). Benzer şekilde, tümör nekroz faktör (TNF)- α indükleyen protein (tip- α) geninin nakavt yapılması durumunda gastrik fare mukozasına kolonize olan *H. pylori*’lerin azaldığı ve Tip- α ’nın ayrıca IL-1 α ve TNF- α gibi proinflamatuvar mediyatörlerin salınımını uyardığı saptanmıştır (110, 134). Ayrıca, yeni bir virulans markerı olarak kabul edilen *homB* geni çocuklarda peptik ülser hastalığıyla yüksek oranda ilişkilidir. **HomB proteini** aynı zamanda *cagA*, *babA2*, *vacAsI*, *hopQI* ve *oipA* varlığı ile korelasyon gözlenmektedir ve *H. pylori* aderansı ve inflamatuvar yanıtı neden olduğu görölmektedir (135). **γ -Glutamil transpeptidaz (GGT)** *H. pylori* kolonizasyonu ve hücre apoptozu ile ilişkili patojenik bir faktördür. Dispepsili hastalardan izole edilen suşlara göre, peptik ülserli hastalardan elde edilen suşlarda daha yüksek GGT aktivitesi gösterilmiştir (109). *H. pylori* **GroEL** (ısı şok protein 60) bakteriyal yaşam için önemli bir faktördür ve gastrik hücre hattına bağlanmada rol oynamaktadır.

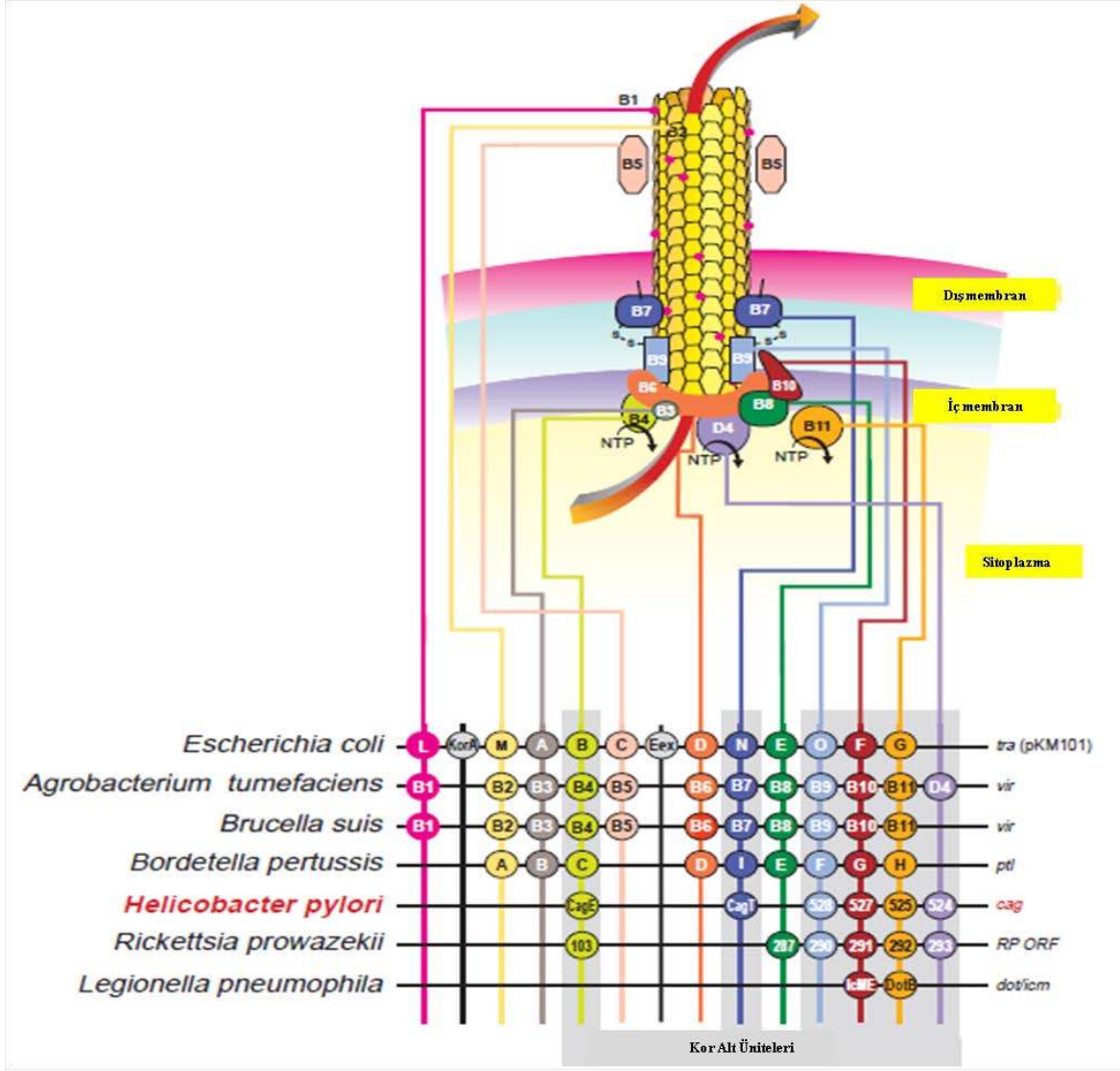
2.5.3. *Helicobacter pylori*’nin Konak Hücreye Tip IV Sekresyon Sistemi ve Diğerk Yolaklarla Girişi

T4SS, Gram negatif bakterilerin çoğunda bulunan konjugasyon sistemi ile ilişkili bir transporter sistemidir. T4SS tipik olarak 11 VirB proteini ve VirD4, VirB4 ve VirB11 NTPaz içerir. Farklı *H. pylori* izolatlarından elde edilen *cagPAI*’nin 31 bp direk tekrarların yanında yer alan 32 gen taşıyan 40kb’lık bir DNA insersiyon elementi olduğu ve kromozomal glutamat rasemaz genine entegre olduğu bulunmuştur. *cagPAI* aynı zamanda, CagA ve peptidoglikanın konak hücre içirisine enjekte edildiği fonksiyonel T4SS’ini kodlar (136). CagD pilus bir araya gelmesinde gerekli olmadığı halde konak epitel hücresine CagA’nın translokasyonu için gerekli olan T4SS esas bir komponentidir (66). VirD homologunu içeren 27 genin 17’si CagA’nın konak hücre translokasyonunda mutlaka gereksinilmektedir (59).

H. pylori T4SS, external pilusa ait komponentlerden oluşmaktadır. şınga benzeri kompleksin VirB fonksiyonel/yapısal homologlarından en az beş tane bu yolda lokalizedir: CagC (VirB2), CagL (VirB5), CagT (VirB7), CagX (*cagORF528*) (VirB9) ve CagY (*cagORF527*) (VirB10), *cagORF525* (VirB11) (51). CagV, CagX, CagY, CagT, Cag α , Cag β , ve CagE (VirB4) VirB/D homologları; Cag δ , CagM ve CagZ proteinleri geniş bir etkileşim ağıının bir parçası olarak identifiye edilmiştir (137). CagZ, Cag β ’yı stabilize etmektedir. Cag β

ve CagA arasında ve CagZ ile Cag β arasında ilişki olduğu bildirilmiştir, böylece T4SS içerisine girmektedir (109). Filamentöz kılıflı bir organel olan T4SS pilusu bakterinin tek bir kutbunda bulunmakta ve hücre ile kontakt kurulduğunda indüklenmektedir. Pilus lokal olarak yada tamamen VirB10 (CagY) ve CagL ile kaplıdır. VirB10 immun kaçışa olanak tanıyan konak antikor tanınmasını azaltan farklı boyutlarda iki transmembran domaini içerir. Pilus, VirB7 (CagT) ve VirB9 (CagW) proteinleri ile ilişkilidir. T4SS’de spesifik yardımcı faktörlerin çoğunun rolü bilinmemesine rağmen, CagF ve CagL’nin fonksiyonları bulunmuştur. CagF, CagA translokasyonu için gerekli olup, CagA efektör proteininin C terminal salgı sinyaline yakın bağlanan şaperon benzeri bir proteindir (136). CagL T4SS ile hedef hücreleri bağlayan özelleşmiş bir adezin olarak rol oynayan pilusu kaplayan bir proteindir. CagL proteini Arg-Gly-Asp (RGD) motifleri aracılığı ile integrin reseptörleri ($\alpha_5\beta_1$) ile etkileşir. CagA konak hücre membranına geçer (64, 136, 138). T4SS atrofik gastrit ve metaplazi gibi histopatolojik değişiklikler ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun artması ile ilişkili olup erken ve ciddi korpus enflamasyonunun indüksiyonu için gereklidir (66).

VirB4 (CagE), VirB7 (CagT), VirB9 (*cag*ORF528), VirB10 (*cag*ORF527), VirB11 (*cag*ORF525) ve VirD4 (*cag*ORF524) *cag* genlerinin altısının, *Bordetella pertussis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii* ve *Brucella suis*’in operonlarında aynı doğrultuda yerleşmiş genleri ile homolog olduğu gösterilmiştir (56, 139). T4SS için kodlanan bu operonlar, multimoleküler bileşenleri bakteriyal membrandan geçerek hücreler arası boşluğa ya da diğer hücrelere transfer etmek üzere özelleşmiştir. Bu homolog genlerin bazılarının lokalizasyonu ve fonksiyonu bilinmektedir. VirB4, VirB9 ve VirD4 fonksiyonel adenozin trifosfataz (ATPaz) aktivitesine sahip iken, VirB2 konjugatif pilinin yapısal alt ünitesidir. VirB4, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11 ve VirD4 bir kompleks oluşturmak üzere birleşmektedirler ve tip 4 transport biyogenezi için gerekli minimum kor yapıyı oluşturmaktadır (Şekil 6). VirD4 nükleoproteinlerin transferi olduğu zaman gereklidir ve ayrıca birçok T4SS’de VirD4 homoloğu bulunması memeli hücrelerine konjugatif DNA transferi olasılığını göstermektedir (56).



Şekil 6. Tip IV sekresyon sistemi şematik yapısı ve farklı bakterilerde kodlanan operonlar (56)

2.5.4. Hücre İçi Sinyal Yolaklarının Başlangıcı

H. pylori'nin epitel hücreler ile etkileşiminde, bazı bakteriyal efektör moleküller (CagA, VacA, OipA, DupA ve NAP) gastrik epitel hücrelerin sitoplazmasının içine penetre olup enjekte edildiğinde epitel hücrelerin fonksiyon değişikliğini başlatmaktadır (35).

2.5.4.1. Peptidoglikan ve İndüklediği Sinyal Yolakları

H. pylori'nin helikal şeklini hangi mekanizma ile oluşturduğu bilinmemektedir. Son çalışmalarda peptidoglikan endopeptidaz (*csd* 1-3) ve *ccmA* genleri identifiye edilmiştir.

Çoklu proteinlerin koordineli hareketleri midede güçlü bakteriyal kolonizasyon için gereken helikal hücre kurvatur ve kıvrım oluşmasına olanak tanıyan peptidoglikan çapraz bağlarını gevşetmektedir. İntegrin bağımlı yolak ile CagA'nın konak hücre içine girmesinin yanı sıra, T4SS aynı zamanda doğal bağışık yanıtı neden olan peptidoglikanı hücre içerisine enjekte etmektedir. $\alpha_5\beta_1$ integrin kolestrolde zengin mikrodomanler (lipid raftlar) içinde bulunduğu gibi, enjekte edilen peptidoglikanın NOD1 tanınması ile düzenlenen proenflamatuvar yanıtları indükleyebildiği düşünülmektedir. Kolestrol ve $\alpha_5\beta_1$ integrin boşalması peptidoglikan enjeksiyonu ve NF- κ B ve IL-8 yanıtlarını engelleyici etkiye sahiptir. İnsan beta-defensinlerin NOD1 bağımlı regülasyonu tanımlanmıştır. NOD1 ve beta-defensin-2 epitel hücreler tarafından *H. pylori*'nin direk öldürülmesinde gerekli olduğu gösterilmiştir, böylece konak savunmasında NOD1'in önemi konfirme edilmiştir. İnsan epitel hücre hatlarında beklenmedik NOD1-bağımlı kaskad aktive olmakta ve RICK→TRAF3→TB-K1→IKK→IRF7 yolağı ile tip I interferon sentezine neden olmakta ancak nüklear faktör kappa B (NF- κ B) aktivasyonunu sağlamamaktadır (109).

2.5.4.2. Lipopolisakkarit (LPS) ve İndüklediği Sinyal Yolakları

H. pylori'de tipik olarak LPS biyosentezinde görevli glikoziltransferaz WecA ve O-antijen ligaz WaaL olarak adlandırılan iki yeni enzim bulunmuştur, fakat normal olarak O-antijen sentezinde görevli flippaz enzimi saptanmamıştır. Bunun yerine, *H. pylori* evrimsel olarak protein N-glikolizasyon ile ilişkili LPS biyosentetik yolağında Wzk olarak adlandırılan bir translokaz kullanmaktadır. Ayrıca, 3-deoksi-D-manno-oktulosonik asit (Kdo) hidrolaz genleri (HP0579 ve HP0580) O-antijen Lewis epitoplarının ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Sonuç olarak, bir ADP-L-gliserol-D-mannoheptoz-6-epimeraz ortolog (HP0859) karakterize edilmiştir. Δ HP0859 mutantları ciddi LPS kırıkları, büyüme oranında azalma, novobiosine duyarlılıkta artış ve AGS elongasyon fenotipini oluşturmada başarısızlık göstermektedir. Genetik komplementasyon LPS biyosentezi ve virulansı için gerekli olan HP0859 gösteren bu fenotipleri yenilemektedir (109).

Toll benzeri reseptörleri (TLR) doğal bağışıklığın başlamasına neden olan çeşitli mikrobiyal ürünleri tanımaktadır. *H. pylori* LPS'si klasik olarak TLR-4 ile değil TLR-2 ile tanınmaktadır. TLR-2 ligandı olarak LPS fonksiyonları MyD88, IRAK1, IRAK4, TNFR-ilişkili faktör 6, I κ B kinaz- β ve I κ B α yolaklarını aktive eder. Gastrik epitel hücrelerin enfeksiyonu sinyal faktör tribbles-3 (TRIB3) ekspresyonunun azalması ile ilişkilidir ve

TRIB3 ve C/EBP homolog proteininin yıkımı LPS tarafından kemokin indüksiyonu TLR-2 aracılı NF- κ B aktivasyonunu arttırmaktadır. Böylece, TRIB3 modulasyonu TLR-2'nin *H. pylori* ilişkili patogeneze akım yönü esnasında önemli bir mekanizma olabilmektedir. İlaveten, iki kolon karsinoma hücre hattı kullanılarak LPS'nin genotoksik etkilerin riskini arttıran ve DNA tamir mekanizmasını engelleme yeteneği gösteren indüklenabilir nitrik oksit (NO) ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir (109). Epitel hücre hattında *H. pylori*'ye karşı yanıtta iNOS ekspresyonu aracılığı ile NO üretimi indüklenmektedir ve NF- κ B aktivasyonu aracılığı ile epitel hücre apoptozu ile korelasyonu olduğu gösterilmiştir (105). Sonuç olarak, *H. pylori* LPS'si kültüre gastrik hücrelerin parahücrese geçirgenliğini arttırmaktadır. *In vivo*'da benzer bir etkinin epitelyal bariyer fonksiyonlarda ve patolojide önemli bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (109).

2.5.4.3. Sítotoksin ilişkili gen A (CagA) Proteini ve İndüklediği Sinyal Yolakları

cagPAI horizontal gen transferi ile kazanılmış, kromozomda glutamat rasemaz geni içerisine eklenmiş yaklaşık 40 kb bir gen kümesidir (18, 19, 21, 50, 110, 116, 138-141). G+C içeriği (%35) genomun tümünün G+C içeriğinden (%39) farklı olduğu için başka organizmalardan horizontal transfer ile kazanıldığı düşünölmektedir. Evrimde bazı noktalarda, iki transpozazı kodlayan IS605 mobil sekansı *H. pylori* genomuna girmiş, bazı suşlarda yarıda kesilmiş, çoğalmış ya da silinmiş PAI kısmını oluşturmaktadır (139). *cagPAI*, gastrik epitel hücre içerisine ya da ekstrasellöler boşluğa bakteriyel membrandan CagA transferi için özelleşmiş T4SS multi moleküler komponentlerini kodlayan genleri ve *cagA-cagZ* ve *cagA-cagZ*'yi içeren yaklaşık 31 kadar gene sahip olduğu bildirilmiştir (18, 142, 143). CagA bakteriden türevlenmiş bir onkoproteindir (52). *cagPAI* içinde lokalize olan *cagA* geni 120-145 kDa'luk bir proteini kodlar (18, 55, 112, 117, 143-145). *H. pylori*'de *cagA* varlığı; *cagA* pozitif ve *cagA* negatif olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Ancak *cagA*-pozitif suşların gastrik mukozaya zarar verme yeteneği daha fazla olduğu ve *cagA* pozitif suş ile enfeksiyonda gastrik karsinoma gelişme riskinin arttığı bildirilmektedir (21). Avrupa ve Afrika'dan izole edilen suşların yaklaşık %20-40'ı *cagA* negatif iken, doğu Asya'dan izole edilen *H. pylori* suşlarının hemen hepsi *cagA*-pozitif olduğu bildirilmiştir (18, 52, 142) Batı ölkelerinde, *cagA* pozitif *H. pylori* suşları ile enfekte olan bireylerin peptik ülser veya gastrik kanser açısından büyük riske sahip olduğu bildirilmiştir. *cagA*, *cagA* geninin 3' bölgesinde lokalize olan Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifi içeren farklı sayıda tekrar sekansları içermektedir. EPIYA

motiflerini oluşturan bu sekanslardan dört farklı EPIYA segmenti bulunur; EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C ve EPIYA-D. Batı ülkeleri kökenli *H. pylori* suşlarının CagA proteinlerinin her biri 32 aminoasit içeren EPIYA-A segmenti ve 40 aminoasit içeren EPIYA-B segmentini 34 aminoasit içeren EPIYA-C segmenti izler (EPIYA A-B-C tip CagA). Doğu Asya *H. pylori* suşlarının CagA proteinleri de EPIYA-A ve EPIYA-B segmentlerini içerir fakat EPIYA-C segmentini içermezler. Bunun yerine, EPIYA-D segmenti denilen farklı EPIYA sekansı içerirler ve Doğu Asya CagA'sı tek bu segmenti (EPIYA A-B-D tip CagA) içerir (Şekil 7) (18, 19, 21, 52, 141-143, 145). EPIYA-A ve EPIYA-B bölgesi primer olarak CagA ile membranın ilişkisinden sorumludur (21). EPIYA motiflerinin sayısı ile farklı gastrodüenal hastalıklar arasında korelasyon olmadığı gösterilmiştir (144).

Şekil 7. CagA proteininin EPIYA tekrar bölgesindeki sekans çeşitliliği (142)

Peru Amazon popülasyonunda ilave bir CagA tipi, Kızılderili cagA bildirilmektedir. Kızılderili CagA AM-I ve AM-II olmak üzere iki tipe ayrılmaktadır. Kızılderili CagA, değişmiş EPIYA-B motifi içermektedir; AM-I'de ESIYT ve AM-2'de GSIYD. AM-II CagA N ucu toplamda 180 aminoasitlik iki geniş internal segmentten yoksundur. İlginçtir ki, AM-II CagA Western tip CagA ya da Doğu Asya tip CagA ile karşılaştırıldığında, enfeksiyon esnasında gastrik epitel proliferasyonu ve inflamasyonu stimüle edebilme yeteneğinin azaldığı bildirilmiştir. CagPAI'nin sağ ucu delesyon, insersiyon ve ilave motiflere göre beş alt tipe ayrılmaktadır. Tip 1 en sık etnik Avrupa gruplarından ve Afrika'dan izole edilmekte, Tip II Doğu Asya'da predominant, Tip III Güney Asya'da predominant, Tip IV çok nadir gözlenmekte (spesifik coğrafik bir bölge tanımlanmamıştır), Tip V Calcuttai Hindistan'dan izole edilen az bir suşta ve ayrıca Tayland'dan izole edilen suşlarda bulunmaktadır (52).

T4SS'ne doğru bakteriyal yüzeyde salınan CagA, CagA'nın merkesinde bulunan Lys-Xn-Arg-X-Arg (K-Xn-R-X-R) motifi aracılığı ile membran eksternalize fosfotidil serine bağlanmaktadır. K-Xn-R-X-R motifinde iki arginin rezidüsü çeşitli *H. pylori* suşlarından türetilen CagA proteinleri arasında yüksek oranda korunmuş bir bölgedir. Böylece, cagA konak plazma membran fosfotidilserini kendi reseptörü olarak kullanmaktadır (142). T4SS'in komponenti olan CagL'nin $\alpha 5/\beta 1$ integrini ile etkileşimi CagA translokasyonu için gereklidir. Bundan başka, T4SS komponenti CagY'nin ve konak hücre $\beta 1$ integrinine efektör protein CagA'nın spesifik bağlanması CagA translokasyonu için önemlidir. Bu bulgular, *H. pylori*'nin konak hücre içerisine CagA'yı geçirmek için fosfotidilserin ve integrinler gibi konak hücre moleküllerinin kullandığını göstermektedir (117, 142).

CagA hücre dışı pH'nın düşmesi sonucu dış sitoplazmik membrandan geçer. Translokasyon, proton bağımlı üre kanalı UreI'ya bağlıdır ve *H. pylori*'nin T4SS ile CagA'nın etkileşimini hızlandırmak için proton bağımlı intrasellüler transport sistemine sahip olduğunu gösterir (146). Konak hücre içerisinde, CagA fosfotidil serin ile etkileşimi aracılığı ile yeniden plazma membranının iç kısmına lokalize olmaktadır ve sonra c-Src, Fyn, Lyn ve Yes gibi Src ailesi kinazlar (SFKs) ve Abl kinaz tarafından karboksi terminal EPIYA motiflerinde tirozin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Tirozin fosforillenen CagA Src homoloji 2 fosfataz (SHP-2)'yi aktive etmektedir (18, 25, 142, 143, 147). SHP-2, CagA'nın en çok bilinen hücre hedefidir (52, 111, 146). SHP-2, özellikle tirozin fosforilleniş EPIYA-C ve EPIYA-D bölgesi ile etkileşimdedir (21, 140, 143). CagA'nın aktive ettiği SHP-2, hücre proliferasyonunun deregüle eden Ras-Erk MAP kinazı stimüle ederek hücre

CagA çoklu EPIYA segmentine sahip olduğundan, Batı CagA'da tirozin fosforillenmiş EPIYA-C segmenti, Doğu Asya tip CagA'da tirozin fosforillenmiş EPIYA-D segmenti spesifik olarak CagA-SHP2 etkileşiminde yer almaktadır. Fazla sayıdaki EPIYA-C ya da EPIYA-D segmentleri SHP2'ye bağlanmak için güçlü aktivite göstermektedir. Ayrıca, EPIYA-D segmenti içeren Doğu Asya CagA EPIYA-C segmenti içeren batısal CagA'ya göre daha yüksek SHP2'ye bağlanma yeteneği göstermektedir (142, 147). SHP2 bir katalitik protein tirozin fosfataz (PTP) domaini ve bir C terminal ucunu içeren 2 SH2 domainine (N-SH2 ve C-SH2) sahiptir (142, 143, 147, 149). SHP2'nin iki SH2 domaini pY-(S/T/A/V/I)-X-(V/I/L)-X-(W/F) konsensus sekansına yüksek afinite ile bağlanmaktadır (142, 144, 149). İlginçtir ki, bu konsensus sekans Doğu Asya CagA'nın SHP2 bağlanma bölgesi pY-A-T-I-D-F ile mükemmel uyumludur fakat Batı CagA'nın SHP2 bağlanma bölgesi pY-A-T-I-D-D'nden farklıdır. SHP2'ye güçlü bağlanabilme yeteneğinden dolayı, Doğu Asya CagA hummingbird fenotipi indüksiyonu için daha yüksek bir potansiyel gösterdiği ve hücre proliferasyonu kadar Erk MAP kinaz aktivitesinde daha etkili olduğu bildirilmiştir. CagA proteini multimer oluşturabilir ama sıklıkla konak hücrelerde dimer oluşturmaktadır. CagA multimerizasyonu tirozin fosforilasyonundan bağımsızdır, fakat hem Doğu Asya CagA hemde Batısal CagA arasında yüksek oranda korunmuş 16 aminoasitlik CagA multimerizasyon (CM) sekansına gereksinim duymaktadır (Şekil 7). CM sekansı EPIYA-C segmentinin içinde ilk 16 aminoasit rezidüsünde ayrıca EPIYA-C ya da EPIYA-D segmentinin 16 aminoasit downstream rezidüsünde bulunmaktadır. Spesifik olarak CM sekansı olmayan mutant CagA proteininin SHP2'ye bağlanabilme yeteneğinde belirgin bir azalma gösterilmiştir (142, 147).

SHP2'nin yanı sıra, tirozin fosforilasyonuna bağımlı olarak C-terminal Src kinaz (Csk)'ya spesifik olarak bağlanmaktadır. Tirozin fosforillenmiş EPIYA-C ya da EPIYA-D segmenti CagA-SHP-2 etkileşimini düzenlerken, EPIYA-A ya da EPIYA B segmenti CagA-Csk etkileşimini sağlamaktadır. SHP2'de olduğu gibi CagA kompleks oluşumuna doğru Csk'yı aktive etmektedir. Csk C-terminal inhibitör tirozin rezidüsünde SFK'ları fosforillediğinden ve SFK aktivitesini inhibe ettiğinden, csk SFKs'nın negatif bir regülatörü olarak karakterize edilmiştir. SFKs, hücre proliferasyonunun deregülasyonunda olduğu gibi CagA-SHP2 kompleks oluşumu için en gereksinim duyulan CagA fosforilasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca, CagA ile aktive olmuş Csk, CagA-SHP-2 etkileşiminin negatif bir regülatörü olarak fonksiyon göstermektedir. Aktive SHP2'nin ektopik ekspresyonu Ras'ın aktivasyonunda olduğu gibi apoptozu indüklemektedir. CagA bağımlı apoptoz ile gastrik

epitel hücrelerin kaybı midede uzun süreli kolonizasyonda *H. pylori* için dezavantaj oluşturmaktadır. Csk tarafından CagA-SHP2 sinyalinin azaltılması, SHP2'nin tipik olmayan aktivasyonunun kontrolü aracılığıyla *cagA*-pozitif *H. pylori*'nin uzun süreli enfeksiyonuna olanak tanıyabilmektedir. Ayrıca, SFKs'nın CagA bağımlı inhibisyonu, kısmen hummingbird fenotipinin indüksiyonuna kısmen neden olan vinkulin, ezrin ve kortaktin gibi diğer konak hğcre proteinlerinin defosforilasyonuna neden olmaktadır (142).

CagA aynı zamanda tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak hücre büyümesi ve hareketi deregüle etmektedir. CagA, tümör hücrelerinin invaziv büyümesine neden olan hepatosit büyüme faktör reseptörü c-Met'e bağlanmaktadır. CagA ile aktive olmuş c-Met hücre büyümesini ve hareketi stimüle etmektedir (142). CagA ayrıca tirozin fosforilasyonunda bağımsız olarak "son of sevenless (SOS)", c-Met hepatosit büyüme faktörü reseptörü ve fosfolipaz C- γ (PLC γ) ile bir kompleks oluşturan büyüme faktör reseptör bağlayan protein 2 (Grb2)'ye de bağlanmaktadır (142, 143). CagA ile c-Met kompleksi epitel hücrelerde morfolojik değişikliğe neden olurken, PLC γ ile CagA'nın kompleks oluşturmalarının biyolojik fonksiyonu açıklığa kavuşmamıştır (142). CagA-Grb2 etkileşimi SOS'a doğru Erk MAP kinazı aktive etmekte ve böylece hücre büyümesinde olduğu gibi hücre saçılmasında (scattering) stimüle etmektedir (25, 117, 142).

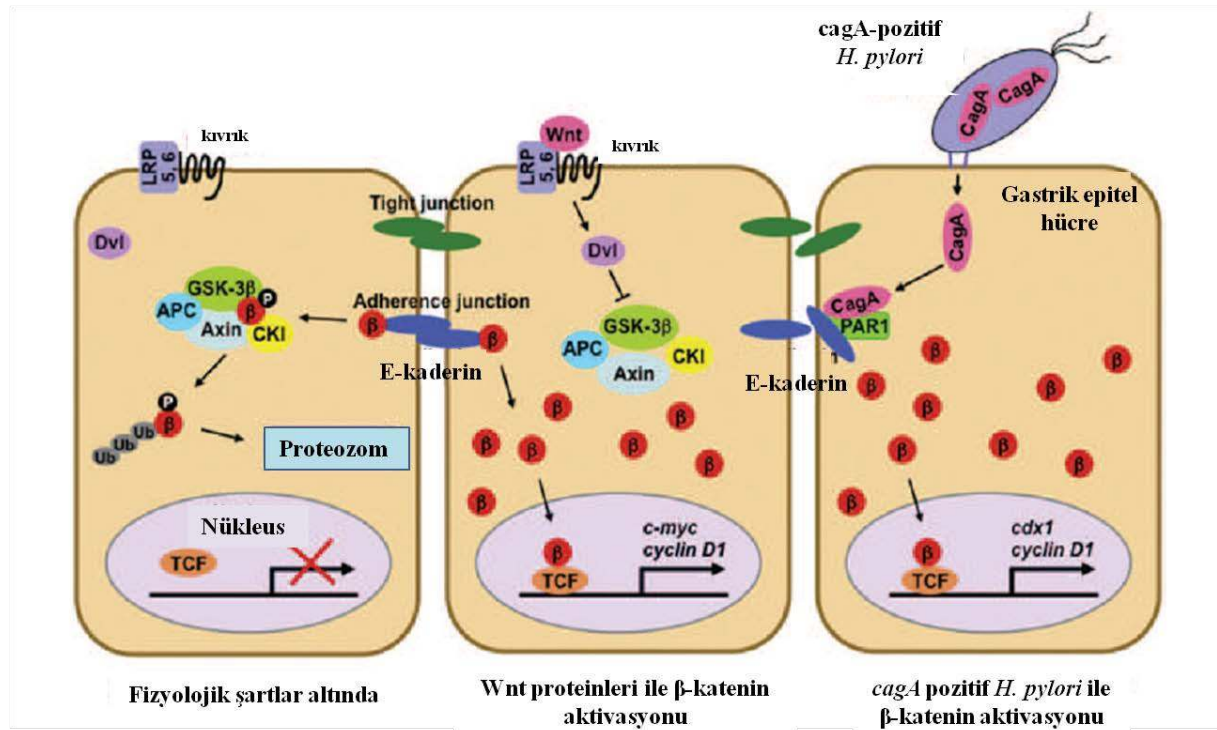
Gastrik mukoza, tight junction ve aderans junction gibi hücre-hücre adezyon mekanizmaları aracılığı ile her bir hücrenin sıkıca adhere olduğu polarize epitel tek tabakadan oluşmaktadır. Tight junctionların çoğu apikal hücreler arası bağlantılardır ve bazolateral hücre yüzey domaininden apikali bölmektedir. Sonuç olarak, epitel hücreler apikal-bazal epitelyal polarite kazanmaktadır. Epitelyal polaritenin korunmasına ilaveten, tight junctionlar epitel tek tabakanın parasellüler bariyerini oluşturmakta ve böylece, gastrik mukoza gibi epitel dokuların homeostazını regüle etmektedir (142). CagA, polarize epitel hücrelerde ZO-1 ve JAM gibi tight junction komponentleri ile birlikte lokalize olmaktadır (21, 117, 142, 143). Ayrıca, polarize epitel hücrelerde CagA'nın ekspresyonu, CagA tirozin fosforilasyonundan bağımsız olan polarize tek tabakadan CagA eksprese eden hücrelerin dışarıya çıkmasına neden olmaktadır (142).

CagA, tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak partitioning-defektif 1 (PAR1)/mikrotübül afinite regüle eden kinaz (MARK) ile birbirlerini etkilemektedir ve epitel polaritenin kaybı ve tight junctionların parçalanması ile sonuçlanan kinaz aktivitesini inhibe etmektedir (142, 150). Memeli hücrelerde, dört PAR1 izoformu (PAR1a/MARK3,

PAR1b/MARK2, PAR1c/MARK1 ve PAR1d/MARK4) hücre polaritesi, hücre içi transport, hücre döngüsü, hücre göçü, nöral farklılaşma ve nörodejenerasyonda önemli rollere sahiptir. Bu fonksiyonların çoğu, sitoskelet mikrotübülleri ve aktin ağının polaritesi ve dinamikleri ile ilişkilidir. PAR1b ve atipik protein kinaz C (aPKC) epitel polaritesini regüle ettiği düşünülmektedir. Epitel hücrelerde, aPKC-PAR3-PAR6 kompleksi apikal membrana lokalize, PAR1b ise bazolateral membrana lokalize olmaktadır. Tight junctionlarda, PAR1b aPKC tarafından fosforillenmekte ve membrandan sitoplazmaya salınmaktadır. CagA, CagA dimerizasyonunu düzenleyen CM sekansı aracılığı ile PAR1 ile birbirlerini etkilediği bulunmuştur. PAR1 bir dimer olarak bulunduğu için, iki CagA proteini PAR1 dimeri ile etkileşim aracılığı ile pasif olarak homodimerize olduğu görülmektedir. Böylece, CagA-PAR1 etkileşimi hem epitel polariteyi bozmakta hem de CagA-SHP2 etkileşiminde zorunlu bir rol oynamaktadır. Memeli PAR1 kinazları, mikrotübüllerin stabilitesini regüle etmek suretiyle Tau, MAP2 ve MAP4 gibi mikrotübül ilişkili proteinleri (MAPs) fosforile eden MARKs olarak tanımlanmaktadır. Mikrotübüller mitoz esnasında ayrılan ve kromozomal düzende gerekli bir rol oynayan hücre döngüsünde M fazında mitotik iğ oluşturmaktadır. CagA, iğ oluşumunu bozan PAR1 kinaz aktivitesini inhibe etmekte ve böylece mitoz esnasında profazdan metafaza geçişi geciktirmektedir. CagA aynı zamanda anafaz esnasında hücre eksen bölünmesine zarar vermektedir. Sonuç olarak, CagA'nın kronik maruz kalması hücrelerde kromozomal aneuploidi ve poliploidine neden olmaktadır (142). Fosforillenmemiş CagA tight and adherens junctionların yıkımı hücre polaritesinin kaybı, proinflatuvar ve mitojenik yanıtlar gibi konak hücre yanıtlarını ortaya çıkarabilmektedir. CagA bağlanır ve epitel hücrelerde epitel hücre polaritesini ve bağlantılarını parçalayarak PAR1b/MARK2 kinaz aktivitesini inhibe eder. CagA-PAR1b etkileşimi CagA multimerizasyon motifleri ile düzenlenir. Doğu Asya suşlarının CagA multimerizasyon motifleri Western CagA'dakine göre PAR1b'ye daha güçlü bağlanmaktadır. CagA'nın bir diğer fosforilasyon bağımsız hücresel etkisi STAT3 sinyal yolağının aktivasyonudur. Hep-2 hücre hattında *H. pylori* cagA bağımlı bir biçimde tirozin fosforilasyonunu, nükleer translokasyonu ve STAT3 transkripsiyonel aktivitesini başlatmaktadır. IL-6 ile otokrin aktivasyonu aracılığıyla STAT3'ün düzenlendiği diğer bakteriyel patojenlerden farklı olarak, *H. pylori* aracılı STAT3 aktivasyonu IL-6R düzeyinde meydana gelir fakat bilinen aktivasyonu ligandları IL-6, IL-11 ve LIF'ten bağımsızdır. Uzamış enfeksiyonda *H. pylori* reseptör endositoz ve degradasyonun inhibisyonu ile Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) yüzey ekspresyonunu

arttırmaktadır. Bu olay CagA bağımlı fakat c-Abl'nin cagA fosforilasyon bağımsız aktivasyonu ile olmaktadır (66).

E-kaderinin sitoplazmik ucu ile etkileşimi ile adherens junctiona lokalize olan β -katenin adherens junctionların temel bir komponenti olarak önemli bir rol oynamaktadır. β -katenin aynı zamanda Wnt/ β -katenin yolağında sinyal uyum sağlayan molekül olarak fonksiyon göstermektedir. Fizyolojik şartlar altında, Wnt proteini yoksa, sitoplazmik β -katenin, Aksin-adenomatöz polipozis coli (APC)-kazein kinaz I (CKI)-glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) kompleksi tarafından fosforillenmekte ve sonra ubiquitinasyona bağımlı proteozomal degradasyon mekanizması tarafından degrade olmaktadır. Ayrıca, Wnt proteinleri tarafından aktivasyonun üzerine, disheveled (Dvl), GSK-3 β aracılığı ile β -kateninin fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Sonuç olarak, β -katenin stabilize olmakta ve TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olduğu sitoplazma ve nükleusta çoğalmaktadır ve sonra *c-myc* ve *siklin D1* gibi β -katenin bağımlı genleri transaktif etmektedir (Şekil 9) (142).



Şekil 9. CagA ile β -katenin sinyalinin aktivasyonu (142).

H. pylori cagA pozitif suşları ile enfeksiyon Wnt yokluğunda β -katenin sinyali aktive etmektedir. Gerçekten, CagA fiziksel olarak E-kaderin- β -katenin kompleksinin

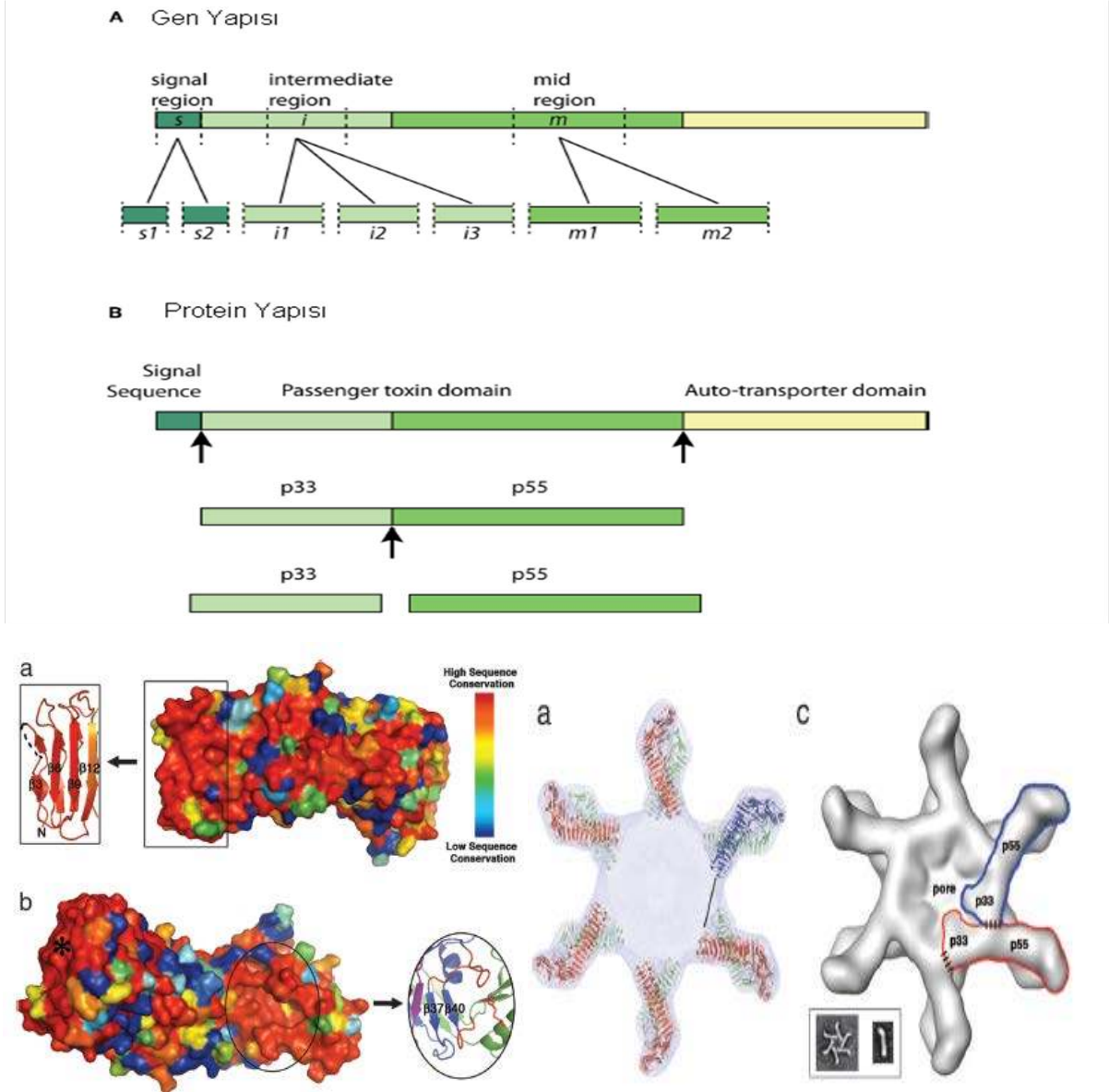
destabilizasyonuna neden olan tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak E-kaderin ile etkileşime girmekte ve böylece *siklin D1*'i içeren β -katenin hedef genlerinin transaktivasyonu ile sonuçlanan β -kateninin nükleer translokasyonuna neden olmaktadır. Aynı zamanda, CagA ile deregüle olan β -katenin tipik olmayan şekilde bağırsak spesifik transkripsiyon faktör CDX1'i kodlayan *cdx1*'i transaktive etmektedir ve sonra gastrik epitel hücrelerde intestinal farklılaşma marker MUC2'yi indüklemektedir. Bu bulgular CagA'nın *cagA* pozitif *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkili olan intestinal metaplazi, midede prekanseröz lezyon gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (142). CagA hem SHP-2 bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar ile ERK MAPK aktivasyonunu sağlar. CagA tarafından ERK'in regülasyonunun bozulması, G1-S progresini sağlayan siklin D1'i indükler, gastrik stromayı parçalayan matriks metalloproteaz 1'in (MMP-1) salınımına yol açar (151-153). Chang ve arkadaşları *H. pylori*'nin uyardığı hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli olan siklin D1 ekspresyonunun *cagA* mutantlarında azaldığını ve API ve CAMP yanıt elemanlarının (CRE) siklin D1 ekspresyonunu uyardığını bildirmişlerdir (154). CagA ile β -katenin sinyal aktivasyonu CagA CM sekansına gerek duymaktadır. PAR1 CagA ve E-kaderin ile bir kompleks oluşturmaktadır. CagA-PAR1 etkileşimi CagA ile E-kaderin- β -katenin kompleksinin destabilizasyonuna neden olma olasılığı vardır (142).

NF- κ B ve mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) doğal bağışık yanıt ve inflamasyon da önemli düzenleyicilerdir. Hücre içerisine giren CagA hem tirozin fosforilasyonuna bağlı hem de bağımsız olarak birçok konak hücre molekülü ile etkileşime girer; *H. pylori*'nin NF- κ B'yi aktive ettiği ve bundan dolayı T4SS ile CagA'nın değil, peptidoglikanın translokasyonu ile IL-8 ve diğer proinflamatuvar sitokinleri uyardığı bildirilmiştir (84, 155, 156). Brandt ve arkadaşları CagA'nın tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak Ras-MAPK yolağı ile NF- κ B'yi aktive ettiğini, Hirata ve arkadaşları ise gastrik epitel hücrelerde I κ B kinazı (IKK) uyarması ile NF- κ B'nin aktive edildiğini ve *H. pylori*'nin birçok farklı mekanizma ile NF- κ B transkripsiyonunu aktive ettiğini göstermişlerdir (155, 156). *H. pylori* enfeksiyonunda CagA'nın aktive ettiği MAPK yolağı ile eksprese edilen galektin-3 seviyesinin arttığı bildirilmiştir (146). *cagPAI* dışında; HSP60 ve DNA bağımlı RNA polimerazın β -alt ünitesini kodlayan *rpoB* gen polimorfizminin epitel hücrelerinden IL-8 indüksiyonunda rol oynayan faktörler olduğu gösterilmiştir (70). Cho ve arkadaşları *H. pylori*'nin NF- κ B ve MAPK aktivasyonu arasındaki ilişkide *H. pylori* enfekteli AGS hücrelerinde ERK'nin I κ B' fosforilasyonunu uyardığını bildirmişlerdir (157).

Aktivasyon-indükleyici sitidin deaminaz (AID), DNA ve RNA enzimi gibi fonksiyon gösteren sitidin deaminaz ailesinin bir üyesidir. *cagPAI* pozitif *H. pylori* ile enfeksiyon ektopik olarak IKK bağımlı NF- κ B aktivasyonu aracılığı ile insan gastrik epitel hücrelerde tipik olmayan AID ekspresyonunu indüklemekte ve böylece *p53* tümör supresör gende mutasyonlara neden olmaktadır. Tipik olmayan AID ekspresyonu ile indüklenen mutasyonların birikimi aynı zamanda *H. pylori* ilişkili gastrik karsinogeneze neden olma olasılığı vardır (142). Gastrik atrofi ve gastrik kanser ile PTPN11 geni tarafından kodlanan SHP-2'deki intron-3 (SNP; JSTO57927; G'den T'ye) tek nükleotit polimorfizm (SNP) ilişkisinde PTPN11 genotipinin A alleli ile gastrik atrofinin düşük düzeyde ilişkisi olduğunu ve PTPN11 genindeki G/A SNP'in gastrik atrofi ve gastrik kanser oluşumunda risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (140, 158, 159). Birçok maliniteli hastada görülen SHP-2'yi kodlayan PTPN11 genindeki mutasyonlar, gastrik kanser oluşumunda CagA tarafından SHP-2'nin aktivasyon deregulasyonunda önemlidir (147).

2.5.4.4. Vakuol oluşturan sitotoksin A (VacA) Proteini ve İndüklediği Sinyal Yolakları

VacA proteini 140-kDa'luk protoksine benzeyen ve salgılandığında 88-kDa olgun forma dönüşen, çiçek şeklinde bir yapıya ve altı ya da yedi kat radyal simetriye sahip 12 nm uzunluğunda ve 30 nm çapında oligomerik bir toksindir (47, 56, 122, 160, 161). VacA toksini AB grubu toksinlerdendir, A-alt ünitesi enzimatik aktiviteden sorumlu iken, B alt ünitesi ise hedef hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlanma ve tanımadan sorumludur (47, 162). Salgılanan VacA toksini (88 kDa) anyon seçici membran kanallarının oluşumu için düzlemsel bilayer yağ tabakalarının iç kısmına yerleşebilmektedir. Bu kanalların oluşumunun sitotoksik aktivite için gerekli olduğu bildirilmiştir (70). 140 kDa'luk protoksin sinyal sekansı, passenger domain ve sonuncu olarak tip V sekresyon sistemi olarak fonksiyon gösteren bir kısım bulunur (160, 163). Olgun 88 kDa VacA passenger domaini, VacA'nın iki domaini ya da alt ünitesi olduğu düşünülen 33 kDa (p33) amino terminal fragmenti ve 55 kDa (p55) karboksi terminal fragmentinden oluşmaktadır ve olgun virulan 88 kDa'luk VacA toksinini oluşturan ekstrasellüler çevreye geçişi esnasında aynı noktada oto-transporter domaininden ayrılır ve işlenir (Şekil 10) (160, 161, 164).



Şekil 10. VacA'nın genotipik çeşitliliği ve yapısı (160, 161).

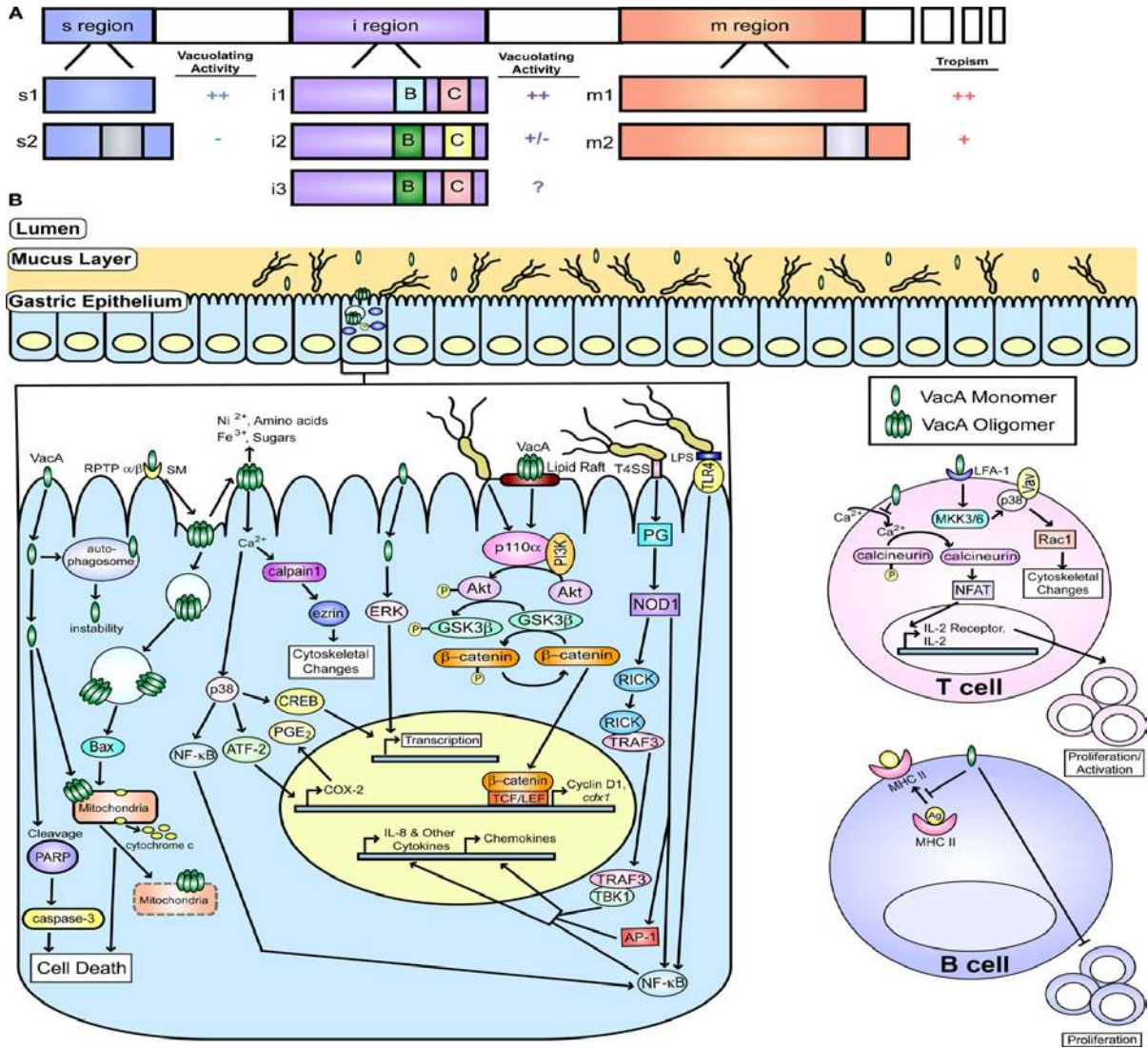
Yaklaşık 33 kDa moleküler ağırlığındaki N-terminal ucu "p33" (aynı zamanda p34 ve p35 olarak bilinmekte) olarak isimlendirilmektedir. Yaklaşık 55 kDa moleküler ağırlığındaki C-terminal ucu "p55" (aynı zamanda p58 olarak bilinmekte) olarak isimlendirilmektedir. VacA'nın por oluşturma aktivitesi p33'e, hücre bağlanmasında başlangıçta p55 domainine bağlıdır. p33 aynı zamanda hücre bağlanmasında da etkilidir ve son zamanlarda p55'in vakuolizasyon ve membran depolarizasyonu için önemli olduğu gösterilmiştir (160). p33 domaini membran kanal oluşumunda önemli bir role sahiptir. Hem p33 domaininin hem de p55 domaininin bileşenleri VacA oligomerizasyonu için gereklidir ve p55 domaininin bileşenleri VacA'nın konak hücreye bağlanması için gereklidir. p55

domaininde iki aminoasit delesyonu (aspartik asit 346 ve glisin 347) VacA oligomerizasyonunda eksikliğe neden olmaktadır. VacA p55 domaini ototranspor passenger domainlerin karakteristiği olan sağa dönüşlü paralel bir β -heliks yapısına sahiptir (163, 164). Torres ve arkadaşları VacA'nın iki domaini p33 ve p55'in birbirleri ile moleküller arası etkileşimi ile bağlanmada, hücreye alınmada ve VacA'nın vakuol oluşturma aktivitesinde rolleri bildirilmiştir (165). Ayrıca, VacA p33'ün hücre ölümü ile ilişkili olduğu, p55'in ise hedef hücreye toksin bağlanması ile ilişkilidir (162). VacA'nın iki domaini olan p33 ve p55'in epitel hücrelerin yüzeyine tek tek eklendiğinde, vakuolun sitotoksik aktivite göstermediği; buna karşın, domainler beraber eklendiğinde hücre yüzeyine bağlanan p33/p55 protein kompleksinin hücre vakuolasyonunu indükledikleri gösterilmiştir. VacA'nın p33 domaini anyon seçici membran kanal oluşumu için gerekli hidrofobik bir amino terminal bölge içerir. Bu bölge çoğunlukla transmembran oligomerizasyonuna arabuluculuk eden üç GXXXG sekans motiflerini içerir (70). p55'in N terminali VacA'nın indüklediği vakuolizasyon ve konak hücre membranı depolarizasyonu için gereklidir. Bu domain anyonik membran kanallarının oluşumunda rolü olan VacA oligomerik yapıların oluşumu için önemlidir. p55'in N terminali VacA'nın indüklediği vakuolizasyon ve konak hücre membranı depolarizasyonu için gereklidir. Bu domain anyonik membran kanallarının oluşumunda rolü olan VacA oligomerik yapıların oluşumu için önemlidir. p33 VacA domainini kodlayan *vacA* intermediate (i) bölgesi sekans varyasyonunda rol oynamaktadır. il tip suşlar İran popülasyonunda gastrik karsinoma ile İtalyan popülasyonunda ise peptik ülser hastalığı ile ilişkilidir (66).

vacA geni iki değişken bölge içermektedir: *s1a*, *s1b*, *s1c* ya da *s2* allellerini içeren sinyal (s) peptit kodlayan bölge ve *m1a*, *m1b*, *m1c*, *m2a* ve *m2b* allellerini içeren orta (m) bölge (50, 52, 166, 167). VacA yapısındaki sinyal (s) bölge (s1 ve s2) ve orta (m) bölge (m1 ve m2) farklı *H. pylori* suşlarının vakuolizasyon aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır (Şekil 10) (52, 160). *vacA* s2 genotipi *vacA* s1'de bulunmayan ilave N terminal hidrofilik aminoasit segmenti içeren VacA proteini kodlar. Bu ekstra segmentin varlığı, s2 genotipinin vakuolizasyonu indüklemesini engeller (160, 166, 167). m bölgesi c-terminal bölgesinde yer alan 55 kDa'luk alt ünitesi kısmını kodlamaktadır. m1 genotipi m2'ye göre daha güçlü vakuolizasyon aktivitesi göstermektedir. s ve m bölgesindeki bu varyasyonlar dört olası *H. pylori* genotipi göstermektedir: s1m1, s1m2, s2m1 ve s2m2. s2m1 genotipine çok nadir rastlanmaktadır (167). *In vitro* denemeler s1m2 suşları gibi s1m1 suşlarının en sitotoksik

olduğu, s2m2 suşlarının çok az ya da hiçbir sitotoksik aktiviteye sahip olmadığı, s2m1 suşlarının ise nadir sitotoksikiteye sahip olduğu bildirilmiştir (25, 50, 52, 166, 167). s1m1 ve s1m2 VacA genotipine sahip *H. pylori* suşları, diğer genotiplerle karşılaştırıldığında daha ciddi kronik enflamasyona neden olmaktadır. s1m1 genotipi en yüksek artmış gastrik kanser riski ile ilişkilidir (160). vacA s2 ya da m2 suşları ile enfekte olanlar ile karşılaştırıldığında vacA s1 ya da m1 suşu ile enfekte bireylerde peptik ülser ve gastrik kanser riski artmaktadır (52, 168). vacA s1 tipi s1a, s1b ve s1c; vacA m1 tipi m1a, m1b ve m1c olarak üç tipe ayrılmaktadır (52, 167). vacA s1c ve m1b tipleri sıklıkla Doğu Asya’da, s1a ve m1c tipleri ise sıklıkla GüneyAsya’da görülmektedir (52). Türkiye’de vacA s1 genotipinin %97.9’unda s1a alt tipi dominanttır (167). vacA m1c genotipi merkez Asya’daki suşlarda predominanttır, m1a tipi Afrika’da ve etnik Avrupalı’larda ve s1b tipi özellikle İberyalı yarımadası ve Latin Amerika suşlarında yaygın olduğu bildirilmiştir. s1b tipi aynı zamanda Afrika’da predominanttır (52, 166). vacA’nın üçüncü hastalık ile ilişkili vakuolizasyon aktivitesinin polimorfik determinantı intermediate (i) bölgesi s ve m bölgesi arasında identifiye edilmiştir (52, 167). vacA i bölgesi p33 vacA alt ünitesini kodlamakta ve i1 (vakuolasyon aktivitesine sahip) ve i2 (vakuolizasyon aktivitesine sahip olmayan) olarak iki tipte sınıflandırılmaktadır (167). s1m1 yalnızca i1 ve s2m2 suşlarında yalnızca i2 olarak sınıflandırılmasına rağmen, s1m2 suşları ya i1 ya da i2 olarak sınıflandırılmaktadır (52). vacA i1 suşları ile enfekte gastrik mukozada vacA i2 suşları ile enfekte olanla karşılaştırıldığında enflamasyon, hücre infiltrasyonu ve enflamasyon aktivitesinde belirgin olarak artış olduğu gösterilmiştir (167). i1 suşlarının daha patojenik olduğu bildirilmiştir (52). i1 genotipi güçlü olarak CagA üretimi ile ilişkilidir (159). Dördüncü ve olası hastalıkla ilişkili bölge ise i ve m bölgeleri arasında yer alan delesyon (d) bölgesidir ve d1 (delesyon yok) ve d2 (69-81 bp delesyon) olmak üzere iki farklı tipi vardır (52).

VacA bakterinin yüzeyi ile ilişkilidir, düşük pH ayrımı olmadığında aktiftir ve toksin yalnızca bakteriden salındıktan sonra oligomerleri oluşturmaktadır (56). VacA, epitel hücre membranlarının depolarizasyonu, vakuolizasyon, membran kanal formasyonu, apoptoz, epitel hücre bağlanması inhibisyonu ve T hücre aktivasyonunun inhibisyonu gibi hücresel aktiviteleri indüklemektedir (50, 52, 84, 112). VacA *in vivo* olarak *H. pylori*’nin kolonizasyonu içinde önemlidir (160). VacA hücre membranında por oluşturarak konak hücreden üre ve anyonların salınımını uyarır (Şekil 11) (122, 163).



Şekil 11. VacA'nın hücre içerisine girişi ve indüklediği sinyaller (145)

Hedef hücreye VacA'nın bağlanması, VacA'nın toksisitesinde kritik bir noktadır. VacA epitel hücreler ve T hücreleri içeren çoklu hücre tiplerini etkilemektedir ve hücre bağlanmasında konak hücre reseptörleri ya da diğer yüzey faktörleri de etkilidir (160). VacA'nın sadece gastrik epitel hücrelerdeki etkisinin gösterilmesine rağmen, salgılanan VacA'nın granülosit, monosit gibi diğer ilgili hücre tiplerinde derin dokular içine penetre olduğu görülmektedir (122). VacA toksini ise sitotoksik aktivite için gerekli olan anyon seçici membran kanallarının oluşumu için çift katmanlı yağ tabakalarının iç kısmına yerleştiği bildirilmiştir (121). Böylece, VacA hücre membranında por oluşturarak konak hücreden üre ve anyonların salınımını uyarmaktadır (122). VacA anyon seçici kanalları oluşturmaktadır. Membran geçirgenliğinin indüklenmesi ve transsellüler yolak tarafından epitel hücrenin öteki

tarafına ürenin transepitelyal akışını arttırdığı gösterilmiştir. Özellikle, VacA transmembran porların oluşmasına neden olarak üreyi hücre membranından geçecek duruma getirmektedir. Böylece VacA üreaz aktivitesini arttırarak *H. pylori* patojenitesini arttırabildiği düşünülmektedir (105). *H. pylori* üreazı üreyi amonyağa dönüştürerek asidi nötralize ederek pepsinojenin pepsine aktivasyonunu engellemekte ve dispepsiye neden olmaktadır (163). VacA'nın lipid tabakasına etkin bir şekilde bağlanmasında kolesterol maddesi gerekmektedir. VacA kolesterol, sfingomiyelin ve dioleoilfosfatidilkolinden oluşan iki katmanlı yapı ile etkileşim halindedir ve genellikle VacA'nın sfingomiyelince zengin bölgeleri hedef aldığı bildirilmiştir (169). VacA gastrik epitel hücreye bağlandığında başka, T lenfositlere bağlandığında başka reseptörler kullanılmaktadır. Son zamanlarda lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1 (LFA-1), CD18'in $\beta 2$ integrin alt ünitesi T hücrelerinde spesifik VacA reseptörü olduğu bildirilmiştir. VacA'nın gastrik epitelyum hücreye bağlanmasında EGFR, heparin sülfat, glikosfingolipitler, reseptör protein fosfataz alfa (RPTP α), reseptör protein fosfataz beta (RPTP β) ve sfingomiyelin reseptörleri kullanılmaktadır (160). VacA'nın RPTP α ve RPTP β ile etkileşimin peptik ülser oluşumuna yardımcı olduğu düşünülmektedir (146). RPTP- α ve RPTP- β VacA'nın konak hücre reseptörü olarak identifiye edilen sfingomiyelinlerdir. Sfingomiyelin hücre memranı ile VacA ilişkisinde ve toksinin indüklediği vakuolizasyonda gereklidir. VacA'nın özelleşmiş membran fonksiyonel domainlerine bağlanmasının hücre sinyalizasyonunda biyolojik olarak anlamlı olabileceği düşünülmektedir (66). VacA'nın RPTP β 'ya bağlanması hücre vakuolizasyonuna neden olur (70). Ayrıca, VacA proteinin hem m1 hem m2 formlarının RPTP α ve RPTP β 'ya bağlanabildiği gösterilmiştir. RPTP molekülünün ekstrasellüler domainleri farklı hücrelerde diferansiyel post-translasyonel modifikasyonlar (glikolizasyon) geçirirler ve bu modifikasyonların VacA'nın bağlanma aktivitesini etkilediği bilinmektedir. Bu yüzden, VacA'nın m1 veya m2 formlarına karşı hücresel yanıtının bir kısmının en azından RPTPs post-translasyon modifikasyonları ile kontrol edilebileceği düşünülmektedir (146). VacA'nın konak hücrede sitoplazmik vakuolizasyon, mitakondriyal hasar, sitokrom c salınımı, apoptoz ve immun kaçış gibi etkileri vardır. VacA oligomerleri erken endozom ve geç endozom kompartmanlarının oluşması ile vakuolizasyona neden olmaktadır. *H. pylori* hücre yüzeyinde vacA ile bağlandığında proinflamatuvar sinyaller oluşturarak nükleusa kadar ulaşmakta ve inflamasyonu indüklemektedir. VacA, mitakondriye lokalize olarak depolarizasyonu etkiler, mitakondriyal dinamikleri bozar, mitakondriyal dış membranda bax geçirgenliğini

tetikleyerek apoptozu uyarmaktadır. Apoptoz esnasında sitokrom c salınımı olur ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. *vacA*, ayrıca p38 aracılığı ile ve glikojen sentaz kinaz aktivasyonu ile prostoglandin E2 regülasyonunda artış olmakta hücresel proliferasyonu düzenlemektedir. *vacA* tarafından stimüle edilen histamin, asit ve pepsine karşı bikarbonat aracılı korumayı inhibe etmektedir (163).

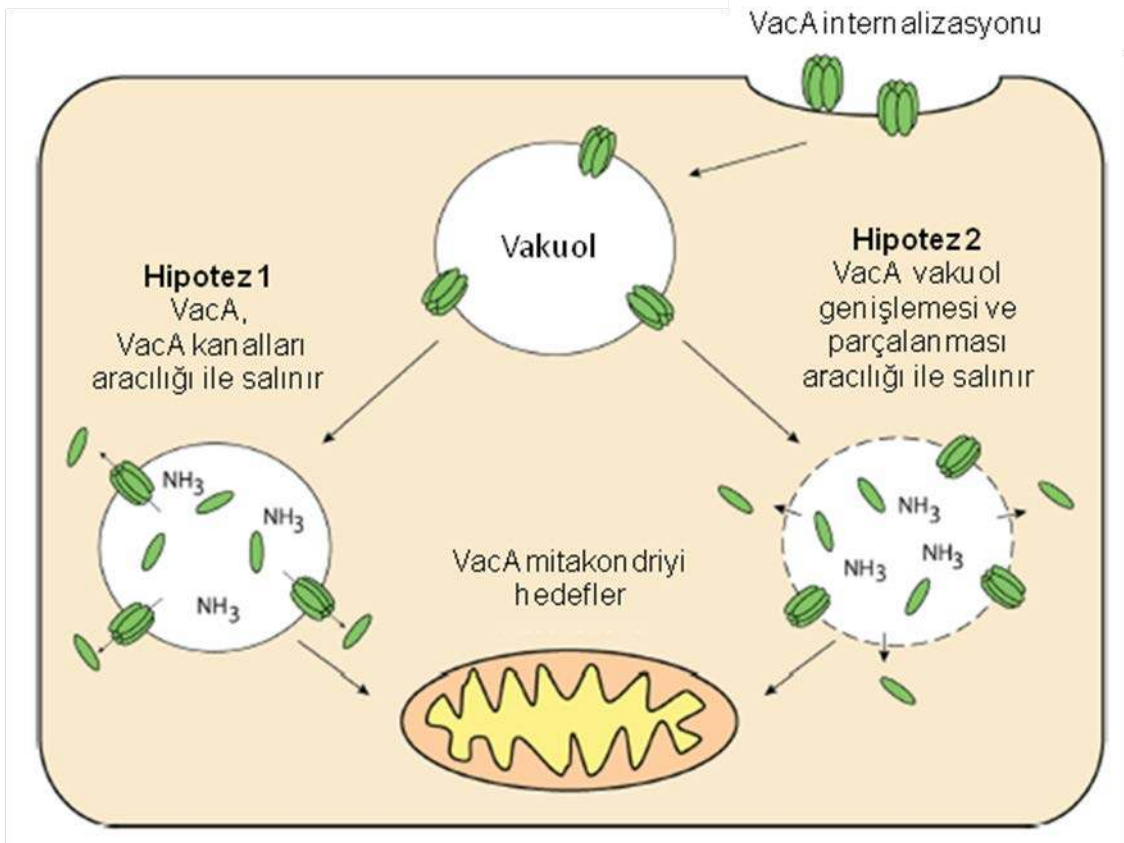
VacA başka hücrel eride etkilemektedir. VacA, parietal hücre içerisine kalsiyum girişini indükleyerek calpain 1'i aktive eder ve proton salınımını engeller. *H. pylori*'nin içerdiği vakuoller makrofaj içerisinde yaşama olanak tanıyarak immun kaçış sağlamaktadır. Hücre içi kalsiyum salınımına neden olarak mast hücreleri içerisinde salgısal granüllerin salınımını indükler. Monositlerin *vacA* intoksikasyonu p38 aktivasyonuna neden olur NFkB aracılığı ile sitokin salınımı olur. *H. pylori* tarafından epitel hücre-hücre bağlarının harabiyeti ile VacA T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunun bozulmasını aktive etmektedir. B hücrelerde ise MHCII antijen sunumunu engellemektedir (163).

VacA'nın ilk olarak Rac1 guanin trifosfastaz (GTPaz) ile kontrol edilen filamentöz aktin (F-aktin) yapısının altındaki plazma membran bölgesine bağlandığı bildirilmiştir (165). VacA daha sonra klatrinden bağımsız Cdc24 ile kontrol edilen erken endositik kompartman içinde pinositoz edilir ve vakuol oluşumunu uyaran geç endozom oluşur (146). CD2-ilişkili proteininin (CD2AP) VacA içeren erken endozom ile F-aktin arasında köprü kurduğu bildirilmiştir. CD2AP, F-aktin yapısını düzenler ve VacA'nın erken endozomdan geç endozoma transferi için gereklidir (110). Lizozom-endozom füzyon sürecinde ise vezikül ilişkili membran protein 7 (VAMP7) ile Q-SNARE sintaksin yedi rol oynamaktadır (66). *H. pylori* ile enfekte epitel hücre kültüründe kullanılan golgi parçalama ajanı Brefeldin A (BFA)'nın VacA'nın indüklediği hücre vakuolizasyonunu artırdığı ve ayrıca VacA'nın düşük toksik formları ile hücresel vakuolizasyonu indüklediği gösterilmiştir (70).

VacA, insan T hücrelerinin *H. pylori* aracılı inhibisyonunda anahtar faktördür (170, 171). VacA başlangıçta epitel hücrelerin vakuolizasyonunu indükleme yeteneğine sahip olduğu tanımlanmıştır (70, 171). VacA, Ca^{+2} -kalmodulin- bağımlı fosfataz kalsinörin seviyesinde T-hücre reseptör/IL-2 sinyal yolağı ile engelleyerek hücre proliferasyonunu inhibe eder (171). Transforme T hücre hattında, VacA optimal T-hücre aktivasyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörü nükleer faktör aktive edici T hücreleri (NFAT) 'nin nükleer translokasyonu ve T-hücre canlılığı ve proliferasyonu için gerekli olan IL-2 salınımını bloke eder (170, 171). Sundrud ve arkadaşları VacA'nın NFAT aktivasyonu ve IL-

2 ekspresyonundan bağımsız olarak, aktive CD4+ T-hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (170).

VacA'nın mitokondriye geçişindeki hedef yolak tam olarak bilinmemektedir (Şekil 12). VacA plazma membranına bağlandıktan sonra ilk olarak sitozole ulaşmalıdır. Bundan sonra, VacA mitokondriye geçer ve sonrasında dış mitokondriyal membranın öbür tarafına geçmektedir. Dış mitokondriyal membranın sırayla proteinler karşıya geçmekte ve bunlar dış mitokondriyal membran translokazı (TOM) içinden geçirilmelidir (160). VacA uygun şartlar altında heptamer, dodekamer, tetradekamer oluşturabilmektedir (162). Protein geçiren kanal katlanmış proteinler için uygun olmayan bir çapa sahiptir. Bu nedenle, VacA kanal arasından geçmek ve mitokondriye girmek için translokasyon öncesi ya da esnasında katlanmamış olmalıdır. Son çalışmalarda VacA'nın N-terminal domaininin mitokondriyal geçişte önemli olduğu bildirilmiştir. N-terminal ucu aynı zamanda VacA membran kanal oluşumu için gereklidir. Kanal oluşumu sitozole endozomal kısımdan VacA'nın salınmasında önemli olduğu ve mitokondri için hedef olabileceği düşünülmektedir (160).



Şekil 12. VacA'nın mitokondriye girişi (160)

VacA p33 ve p55 alt üniteleri endositozla konak hedef hücrelerine girmektedir. Mitokondrial iç membranda anyon kanalı oluşmaktadır. p33 ve p55 alt ünitelerinin bir araya gelmekte ve mitokondri iç membranında por oluşturmaktadır (109). p33 N-terminal ucu, mitokondriyal hedef için önemli ve etkili olduğu bildirilmiştir. Mitokondriyal dış yüzeyde p33 için primer reseptör yapısının endojen mitokondriyal proteinlerin içeri aktarılması için gereksinim duyulan dış membran TOM kompleksinin bir parçası olan Tom20 olduğu bildirilmiştir (162, 172). TOM kompleksinin merkez komponenti Tom40 mitokondri içine p33'ün aktarılmasını düzenlemektedir. Sonuç olarak, p33 mitokondriyal iç membranda toplanmaktadır. VacA ya da toksik alt ünite p33, direkt temas yoluyla endozomdan mitokondriyal membrana transfer olabilmektedir. VacA'nın mitokondriye geçiş yolağının "1) Hedef hücreye VacA bağlanması p55 alt ünitesi ile ilişkilidir 2) VacA hedef hücrelere endositoz ile girer 3) Erken ve geç endozom toplanır 4) Mitokondriyal dış membran ile endozomal membranın spesifik ve direkt etkileşimini düzenler 5) VacA sonuçta mitokondri içerisine aktarılır." şekilde olduğu öngörülmektedir (162).

VacA sitozol içine geçer, mitokondri iç membranında toplanarak endojen mitokondri kanalları aktive olur ve böylece apoptoz uyarılır. VacA'nın proapoptotik etkisi hücre tipine bağlıdır ve gastrik epitel hücrelerde sınırlı kalacağı düşünülmektedir. CagA'dan farklı olarak VacA'nın T hücre apoptozunu uyarmadığı ve T hücre proliferasyonunu önemli derecede azalttığı ve böylece *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinin yeni bir bakış açısı kazandıracağı düşünülmektedir (149). vacA'nın N-terminal domainindeki hidrofobik bölgenin vakuolizasyon için gereksinim duyulduğu gösterilmiştir. vacA'nın hidrofobik bölgesi uzaklaştırıldığında yalnızca vakuolizasyonu inhibe etmez aynı zamanda mitokondri iç membranına entegre olmasını engeller. Vakuolizasyon indüksiyonundaki rolünün yanı sıra apoptotik kaskadını başlatmaya neden olabilen mitokondriye lokalize olduğu gösterilmiştir. Tipik olarak apoptoz esnasında bilinmeyen bir mekanizma aracılığı ile mitokondri iç membran boşluğundan sitoplazma içerisine sitokrom c salınır, sonrasında hücre ölümü ile sonuçlanan downstream ölüm kaspazları aktive olur (160). VacA, Bax ve Bak pro-apoptotik proteinlerini aktive ederek mitokondriden sitokrom-c salınımını uyarır ve böylece VacA ile uyarılmış apoptozun hücrenin vakuolizasyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (47, 146).

vacA geni tüm *H. pylori* suşlarında bulunmasına karşın, tüm *H. pylori* suşlarının hepsi protein salgılamazlar (50). Suşların %50-65'i sitotoksin üretir ve *in vitro* olarak HeLa hücrelerinde ve *in vivo* gastrik epitel hücrelerde vakuolizasyonu indüklemektedir (173). VacA

pozitif *H. pylori* suşları çözünabilir formda bir sitotoksin salgılamakta ve dış membran vezikülleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu küçük membranöz yapılar *in vitro* ve *in vivo* olarak *H. pylori*'nin yüzeyinden oluşmaktadır (174). VacA proteininin salgılanması CagA proteini varlığı ile ilişkilidir (50). VacA'nın epitel hücrelerde CagA'nın indüklediği bazı yanıtları inhibe edebildiği gösterilmiştir. VacA EGFR, HER2/Neu ve sonradan hücre scattering ve elongasyonunda önemli olan Erk1/2 MAPK 'nun aktivasyonunu inhibe etmektedir. Bu durum, VacA ve CagA'nın çok fazla hücre hasardan kaçınırken hücreler ile *H. pylori* etkileşimine izin vererek epitel hücrelerde birbirlerinin etkilerini downregüle ettiğini göstermektedir. Parietal hücreler ile VacA etkileşimi apikal membran sitoskelet etkileşimlerini bozan, gastrik asit sekresyonunu inhibe eden ve *H. pylori* ile enfekte hastalarda gözlenen hipoklorhidrik fenotipini taklit eden ezrinin kalpain aracılı proteolizini düzenlemektedir. Ayrıca VacA mukozal histamin salınımını stimule ederek prostoglandin E2-stimule duodenal mukozal bikarbonat salınımını inhibe eder. Bikarbonat salınımında VacA'nın inhibitör etkisi ülser gelişimine katılarak asit hasarına karşı duodenal mukozal savunmayı zayıflatabilmektedir (66).

vacA m1 alleli sıklıkla epitel hasar, atrofik gastrit ve intestinal metaplaziyi içeren gastrik değişiklikler ve gastrik karsinoma ile ilişkilidir. Ayrıca, insan gastrik mukozasında PMN infiltrasyonu ve bakteriyel yük artışı, duodenal ve gastrik ülserasyon, gastrik kanser ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (163). *babA*, *cagA* ve *vacAs1* birlikte bulunduğunda, batı popülasyonunda duodenal ülser ve gastrik adenokarsinoma ile ilişkilidir (117). *vacA* s1 ve i1 polimorfizmi, antrumda kronik inflamatuvar infiltrasyon ile ilişkili olduğu, gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve *H. pylori* kolonizasyonu yoğunluğu ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (175).

2.5.5. Konak Hücre Yanıtı

Doğal bağışıklık yanıtta, epitel hücreler patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPs) olarak adlandırılan patojenlerin korunmuş mikrobiyal yapıları aracılığı ile enfeksiyon için ilk bariyeri oluşturmaktadır. PAMP'lar mikrobiyal nükleik asitler ve peptidoglikan, LPS, lipoproteinler ve flajellinler gibi hücre duvar ve flajellar komponentleri içermektedir. PAMP'lar sitoplazmik ve endosomal membranlarda [TLR'ler, C-tip lektin reseptörleri (CLRs)] ya da sitozolde [NOD benzeri reseptörler (NLRs), RIG benzeri reseptörler (RLSs)] bulunan doğal immün ya da patern tanıma reseptörlerin (PRRs) en az dört farklı sınıfı ile

tanınmaktadır. PRR'ler yalnızca hematopoetik hücrelerde değil aynı zamanda *H. pylori* enfeksiyonuna karşı savunmada ilk hat olan gastrik epitel hücrelerdede bulunmaktadır (170). TLR ve nükleotid bağlayan oligomerizasyon domain (Nod) proteinleri; lipoproteinler ve peptidoglikan (TLR2), lipopolisakkarit (TLR4), flajellin (TLR5), bakteriyel DNA'nın CpG motifleri (TLR9) ve peptidoglikan (Nod1 ve Nod2) gibi bakteriyel komponentleri düzenleyen konak molekülleridir. *H. pylori*'ye karşı sitokin yanıtı TLR2, TLR5 ve TLR9 (ama TLR4 değil) yoluyla aracılı doğal bağışıklık reseptörleridir (70). TLR2, *H. pylori* LPS'sini, TLR9 *H. pylori* lipoproteinlerini ve DNA'sını tanımaktadır (171). Ayrıca bazı çalışmalarda bunun aksine, gastrik epitel hücreler TLR-4 eksprese etmediklerinden, *H. pylori* LPS'si muhtemelen fare modellerinde gösterildiği gibi TLR-4 eksprese eden monositlerle enfekte mukozanın infiltrasyonu aracılığı ile tanımlandığı da bildirilmektedir (176). Dendritik hücrelerde *H. pylori* 5'-trifosforlanmış RNA, RIG-1 bağımlı tanıma ile tip 1 interferonların ekspresyonunu indükler. DC-SIGN gibi CLR reseptörleri için fukosillenmiş *H. pylori* ligandları tanımlanmıştır. NOD1 *H. pylori* peptidoglikanını tanır ve NF- κ B ve AP1 transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve aynı zamanda tip 1 interferonların üretimine neden olur. Muhtemelen, henüz kesin olmamakla birlikte flajellin (NAIP5 ve IPAF) ve toksinleri (NALP3) içeren *H. pylori* NLRs'lerinin inflamazomu aktive ettiği ve olgun IL-1 β ve IL-18 salınımına neden olduğu düşünülmektedir (Şekil 13) (171).

eksprese edilen TLR9'u aktive ederken, TLR9^{-/-} fareler *H. pylori* enfeksiyonlarını kontrol etme yeteneğinde vahşi tip farelerden farklı olmadığı bildirilmiştir (171).

Ekstrasellüler TLR4, peptidil-prolil sis-trans izomeras HP0175 ile direkt olarak etkileşir. HP0175'in uyardığı IL-6 gen ekspresyonunun, monositik hücrelerde MAPK ve TLR4 bağımlı NF-κB aktivasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. TLR2 ve TLR4, makrofajlardan IL-1β ve IL-6 gibi *H. pylori*'nin uyardığı sitokin ekspresyonu için gereklidir. Ayrıca, TLR2'ye bağımlı NF-κB ve MAPK sinyallerinin IL-8 salınımını uyaran HSP60 için gerekliliğinin ve NF-κB ve MAPK gibi TLR-ilişkili sinyal transdüksiyon yollarının *H. pylori* enfeksiyonu patogeneğinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (14). NF-κB, NF-IL6 ve CRE *H. pylori* enfeksiyonu aracılı COX-2 indüklenmesiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (70). Chan ve arkadaşları *H. pylori*'nin uyardığı COX-2 ekspresyonunun COX-2 promotorü ile CRE ve AP-1 aktivasyonu sonucu downstream transkripsiyon faktörleri (CREB-1, ATF-2, c-jun, c-fos) ve özellikle p38'in MAPK'ı aktive ettiğini, TLR2/TLR9 yoluyla anjiyogenez oluşumunu ve kanser hücre yayılmasını arttırdığını; bunun etkisinin hem NS398 hem de celecoxib spesifik COX-2 inhibitörü ile inhibe olduğu bildirilmiştir (178).

H. pylori güçlü bir doğal bağışıklık yanıtı indükler. *H. pylori*'ye karşı doğal bağışık yanıt gastrik epitel inflamasyonu (gastrit) ile sonuçlanır ve *H. pylori*'ye karşı kazanılmış immün yanıtın başlangıcı için önemli olan kemokinler ve sitokinlerin salınımı aracılığı ile diğer immün hücreleri ve nötrofillerin akınını indükler. *H. pylori*'ye karşı immünite T hücre bağımlıdır. T hücreler *Helicobacter*'e karşı koruma için gereklidirler, fakat aynı zamanda gastik immün aracılı hasar B hücrelere ya da antikor salınımına değil T hücrelere bağlıdır (97).

Hem CD4⁺ hemde CD8⁺ T hücreler *H. pylori* enfeksiyon bölgesinde artış göstermektedir (175). CD4⁺ T hücreleri sitokin salınım profili ve sitotoksik potansiyeline göre sınıflandırılır. İki temel Th hücre vardır. Th1 hücreleri TNF ve interferon-γ (IFN-γ) salgılar, perforin ya da FAS (CD95) ile düzenlenen mekanizmalar aracılığı ile antijen yüklü hedef hücreleri lizisine ve makrofaj aktivasyonuna neden olmaktadır. IL-4, IL-5 ve IL-10 salınımına neden olan Th2 hücreler, Th1 hücre aracılı inflamatuvar olayların down regülasyonunu sağlar ve B hücreler tarafından antikor üretimine yardımcı olmaktadır. Konak sitokin yanıtı hastalık gelişimi ve gastrit başlangıcında önemli bir belirteçdir (97). Farklı fare suşlarındaki aşı çalışmalarında, *Helicobacter* türleri ya da fare suşlarına bağlı olarak hem Th2 hem de Th1 sitokin yanıtının *H. pylori*'ye karşı kazanılmış bağışık yanıtta rol oynadığı ve hastalıktan

korunmada enfeksiyona karşı Th1/Th2 yanıtının dengesinin önemli olduğu gösterilmiştir (97, 176). Gastritin şiddeti doğal bağışık yanıtla bağlıdır ve midedeki inflamasyon paterni hangi hastalığın gelişeceğini belirlemektedir. Kronik antrum baskın gastrit, artmış asit üretimi ve duodenal ülser eğilim ile ilişkili iken; korpus baskın ya da pan-gastrit azalmış asit üretimi, gastrik ülser ve adenokarsinomaya eğilim ile ilişkilidir. *H. pylori* ilişkili gastroduodenal hastalıkların gelişimi ya da asemptomatik kronik gastrit kazanılmış bağışıklık yanıtın predominant T-yardımcı fenotipi ile ilişkilidir. *H. pylori* enfeksiyonunda insan gastrik T hücreleri patoloji ile ilişkili olan Th1 fenotipi baskındır (97). *H. pylori*'nin indüklediği Th1 yanıtı kanser gelişimine neden olduğu bildirilmektedir (111).

Gastrik mukozada dendritik hücreler antijen yapmaya başlamaktadır ve naif T hücrelerin aktive edileceği lenf nodları yakınına göç etmektedir. *In vitro* olarak, *H. pylori* varlığında kültüre edilen dendritik hücreler aktive olmakta ve IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1 β ve TNF α sitokinleri salgılanmaktadır. *H. pylori* enfekte bireylerde, peptik ülser hastalığı gastrik CD4⁺ T hücre yanıtlarının Th1 polarizasyonu ile ilişkilidir. Kronik gastrit hastalığı ise karışık Th1/Th2 yanıtı ile ilişkilidir. Peptik ülser hastalarından türevlenen *H. pylori* reaktif Th hücre klonlarının yaklaşık yarısı CagA'ya spesifiktir. Ülser olmayan gastritli hastalardan türevlenen *H. pylori* reaktif Th hücre klonlarının yaklaşık dörtte biri *H. pylori* üreazına spesifiktir. *H. pylori* spesifik T hücre yanıtının Th1 polarizasyonu daha ciddi hastalık ile ilişkilidir (97). Afrika'da ve Çin, Japonya, Tayland ve Endonezya gibi Asya ülkelerinde *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı yüksek olmasına rağmen, diğer ülkelere göre bu bölgelerde gastrik kanser insidansı daha düşüktür, bu fenomen "Afrikalı enigma" ve "Asyalı enigma" olarak adlandırılmaktadır (52, 111). *H. pylori* enfeksiyonunda polarize Th1 yanıtının patojenik kapasitesi indirekt olarak sıklıkla "Afrikalı enigma" olarak adlandırılan fenomen ile desteklenmektedir. Afrika'da *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı yüksek olmasına rağmen, peptik ülser hastalığı ve gastrik kanserin nadir olduğu bildirilmiştir. Afrika'da *H. pylori* ilişkili hastalıkların düşük prevalans göstermesi olası nedeninin; endemik yüksek parazitik salgın Th2 baskın yanıtına neden olduğu ve bu yanıtın da *H. pylori* enfeksiyonuna sahip bireyleri peptik ülser ve gastrik kanser gelişiminden korumakta olduğu bildirilmektedir (97).

CD4⁺CD25⁺ regülör T hücreleri (Treg) yalnızca otoimmün hastalıkların gelişmesini önlemez aynı zamanda *H. pylori* enfeksiyonu gibi patojen tarafından indüklenen enflamasyon ve hastalığı regüle etmekte olduğu bildirilmiştir. Farede, CD4⁺CD25⁺ Treg gastrik mukozada *H. pylori* kolonizasyonunu arttırmasına rağmen, gastik immunopatolojiyi azaltmakta ve

H. pylori spesifik CD4⁺ T efektör hücrelerin antijen spesifik proliferasyonunu *in vitro* olarak baskılamakta olduğu bildirilmiştir. *In vivo* olarak, *H. pylori* ile enfekte farelerde CD4⁺CD25⁺ Foxp³⁺ Treg'lerin boşaltması ciddi gastrite, gastrik mukoza içerisine B hücreleri, T hücreleri ve makrofajların salınımına, *H. pylori* spesifik IgG1 ve IgG2c titresinin artmasına ve sonuç olarak bakteriyal yükün azalmasına neden olmaktadır. CD4⁺CD25⁺ Treg tarafından efektör T hücre baskılanmasının mekanizması açıklığa kavuşmamıştır ancak CTLA-4 aracılı anergi ve TGF- β salınımını içermekte olduğu bildirilmiştir. CD4⁺ T hücreleri bir kere CD4⁺CD25⁺ Treg tarafından anerjik hale getirildiğinde, bu Treg'lerin varlığı hiporeaktiviteyi korumak için gerekli değildir. İnsanlarda aynı zamanda, doğal CD4⁺CD25⁺ Foxp³⁺ Treg'ler *H. pylori* enfeksiyonu esnasında çalışmakta ve bakteriyal kolonizasyon ve mukozal TGF- β gen ekspresyonu artışı ile korele olduğu bildirilmiştir. Yetişkin bireyler ile karşılaştırıldığında *H. pylori* ile enfekte çocuklarda *H. pylori* kolonizasyon düzeyi benzer olmasına rağmen, Treg sayılarının arttığı ve Treg- sitokinleri TGF- β ve IL-10'un ekspresyonunun arttığı ve gastrit düzeyinin daha düşük olduğu bildirilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonu insanların çoğunda asemptomatik persistent enfeksiyona ve yetersiz regülatör T hücre yanıtı olan bireylerde gastroduodenal patoloji gelişimine neden olan CD4⁺CD25⁺ Foxp³⁺ Treg'leri indüklemektedir. *H. pylori* enfeksiyonuna yaklaşımda regülatör T hücrelerinin bu etkileyici rolü "Afrikalı enigma" için bir diğer açıklama getirmektedir; endemik bölgelerde uzun süreli helmint enfeksiyonları sağlam bir anti-enflamatuvar, regülatör T hücre ağını indüklemektedir ve bu da *H. pylori* ile enfekte bireyleri peptik ülser ve gastrik kanser hastalığından korumaktadır (97).

H. pylori enfeksiyonu IL-2 ve IFN- γ üretimi ile sonuçlanan primer Th1 T hücre yanıtına neden olmaktadır (84, 168). *H. pylori* ve B lenfositler arasındaki etkileşim predominant CD5⁺ B hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve proliferasyonuna neden olmaktadır. Bu hücreler polireaktif ve oto reaktif IgM ve IgG3 antikoru üretmektedir. *H. pylori* ile kronik enfeksiyon ve sonuçta oluşan üreaz salınımı B hücrelerin canlılığının artması ve stimülasyonuna neden olmaktadır (84).

H. pylori enfeksiyon patolojisi gastrik mukozada kaskad olayları şeklinde gerçekleşir. Bakterinin gastrik mukozada kolonizasyonu kronik gastrit ile sonuçlanır, bazı hastalarda ise kronik gastrit ülser veya kansere dönüşebilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonu kanser oluşumunda, ilerlemesinde ve kanser hücrelerinin yayılımında önemli rol oynamaktadır. *H. pylori*'nin indüklediği patolojik değişikliklerin mekanizması proinflamatuvar sitokin olan NF- κ B'nin aktivasyonunu ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme

faktörlerinin ekspresyonunu arttırır. NF- κ B uyaran kinaz (NIK) ve p21 uyaran kinaz 1 (PAK1) arasındaki direkt etkileşim *H. pylori* infekte epitel hücrelerde gösterilmiş ve proinflamatuvar sitokinlerinden TNF- α 'nın endojen tümör promotorü olduğu bildirilmiştir. *H. pylori*'de gastrik kanser oluşumunda yeni proteinler Tip α gen ailesi ve HP-MPI'nın, Ras protein ve NF- κ B aktivasyonu ile tümör-destekleyici aktivitesinin ortak çalıştığı gösterilmiştir (146).

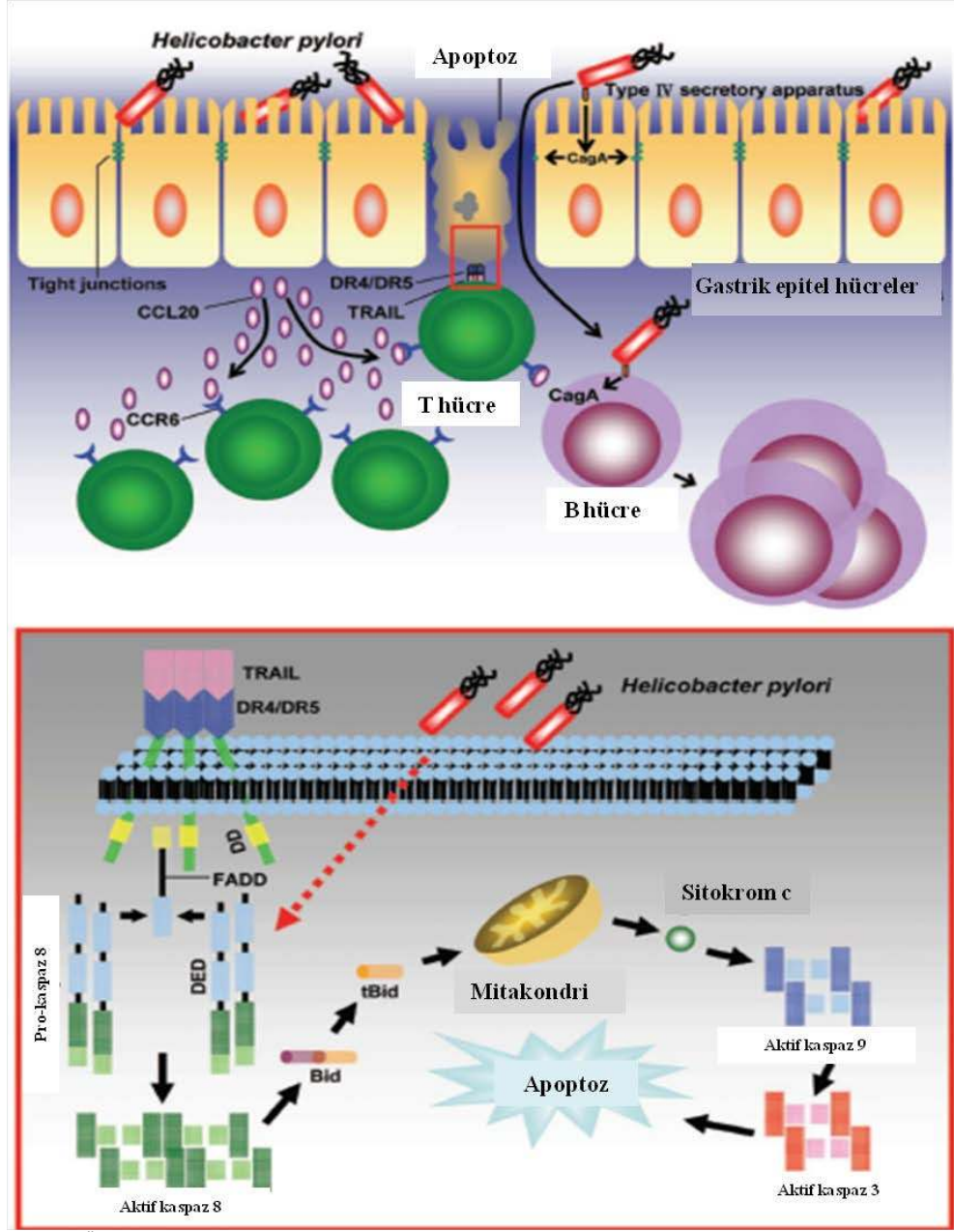
H. pylori enfeksiyonu gastrik mukozanın mikroçevresinde; gastrik epitel hücrelerin apoptozunda artış ve gastrik mukoza hücrelerinde enflamatuvar yanıtın yanı sıra direkt sitotoksiste oluşturmaları gibi değişikliklere neden olmaktadır. Th1 hücreler *H. pylori* enfeksiyonunda seçici olarak artmaktadır. IFN- γ ve TNF- α gibi Th1 sitokinler, *H. pylori* tarafından indüklenen apoptoza ek olarak proinflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırabilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonu aynı zamanda T hücrelerin infiltrasyonu ile Fas/FasL ilişkisi aracılığı ile gastrik epitel hücre apoptozuna neden olan gastrik epitel hücrelerde Fas ekspresyonundaki artış ile gastrik mukoza hasarını da indükleyebilmektedir. *H. pylori*'nin gastrik epitel hücre ile etkileşimden sonra sitotoksinler aracılığı ile hücre ölümüne direkt neden olduğu gösterilmiştir (179).

H. pylori enfeksiyonu mitokondriyal yolak aracılığı ile apoptozu indüklemektedir. Bax ve Bak pro-apoptotik proteinleri *H. pylori* enfeksiyonunda fazla miktarda eksprese edilmektedir. Ayrıca, *cagA* pozitif suşlar yüksek Bax ve Bak skoru ile ilişkilidir. Anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2 ve Bcl-x midede küçük kurvaturda fazla miktarda eksprese edildiği bildirilmiştir. Oksidatif stres ile mitokondriyal yol aktive edilmektedir. Virulan suşlar ile enfeksiyon daha ciddi enflamasyon reaksiyonu ve yüksek oksidatif hasarı ortaya çıkarmaktadır (180). *H. pylori* aracılı patogeneizde apoptoz da düzensizlik ve anti-apoptotik yolak önemli faktörler olarak tanımlanmıştır (111). Sitokrom-c gibi Bcl-2 protein ailesi ile *H. pylori*'nin uyardığı hücre ölümü ispat edilmiştir. Son yıllarda, apoptozu düzenleyen mekanizma bazı araştırmacılar tarafından aydınlatılmıştır. Ashktorab ve arkadaşları, fonksiyonel ARF ve p53 proteini mitokondriyal modifikasyonu uyarır ve bunda *H. pylori*'nin de önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir (181). Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) kanser oluşumu ile ilgili proinflamatuvar sitokindir (14). Beswick ve arkadaşları, *H. pylori*'nin CagA'ya bağlı olarak MIF'ı uyardığını, MIF'in epitel proliferasyon ve prokarsinogenezdeki rolünün *H. pylori* rekombinantında hücre proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir (182). Galgani ve arkadaşları, *H. pylori* suşlarının fonksiyonel *cag* PAI'nin

ekspresyonu ile insan monositlerinde apoptozu uyardığını göstermişlerdir (183). Eguchi ve arkadaşları ise siklin bağlı kinaz inhibitörü olan p27'nin *H. pylori*'ye karşı gastrik epitel hücrelerdeki apoptotik yanıtın bir kısmını düzenlediğini bildirmişlerdir (184). Fosfatidil inositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K)/(Akt) sinyal yolağı hücre proliferasyonunu, canlılığını ve göçünü içeren farklı biyolojik süreçleri regüle etmektedir. *H. pylori* epitel hücrelerde PI3K-Akt sinyal yolağını aktive etmektedir. Mongolian gerbil modellerde hiperfosforillenmiş Akt *H. pylori* ile enfekte hayvanların gastrik pit hücrelerinde predominant olarak eksprese edilmektedir. *H. pylori*'nin indüklediği PI3K-Akt sinyalinde bakteriyal virulans faktörlerin gerekmesi gibi farklılıklar bulunmaktadır. PI3K aktivitesi reseptör tirozin kinaz tarafından indüklenebilmektedir. C-Met değil ama EGFR aktivasyonunun *H. pylori* aracılı PI3K-Akt sinyali ile ilişkili olduğu bulunmuştur ve hücre canlılığı, göçü ve IL-8 üretiminde önemli olduğu gösterilmiştir. Hücre hattı modellerinde Akt'ın downstream hedefi olan GSK3 β 'nın *H. pylori* tarafından fosforillendiği ve inaktive edildiği gösterilmiştir. GSK3 β aktivitesinin suprese edilmesiyle, *H. pylori* β -katenin fosforilasyonu ve ubiquitin bağımlı degradasyonun inhibisyonuna ve siklin D1'in T hücre faktör/lenfoid enhancer bağlayan faktör (Tcf/Lef) bağımlı transkripsiyonuna neden olmaktadır. *H. pylori* tarafından PI3K-Akt aktivasyonu ile GSK3 β supresyonu NF- κ B aktivasyonu ve IL-8 üretimi ile ilişkili olabilmektedir (66). EGFR promotik ve antiapoptotiktir ve aşırı ekspresyonunun kontrolsüz proliferasyon ve gastrik neoplazi riskinin artmasına yol açabileceği düşünülmektedir. EGFR ekspresyonunun *H. pylori* enfeksiyonu üzerindeki etkisi AGS hücrelerinde çalışılmıştır. *cagPAI*-pozitif suşlarda; EGFR transaktivasyonu, ERK fosforilasyonu ve Src aktivasyonunu ile EGFR ekspresyonunun önemli derecede artış gösterdiği bulunmuştur (110). Ayrıca eksternal membran vezikülü olan gama-glutamil transpeptidaz ve VacA gibi virulans faktörlerinin apoptoz için uyarıcı oldukları gösterilmiştir. CagA'nın pro ve anti-apoptotik faktörler arasındaki ilişkisi rapor edilmiştir (14). CagA'nın Mek $\rightarrow$ Erk $\rightarrow$ SRE yolağı ile antiapoptatik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (185). CagA pozitif suşlar ile enfeksiyon, atrofi oluşumunda önemli görevi olan çoğunlukla sinusa ait küçük kıvrımlarda bulunan gastrik mukozadaki pro-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (14). Bu etkide monositler ve bakteri arasında direkt bağlantı gereklidir fakat VacA ve CagA'dan farklı olarak tanımlanmamış faktörlere de gereksinim duyar. İlginç olarak, *in vitro* üretilmiş monosit türevi dendritik hücreler *H. pylori*'nin uyardığı apoptozu dirençlidirler (94).

Direkt olarak apoptoza neden olmasının yanı sıra, *H. pylori* TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) aracılı apoptoz sinyalinin modülasyonu aracılığı ile gastrik epitel hücrelerde TRAIL aracılı apoptoza duyarlılığı indüklemektedir (179, 186). Ayrıca, *H. pylori* enfeksiyonu T lenfositlerin infiltrasyonunu indüklemektedir ve apoptozu arttırmak için enflamasyona neden olmaktadır. FasL ile güçlü homoloji gösteren TNF süper aile üyesi olan TRAIL (aynı zamanda Apo2L olarak adlandırılır) *in vitro* olarak transforme hücre hatlarının çeşitliliğinde apoptozu indükleyebilir ancak normalde ana hücrelerde indükleyememektedir. *in vivo* olarak aktive olmuş T hücrelerde sitotoksik efektör bir molekül olarak görev yapabildiğinin göstergesi olarak T hücreler TRAIL/TRAIL reseptör etkileşimi aracılığı ile hedef hücreleri öldürebilmektedir. *H. pylori* gastritinde TRAIL/TRAIL reseptör etkileşimi infiltre edilmiş T hücreleri ve gastrik epitel arasındaki etkileşimi kapsamaktadır. *H. pylori*'ye karşı hassas insan gastrik epitel hücreler, *Helicobacter* enfeksiyonu esnasında infiltre edilmiş T hücreler tarafından gastrik epitel hücrelerin immün aracılı apoptozunda rol oynayan TRAIL-aracılı apoptoza duyarlılığı arttırmaktadır. *H. pylori* tarafından TRAIL duyarlılığının indüksiyonu *H. pylori*'nin virulans faktörleri VacA ve CagA'nın ekspresyonuna bağlı değildir, canlı bakteri ve direkt epitelle bağlantıya bağlıdır. Gastrik epitel hücrelerde *H. pylori*'nin indüklediği TRAIL-aracılı apoptoza karşı duyarlılık apoptoza direncinin kırılması ve mitokondrial yolağın aktivasyonuna neden olan mitokondriye ölüm sinyalini götüren kaspaz 8 down-stream yolağının aktivasyonuna bağlıdır (179).

Gastrointestinal epitel organizmaların kaçmasına duyarlıdır ve enflamasyon bölgesine lenfositlerin ve dendritik hücrelerin çekilmesi için sitokinler/kemokinlerin üretmektedir. CCR6 mukozal hücrelerde dendritik hücre lokalizasyonu, lenfosit homeostazı ve immün yanıtı düzenlemektedir. CCR6 seçici olarak dendritik hücrelerde ve bazı bellek T hücrelerinde eksprese edilen CCL20 için spesifik bir β kemokin reseptörüdür ve gastrik enflamasyon esnasında kemokin aracılı lenfosit trafiğinde rol oynayabilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunda, gastrik mukozada CCR6⁺CD3⁺ T hücre infiltrasyonunda belirgin artış gözlenmektedir ve CCR6 ligand, CCL20 kemokini inflame gastrik dokularda seçici olarak eksprese edilmektedir. Bu sonuçlar, CCL20 ve CCR6 arasındaki etkileşim *Helicobacter* enfeksiyonu esnasında gastrik mukozada inflamasyon bölgesine T hücrelerin toplanmasında rol oynayabileceğini göstermektedir (Şekil 14) (179).



FADD: Ölüm domainli Fas ilişkili protein

Şekil 14. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda gastrik mukoza hasarının immun patogenezi (179)

H. pylori enfeksiyonu yokluğunda, gastrik mukoza içerisine çok az T hücre infiltrasyonu olmakta ve gastrik epitel hücrelerde apoptozu indüklememektedir. Ancak *H. pylori* enfeksiyonu varlığında, *H. pylori* enflamasyonu indüklemektedir ve gastrik mukozada enflamasyon bölgesine CCR6 eksprese eden $CD4^+$ T hücrelerin infiltrasyonuna neden olan CCL20 kemokininin üretimini indüklemektedir. TRAIL eksprese eden T hücreler

H. pylori ile enfekte gastrik epitel hücrelerde sonradan apoptozu indüklemektedir. Bu arada, CagA gastrik epitel hücrelerde olduğu gibi lenfositlerin içine de entegre olabilmektedir. CagA B hücrelerin içerisine transloke olduğunda, proliferasyon için B lenfositlerin aktivasyonunu indükleyebilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonu yokluğunda, gastrik epitel hücrelerde ölüm reseptörleri ile TRAIL bağlanması yalnızca zayıf olarak kaspaz sekiz aktivasyonunu indüklemektedir ve hücre ölümüne neden olan kaspaz sekiz sonrası sinyaller aktive olmamaktadır. Ancak *H. pylori* enfeksiyonu varlığında, *H. pylori* apoptoz direncinin kırılması ve mitokondriyal yolağın aktivasyonuna neden olan Bid bölünmesi aracılığı ile mitokondriye ölüm sinyalini iletmek ve kaspaz sekiz aktivasyonunu arttırmak için TRAIL birleşmesinden sonra TRAIL ölüm indükleyen sinyal kompleksinin (DISC) birleşmesini arttırmaktadır (179).

2.5.6. Otoimmünite

H. pylori enfeksiyonu gastrik otoimmünite ile güçlü olarak ilişkilidir (97, 118). Birçok klinik ve epidemiyolojik çalışma otoimmün gastritli birçok hastanın *H. pylori* enfeksiyonuna sahip olduğunu ya da önceden geçirdiğini göstermektedir. Otoimmün gastrit korpusta parietal hücrelerin ve zimojenik hücrelerin ürettiği gastrik asit kaybına neden olan salgı bezlerinin otoimmün aracılı yıkımı (korpus atrofi) ile karakterize edilmektedir. Otoimmün gastritin son noktası pernisiyöz anemidir. Klasik otoimmün gastrit ve *H. pylori* ile indüklenmiş korpus atrofik gastrit arasında dikkat çekici benzerlikler vardır ve otoimmün gastritin histolojik olarak tanımlanan ön klinik safhası *H. pylori* eradikasyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir. *H. pylori*, enfekte bireylerin yaklaşık yarısında gastrik mukozal antijenlere karşı tepki oluşturan otoantikörleri indüklemektedir. Parietal hücrelerin sekretuar kanalcıklarında yer alan proton pompası gastrik H^+K^+ -ATPaz otoimmün gastritte immunopatolojiye neden olan otoantijendir. H^+K^+ -ATPaz aynı zamanda korpus atrofi kronik *H. pylori* gastritinde tek temel otoantijen olarak tanımlanmıştır. Farede, *H. pylori* enfeksiyonu H^+K^+ -ATPaz'ın glikozillenmiş β -alt ünitesindeki Lewis antijenleri ve LPS Lewis kan grup antijenleri arasındaki mimikri aracılığı ile gastrik otoantikörleri indüklemektedir. Ayrıca, insanda *H. pylori* ilişkili anti- H^+K^+ -ATPaz otoantikörleri protein epitoplarına karşı yönelmektedir ve onların oluşumu Lewis mimikrisini içermemektedir. İnsanda, *H. pylori* enfeksiyonu, bir kısmının hem *H. pylori* peptit antijenleri hemde H^+K^+ -ATPaz'a karşı çapraz yanıt oluşturduğu gastrik T hücrelerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Dolaşan antigastrik

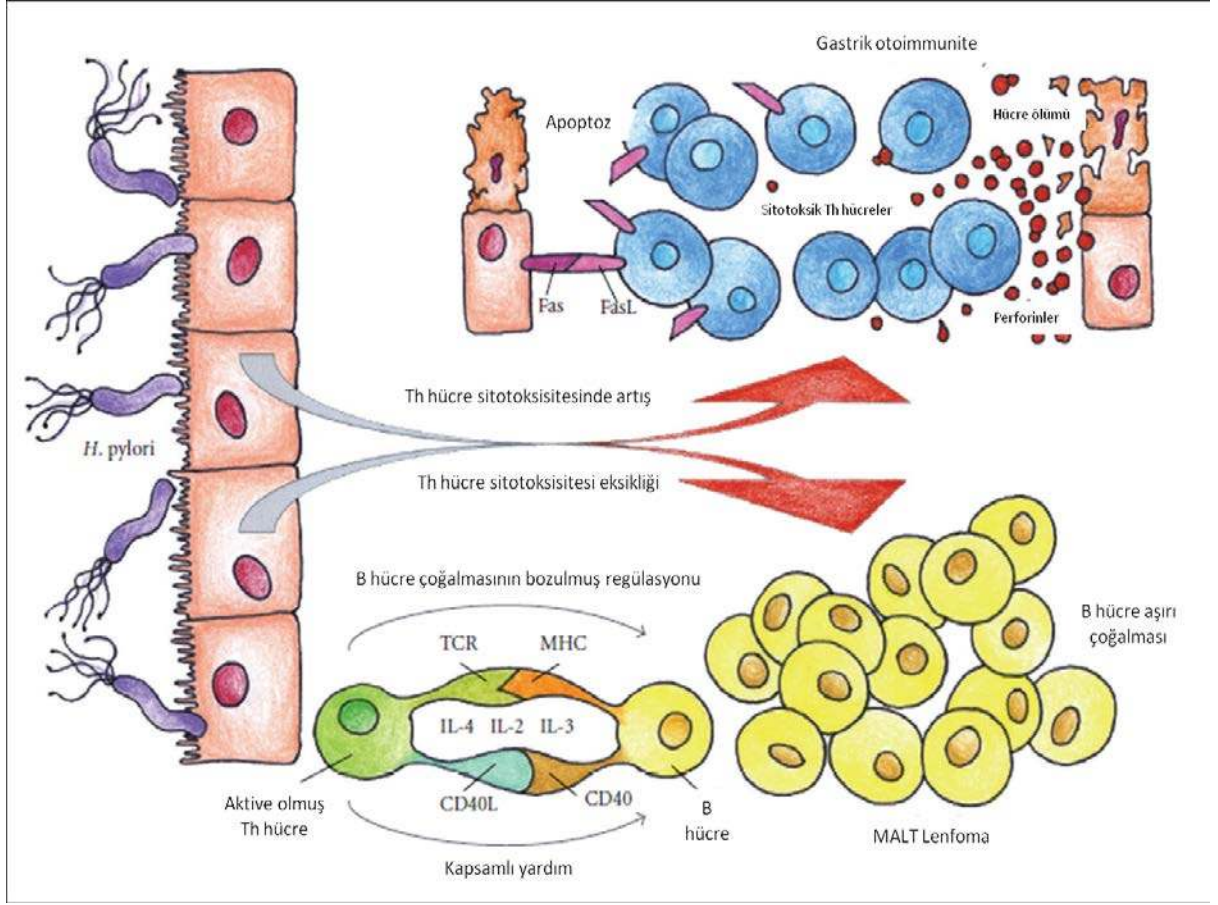
otoantikörler kendi başlarına patojenik değildir fakat devam eden T-hücre aracılı gastrik otoimmüniteye işaret etmektedir (97).

İnsan otoimmün gastrit patogenezi hakkında bilinenler deneysel otoimmün gastritin fare modellerine dayanmaktadır. Deneysel otoimmün gastrit CD4⁺ T hücrelerin H⁺K⁺-ATPaz α -alt ünitesi (630-641) epitopunu tanıyan $\alpha\beta$ TCR eksprese ettiği T hücre reseptör transjenik (TCR-Tg) farelerde ya da neonatal timektomize farelerde spontan olarak gelişmektedir. Deneysel otoimmün gastrit ve otoimmün gastritte, gastrik enflamatuvar infiltratlar CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler, makrofajlar ve B hücrelerden oluştuğu ve fare modellerindeki histopatolojik lezyonlar kronik otoimmün gastriti olan insanda gözlenenler ile benzer olduğu bildirilmiştir. Deneysel otoimmün gastrit H⁺K⁺-ATPaz-spesifik CD4⁺ T hücreler ile düzenlenmektedir ve H⁺K⁺-ATPaz'daki hem α hem de β alt ünitesindeki gastritojenik T hücre epitopları tanımlanmıştır. Deneysel otoimmün gastrit H⁺K⁺-ATPaz için spesifik Th1, Th2 ya da Th17 hücreler tarafından indüklenebilmektedir. Ayrıca, en temel rol gastrik mukozadan içeriye giren Th1 hücreleri ve IFN- γ 'ya bağlanabilmesidir. Th1-, Th2- ve Th17-aracılı gastritte doğal olarak oluşan CD4⁺CD25⁺ Treg'lerin rolü tanımlanmış ve TGF β -indüklenmiş otoantijen spesifik Foxp3⁺ regülör T hücreler (iTreg) otoantijen sunan dendritik hücrelerin aktivasyonunun baskılanması ile otoimmünitenin önlenebileceği gösterilmiştir (97).

Geçmiş ya da aktif *H. pylori* enfeksiyonunun kanıtı olmaksızın otoimmün gastritli hastalarda gastrik mukozada çok sayıda T hücre bulunmaktadır. H⁺K⁺-ATPaz otoantijeninin uyarımı ile antral T hücrelerinin %3'ü çoğalabilirken, korpustan türevlenen T hücrelerin yaklaşık %25'i gastrik H⁺K⁺-ATPazı tanıyabilmektedir. Pürifiye H⁺K⁺-ATPazın T hücre proliferasyonu doza bağımlı ve HLA sınıf II ile sınırlıdır, otoreaktif T hücrelerin antijen spesifik poliklonal aktivasyonu ile oluşan otoimmün gastritin göstergesi olan farklı TCR V β yeniden birleşmesi ve submoleküler epitoplar içermektedir. Çakışan 15-mer sentetik peptitlerin kütüphanesi, insan gastrik H⁺K⁺-ATPazın bütün α ve β alt ünitelerini kapsamakla birlikte, *H. pylori* enfekte otoimmün gastritli hastalardan H⁺K⁺-ATPaz-spesifik ve *H. pylori*/H⁺K⁺-ATPaz-spesifik CD4⁺ T hücreleri tarafından tanınan submoleküler epitopların identifikasyonu için kullanılmaktadır. Sonuç olarak, aday *H. pylori* epitopları her bir bireyin T hücre donörünün MHC sınıf II peptit bağlayan motiflerinin dikkate alındığı *H. pylori* J99 ve 26695 suşlarının genomları ile tanımlanmış H⁺K⁺-ATPaz epitoplarının dizileriyle karşılaştırılmaktadır. H⁺K⁺-ATPaz-spesifik CD4⁺ T hücre klonları tarafından tanınan H⁺K⁺-ATPaz α ve β alt ünitelerinin epitoplarının repertuarı *H. pylori* ile enfekte olan ve olmayan

otoimmün gastritli hastalarda benzerdir. Bütün *H. pylori*/H⁺K⁺-ATPaz çapraz reaktif T hücreleri β alt ünitesinden (270 aminoasit uzunluğunda) daha uzun olan H⁺K⁺-ATPazın α alt ünitesindeki (1034 aminoasit uzunluğunda) otoantijenik epitoplarını tanımaktadır. Şaşırtıcı şekilde, identifiye edilen *H. pylori* peptitlerinin hiçbiri *H. pylori* ile enfekte kronik antral gastrit ve peptik ülserli hastalarda gastrik T hücrelerin temel hedefi olarak identifiye edilen VacA, CagA ve üreaz gibi bilinen immunodominant *H. pylori* proteinlerine ait *H. pylori*/H⁺K⁺-ATPaz çapraz reaktif T hücreleri tarafından tanınmamaktadır. *H. pylori*/H⁺K⁺-ATPaz çapraz reaktif T hücrelerinin antijen spesifik uyarımı HLA-DR ile sınırlıdır (97).

Otoreaktif ya da çapraz reaktif H⁺K⁺-ATPaz-spesifik Th klonları hedef hücrelere karşı ya Fas-fas ligand-aracılı apoptoz ya da perforin aracılı sitotoksiste aracılığı ile hücre ölümünü indükleyebilmektedir. Gastrik epitel hücrelerinde Fas ekspresyonu Th1 sitokinleri IFN- γ ve TNF α tarafından artırılmaktadır ve Fas/FasL etkileşimi gastrik epitel hücrelerin ölümüne katkıda bulunmaktadır. Bu gözlemlere dayanarak gastrik otoimmünitenin başlangıcında ya da hızlanmasında *H. pylori* enfeksiyonunun rolü ile ilgili en azından iki olası senaryo düşünülmektedir. Çoğu enfekte bireyde, henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen, *H. pylori* ve konak immün yanıt arasındaki etkileşimler CD4⁺CD25⁺ Treg tarafından kontrol altında tutulan gastrik mukozanın asemptomatik kronik enflamasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, aynı zamanda görünüme göre sağlıklı bireylerde timustaki negatif seleksiyondan kaçan H⁺K⁺-ATPaz-otoreaktif CD4⁺ T hücrelerini barındırabilmektedir. Bazı bireylerde, *H. pylori*'nin neden olduğu kronik Th1 aracılı enflamasyon H⁺K⁺-ATPaz-spesifik CD4⁺ T hücrelerinin aktivasyonuna ve sonrasında gastrik otoimmüniteye neden olan CD4⁺CD25⁺ Treg baskılanmasına son vermek için yeterli olabilmektedir. İkinci senaryo aynı zamanda H⁺K⁺-ATPaz-spesifik otoreaktif T hücreler tarafından timik kaçıışı kapsamaktadır, fakat ilaveten eğer konakta hem H⁺K⁺-ATPaz hem de *H. pylori* peptitlerinin sunumunu kolaylaştırabilen HLA genleri eksprese edilirse, gastrik otoimmünite gelişimi için konağın genetiği etkilenmektedir. Gastrik *H. pylori*-spesifik T hücrelerin sitolitik efektör fonksiyonları otoimmün gastrit yada MALT lenfomalı hastalar arasında aşırı derecede farklılık göstermektedir (Şekil 15) (97).



Şekil 15. *Helicobacter pylori* ilişkili gastrik otoimmünite ve gastrik lenfomada T hücrelerin farklı sitotoksik fonksiyonları (97)

T hücreler enfeksiyona karşı savunmada önemlidir, fakat uygun olmayan Th yanıtları konak için tehlikeli olabilmektedir. Duyarlı bireylerde, *H. pylori* H^+K^+ -ATPaz epitopları ile çapraz reaksiyon veren *H. pylori*-spesifik T hücrelerin yayılması ile moleküler mimikri aracılığı ile gastrik otoimmüniteyi indüklemektedir. Çapraz reaktif T hücreler hem Fas-ligand (FasL) ile indüklenen apoptoz hem de perforin aracılı sitotoksitenin uzun süreli aktivasyonu ile gastrik mukozanın yıkımı ile sonuçlanabilmektedir. Bunların aksine, enfekte bireylerin az bir kısmında gastrik *H. pylori* spesifik Th hücreler B hücre büyümesinin sitotoksik kontrol (hem perforin hem de Fas-FasL aracılı) eksikliğinde rol oynar. Benzer sitolitik defektler, B hücre büyüme faktör aktivitesi ve Th hücreler tarafından kostimulatör sinyallerin kronik akışı ile sitokinlerin üretimi ile ilişkilidir. *H. pylori* antijenlerine kronik maruz kalma ile birlikte B hücrelerinin aşırı büyümesi ile sonuçlanır, böylece neoplastik B-hücre transformasyonuna ve gastrik düşük düzeyde MALT, B hücre lenfomanın başlamasına yardımcı olmaktadır (97).

Otoimmün hastalıklar kendi antijenlerine karşı toleransını kaybeden immün sistemin disregulasyonu ile karakterize edilmiştir. Bu hastalıkların tam etiyolojisi bilinmemektedir; ancak konak ve çevresel faktörlerin kompleks kombinasyonunun eksensel bir rol oynadığına inanılmaktadır. *H. pylori* antijenlerinin moleküler mimikrisi otoimmün gastrite neden olan çapraz reaktif T hücrelerinin aktivasyonunda bulunmaktadır. IgM romatoid faktör, anti tek iplikli DNA antikoru ve anti-fosfotidil kolin antikoru *H. pylori* komponentleri özellikle üreaz tarafından aktivasyonu sonrası B hücrelerin üretildiği gösterilmiştir. İmmün hastalıkların patogenezinde insan ısı şok proteinleri (HSP) ile yüksek düzey sekans homolojisi gösterdiğinden dolayı mikrobiyal HSP rolü kabul edilmektedir. Sjögren's sendromu patogenezinde *H. pylori* tarafından üretilen HSP 60'ın olası bir rolü olduğu düşünülmektedir. İmmün trombositopenik purpuralı hastalarda *H. pylori* enfeksiyonunun eradikasyonunun vakaların %50'sinde platelet sayımının geliştirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonu ile diğer otoimmün hastalıklar ile ilişkiye dair çelişen ve tartışmaya yol açan veriler bulunmaktadır. Bazı durumlarda, enflamatuvar barsak hastalığının *H. pylori* enfeksiyonundan korunma etkisi olduğu bulunmuştur (84).

2.6. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler

H. pylori enfeksiyonu tanısında kullanılan yöntemler; endoskopi gerektiren invaziv yöntemler ve endoskopi gerektirmeyen invaziv olmayan yöntemler olmak üzere iki grupta incelenmektedir (79, 187).

2.6.1. İnvaziv Yöntemler

2.6.1.1. Endoskopi

Biyopsilerin elde edilmesi için üst sindirim sistemi endoskopisi yapılmalıdır. Fenol kırmızısı mukozal pH testi *H. pylori* standart endoskopik tanısı için yeni bir metottur. Gastrik mukozaya %0.1'lik fenol kırmızısı solüsyonu spreylenebilir. Boyama skoru olarak eksprese edilen boyama alanı histopatoloji ile ölçülen *H. pylori* dansitesi ve UBT pozitifliği ile korelasyon göstermektedir. Endoskopik fenol kırmızısı boyaması *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için alternatif bir yöntem olabilir (125, 188).

Yeni yüksek rezolüsyon magnifying endoskopi metodu, *H. pylori* gastriti tanısı ve atrofi, intestinal metaplazi gibi spesifik histopatolojik özelliklerin identifikasyonu için

standard endoskopiden daha üstündür. Konfokal lazer endomikroskopisinde *H. pylori* gastriti tanısında rolü bulunmaktadır (141, 188). Atrofi ve intestinal metaplazi oranına bağlı olarak biyopsi alınımında en iyi bölgenin üst korpus büyük kurvatur olduğu bulunmuştur (188).

Konvansiyonel dar bantlı görüntüleme (NBI) ile *H. pylori* gastritinin beş farklı histopatolojik aşamasını tanımlamakta olduğu bildirilmiştir. Konfokal lazer endomikroskopi *H. pylori* ve intestinal metaplazili hastalarda mukozal bariyer defektini saptamak için fonksiyonel görüntüleme tekniği olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca, endositoskopi yüksek tanı değeri olan biyopsiler ve *in vivo* histoloji elde etmek için güvenli ve etkili yeni endoskopik görüntüleme tekniğidir. Endositoskopi *H. pylori*'nin *in vivo* saptanması kadar hücresel düzeyde mukozal yapıların analizine de izin veren 1400 kat büyütme ile mikroskopik görüntüleme sağlar. Son zamanlarda, fonksiyonel ve moleküler hedefli görüntüleme teknolojileri *H. pylori*'nin gerçek zamanlı saptanması alanında potansiyel bir öneme sahip olduğu bildirilmiştir (96).

2.6.1.2. Hızlı Üreaz Testi (HUT)

H. pylori, kandan gastrik mukozaya difüze olan ürenin konsantrasyonunun düşük olduğu özel ekolojik çevresine adapte olmak için, geniş miktarda üreaz üretmektedir. *H. pylori* üreazının bakteriyal üreazlar arasında en yüksek spesifikliğe (36 ± 28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{proteinin mg}$) sahip olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* içeren bir biyopsi örneği üre açısından zengin bir ortam içerisine konulduğunda, üreaz enzimi üreyi karbondioksit ve amonyağa parçalamaktadır. Amonyum iyonları pH'ı arttırmaktadır ve fenol red gibi bir pH indikatörü varlığında sarıdan kırmızıya renk değişikliği görülmektedir. Üre konsantrasyonunu %2'den %10'a arttırmak, daha yüksek sıcaklıkta (37°C) enkübe etmek ve tamponun baskılanması gibi farklı yollar testin duyarlılığının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Biyopsinin boyutu testin duyarlılığını etkilememektedir (78). Sıvı kültür ortamına üre eklenmesi *H. pylori* canlılığını negatif olarak etkileyebilmektedir. Üreaz enzimi sayesinde pH'ın 7.2'ye hızlı artışı *H. pylori*'nin yaşamını sürdürmesinin dramatik olarak azalmasına neden olmaktadır (189).

İlk jenerasyon ticari kitler (CLO test ve Hpfast) agar temellidir, yeni jenerasyon kitler ise (PyloriTek) mikropor membran ile iki bölgeye ayrılan strip temelli testlerdir (42, 79). Agar bazlı testler bir saat sonra %70-80, 24 saat sonra %90-95 duyarlılık göstermektedir. Bu

nedenle uzun süreli beklemeden dolayı bu testler hızlı test olarak sınıflandırılmamaktadır. Ayrıca, ağızdaki diğer üreaz pozitif bakteriler 24 saat sonra okunduğunda spesifikliği azaltabilmektedir. Midede bulunabilen *H. heilmannii* üreaz pozitif bir bakteridir ancak bakteriyal yükün az olması nedeni ile pozitif bir sonuç vermeyebilir. Strip temelli testler (PyloriTek) iki saat sonra %99 duyarlılık, %95 özgüllük göstermektedir (79). Ayrıca sıvı temelli testler (CPtest, EndoscHp) daha kısa sürede sonuç vermektedir ve *in house* olarakta hazırlanabilmektedir (187). *H. pylori* Quick test CLO'dan daha ucuz ve etkili daha hızlı bir üreaz testidir (96).

Üreaz testinin sonuçlarını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Üreaz testinde yeterli duyarlılık elde etmek en azından 10^5 bakteriyal yük ile kısıtlıdır (79, 189). PPI ile tedavi üreaz testi sonuçlarını etkilemektedir. PPI bakteriyal yükü azaltmaktadır ve ayrıca PPI'nin kendisi de antiüreaz özellik gösterebilmektedir. İntestinal metaplazi varlığında, yalancı negatif test sonucu vermektedir (79). Aktif ülserli kanamalı hastalarda ya da tedavi sonrası düşük duyarlılık ve özgüllük gözlenmektedir (96, 187).

HUT duyarlılığı kanamalı hastalarda azalmaktadır fakat PPI standart dozunun kısa süreli kullanımı etkilememektedir. HUT'un düşük duyarlılığına bir çözüm olarak test edilen biyopsi sayısını dörde arttırmak önerilmiştir. Bir biyopsi yerine dört biyopsi kullanıldığında pozitif sonuçlar %52'den %96'ya artış göstermiştir (188).

2.6.1.3. Histopatolojik İnceleme

Histopatoloji, *H. pylori* gastritinin direkt tanısında altın standard yöntemidir (96). Biyopsi örnekleri %10 formaldehit fiksatifine içerisinde konulmaktadır. Herhangi bir transport problemi yoktur, materyal oda ısısında gönderilebilir ve enfeksiyöz değildir. Bu fiksatif bakterinin morfolojisini korumaktadır ve birçok boya kullanılabilir. Ayrıca, formaldehit içerisinde saklama kısıtlıdır çünkü bir hafta sonra tanı zorlaşmaktadır. Bakterinin morfolojisini değiştirdiği için bouin fiksatif kullanılmamalıdır (79).

H. pylori'ye spesifik bir boya bulunmamaktadır. Rutin hematoksilen-eosin boyası, bakteri ve mukus arasında zayıf kontrast oluşturduğu için *H. pylori* için uygun değildir. Warthin-Starry gümüş boyası, modifiye Giemsa ve akridin oranj gibi özgün boyalarla bakterinin histolojik olarak tanımlanması daha kolaydır. Bakterinin bulunduğu mukozanın değil *H. pylori* DNA'sının boyanmasına izin veren bu boyalar asidofil özelliktedir. *H. pylori*'ye karşı özel bir boya düşünülen Genta boyası ile hem bakteri hem de gastrit

lezyonlar gözlemlenebilmektedir (79). Karbol fuksin ve alsian blue boyalarının karışımı, Tayland'da Giemsa boyamaya alternatif olarak önerilmiştir. Giemsa ve hematoksilin eozin boyamalarıyla karşılaştırıldığında aynı oranda pozitiflik gözlenmiş ve kombine boyamanın basitliğine ve düşük maliyetine ve intestinal metaplazide goblet hücrelerinin identifikasyonunda değerli olduğuna işaret edilmiştir (188).

Güncelleştirilmiş Sydney sistemine göre erişkinde antrumdan iki biyopsi, fundustan iki biyopsi ve incisura angularisten de bir biyopsi alınmalıdır. Gastrik aktivite açısından; yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3) olarak *H. pylori* bakteriyel dansitesi ve intestinal metaplazi, PNL, lenfositler ve atrofi yönünden Güncelleştirilmiş Sydney sistemine göre değerlendirilmektedir (190). Atrofi için yeni derecelendirme sistemi olan OLGA kullanım kolaylığı ve atrofik gastritin şiddetini değerlendirmek için oldukça yararlıdır. Populasyondaki gastrik kanserin farklı risklerine ilişkin olarak OLGA derecelendirmesi gastrik kanser insidansını göstermektedir. Karsinoma hücreleri intestinal metaplaziden bağımsız meydana gelebildiği bulunmuştur. Bu bulgu konfirme edilirse, intestinal metaplazinin prekanseröz olmadığı ancak parakanseröz lezyon olduğu gösterilecektir (188).

H. pylori enfeksiyonunun histopatolojik tanısı patoloğun deneyimine bağlıdır ve tanısı zaman almaktadır. Spesifik *H. pylori* antikoru ile immun boyama yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermektedir. Ayrıca, digoksijenin ya da florosein ile işaretlenmiş 16S rRNA gen probu kullanılarak uygulanan *in situ* hibridizasyon geliştirilmiştir (79).

Histopatolojik saptama uygun şartlar altında duyarlılığı %95'e ulaşabilmektedir. Patoloğun deneyimi ve materyalin kalitesi önemlidir. Özgüllüğü de %95'e yaklaşmaktadır. Mukozada diğer bakterilerin varlığı yanlış pozitif sonuca neden olabilmektedir. Ayrıca, patolog immunohistokimya ya da FISH yöntemini konfirmasyon için kullanabilmektedir (79). Yüksek duyarlılığa sahip olmasına rağmen, biyopsinin alındığı bölge, biyopsi sayısı ve biyopsinin boyutu tanı kesinliğini etkilemektedir. Patchy dağılım nedeniyle yanlış tanıya neden olabilmektedir (187). Maastricht IV Sonuç Raporu'na göre, eğer mümkünse histopatoloji uygulanmadan iki hafta önce PPI kullanımının bırakılması gerektiği bildirilmiştir (96, 191). Peptik ülser kanamalı hastalarda *H. pylori* tanı testlerinin duyarlılığının kanamadan dolayı azaldığı bilinmektedir, fakat kanama varlığında bile histopatoloji oldukça güvenilir bir test olduğu bildirilmiştir (96).

2.6.1.4. Kültür

H. pylori kültürü için en iyi örnek endoskopi esnasında elde edilen biyopsi örnekleridir. Hastaların antibiyotik ya da antisekreatuvar ilaçlar özellikle PPI kullanmamış olmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. PPI'nın gastrik mukozada bulunan konsantrasyonda direkt antimikrobiyal etkisi olmamasına rağmen, antrumda bulunmamasına neden olan, bakteriyal çevresindeki pH'ı değiştirerek midede *H. pylori*'nin dağılımını indirekt olarak etkilemektedir (79). Endoskopi öncesinde iki hafta kadar antibiyotikler, PPI ve H₂ antagonistlerinin kullanımından kaçınılması önerilmektedir (79, 187). *H. pylori*'nin biyopsi örneklerinden primer izolasyonu oldukça zordur ve izolasyon oranları %75-90 olarak bildirilmektedir. Bu oranlar *H. pylori*'nin nazlı bir organizma olması ve gastrik mukozada bakterinin patchy dağılımı, biyopsi forsepslerinin kontaminasyonu, anestetik alımını, orofaringeal flora varlığı ve transport esnasında organizmanın canlılığını kaybetmesi gibi kontrolü zor birçok faktöre bağlı olabilmektedir (192).

Endoskoplar aracılığı ile biyopsi örneklerinin potansiyel kontaminasyonu söz konusudur (79, 192). Biyopsi örneklerinin tuzlu solüsyon ile yıkanması *H. pylori*'nin üretimini arttırmaktadır. Antrumdan alınan biyopsi örneği iyi duyarlılık göstermektedir fakat güvenilir bir tanı için yeterli değildir. *H. pylori* düzensiz dağılım gösterebilir ve daha fazla biyopsi örneği analiz edilirse organizmanın saptanma şansı artmaktadır. Antrumdan iki, korpustan iki biyopsi örneği alınması önerilmektedir (79).

H. pylori narin bir mikroorganizmadır. Kuruma, oksijenle temas ve oda ısısından korunmalıdır. Biyopsi örneklerinin hava ile temas etmemesi gerekmektedir ve kısa süreli transport için (maksimum dört saat) tuzlu su içerisine konulmaktadır (79). Daha uzun (24 saat) saklanacaksa Stuart, Portagerm pylori (bioMérieux, France) gibi transport ortamları kullanılmalı ve 4°C'de saklanmalıdır (79, 187). Biyopsi örneği 24 saatten uzun süre saklanacaksa -70°C veya sıvı nitrojen kullanılmalıdır (79).

H. pylori'yi kültürde üretebilmek için agar bazlı, üremesini ve seçiciliğini arttıran katkılar içeren besiyerleri mevcuttur. Beyin kalp infüzyon agar, Columbia agar ve Wilkins Chalgren agar *H. pylori* kültüründe kullanılan besiyerleridir. At kanı, at serumu veya koyun kanı, çeşitli besinler (vitaminler ve oligoelementler) ve üreme katkıları (yumurta sarısı, aktif kömür, nişasta, sığır serum albumini, katalaz) *H. pylori* üremesini arttırmaktadır. Demir sülfat, sodyum pürivat, domuz musini *H. pylori* üremesini arttırmakta olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, kan içermeyen izovitaleks (%2) ve hemin (10 mg/l) içeren ve ayrıca bu besiyerinin

içerisine üreaz pozitif kolonilerin identifikasyonu için üre (20g/lt) ve bir pH indikatöründe (fenol red) eklenen bir besiyeride bildirilmiştir (79). 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorid (40mg/lt) *H. pylori* kolonilerinin identifikasyonu için kullanılan bir diğer suplemandır (79, 192). Besiyerine, Gram pozitif kokların inhibe edilmesi için vankomisin ya da teikoplanin, Gram negatif basilleri inhibe eden polimiksin, nalidiksik asit, kolistin, trimetoprim ya da sefsulodin ve fungusların inhibe edilmesi için nistatin ve amfoterisin B besiyerine eklenmektedir. En çok kullanılan sefsulodin yerine polimiksin ve amfoterisin B içeren Skirrow formül modifikasyonlu DENT katkısı ticari olarak elde edilebilmektedir (79).

H. pylori mikroaerofilik şartlarda üreyebilmektedir, bu ortamı sağlamak için mikroaerobik kabin ya da inkübatörler, jar içerisinde atmosferi sağlayan otomatik aparat (Anoxomat, MART Microbiology BV, Netherland) ya da gaspackler (CampyPak Plus, BD Diagnostics Systems, Sparks, Md ve Anaxopack-Campylo, Remel, Lenexa, Kans) kullanılmaktadır. Optimal kültür sıcaklığı 37°C'dir. Uygun şartlar altında kültürde üç-dört gün sonra koloniler görülebilmektedir. Ancak kültür negatif sonuç için yedi-on gün beklenmesi gerekmektedir (42, 79). Siavoshi ve arkadaşları iki mukoid *H. pylori* suşunun mikroaerobik ve aerobik şartlarda 24 saat enkübasyondan sonra üreyebildiğini ve bunların metronidazol (32 µg/mL), tetrasiklin, klaritromisin, amoksisilin ve furazolidon (4 µg/mL) antimikrobiyallerine karşı yüksek konsantrasyonda direnç gösterdiğini bildirmişlerdir (58).

Maastricht III ve Maastricht IV Sonuç Raporu'na göre, primer klaritromisin direnci %20'den yüksek olan coğrafik bölgelerde *H. pylori* kültürü ve antimikrobiyal tanı testleri uygulanması gerektiği bildirilmiştir (26, 191). Ayrıca ilk eradikasyon tedavisi başarısızlığından sonra ikinci basamak tedavi uygulanmadan önce bütün bölgelerde kültür uygulanması önerilmiştir (191).

H. pylori tanısında kültür altın standart yöntemlerden biridir (192). İki önemli avantajı vardır: Antimikrobiyal duyarlılık testlerine olanak sağlar ve suş tiplendirme yöntemlerinde, virulans karakteristikleri için ileri araştırmalarda kullanılabilir (79, 187). Sefsulodin, trimetoprim, vankomisin ve amfoterisin antibiyotiklerini ve 2,3,5 tetrazolium klorid içeren Egg Yolk Emülsiyon Agar *H. pylori*'nin primer izolasyonunda oldukça duyarlı (%95) bir besiyeri olduğu bildirilmiştir (192). Biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin hızlı izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için antibiyotikli %5 at serumlu Ham's F12 sıvı kültür ortamı geliştirilmiştir (79, 188, 189). Kültür indikasyon ortamı (CIM), sıvı ortamda *H. pylori* kültürü ile ilgili olarak varolan problemleri çözmek için kullanışlı bir solüsyondur

(188, 189). Serum proteinleri varlığında, CIM 10^3 koloni oluşturan ünite (CFU)/ml minimum başlangıç inokulasyonu ile 48-96 saatte üremeyi sağlamaktadır Klinik materyalden sıvı kültürler elde edildikten sonra metronidazol ve klaritromisin için duyarlılığı için kullanılabilir (189). Albu-MAX II® olarak adlandırılan yüksek oranda pürifiye edilmiş lipidçe zengin bovin serum albumin içeren sıvı ortamın *H. pylori* üremesinde kullanılabilirliği gösterilmiştir (96).

Antimikrobiyal duyarlılık testi için disk difüzyon, E test, agar dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. *H. pylori* duyarlılık testlerinde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından agar dilüsyon yöntemi önerilmektedir (80, 187, 193).

2.6.1.5. Moleküler Tanı Yöntemleri

2.6.1.5.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

PCR mide biyopsi, tükürük, dental plak, gastrik sıvı, dışkı gibi klinik örneklerden *H. pylori*'nin tanısında kullanılır (79, 94, 187, 194, 195). PCR, tedavinin etkinliği ya da ciddi hastalık gelişimi ve suşlarda potansiyel virulans faktörlerinin varlığı hakkında bilgi vermektedir (187). Moleküler testlerin muhtemel klinik kullanım alanları; tedavi sonrası nüksü, re-enfeksiyondan ayırma, bakteri sayısının az olduğu gastrik sıvı, dental plak, dışkı gibi örneklerden tanımlama ve klinik önemi olan DNA mutasyonlarını saptamadır (195, 196). Ayrıca *H. pylori*'nin spesifik patojenik faktörleri (*cag* PAI, *vacA*), aderans genleri (*babA2*, *sabA*) yada patojenite genlerinin (*oipA*, *dupA*, *ice A*) saptanabilmesi için de kullanılmaktadır (79).

2.6.1.5.2. Real-time Polimeraz Zincir Tepkimesi (Real-time PCR)

Real-time PCR 23S rRNA'nın peptidiltransferaz bölgesinde bulunan A2142C, A2142G ve A2143G nokta mutasyonlarıyla oluşan klaritromisin direncinin direkt olarak ve kısa sürede saptanmaktadır (79, 197). Hedef gene spesifik primerler, mutasyon bölgesine hibridize olan 5' ucunda LC-Red 640 ile işaretli sensor prob ve 3-5 nükleotid altındaki bölgeye hibridize olan 3' ucu florosein ile işaretli anchor probu kullanılmaktadır. Anchor prob floroforu uyarıldığında, floresan rezonans enerji transferi aracılığı ile enerji sensor proba transfer olmakta ve bir sinyal yaymaktadır. Nokta mutasyonlarını ya da polimorfizmi saptamak için melting curve analizi kullanılmaktadır (79). *ureA* ve insan β globulinin amplifikasyonu için

yeni bir multipleks floresans rezonans enerji transfer Real-time PCR, gastrik biyopside *ureA*/β globülin oranını belirleyerek bakteriyal dansitenin kantifikasyonuna izin vermektedir. Bu test kullanılarak sağlıklı mide ile karşılaştırıldığında makroskopik erozyonlarda bakteriyal dansitede artış gözlenmektedir. Bir diğer real-time reverse transkriptaz PCR ve *in situ* hibridizasyon yönteminde geniş miktarda *H. pylori* suşlarında yüksek olarak korunmuş 76 bp *H. pylori* 16S rRNA'sı hedeflenmiştir, insandan, hayvandan ve çevresel kaynaklardan *H. pylori*'nin spesifik saptanması, identifikasyonu ve kantifikasyonu için kullanılabilen kombine duyarlı ve spesifik yöntemlerdir. *ureC*'nin termofilik helikaz bağımlı izotermal amplifikasyonu ve *H. pylori* DNA'sının kolorimetrik saptanması ve hibridizasyon için altın nanopartikül probolar kullanılarak nanodiagnostik metod geliştirilmiştir. Bu metod bir saatten az bir zamanda 10 CFU/mL saptayabilmekte ve kültür ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %92.5 spesifikliği %95.4 olarak bulunmuştur (188).

2.6.1.5.3. Dual Priming Oligonükleotid Polimeraz Zincir Tepkimesi (DPO-PCR)

DPO-PCR, nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloklandığı ve bozuk primer ipliklerinin elemine edildiği için konvansiyonel PCR ile karşılaştırıldığında, duyarlılığı ve spesifikliği yüksek multipleks bir PCR yöntemidir (96, 198). DPO-PCR yöntemi, DPO patent teknolojisini kullanan multipleks PCR temeline dayalıdır. DPO primerleri yapısı esasında konvansiyonel primerlerden farklıdır (198). DPO primeri tek basamaklı PCR testi kullanılarak tek nükleotid polimorfizmlerin saptanması için geliştirilmiştir (199). Aslında, primer 55-65°C arasında daha spesifik bir hibridizasyona olanak tanıyan bir 5 polideoksinosin bağlayıcı ile iki kısma ayrılmaktadır. Bu bağlayıcı balon şeklinde bir yapı oluşturmakta ve iki kısım arasındaki sınırı çizmektedir. 5' ucu (yaklaşık 20 baz) matrikse bağlanmakta ve "dengeleyici" olarak bağlanmayı başlatmaktadır. Kısa 3' ucu (yaklaşık 10 baz) ilk basamakta mismatch yoksa hedef bölgeye bağlanmaktadır, hedef spesifik uzamayı belirler ve "belirleyici" olarak görev yapmaktadır. Böylece, uzun 5' segment hedef olmayan bölgeye bağlanmasına rağmen, kısa segment spesifik olmayan uzamaya karşı koymaktadır. Kısa 3' kısım tek başına bağlanma sıcaklığı hazırlığında başarısız olmaktadır. Sonuncusu tercihen hedefe bağlanır ve spesifik olmayan bağları engellemektedir. Bu PCR herhangi bir konvansiyonel termocyclerda gerçekleştirilebilmektedir. Seeplex® ClaR-*H. pylori* ACE detection kit kullanılarak *H. pylori* varlığı ve A2142G ve A2143G nokta mutasyonlarının neden olduğu makrolid direncinin saptanmasında DPO-PCR yöntemi uygulanmaktadır. DPO-PCR yönteminin duyarlılığı %97.7

özgüllüğü %83.1 olarak bildirilmiştir (198). DPO-PCR yöntemi real-time FRET-PCR ve E-test yöntemi ile iyi korelasyon göstermektedir (198, 199).

2.6.1.5.4. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

H. pylori'nin saptanması ve klaritromisin direncinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemdir. 16S rRNA ve 23S rRNA genlerini hedefleyen floresan işaretlenmiş oligonükleotid problemleri kullanılmaktadır. *In situ* hibridizasyon virulans faktörlerin saptanması ve özellikle gastrik mukozada suşların tam olarak lokalizasyonunun saptanmasına da olanak tanımaktadır (200).

2.6.1.6. Moleküler Genotiplendirme

Tıbbi olarak önemli birçok bakteri türü gibi *H. pylori*'de biyokimyasal testler (biyotiplendirme), yüzey yapısal özellikleri (serotiplendirme) veya genetik özelliklerine göre (genotiplendirme) alt gruplara ayrılır. *H. pylori*'nin tiplendirme yöntemleri özellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca aşı çalışmalarında da farklı coğrafik bölgelerde bulunan *H. pylori* türlerinin özelliklerinin belirlenmesinde yararlanılmaktadır (201).

Konak hücreler ile bakterinin eş zamanlı genotiplendirmesi örnek miktarının küçük olması nedeniyle bazen zor olmaktadır. PCR temelli genotiplendirmede amplifiye DNA, hem *H. pylori* 16S rRNA, *vacA*, *hsp60*, *ureI*, *sod*, *ureA* ve *cagA* hem de insan sitokin polimorfizmi için kullanılmaktadır. Gastrik biyopsi örneklerinde, *cagA* Doğu Asya EPIYA motif genotiplendirmesi için bu motiflere karşı monoklonal antikorlar kullanılarak hazırlanan yeni testin duyarlılık %93.2 ve spesifiklik %72.7 saptanmıştır. Optimizasyonu yapıldıktan sonra *cagA* tiplendirme metodu olarak kullanışlı olacaktır (188).

2.6.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler

2.6.2.1. Üre Nefes Testi (UBT) (^{13}C ve ^{14}C UBT)

UBT altın standart yöntemlerden biridir (43). Ağız yoluyla alınan işaretli üre, *H. pylori* ile enfekte kişilerde midedeki bakterinin üreaz enzimi tarafından hidrolize edilmektedir. Oluşan işaretli CO₂ kan ile absorbe edilmekte ve solunum havasında salınmaktadır. Kişi *H. pylori* ile enfekte değil ise, işaretsiz CO₂ üretilmekte ve izotopların çoğu idrar ile

atılmaktadır. ^{13}C üre kullanıldığında, örnek test yapılmadan önce ve sindirimden 30 dk sonra toplanmaktadır. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranı her iki örnekte de ölçülmektedir ve sonuçlar bu iki ölçüm arasındaki farka göre ölçülmektedir. Bireyin diyetine göre nefesinde varolan ^{13}C miktarına bağlı olarak bazal değere gereksinim duyulmaktadır. Sonuç her 1,000'de DOB (delta over baseline) olarak verilmektedir. ^{14}C üre kullanıldığında örnek toplama yalnızca sindirimden 20 dakika sonra olmaktadır (79). ^{13}C doğal olarak elde edilen kararlı bir izotop olduğundan çocuklarda ve hamilelerde kullanılabilir (187).

UBT yüksek doğrulukta ve tekrarlanabilir bir testtir. Duyarlılığı (~% 95) ve özgüllüğü oldukça yüksek tanı testi olmasının yanı sıra; eradikasyon tedavisinin izleminde de kullanılmaktadır. Midedeki diğer üreaz olumlu bakteriler (*H. heilmannii*, *Proteus sp.*) olumlu sonuca neden olabilmektedir. Kanamalı ülser varlığında ya da gastrik biyopsi alınımından hemen sonra test yalancı negatif sonuç verebilmektedir (79). Antibiyotik tedavisi, ranitidin bizmut tuzlarının kullanımı veya PPI kullanımı ise yalancı olumsuz sonuçlara neden olabilir (187). Bazı çalışmalarda klaritromisin dirençli *H. pylori* varlığında UBT değerleri daha yüksek bulunmuştur, ancak diğer antimikrobiyalere dirençli *H. pylori* varlığında aynı durum gözlenmemektedir. Atrofik gastritli hastalarda oral kaviteden üreaz pozitif bakteriye bağlı olarak yanlış pozitif sonuç olasılığı bulunmaktadır. Bu yanlış pozitif sonuçları engellemek için kapsül UBT kullanılmalıdır. Altı yaşından küçük çocuklarda da yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bunun nedeni yalnızca endojen CO_2 üretiminin etkisi ile değil aynı zamanda belirlenemeyen faktörlerle de olabilmektedir. Tedaviden dört hafta sonra tek bir UBT uygulanması *H. pylori* eradikasyonu konfirmasyonunda iki seri UBT uygulanması kadar etkilidir, ikinci UBT uygulanması maliyeti arttırmaktadır (188). 2005 yılında Canadian Consensus Raporunda ^{13}C -UBT testinin çocuklarda en uygun ve en güvenilir olduğu, küçük çocuklarda ise daha az tanı kesinliği olduğu bildirilmiştir (135). Maastricht IV Sonuç Raporuna göre, yüksek tanı kesinliğine sahip olması ve kolay uygulanması açısından ^{13}C -UBT testinin *H. pylori* enfeksiyonu tanısında en iyi test olduğu bildirilmiştir (96, 191).

2.6.2.2. Serolojik Yöntemler

2.6.2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

H. pylori enfeksiyonunun kronik bir enfeksiyon olduğunu düşünüldüğünde, sadece IgG saptanmasının dikkate alındığı ve en avantajlı yönteminde ELISA olduğu bildirilmiştir. Ticari testler değişik antijen ekstraktları kullanmaktadır. Yüksek ya da düşük moleküler ağırlıklı

olanların daha spesifik olduğu görülmektedir. Birçok kitin tanı kesinliği >%90 olarak bildirilmiş olup sadece valide edilmiş ticari testler kullanılmalıdır (191).

H. pylori'ye özgül antikorların tespitinde bir serolojik testin yararlılığı kullanılan antijenin içeriğine bağlıdır. Genelde üç tip antijen kullanılmaktadır. Bunlar; tam hücreler ve tam hücre parçaları gibi ham antijenler; glisin ekstraktları ve ısı stabil antijenler gibi hücre fraksiyonları; üreaz ve 120 kDa antijen gibi zenginleştirilmiş antijenlerdir (51). *cagA* veya *vacA*'ya karşı antikor saptamaya yönelik yeni serolojik testler geliştirilmiştir (196). Bu testler *cagA* proteini gibi özgün saflaştırılmış veya rekombinant antijenleri kullanır (51).

Serolojik testler *H. pylori* tanısı için oldukça uygun testler olup, diğer testlerde yalancı negatifliğe neden olabilen midedeki lokal değişikliklerden etkilenmediği bildirilmiştir. Ayrıca, hasta PPI ile tedavi edildiğinde en az iki hafta önceden bunu kesmek mümkün olmadığı durumlarda valide edilmiş bir IgG seroloji testi (ELISA) kullanılabilir. Bu test antimikrobiyal ve antisekretuarların yakın süreli kullanımında olduğu gibi kanamalı ülserler içinde kullanılabilir (96, 191).

Serum pepsinojen testleri *H. pylori* ile enfekte hastalarda gastrik preneoplastik durumların önlenmesi için klinik olarak kullanışlıdır. *H. pylori* serolojisinde hem serum pepsinojen I/II oranı hem de gastrin 17 (G17) saptanabilmektedir. CagA serum PGI ve PGI/II oranında azalma ile ilişkilidir. Gastrik atrofinin serolojik değerlendirilmesi intestinal tip gastrik kanser riskine maruz kalmanın belirlenmesi için uygun olduğu bildirilmiştir (96).

2.6.2.2.2. Westernblot

“İmmunoblotlama” teknikleri ile başlıca hangi antijenlere karşı antikor yanıtı oluştuğu gösterilebilir. Bu antijenler CagA antijeni, üreaz alt üniteleri olan UreA ve UreB, ısı-şok proteinleri HspA ve HspB, flagellin alt üniteleri, katalaz, lipopolisakkarit, “current infection marker” ve OMP gibi önemi henüz bilinmeyen bazı antijenlerdir; yüzeyde sunulur veya bakterinin salgısal bileşenleridir. *H. pylori* suşları arasındaki farklılıkların yanı sıra bakteriyle enfekte kişilerdeki bağışık yanıtta da farklılıklar görülür. *H. pylori* tam hücre lizatlarının kullanıldığı Westernblot, bakteriyal antijenlere karşı oluşan antikor profili hakkında daha detaylı bilgi edinmemizi sağlamaktadır (202). Bakteri ortadan kaybolduktan yıllar sonra *H. pylori* etiyolojisini konfirme etmek için Anti-CagA antikorları uzun süre kalıcı antikor olarak tanımlanmıştır. İmmunoblot (Helico Blot 2.1) ile CagA antikorlarının saptanması

başarılı bir eradikasyondan 10 ya da daha fazla yıl sonra hastaların %87'sinde CagA antikorları hala gözlenmektedir (188).

2.6.2.3. Dışkı Örneklerinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

2.6.2.3.1. Dışkı Kültürü

Çeşitli bakterilerin dışkıda bulunması ve *H. pylori*'nin zor üremesi nedeniyle dışkı kültürü zordur; bunun için en iyi şartlar hala bilinmemektedir. Bu yüzden *H. pylori*, *E. coli*, *Shigella spp*, *Salmonella spp* veya *V. cholerae* gibi diğer kültürde kolay üretilen enterik bakterilerden farklıdır (203). 1992'de Thomas ve arkadaşları Gambiya'da malnütrisyonlu bebeklerin dışkılarından ve erişkinlerin diyareli dışkılarından yaptıkları kültürde *H. pylori*'yi üretmeyi başarmışlardır. Dışkı kültüründe *H. pylori*'nin üretilmesi bakterinin canlı formunun dışkıda bulunduğunu göstermiştir. İnsan dışkısı yüksek oranda safra asitleri içerir ve *H. pylori* safra tuzlarına özellikle deoksikolik asite duyarlı olduğundan dışkıdan izolasyonu güçtür (79). İntestinal flora ve onun ürünleri, barsaktan geçiş zamanı, dışkının içeriği ve saklama koşulları gibi diğer faktörler de önemlidir. *H. pylori*'nin dışkıdaki formu ve canlılığı konusundaki bilgiler henüz kesinlik kazanmamıştır. Bakteri *in vivo*, spiral veya kıvrımlı basil şeklindedir. *In vitro* deneylerle safra asitlerinin bakterinin morfolojisini küresel şekle dönüştürebildiği gösterilmiştir. Duodenum ve kolondaki anaerobik ortam da *H. pylori*'nin küresel veya kok yapısına dönmesine neden olabilir. Eski kültürlerde de bakteri kok yapısına dönebilir ki bu formun da canlı ve dinlenen form olduğu gösterilmiştir. Kok yapısının patolojik önemi hakkında çelişkili açıklamalar mevcuttur (5). Dışkı kültürünün duyarlılığını arttırmak için örnekteki safranin inaktive edilebilmesi için kolestiramin kullanılması gerekmektedir. Doku temelli testler ve dışkı antijen testi ile karşılaştırıldığında dışkı kültürünün duyarlılığı %21 özgüllüğü ise %100 olarak bildirilmiştir (204).

2.6.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri

Poliklonal ve monoklonal anti-*H. pylori* dışkı antijen testleri kullanılmaktadır. Dışkıda poliklonal anti-*H. pylori* antikorları ile kaplı ELISA testi ve HpSA dışkı antijen testi bulunmaktadır. Avrupa'da 11 endoskopi ünitesi ile yapılan çok merkezli yapılan çalışmada, UBT'nin duyarlılığı %95.3 ve özgüllüğü %97.7 saptanırken, dışkı antijen testinin duyarlılığı %94.1, özgüllüğü %91.8 olarak saptanmıştır. Monoklonal antikorların kullanıldığı Femtolab,

Amplified-IDEA-HpStar ve Immunocard STAT HpSA testleri poliklonal antikorların kullanıldığı testlere göre sabit reaktif kalitesine sahiptir, testler arası değişikliklerden daha ziyade çok iyi çoğalabilirlik özelliğinde ve elde edilen optik dansiteler belirgin olarak daha yüksektir (79). Poliklonal enzim immunoassay (EZ-STEP *H. pylori*) atrofik gastritli ve intestinal metaplazili hastalarda güçlü tanı performansına sahip olduğu ve TestMate pylori enzim immunoassay®'in ise PPI kullanımı esnasında bile güvenilir ve kullanışlı bir test olduğu bildirilmiştir (96). Dışkı antijen enzim immunoassay için *H. pylori*'nin alkil hidroksiperoksit redüktaza (AhpC) karşı basit hızlı ve maliyet etkin poliklonal antikor üretimi bildirilmiştir. Monoklonal antikor temelli, dışkıda antijen immunoassay (Premier Platinum HpSA PLUS) test duyarlılığı %96.6 ve özgüllüğü %94.9 olarak bildirilmiştir (188). Katalaza karşı monoklonal antikorların kullanıldığı Rapid TPAg hızlı bir dışkı antijen testidir. *H. pylori* eradikasyonunun belirlenmesi için Rapid TPAg tanı kesinliği %98 olarak saptanmıştır (96).

Dışkı antijen testlerinin bazı kısıtlılıkları vardır. Barsak hareketlerinin etkisi henüz detaylı olarak çalışılmamıştır. Temelde kabızlık antijenin parçalanmasına neden olurken, önemli bir dilüsyon faktörü var olmadıkça, kısa bir geçiş zamanında değiştirilmemiş antijenin eliminasyonu söz konusudur. Deneysel örnekte en düşük konsantrasyon yalnızca 24 saat bekletilme sonrasında saptanamayabilir. Örneğin mukolitik ajan *N*-asetil sistein ile muamele edilmesi testin duyarlılık ve özgüllüğünü azaltmaktadır. Pozitif örneğin saptanması için cut-off değerinin belirlenmesi önemlidir. Bu testler oldukça spesifik olmasına rağmen, nadiren dışkıda nadir bulunan diğer *Helicobacter* türlerinin de saptayabilmektedir (79).

Üst gastrointestinal kanamalı hastalarda, HUT ve UBT yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Demiray ve arkadaşları iki farklı monoklonal dışkı antijen testini (Rapid STRİP!HpSA ve Simple *H. pylori* antijen kaset test) karşılaştırmışlar. Rapid STRİP!HpSA testinin duyarlılığı %60 spesifikliğı %86, Simple *H. pylori* antijen kaset testinin duyarlılığı %33 ve spesifikliğı %86 saptanmıştır. Bununla birlikte Rapid STRİP!HpSA testinin üst gastrointestinal system kanamalı hastalarda *H. pylori* enfeksiyonunun saptanmasında ve eradikasyon kontrolünde rutin tanı testi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (34).

Maastrich III Sonuç Raporuna göre, dışkı antijen testinin duyarlılığı %91 ve özgüllüğü ise %93 olarak bildirilmiştir. Dışkı antijen testinin duyarlılığı dışkı iki-üç gün oda ısısında bekletildikten sonra %69'a düşmektedir. Ayrıca, tedaviden en az dört hafta sonra *H. pylori* eradikasyonunun değerlendirilmesinde, UBT'nin yapılamadığı durumlarda monoklonal antikorların kullanıldığı dışkı antijen testi önerilmektedir (26, 200). Maastrich IV Sonuç

Raporuna göre, dışkı antijen testleri için poliklonal antikorlar yerine monoklonal antikor testleri önerilmektedir (96, 191).

2.6.2.3.3. Dışkı PCR

H. pylori'nin genellikle yaşayan tek bakteri olduğu gastrik biyopsi örneklerinin aksine dışkı örnekleri ön PCR adımlarının oldukça önemli olduğu kompleks bir materyaldir. İlk kez PCR yöntemi ile dışkıda *H. pylori* DNA'sı ilk olarak 1993'te Mapstone tarafından saptanmıştır. Bu sonuçlar Van Zwet tarafından tekrarlanamamıştır. Bunun nedeninin az miktarda hedef DNA içermesi ya da PCR inhibitörleri olabileceği düşünülmüştür (79). 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 (5). Monteiro bu inhibitörlerin özellikle sebze orjinli kompleks polisakkaritler olduğu saptanmıştır. 48 saat sebzesiz diyet ile bu inhibitörler elimine edilmektedir. Polisakkarit konsantrasyonu büyük porlu polipropilen filtreler kullanılarak (QIAamp tissue kit ve Xtraction DNA ekstraksiyon kiti-QIAGEN) belirgin olarak azaltılmaktadır. Ayrıca son zamanlarda dışkıdan DNA ekstraksiyonu için uygun olan bir kit (QIAamp DNA stool kit-QIAGEN) geliştirilmiştir. Ayrıca *H. pylori* için spesifik hedeflerin kullanılması gerekmektedir çünkü dışkıda *H. cinadei*, *H. pullorum* ve *H. canis*'de bulunabilmektedir (79). Ayrıca, dışkıda *H. pylori* varlığı kolay uygulanabilen kısa sürede sonuç veren yeni bir noninvaziv yöntem olan "basit dışkı PCR" metodu ile saptanabilmektedir (205).

2.6.2.3.4. Dışkı Nested PCR

Dışkı örneklerinde klaritromisin direncinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kültür izolatları, gastrik sıvı ve dışkı örnekleri arasında *H. pylori* klaritromisin direncinin saptanması benzer bulunmuştur. Kültür ile karşılaştırıldığında, dışkı nested PCR tekniğinin duyarlılığı %96.3 spesifikliğı ise %91.3 olarak bulunmuştur (195).

2.6.2.3.5. Dışkı Real Time PCR

Biprob teknolojisi kullanılarak dışkı örneklerinde *H. pylori* enfeksiyonunun saptanması ve klaritromisin direncinin belirlenmesinde Real-time PCR tekniği kullanılmaktadır (79, 200, 206). *glmM* ve *recA* housekeeping genlerini hedefleyen biprob lar florofor Cy5 ile işaretlenmiş sekans spesifik problemlerdir (206). Dışkı real-time PCR testi (*H. pylori* ClariRes assay) *H. pylori* saptanmasında ve klaritromisin duyarlılığının belirlenmesine olanak tanıyan tek invaziv olmayan testtir. Bu testin *H. pylori* saptanmasındaki duyarlılığı %69, özgüllüğü %100; klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde duyarlılık %83.3, özgüllük %100 saptanmıştır (96).

2.6.2.3.6. Dışkı Genotiplendirme

Dışkı örnekleri kullanılarak noninvaziv genotiplendirme *glmM* ve *recA* genlerini hedefleyen iki *H. pylori* spesifik biprob real-time PCR testi ile olmaktadır. Suşlar arası farklılıklar amplikonların melting ısısındaki farklılıklar ile belirlenmektedir. Dışkı örneklerinde bu testin duyarlılığı %92.2 ve spesifikliğı %100 olarak saptanmıştır. Noninvaziv olması, *H. pylori* suşlarının ayrımında ve saptanmasında yüksek hassasiyeti nedeniyle, bu genotiplendirme testi organizmanın bulaş yolunu aydınlatmaya yardımcı olacak geniş ölçülü çalışmalarda kullanılabilme potansiyeline sahiptir (188).

2.6.2.4. Diğer Örnekler İçin Kullanılan Tanı Yöntemleri

2.6.2.4.1. İdrar Antikor Testleri

İdrarda *H. pylori*'ye karşı IgG antikorlarını saptamak için ELISA ve immunokromatografik testler kullanılmaktadır (42). Japonya'da iki çeşit ticari test geliştirilmiştir: standart ELISA (Urinelisa, Otsuka, Tokyo, Japan) ve immunokromatografik test (Rapirun, Otsuka, Tokyo, Japan) (42, 79). İdrarda *H. pylori* IgG'sinin saptanması; non invaziv, kolay, hızlı, ucuz olması nedeni ile avantajlıdır (79). İdrarda *H. pylori* IgG antikorlarının saptanmasında duyarlılık %92.3, özgüllük %89.7 olarak bildirilmiştir (42). İdrar testinin doğruluğu ne pH'a ne de idrarda bakterinin varlığına bağlı değildir. Yüksek bir total IgG yalancı olumsuz sonuçlara neden olabilmektedir ve düşük bir total IgG ise yalancı olumlu sonuçlara neden olabilmektedir; ayrıca idrar analizi anormal olan hastalar dışlanmalıdır. Bir diğer kritik nokta ise dondurulmuş örnek değil taze idrar örneğinin analiz

edilmesi gerekmektedir. Dondurulup çözülmüş örneklerde protein presipitasyonu olabilmekte ve testin duyarlılığını azaltmaktadır (42, 79). Test taze örneklerle uygulanmalı ya da bir koruyucu eklenmelidir (42).

İdrar temelli EIA testleri non invaziv, örnek toplanmasının basit, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle avantajlıdır (26). İdrar EIA testlerine direk uygulanabilmekte ve 20 dakika kadar kısa bir sürede sonuç verilebilmektedir. İdrar temelli immunotestler tarama için uygundur ve geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalar *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansını etkiler (207, 208).

2.6.2.4.2 Tükürük Antikor Testleri

Enfeksiyöz ajanlara karşı immün yanıt sırasında tükürük antikorları salgılanmaktadır. İlginçtir ki, *H. pylori*'ye karşı spesifik IgA saptanması enfekte olan ve olmayan bireyleri ayırt edemeyebilmektedir, fakat IgG saptanması bu ayırımı yapabilmektedir. Tükürük testi Helisal (Cortecs Diagnostics, Deeside, United Kingdom) ve Oralfluid ELISA (Enteric Products, Stony Brook, NY) testleri ticari olarak mevcuttur. Bu testlerin duyarlılık ve spesifikliği çok düşüktür. En iyi sonuç serum titresi yüksek olan duodenal ülserli hastalarda veya beş yaşından büyük çocuklarda gözlemlenmiştir. Serum ve tükürükten elde edilen titreler arasında iyi bir korelasyon olduğu saptanmıştır (79).

2.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Tedavisi

H. pylori enfeksiyonunun kolaylıkla tedavi edilemediği ve çoklu ilaç tedavisine gereksinim duyulduğu bildirilmektedir. Birçok tedavi rejimi klinik olarak basit ve başarılı olmasına rağmen, tedavi başarısızlığı gözlenebilmektedir (43).

İdeal tedavi; ucuz, yüksek oranda başarı gösteren, uygulaması kolay, iyi tolere edilebilmesi ve çok az yan etki gözlenmesi gibi özelliklere sahip olmalıdır. Tüm bu kriterlere sahip olan tedavi rejimi olmamasına rağmen, tedavilerin çoğu iyi tolere edilebilir ve etkilidir (43). Maastricht III konsensus raporunda eradikasyon tedavisi rejiminin etkili olabilmesi için %80'den fazla eradikasyon oranı elde edilmesi gerektiği bildirilmiştir (209).

2.7.1. Tedavide Kullanılan Ajanlar

H. pylori ile ilişkili hastalıkların tedavisinde temel olarak asit giderici, antisekretuar ajanlar ve antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır (43). Her beş yılda dünya çapında ulusal

uzmanların birlikteliğinde (Maastricht Consensus, 2010) revise edilerek *H. pylori* için tedavi opsiyonları tanımlanmakta ve *H. pylori* antibiyotik direnç problemine karşı empirik tedavi önerilmektedir (10).

H₂ reseptör antagonistleri geniş kullanımı olan antisekretuar ajanlardır. Parietal hücrelerde H₂ reseptöründe histaminin geri dönüşümlü inhibitörleridir. H₂ reseptör antagonistleri *H. pylori*'ye karşı antibakteriyal aktivite göstermezler (43).

PPI, gastrik parietal hücrelerin luminalinde hidrojen potasyum ATPaz pompasında asit sekresyonunu bloke etmektedir. Bu pompa, hidrojen iyonlarının gastrik lümene salınması ve gastrik salgının düşük pH çevresel karakteristiğini yaratarak parietal hücre mikrovillus membranında karşılıklı hidrojen ve potasyum değişimini sağlamaktadır. PPI intraluminal gastrik pH'yı arttırarak ATPaza bağlanmakta ve inhibe etmektedir. PPI *H. pylori*'ye karşı direkt antibakteriyal aktiviteye sahiptir fakat tek başına kullanıldığında enfeksiyonu tedavi edememektedir (43).

H. pylori *in vitro* olarak çoğu antimikrobiyale duyarlıdır ancak *in vivo* olarak yalnızca çok az bir antibiyotik enfekte hastaları tedavi edebilmektedir. Gastrik mukus tabakasında uygun düzey ilacın yetersizliği, düşük pH'da ilaçların inaktivasyonu, *H. pylori*'nin yavaş üremesi gibi nedenlerden dolayı *in vivo* olarak antibiyotiklerin aktivitesinde eksiklik görülmektedir (210).

H. pylori enfeksiyonu tedavisinde fiyat, etkinlik, yan etkiler, toplumdaki antibiyotik direnci, doz, kullanım süresi, pH uygun tedavi seçiminde yer almaktadır (43).

1996'dan beri *H. pylori* eradikasyonu için PPI ile iki antibiyotik kombinasyonu birinci basamak tedavi olarak kullanılır. Avrupa ve Kuzey Amerika'da yayınlanan kılavuzlarda önerilen birinci basamak tedavi PPI ile amoksisilin ve klaritromisin kombinasyonunu içermektedir. Bu tedavinin 14 gün kullanılması yedi günlük tedaviye göre daha avantajlıdır. 2000 yılına kadar yapılan çalışmalarda standart üçlü tedavinin eradikasyon oranının %90'ın üstünde olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda bu düzey %60-70'e düşmüştür. Maastricht III Consensus raporuna göre, klaritromisine karşı direnç %15-20 üzerinde ise klaritromisin yerine metronidazol kullanılması önerilmektedir. Klaritromisin duyarlı suşlarda bu rejimin eradikasyon oranı %87.8, klaritromisin dirençli suşlarda %18.3 saptanmıştır. Klaritromisin direncinin artması solunum yolu enfeksiyonu için toplumda çok fazla miktarda klaritromisin kullanılması ile ilişkilidir (135).

2.8. Antimikrobiyal Direnç

2.8.1. Antimikrobiyal Direncin Prevalansı

H. pylori enfeksiyonunun tedavisi oldukça zordur. Tedavi başarısızlığının bazı nedenleri hastanın tedaviye uyumsuzluğu, *H. pylori*'de antibiyotik direnç varlığı, zayıf etki ya da antibiyotik konsantrasyonudur (76, 86). Tedavi başarısızlığı ve diğer faktörler arasındaki ilişki tedavi rejimleri arasında farklılık gösterebilir. Örneğin, PPI ve amoksisilini içeren ikili tedavi sigara içmek gibi eksternal faktörlere çok duyarlıdır. *H. pylori*'de antibiyotiklere karşı direncin kromozomal ilişkili olduğu ve izolatların yarısında plazmid bulunmasına rağmen, plazmid aracılı olmadığı bildirilmiştir (86).

H. pylori'de antibiyotik direnci tedavi başarısızlığının temel nedeni olduğundan antibiyotik direncinin saptanması önemlidir. *H. pylori*'nin antibiyotik direncinin saptanmasında gradiyent difüzyon (E-test), agar dilüsyon ve disk difüzyon gibi kültür temelli fenotipik metotlar kullanılmaktadır. Ancak bu metotlar zaman alıcıdır (197, 210). Hücre geçirgenliği, inokülasyon miktarı, enkübasyon şartları ve büyüme ortamı gibi faktörler sonucu etkileyebilir. Moleküler temelli metotlar bu faktörlerden bağımsızdır ve bu nedenle kültür temelli yöntemlere alternatif yöntemlerdir. Ayrıca, kültür temelli testlerden daha hızlıdır ve gastrik biyopsi örneklerine direkt olarak uygulandığı zaman, sonuç endoskopinin yapıldığı gün elde edilebilmektedir (210).

H. pylori glikopeptitler, sefsulodin, polimiksinler, nalidiksik asit, trimetoprim, sülfonamidler, nistatin, amfoterisin B ve sikloheksimide intrinsik dirençlidir. Bunlardan bazıları izolasyon ortamında seçici ajan olarak kullanılmaktadır. Vahşi tip suşlar β -laktamlar (sefsulodin hariç), fosfomisin, makrolidler, aminoglikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikoller, rifampinler, florokinolonlar, 5-nitroimidazoller ve nitrofuranlara duyarlıdır (79).

H. pylori'de antibiyotik direnci artış göstermektedir. Metronidazol direnci [Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) $\geq 8\text{mg/L}$] *H. pylori*'de en yaygın antimikrobiyal dirençtir. Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori*'de metronidazol direnç oranı yüksek olmasına karşın, endüstriyelleşmiş ülkelerde *H. pylori* suşlarının yaklaşık %35'i metronidazol dirençlidir ve bazı bölgelerde ise çoğu *H. pylori* suşları metronidazol dirençlidir. Bu direnç, gelişmiş ülkelerde jinekolojik ve dental enfeksiyonlarda yaygın kullanılmaktadır, gelişmekte olan ülkelerde ise paraziter hastalıklarda nitroimidazol ve metronidazolün yaygın kullanımıyla ilişkilidir (210).

Metronidazol direnci ile karşılaştırıldığında, *H. pylori*'de klaritromisin direncinin prevalansı ($MİK \geq 2$ mg/L) çok düşüktür. Gelişmekte olan ülkelerde, klaritromisine karşı direnç oranı daha yüksektir ve %25-50 arasında değişmektedir (210). Klaritromisin direnci Asyada %18.9 (bölgesel farklılıklar görülmekte; Malezya'da %2.1, Japonya'da %40.7) ve Avrupada %10-45 (ilginç olarak güney ve kuzey Avrupa'da coğrafik bölgelerde büyük farklılıklar görülmekte; İsveç'te %1.5, Hollanda'da %0.8 olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde ise %38.5 oranında olduğu bildirilmektedir (27).

H. pylori'de amoksisilin direnci ($MİK \geq 0.5$ mg/L) ve tetrasiklin direncinin ($MİK \geq 4$ mg/L) çok ender olduğu bildirilmiştir. Bu antibiyotiklere karşı direnç diğer bakterilerde ise yaygındır. *H. pylori*'de amoksisilin ve tetrasiklin direncinin insidansının özellikle bu antibiyotiklerin reçetesiz elde edilebildiği belli coğrafik bölgelerde (İtalya, Brezilya, El Salvador, Hindistan ve Litvanya) arttığı görülmektedir. *H. pylori* amoksisilin direnci %72 ve tetrasiklin direnç oranı ise %59 bildirilmiştir (210). Türkiye'de *H. pylori* amoksisilin direnci %15.4 levofloksasin direnci % 26.9 olarak bildirilmiştir (211).

2.8.2. Antimikrobiyal Direnç ve Klinik Etki

Birçok çalışma, antimikrobiyal direncin anti-*H. pylori* tedavisinin başarısını azalttığını göstermektedir. *H. pylori* ilişkili hastalıklarda antibiyotik direnci ile klinik ilişki araştırılmaktadır. *H. pylori* eradikasyonunu azaltan antibiyotik direnci, *H. pylori* suşlarında direnç düzeyi, tedavinin süresi, antimikrobiyal ilaçların dozu ve tedavide kullanılan bileşenler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Birçok çalışmada, metronidazol dirençli *H. pylori* suşu ile kolonizasyonda, metronidazol içeren PPI temelli üçlü tedavinin eradikasyon oranı dirençli suşlarda %73, metronidazol duyarlı suşlarda ise %90 olarak gösterilmiştir. Metronidazol direnci, metronidazol içeren PPI temelli üçlü tedavi ile elde edilen eradikasyon oranlarında geniş bir etkiye sahip olduğu, bu tedavilerle eradikasyon oranı ise dirençli suşlar için %63, duyarlı suşlar için %91 olarak belirtilmiştir. PPI temelli bir tedaviye bizmut bileşeninin ilavesinde tedavinin etkinliği dirençli suşlar için %83, metronidazol duyarlı suşlar için %92 olarak bildirilmiştir. Metronidazol direncine karşı ranitidin bizmut sülfat temelli üçlü tedavi çalışmalarının sınırlı olmasına rağmen, eradikasyon oranları dördütlü tedavide dirençli suşlar için %89, metronidazol duyarlı suşlar için %95'tir (210, 212).

H. pylori'de klaritromisin direncinin prevalansı düşüktür, çoğu çalışmada da klaritromisin direnci dramatik olarak bütün klaritromisin içeren tedavilerin başarısını azalttığı

görülmektedir. Klaritromisin içeren ikili tedavinin (PPI ya da bizmut bileşeni) eradikasyon oranı klaritromisin dirençli suşlar için %33, klaritromisin duyarlı suşlar için %68'den azaldığı bildirilmektedir. Klaritromisin içeren üçlü tedavide ise (PPI ve amoksisilin ya da metronidazol) eradikasyon oranı, klaritromisin duyarlı suşlar için artmasına (%86) karşın, klaritromisin dirençli suşlar için bu oranın azaldığı (%25) belirtilmiştir. Tedavi başarısızlığının amoksisilin ve tetrasiklin dirençli *H. pylori* suşlarının varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir, ancak tedavi başarısında bu dirençlerin etkisinin saptanmasında henüz yeterli bir veri yoktur (210, 213).

2.8.3. Antimikrobiyal Direncin Moleküler Mekanizması

H. pylori'de antibiyotik direnç mekanizmaları nokta mutasyonlarına bağlıdır. Mekanizma horizontal olarak aktarılabilen plazmidleri kapsamamaktadır fakat vertikal olarak aktarılan nokta mutasyonları ve midede eş zamanlı iki suş bulunuyorsa transformasyonu kapsamaktadır (79).

2.8.3.1. Metronidazol Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Metronidazol gastrik sıvı içerisine aktif olarak salınan ve antimikrobiyal etkisini düşük pH'da gösterebilen ve *H. pylori*'ye karşı oldukça etkili bir ilaçtır (210). Mikroaerofilik mikroorganizmalara seçici olarak toksik etkili bir nitroimidazoldür. Metronidazol mikroorganizmanın yıkımı ve sitotoksik ürünlerin üretimine neden olan ilaçların kimyasal olarak reaktif indirgenmiş bir formudur. Metronidazol aktivitesi pH bağımsız olması gastrik çevre için idealdir (43). Metronidazolün bakterisid aktivitesi, DNA helikal yapısını bozabilen hidroksilaminler, nitroso türevleri ve anyonik radikallerde nitro gruplarının azalmasına dayanmaktadır. Bu azalma reaksiyonu elektron transport zincirinin komponentlerinin hücre içi redoks potansiyeline bağlıdır. Elektronlar piruvat oksido redüktaz kompleksi (POR) tarafından üretilmekte ve metronidazol gibi diğer moleküllerin azalmasına neden olan ya flavodoksin ya da ferrodoksine geçmektedir. Bu süreç özellikle metronidazole yüksek oranda duyarlılık gösteren anaerob türlerde aktiftir. Antibiyotik direncinde kazanma elektron taşıyıcılarının aktivitesinin ortadan kalkması ya da azalmasına bağlıdır. Aerob şartlarda anaerob bakterilere karşı metronidazol aktivitesi mekanizması oksijen içermeyen radikallerin üretimine bağlı bulunmaktadır. Hücre içi redoks potansiyeli/oksijen gerilimi *H. pylori* direncinde rol oynamaktadır (214).

Metronidazole karşı direnç tam olarak bilinmemektedir, ancak çeşitli olasılıklar söz konusudur: (i) transport eksikliği, (ii) ilaç modifikasyonu ya da export, (iii) biyolojik hedefin kaybı ya da modifikasyonu, (iv) DNA tamir enzimi aktivitesinde artış ve (v) oksijen radikallerini bulma yeteneğinin artması. Metronidazol direnci, metronidazol aktivasyonunu engelleyerek metronidazol indirgenme bölgesinden oksijen uzaklaştırılması ile ilişkili olabilir. Metronidazolün antimikrobiyal etkisi hedef hücrenin redoks sistemi tarafından metronidazolün indirgenme aktivasyonuna bağlıdır (215). Metronidazol nitroredüktazı kodladığı düşünülen oksijenden etkilenmeyen NADPH nitroredüktaz geni *rdxA* ve metronidazol nitroredüktaz kodlayan gen NADPH flavin oksidoredüktaz gen *frxA* metronidazol direncinden sorumludur (194, 210, 215). *fdxB* (ferrodoksin benzeri protein kodlayan gen) ve *frxA* genlerinin kodlandığı redüktaz inaktivasyonu yüksek düzey direnci arttırmaktadır (194, 214). *frxA* geni metronidazolü DNA'yı parçalayan aktif bir bileşene değiştirmede rol oynar. Yüksek düzey metronidazol dirençli bütün *H. pylori* izolatlarında anlamsız ve/veya frameshift mutasyonlarıyla oluşan *rdxA* ve *frxA* premature kesimi bulunur. Metronidazole karşı orta düzey dirençli izolatlar ya *rdxA* ya da *frxA*'nın tekli premature kesimini içerir. Düşük düzeyli metronidazol dirençli izolatlar *frxA* geninde tek bir anlamsız mutasyon içerir fakat *rdxA*'da spesifik bir değişikliğe neden olmaz. *rdxA* geninde nonsense ve/veya frameshift mutasyonları metronidazol dirençli izolatların %68-78'inde bulunduğu bildirilmiştir (215). *H. pylori* suşlarında metronidazolden sorumlu kompleks efflux sisteminde rolü olduğu bildirilmiştir. *H. pylori*'de farklı antibiyotiklerin salgılanmasını düzenleyen ve birçok hücre içi translokazlar ile ilişkide olan dış membran efflux proteinleri (OEP) varlığı gösterilmiştir (214).

2.8.3.2. Tetrasiklin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Tetrasiklin 30S ribozomal alt üniteye bağlanan *H. pylori*'ye karşı aktif bakteriyostatik bir antibiyotiktir. Ribozoma aminoasil tRNA'nın bağlanmasını engelleyerek, bakteri büyümesi ve protein sentezini inhibe eder (210, 216). Tetrasiklin hidroklorid *H. pylori*'ye karşı ilk etkili tedavi olarak kullanılmıştır. Tetrasiklin aktivitesi gastrik asiditeden bağımsızdır (43). İlaç bağlanmasının yetersizliği ve/veya ilaç efflux'unda artış, ribozomal koruyucu proteinlerin değişimi veya 16S rRNA molekülünün heliks 31 bölgesi ile ilgili olarak tetrasiklin bağlanma bölgesinde mutasyonlar *H. pylori*'nin tetrasiklin direncinden sorumludur (10, 210, 217).

H. pylori'de tetrasiklin direnci için 16S rRNA genlerinde (*rrnA* ve *rrnB*) AGA926-928TTC üçlü baz çifti değişikliğine dayanmaktadır. Bu mutasyon bakteriyal ribozoma tetrasiklin molekülünün bağlandığı noktayı içeren bölgede lokalizedir (79, 210, 216, 217). AGA926-928TTC üçlü mutasyon yüksek düzeyde (≥ 256 mg/L) tetrasiklin direncine neden olmaktadır, bu üç baz arasında AG926-927GT ve A926G/A928C gibi tekli ve çiftli baz mutasyonları düşük düzeyde (1 mg/L ve 4 mg/L) direnç ile ilişkilidir (210, 216, 217).

2.8.3.3. Amoksisilin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Amoksisilin penisilin grubuna ait bakterisidal bir antibiyotiktir. Amoksisilin bir β -laktam antibiyotığıdır. β -laktam direncinde iki temel mekanizma vardır: β -laktam halkasını hidrolize eden β -laktamaz varlığı ve β -laktamların hedefi olan penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklik. Amoksisilin antimikrobiyal aktivitesi pH bağımlıdır, pH artışı ile MİK azalmaktadır. Amoksisilin konsantrasyonu antral mukozada en yüksek, korpus mukozasında ve mukus tabakasında daha düşük düzeyde bulunmaktadır. Amoksisilin, kombinasyon tedavisi içerisinde kullanıldığında etkili bir anti-*H. pylori* ajanıdır (43). Klinik *H. pylori* izolatlarında β -laktamaz aktivitesi gözlenmemiştir bu nedenle PBP'lerde değişiklik *H. pylori*'de olası amoksisilin direncine neden olmaktadır. PBP'ler peptidoglikan sentazdır ve C-terminal bölgesinde transpeptidaz aktivitesi göstermektedir (218). Amoksisilin PBP'ye bağlanarak peptidoglikan sentezini engelleyerek etki göstermektedir (79). Amoksisilin dirençli *H. pylori* suşlarında *pbp-1a* geninde mutasyonlar bulunmaktadır (79, 218, 219). Penisilin transportunun bloklanmasına neden olan Ser-414→Arg aminoasit değişikliği görülmektedir. Amoksisiline karşı tolerans tanımlanmıştır ve olası mekanizma dördüncü PBP'nin (PBP-D) eksik olmasıdır (79).

2.8.3.4. Florokinolon Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

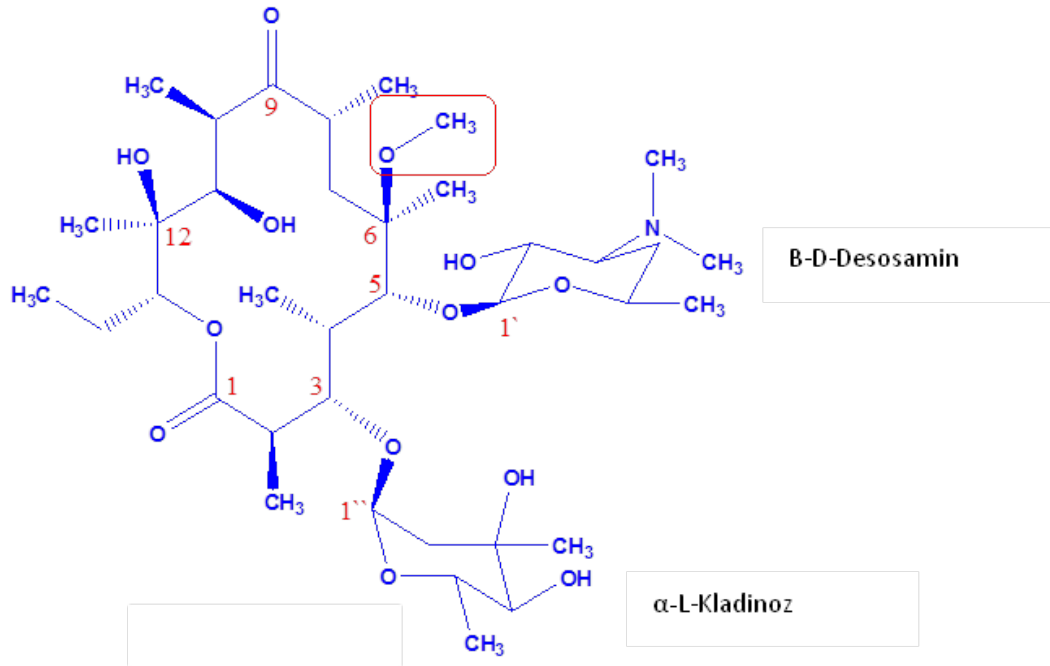
Florokinolonlar, *gyrA* geni tarafından kodlanan DNA girazın A alt ünitesini inhibe etmektedir (10, 79, 220). DNA giraz enzimi, *gyrA* tarafından kodlanan A alt ünitesi ve *gyrB* tarafından kodlanan B alt ünitesini içeren tetramer yapıda bir enzimdir. Bu enzimin temel fonksiyonu replikasyona olanak tanımak için süper kıvrımlı DNA'nın ayrılmasını sağlamaktır (220). *gyrA* geninin 87, 88, 91 ve 97 aminoasit pozisyonunda kinolon direnç belirleme bölgesindeki (QRDR) mutasyonlar ile *H. pylori*'de direnç görülmektedir (10, 79, 210, 221).

2.8.3.5. Rifampisin Aktivitesi ve Direnc Mekanizması

Rifampisin ile yapısal olarak ilişkili rifabutın, DNA bağımlı RNA polimerazın β alt ünitesine bağlanarak bakterinin hem RNA hem de protein sentezini engellemektedir. Bu kompleksin β alt ünitesi *rpoB* geni tarafından kodlanır (222). *H. pylori*'de bu antibiyotiklere karşı direnç *rpoB* genindeki 524, 525, 527, 530, 540, 545, 585, 586 ve 149 pozisyonundaki nokta mutasyonları ile ilişkilidir (78, 193, 209, 221). *H. pylori*'de *rpoB* genindeki aminoasit değişikliği rifampisin direncini indüklemektedir ve mutasyonel rifabutın direnci yüksek düzey rifampin direnci ile ilişkilidir (194, 222).

2.8.3.6. Klaritromisin Aktivitesi ve Direnc Mekanizması

Makrolidler kimyasal olarak 14-16 üyeli lakton (eritronolit) halkası içermektedir (223-226). Onuncu karbondan bir keton fonksiyonu içermektedir, C_3 'e α -glikozidik bağla bağlanan kladinoz ve C_5 'ya β -glikozidik bağla bağlanan desozamin olarak adlandırılan iki şekerden oluşmaktadır. Kladinoz şekeri yan etkilerin oluşmasında etkilidir (227, 228). On dört üyeli lakton halkası içeren makrolidler lakton zincirinin iki yanı arasında hidrofobisite farklılığı ile karakterizedir (225). Klaritromisin makrolidi eritromisinden farklı olarak altıncı karbonunda hidroksil grubu yerine metil grubu içermektedir (Şekil 16) (227-229).



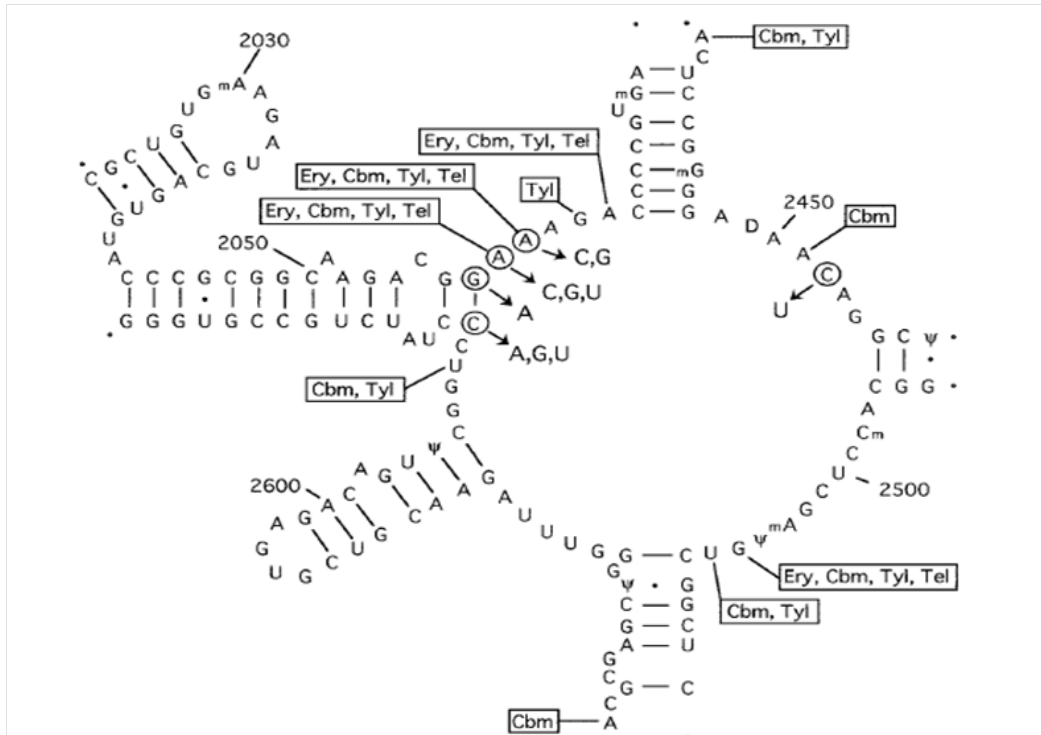
Şekil 16. Klaritromisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı (228)

Makrolidler 70S ribozomun 50S ribozomal alt ünitesine geri dönüşümlü olarak bağlanması sayesinde aminoasit transfer RNA'nın translokasyonunu inhibe ederek antimikrobiyal etkisini göstermektedir. Makrolide karşı mikrobiyal direnç intrinsik ya da kazanılmış özellikte olabilir (36, 223, 230). Fizyolojik pH'da makrolidler düşük derecede iyonizasyon göstermektedir. Gram negatif basillerin ve enterokokların çoğunda bu hidrofobik ilaçlara karşı intrinsik direncin dış membran geçirgenliğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Makrolidlerde kazanılmış direnç üç yolla: (i) hedef bölge modifikasyonu ve ribozomal metilasyona neden olan enzimlerin indüksiyonu ile; (ii) aktif efflux (*Staphylococcus aureus*'da *msrA* ve *msrB*, *Streptococcus pneumoniae*'de *mefE* ve *S. pyogenes*'de *mefA* geni) (PABN, CmeB, Acr-AB-TolC efflux pompası) ile; (iii) bakteriyal enzimler (esteraz, fosforilaz, glikozidaz) tarafından makrolidin hidrolizi ile oluşmaktadır (36, 42, 223, 226, 230, 231). Ribozomal hedef bölge modifikasyonu *erm* (eritromisin ribozomal metilaz) genlerinden (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR*) birinde ya da L4 ve L22 ribozomal proteinlerinde meydana gelmektedir (36, 223, 224, 226, 227, 232). Bu genler makrolid, linkozamid ve streptogramin tip B antibiyotikleri ile etkileşimde olan 23S ribozomun korunan bölgesinde spesifik adenin rezidüsünün metilasyonu ile ribozomu modifiye etmektedir. Makrolid, linkozamid ve streptogramin (MLS) direnci tipik olarak bütün makrolidlere karşı yüksek düzey direnç ile ilişkilidir (223, 233).

Bakterilerde 70S ribozom, küçük bir 30S alt ünitesi ve büyük bir 50S alt ünitesinden oluşmaktadır. Herbir alt ünite rRNA ve ribozomal proteinler içermektedir (234). Protein sentezinde başlangıç aminoasidi taşıyan aminoasit tRNA mRNA dizisine bağlandığında ribozomun 30S alt birim ve 50S alt birimde birleşerek başlangıç kompleksini oluştururlar (227). Bir diğer aminoasidi taşıyan aminoasit tRNA, A bölgesine gelir ve P bölgesindeki aminoasit ile aralarında peptit bağı oluşturur. Ribozom mRNA üzerinde hareket eder ve aralarında peptit bağı oluşan iki aminoasiti taşıyan aminoasit tRNA P bölgesine kayar ve yeni bir aminoasidi taşıyan tRNA'nın bağlanabilmesi için A bölgesini boşaltır (230, 234). Klaritromisin sahip olduğu kladinoz şekeri ile 50S alt ünitenin peptidil transferaz bölgesinin V domainine 2142, 2143 ve 2144 pozisyonlarındaki klaritromisin bağlanma bölgelerine hidrojen bağı oluşturarak bağlanır. Makrolid bağlanma bölgesi peptidil transferaz merkezi yanında peptit çıkış tüneli içerisinde 50S ribozomal alt ünitesinde lokalize olarak bulunmaktadır. Klaritromisin antibiyotiği bağlandıktan sonra, aminoasidi taşıyan aminoasit

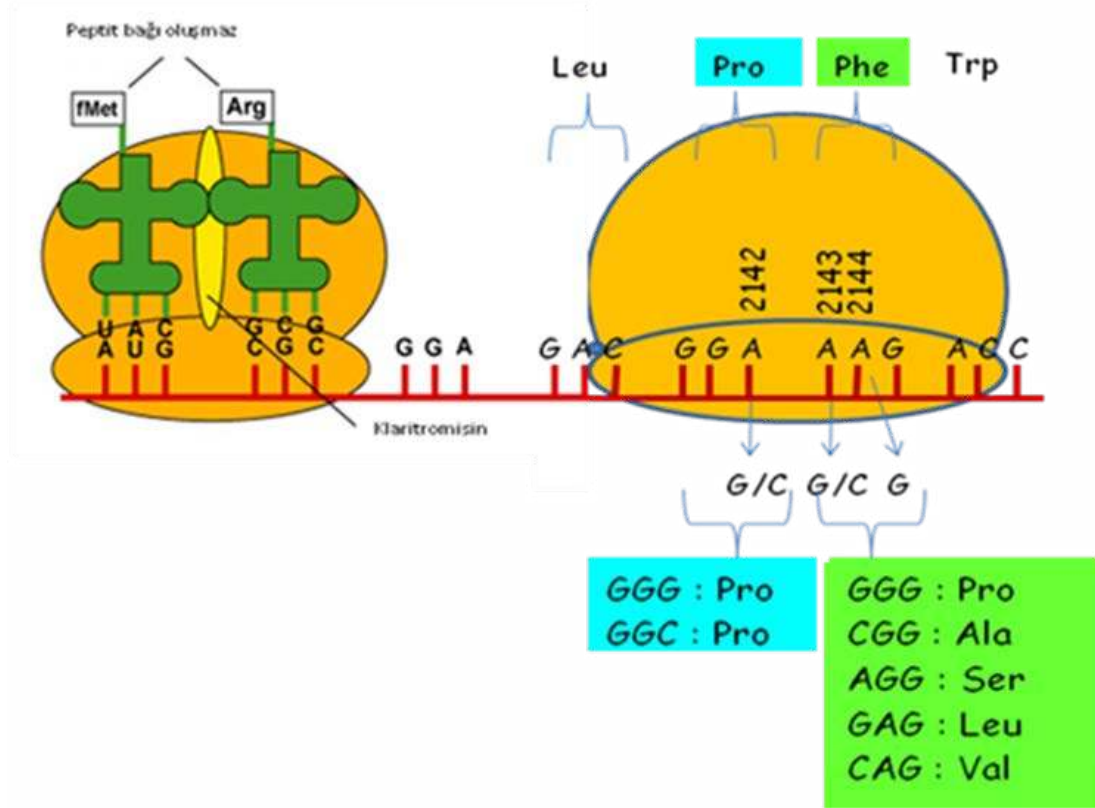
tRNA A bölgesinden P bölgesine kayamaz ve bu noktadan itibaren protein sentezi durur yanlış protein ya da anlamsız proteinler oluşur (224, 226).

Klaritromisin, altı ayrı domaini olan 23S rRNA'nın domain II'de hairpin 35'e ve V domaininin peptidil transferaz bölgesine bağlanan makrolid gruba ait olan aside en dayanıklı ve en düşük MİK'e sahip bakteriyostatik bir antibiyotiktir (Şekil 17) (37, 43, 210, 224, 226, 235). Ancak duyarlı organizmalara karşı yüksek konsantrasyon kullanıldığında veya düşük inokülasyonda bakterisidal olabilir (42, 223). Bu bağlanma protein elongasyonunu engeller ve böylece etkili olarak bakteriyal protein sentezini durdurur (210, 235). Klaritromisinin aktif formu 14-hidroksi metabolitidir (31, 220). Klaritromisinin antibakteriyal aktivitesi daha çok tek doku dağılımıyla ve eritromisin kullanımı ile üretilenlerle ilgili olarak yüksek ya da uzun süreli doku düzeyi ile sonuçlanan eliminasyon profili ile artmaktadır (223). Klaritromisinin antibakteriyal aktivitesi diğer makrolidlerle benzerdir, ancak klaritromisin asidik gastrik mukus tabakasında daha iyi absorbe olur ve bu nedenle *H. pylori*'ye karşı daha etkilidir (210, 223). Klaritromisinin MİK değeri 0.03-0.06 olarak bildirilmiştir (223).



Şekil 17. 50S ribozomal alt ünitenin domain II'de hairpin 35 ve domain V'te peptidil transferaz bölgesi (226)

H. pylori'de klaritromisin direnci 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesinde A2142G (A2146G), A2143G (A2147G) ve A2144G pozisyonlarındaki adeninin guanin ile yer değiştirdiği ve A2142C (A2146C) ve A2143C pozisyonlarındaki adeninin sitozinle yer değiştirdiği nokta mutasyonlarıyla oluşur (2, 3, 28-32, 40, 82, 236-239) (Şekil 18).



Şekil 18. Klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarının oluşturduğu değişiklikler

A2143G için MİK değeri genellikle 0.5-4 µg/mL ve A2142G mutasyonu için 8-32 µg/mL olduğu bildirilmiştir (230, 232). A2143G mutasyonu düşük MİK (<64 mg/L)'li izolatlarda sık bulunurken, A2142G ve A2142C özellikle yüksek klaritromisin MİK (>64 mg/L)'li izolatlarda daha çok görülmektedir (26, 36, 210). Aynı zamanda A2115G, A2143T, T2183C, T2245C, T2144T, G2141A, T2717C, T2182G, T2182C, C2195T, G1939A, T1942C, G2223A, G2224A, T2288C ve C2288T gibi diğer 23S rRNA mutasyonları da gösterilmiştir, ancak bu mutasyonlar çok nadir gözlenmektedir (3, 33-39, 82, 232, 237, 240). A2142C, A2142G, A2142T, A2143G, A2143C, C1939A ve T1942C domain V'te bulunurken T2717C ise domain VI'da bulunmaktadır (40).

H. pylori iki 23S rRNA geni (*rrn* operonu) içerir ve mutasyonlar genellikle her iki kopyada da bulunur (36, 226, 230, 232, 241). 23S rRNA'nın bir kopyasında mutasyon, yüksek klaritromisin direncinin homolog DNA rekombinasyonu ile diğer 23S rRNA genine kolayca transfer olabildiği gösterilmiştir (28, 29, 210, 241). İki RNA kopyasının birinde mutasyonun gözlenmesi yüksek düzey dirence neden olmak için yeterlidir (36, 114, 226).

Klaritromisin direnci diğer makrolidlere karşı dirençle uyudur. A2143G mutasyonu klaritromisin ve linkosamide karşı orta düzey dirençte yükselme olduğu fakat streptogramin B'ye karşı direnç göstermediği bildirilmiştir (230). A2142G ve A2142C mutasyonları bütün makrolidlere yüksek düzey çapraz direnç verdiği bildirilmiştir (210, 230).

2.8.4. Klaritromisin Direnci Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

H. pylori duyarlılık testleri için kullanılan yöntemler difüzyon ya da dilüsyon temelli standart fenotipik yöntemler ve genotipik yöntemler olarak iki grupta incelenir (79).

2.8.4.1. Fenotipik Yöntemler

2.8.4.1.1. Agar Dilüsyon

Agar dilüsyon, antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan referans bir tekniktir. *H. pylori* için CLSI'nın önerdiği antimikrobiyal duyarlılık testi agar dilüsyondur (79, 193, 210). Uygun ortam (Brucella agar, Columbia agar, Wilkins Chalgren agar vb), suplementler (%5-10 kan), inokulum miktarı (10^4 - 10^8 CFU/ml), inkübasyon atmosferi ve plakları okumak için uygun zamanın belirlenmesi ile ilgili olarak standardizasyona ihtiyaç duyulmaktadır (220). CLSI'ya göre klaritromisin için sınır değerler <0.25 µg/mL duyarlı, 0.5 µg/mL intermediate ve >1 µg/mL dirençli olarak belirlenmiştir (79, 193). EUCAST'a göre ≤ 0.25 µg/mL duyarlı, >0.5 µg/mL dirençli olarak belirlenmiştir (242).

2.8.4.1.2. Broth Dilüsyon

Broth dilüsyon metodu otomasyona adapte olabilme avantajına sahiptir. Ayrıca, *H. pylori*'nin sıvıda büyümesinin zorluğu nedeniyle *H. pylori* için çok sık kullanılmamaktadır (79, 220). E-test ile iyi bir korelasyon göstermektedir (79).

2.8.4.1.3. Disk Difüzyon

Rutin duyarlılık testleri için çok ekonomik en basit ve en sık kullanılan metottur (79, 210). *H. pylori* gibi yavaş üreyen bakteriler için önerilmeyen bir yöntemdir. Makrolid direncini saptamak için disk difüzyon yöntemi valide edilmiştir. MİK >0.5 µg/mL'ye karşılık gelen sınır değer inhibisyon zonu klaritromisin için 22 mm ve eritromisin için 17 mm'dir (79).

2.8.4.1.4. Gradyent Difüzyon (E-test)

Gradyent difüzyon (E-test) yöntemi MİK değerlerinin direkt ekspresyonu ile kantitatif bir yöntem olarak avantaja sahiptir ve ayrıca *H. pylori* gibi yavaş üreyen bakterilere karşı uyarlanmıştır. Agar dilüsyon metodu ile bu metot arasında iyi bir korelasyon saptanmıştır (243).

2.8.4.2. Genotipik Yöntemler

H. pylori'de klaritromisin direncinin saptanması için birçok teknik geliştirilmiştir. Klaritromisin direnci 23S rRNA geninin V domaininin peptidiltransferaz bölgesinde çeşitli nokta mutasyonlarına bağlıdır. Moleküler bazlı metotlar bakterilerin canlılığına bağımlı değildir (79).

2.8.4.2.1. PCR- Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)

RFLP ampikon içinde restriksiyon bölgesinin bulunmasını temel alan basit bir yöntemdir (194, 210). PCR-RFLP biyopsi örneği ya da dışkıdan elde edilen *H. pylori*'deki mutasyonel değişiklikleri saptamak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (210). Bu test *BceA*1 (A2142C), *Bbs*I (A2142G), *Bsa*I (A2143G), *Bpi* (A2143G) ve *Mbo*II (A2142G) restriksiyon endonükleazlarını kullanarak önceden tanımlanan 23S rRNA mutasyonlarının saptanmasını sağlar (82, 118, 240).

2.8.4.2.2. PCR-Oligonükleotid ligasyon testi (OLA)

PCR-OLA, PCR'dan sonra ek bir hibridizasyon basamağı içerir. PCR ürünleri için oldukça zorlu şartlar altında işaretlenmiş oligonükleotit problemleri kullanılır (210, 244).

2.8.4.2.3. PCR-DNA enzim immun testi (DEIA)

PCR-DEIA, PCR'dan sonra ek bir hibridizasyon basamağı içerirler. Mikrotitre kuyucuklarda immobilize edilen, mutasyonların işaretlendiği problarla ters hibridizasyon prensibine dayanmaktadır (210, 245).

2.8.4.2.4. PCR-Line Prob Testi (PCR-LİPA)

Nokta mutasyonlarına uygun oligonükleotid probları nitroselüloz bir stripe uygulanır ve amplifiye edilmiş ürünlerle ters hibridizasyon prensibine bağlıdır (244, 245). Hibritler streptavidin-alkalin fosfataz konjugat/substrat kolorimetrik sistem aracılığıyla saptanır. PCR-LİPA, geniş sayıda örneklerin test edilmesi için oldukça uygundur ve yedi farklı direnç mutasyonunun saptanması için uygun ve basit bir sistemdir (245).

2.8.4.2.5. PCR-Preferential Homodubleks Formasyon Testi (PCR-PHFA)

Gastrik sıvı örneklerinde klaritromisin dirençli mutantların ve *H. pylori*'nin direkt saptanması için uygulanır. Karışık popülasyonu ve fenotipik metotlarla saptanamayacak kadar düşük konsantrasyonda dirençli popülasyonu saptayabildiğinden daha duyarlı bir yöntemdir. Bütün midenin incelenmesine olanak tanımaktadır (244).

2.8.4.2.6. 3' Mismatched Ters Primer PCR (3M-PCR)

3M-PCR metodu A2142C mutasyonunuda içeren tüm nokta mutasyonları için kullanılmaktadır (244).

2.8.4.2.7. Real-Time PCR Hibridizasyon Testi

Bu yöntemde, floresanla işaretlenmiş mutasyonlu ya da sıkıca bağlanan probun varlığında bir 23S rDNA fragmenti amplifiye edilir. Bu problar PCR ürünleriyle hibridize olduğu zaman, bir floresan sinyal oluşur. PCR tamamlandıktan sonra, ısı mutasyon probunun erime noktasını saptamak için arttırılır. Floresan sinyalin oluşturduğu ısı, mutasyon probunun ayrıldığı noktada (erime noktası) sinyal verir. Hedef sekansta uyumsuzluk olduğunda, daha düşük erime sıcaklığı hibrid birleşimi karşılaştırılarak elde edilir. Kültüre gereksinim duymadan, direk gastrik dokuya uygulandığında üç saat içerisinde sonuç veren basit ve hızlı bir tekniktir (210, 246).

2.8.4.2.8. Biprob Real-time PCR

H. pylori'nin *ureA* ve 23S rRNA'sı Lightcycler termocycler ile floresan rezonans enerji transfer teknolojisi ve ergime eğrisi analizi kullanılarak saptamaktadır (10, 31). Biprobolar Cy5 floroforu ile işaretlenmiş sekans spesifik problardır. Prob hedef sekansa hibridize olduğunda, Cy5 SybrGreenI'den enerji transferine neden olmakta ve salınan ışık artmaktadır. Prob ve hedef arasında uyumsuz baz çiftleri varlığında, ergime eğrisi analizinde düşük ergime derecesi açığa çıkarmaktadır (31). Bu protokol hem gastrik biyopsi ve dışkı örneklerine uygulanabilmektedir (10).

2.8.4.2.9. Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP) analizi

Tek nükleotid polimorfizm analizi çeşitli hastalıklara kalıtsal duyarlılık ve ilaçlara bireysel duyarlılık saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Tek işaretli piren modifiye nükleosid 5-[3-(1-pirenkarboksiamido) propinil]-2'-deoksiüridin ve 5-(piren-1-etinil)-2'-deoksiüridin içeren oligonükleotid proplar SNP saptanmasına olanak tanır. GPM9 (5'-GCAAGACXXAAAGACCCCGT-3') ve GPM10 (5'-GCAAGACGGXXAGACCCCGT-3') propları *H. pylori* 23S rRNA'nın 2143 ve 2144 pozisyonundaki değişiklikleri saptayabilmektedir. Bu proplar tek iplik, doğal dupleks ve tek nükleotid değişikliği olan dupleks gibi üç farklı pozisyonunda floresan moleküler ile yer değiştirme yapmaktadırlar (247).

2.8.4.2.10. Tek Kanal Multipleks PCR

H. pylori enfeksiyonunu saptamakta ve allel spesifik Scorpion primerleri kullanarak klaritromisin direncine neden olan üç 23S rDNA mutasyonlarını tanımlamada kullanılmaktadır. Scorpion primerler tek bir molekülde bir primer ve bir prob birleşmesi ile oluşmaktadır ve tek nükleotid polimorfizmlerini ayırt edebilmektedir. Floresan sinyaller SmartCycler II cihazı ile dört kanalda okunmaktadır. Scorpion PCR duyarlılığı ve spesifikliği yüksek bir test olup A2142G ve A2143G mutasyonlarını ayırtabilmektedir (10).

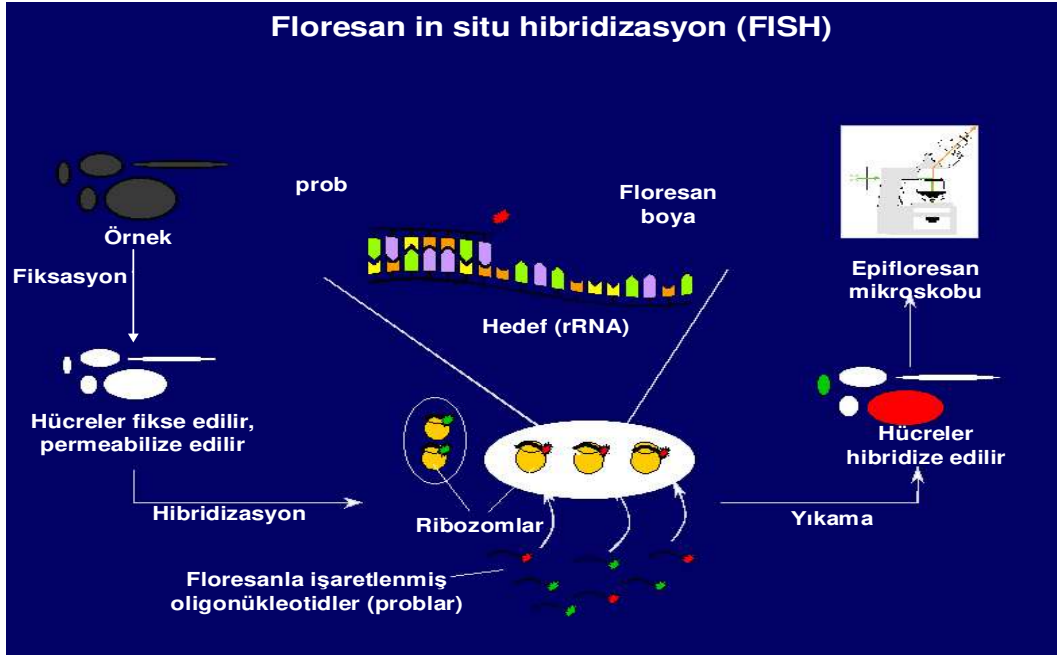
2.8.4.2.11. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

Konvensiyonel *in situ* hibridizasyon (ISH) hücre içerisindeki spesifik bir hedef sekans için DNA ya da RNA moleküllerinin bağlanması temeline dayanmaktadır (248). Kromozomun fonksiyonu ve yapısının çalışılmasında FISH 30 yıl kadar önce yeni bir dönem

başlatmıştır. Klinik genetik, sinir bilimi, üreme, toksikoloji, mikrobiyal ekoloji, evrim biyolojisi, karşılaştırmalı genomik ve kromozom biyoloji gibi farklı alanlarda FISH tekniğinden yararlanılmaktadır (249). FISH yöntemi olarak adlandırılan teknikte nükleik asitlere floresan etiketler eklenmektedir (248). Problar direkt olarak floresan nükleotidlerle ya da indirekt olarak floresan antikorlar tarafından saptanan taşıyıcı moleküller ile işaretlenmektedir (249). Tipik etiketler siyanin (Cy3 ve Cy5) ve florosein (eksitasyon dalga boyu 490 nm, emisyon dalga boyu 520 nm), tetrametilrodamin (eksitasyon dalga boyu 550 nm, emisyon dalga boyu 575 nm) ve texas Red (eksitasyon dalga boyu 578 nm, emisyon dalga boyu 600 nm) molekülleridir (248, 250). Alexa Fluors’uda içeren florofor ailesi ve kuantum dots olarak adlandırılan küçük boyutta kristal partiküllerde geniş oranda kabul görmektedir. Bu yeni boyaların avantajı fotostabilite ve parlaklığın artmış olması temeline bağlıdır (248). Radyoaktif işaretli problemler de kullanılmaktadır (250).

Bakteriyal FISH teknolojisi, bakteriyal bir türün ribozomal RNA’sının çoklu kopyaları ile oligonükleotidlerin tanımlanmasının spesifik DNA-DNA hibridizasyonuna bağlıdır (16S rRNA, 23S rRNA). Floresan boyalarla işaretli oligonükleotidler, bakteriyal hücreye penetre olur ve hedef sekansa bağlanır. Bu teknik ile bakteri, hayvan modellerinde ya da enfekte insanların gastrik mukoza örnekleri gibi doğal habitatlarda floresan mikroskopisi kullanılarak saptanabilmektedir (250, 251).

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan FISH yöntemi fiksasyon, preparatların hazırlanması ve dehidratasyon, hibridizasyon, yıkama basamaklarından oluşmakta ve sonuçların analizi epifloresan mikroskopun ya da flow sitometri ile yapılmaktadır (Şekil 19) (212, 248).



Şekil 19. FISH yöntemi basamakları (212)

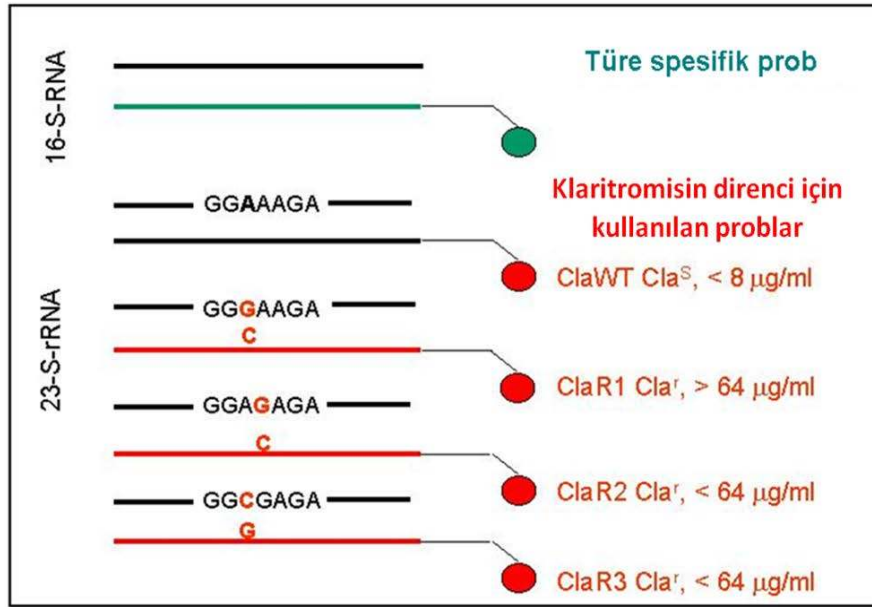
Fiksasyon basamağında; bakteriyal ve insan hücrelerinde sıklıkla kullanılan formalin, paraformaldehit ve etanol gibi kimyasal fiksatifler uygulanmaktadır (248, 250). Gram negatif bakterilerin çoğu için %3 paraformaldehit solüsyonunun iyi bir fiksatif olduğu bildirilmiştir. Gram pozitif hücreler ise ısı, etanol-formalin (9:1 oranında) ya da %50 etanol ile fikse edilmektedir (250). Hibridizasyon basamağında; prob işlenmesi ve hedef sekans ile hibridizasyonu için sıcaklık, pH, iyonik güç and formamid konsantrasyonunun iyi bilinmesi gerekmektedir. Yıkama basamağında, zayıf bağlanan ya da bağlanmayan işaretli proplar örnekten uzaklaştırılmaktadır ve hibridizasyon metodunun optimizasyonundan sonra, proplar yalnızca kendilerine komplementer sekansları tanımaktadır. Bu, metodun özgüllüğünü belirlemektedir. FISH yönteminde identifikasyon için kullanılan proplar bakteri ya da archaealarda 16S rRNA sekansını, ökaryotlarda ise 18S rRNA sekansını hedeflemektedir. Hedef molekül olarak rRNA seçimi hücrede bu yapıların bol miktarda bulunması ile ilişkilidir. *Mycobacterium tuberculosis*'in tek bir hücresinde 10^2 - 10^3 , *Escherichia coli*'nin tek bir hücresinde ise 10^4 - 10^5 sayıda ribozom bulunmaktadır. Floresan yoğunluğu çoklu prob etiketlenmesi sonucudur ve ribozomal içerik ile ilişkilidir. Düşük sinyal yoğunluğu hücredeki düşük rRNA içeriğinden kaynaklanabilmektedir. DNA FISH uygulamasında, prob dizaynı uygulama protokolü hakkında her şey tam olarak bilinmemektedir. DNA probları her zaman hücre membranlarından geçememektedir. Özellikle Gram pozitif bakterilerde lizozim ya da

diğer proteolitik enzimlere ihtiyaç duyulabilmektedir. Canlı hücrelerde proteazlar ya da endonükleazlar tarafından probun degradasyonu oluşabilirken, ribozomal ikincil yapıya bağlı olarak rRNA ulaşılabilirliği hibridizasyon süresi 96 saat ya da daha fazla sürmektedir. DNA problemleri, prob ve hedef arasındaki düşük afinite ile ilişkili olarak parlak sinyal vermemektedir. Bu problemlerin çözümü için, DNA'yı taklit eden nükleik asit analogları kullanılmaktadır (248). Peptit nükleik asit (PNA) problemleri bakteriyal saptama için optimize edilmiştir. PNA molekülleri, DNA ile benzerlik göstermektedir ve negatif yüklü şeker-fosfat omurgası, DNA'nın tekrarlayan N-(2-aminoetil) glisin tarafından oluşturulan akiral nötral poliamid omurgası ile yer değiştirmektedir (248, 252, 253). PNA Watson-Crick baz çifti kurallarına göre komplement nükleik asit hedefleri ile hibridize olabilmektedir. PNA problemleri elektrostatik repulsiyonun yokluğu ve komplementer hedeflere daha hızlı ve güçlü bağlanma gibi daha kuvvetli hibridizasyon karakteristiği göstermektedir (252). PNA problemlerinin rölatif hidrofobik karakteri hücre morfolojisinin parçalanmasına izin vermeyen uygun şartlarda hücre duvarı boyunca PNA probunun difüze olmasını sağlamaktadır (253, 254). DNA probunun uzunluğu 20-24 bp iken, PNA probunun optimum uzunluğu 15 bp'dir. *Campylobacter* spp., *Candida albicans*, *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila* ve *H. pylori* için birçok PNA probu dizayn edilip optimize edilmiştir (252). PNA FISH, *Staphylococcus aureus* ile koagülaz negatif stafilokokların hızlı ayrımında ve aynı zamanda *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis*'in identifikasyonunda kullanılmaktadır (248, 254). Locked nükleik asit (LNA) probu ve 2'-O-metil (2'-OMe) RNA'da sık olarak kullanılmaktadır. LNA, ribozun 2' oksijen ve 4' karbon atomları arasında metilen köprüsü ile bağlandığı sentetik RNA türevidir. 2'-OMe RNA, 2'-deoksi-2'-floro-β-D-ribonükleik asit (2'-F RNA) ve morfolinler üç diğer modifiye yapıdır. 2' OMe RNA ökaryotlar için kullanılmaktadır (248).

FISH yönteminde kullanılan florofor boyaları ile sinyalin görüntülenmesinde epifloresan mikroskop, flow sitometri veya konfokal lazer taramalı mikroskop kullanılmaktadır (248, 255).

FISH yöntemi, klinik mikrobiyolojide *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter*, *Legionella pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Candida albicans*, *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Pseudomonas* spp. gibi organizmaların saptanmasında kullanılan hızlı, kültürden bağımsız bir yöntemdir (253-260). Bu metotta *H. pylori*, floresanla işaretlenmiş *H. pylori* spesifik 16S ve 23S rRNA ile hibridize edilmektedir. İşaretlenmiş problemlerle *in situ* olarak hibridize edilmiş bakteriler floresan

mikrokobisi ile incelenebilmektedir. Bu test eş zamanlı olarak *H. pylori* ve klaritromisin direncinin saptanmasına olanak verir ve direk olarak gastrik biyopsi örneklerine uygulanabilmektedir (2, 3, 10, 210, 244, 245). *H. pylori* için türe spesifik saptama floresein ile işaretli 16S rRNA spesifik oligonükleotid Hpy-1 (5'-CACACCTGACTGACTATCCCG-3') probu ile yapılmaktadır. Eş zamanlı olarak tür için genotipik antibiyotik direncin saptanması mümkündür. *H. pylori* enfeksiyonuna karşı üçlü tedavide kullanılan temel antibiyotik klaritromisine karşı direnç 23S rRNA'da tanımlanan üç nokta mutasyonuna dayanmaktadır. Bu nokta mutasyonları rodamin ile işaretli ClaR1 (5'-CGGGGTCTTCCCGTCTT-3'), ClaR2 (5'-CGGGGTCTCTCCGTCTT-3') ve ClaR3 (5'-CGGGGTCTTGCCGTCTT-3') probları ile spesifik olarak saptanmaktadır. Mutasyon içermeyen wild tipin belirlenmesi için rodamin işaretli ClaWT (5'-CGGGGTCTTCCGTCTT-3') probu kullanılmaktadır (Şekil 20) (2, 3, 212, 236, 261).



Şekil 20. *Helicobacter pylori* spesifik oligonükleotid FISH probları (212)

FISH klaritromisin dirençli *H. pylori* mutantlarının saptanması için hızlı bir yöntemdir ve sonuçlar endoskopiden sonra üç saat içinde verilebilmektedir. Problar ticari olarak sağlanabilir ve bu yöntem maliyet açısından çok uygundur, epifloresan mikroskobu dışında özel donanım gerektirmeksizin laboratuvarlarda uygulanabilmektedir (251). Maastricht IV Sonuç Raporu'nda kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanmasının mümkün olmadığı durumlarda FISH yöntemi gibi moleküler yöntemlerin *H. pylori* varlığı ve klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir (191).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2006-2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğine dispeptik yakınmalar ile 2006-2011 tarihleri arasında başvuran toplam 234 hasta (169 kadın, 65 erkek; yaş ortalaması 43.8 ± 14.0 ; yaş aralığı 17-83) çalışmaya alındı. Dispeptik hastalar Roma III Kriteri'ne göre belirlendi (262). Koagülopati, gebelik, laktasyon, malignansiler, yakın zamanda kan transfüzyonu olan, gastrik cerrahi girişim geçiren, ciddi karaciğer hastalığı olan, son altı ay içinde *H. pylori* eradikasyon tedavisi alanlar, son bir ay içinde NSAID, proton pompa inhibitörü ve antibiyotik 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 "Hasta bilgilendirme ve rıza formu" (EK-1) okutulup imzalatıldı. Çalışmanın kapsamı hakkında verilen bilgilerin yanı sıra, hastalara endoskopi işlemi esnasında bizzat refakat edildi ve alınan örnekler Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ulaştırıldı.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı *Helicobacter* Laboratuvarına örnekleri getirilen her hastaya bir protokol numarası verilmekte, bu protokol numarasına göre hastanın imzaladığı "Hasta bilgilendirme ve rıza formu", Uzman Gastroenterolog/Endoskopist'in hazırladığı endoskopi raporu ve "Hasta Gözlem Formu" (EK-2) dosyada toplandı. Endoskopinin yapıldığı günden yaklaşık 10 gün sonra sonuçlanan hastaya ait patoloji raporları ise ilgili protokol numaralı dosyaya eklendi.

3.4. Çalışma Materyali

3.4.1. Biyopsi Örneklerinin Alınması

En az sekiz saatlik açlıktan sonra Fujinon SN2 GN20 A003 veya SN1 GN20 A923 marka videoendoskop kullanılarak üst GIS endoskopisi Uzman Gastroenterolog/Endoskopist tarafından değerlendirildi.

Endoskopi öncesinde %10'luk Xylocain sprey ile farinkse lokal anestezi uygulandı. Etik kurul onayı olan doktora tez çalışmamız için endoskopi sırasında mide antrum ve korpusundan beşer adet olmak üzere hastadan toplam on adet biyopsi örneği alınması gerekmektedir. Bir korpus ve bir antrum biyopsi örneğine endoskopi sırasında HUT uygulanıp, diğer üç korpus ve üç antrum örneği ise kültür, real-time PCR ve FISH yöntemleri uygulanması için Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na 30 dakika içerisinde ulaştırıldı.

3.4.2. Formalin Fikse Parafine Gömülü Biyopsi Kesitlerinin Alınması

Hastalardan alınan diğer bir korpus ve bir antrum örneği histopatolojik inceleme için endoskopi ünitesinde hazırlanan %10 tamponlanmış formalin içerisinde Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Bu hastaların formalin fikse parafine gömülü gastrik biyopsi örneklerinden FISH yöntemi uygulanması için Poly-L-Lysine lamlara 4 µm olarak alınan kesitler Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ulaştırıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

H. pylori'nin pozitifliği ve klaritromisin duyarlılığının saptanması “bağımlı değişken”, cinsiyet, yaş ve endoskopik veriler “bağımsız değişken”; dispeptik şikayetleri olan erişkin hasta olması “kontrol değişkeni olarak değerlendirildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

Sıra No	Malzeme Adı	Marka	Lot No, Model, Seri No, Katalog No	Kullanıldığı Analiz
1.	Columbia Blood Agar	OXOID	CM0331	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden <i>H. pylori</i> suşlarının izolasyonu ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının pasajlanması
2.	Mueller Hinton Agar	OXOID	CM0337	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
3	Brain Heart Infusion Broth	OXOID	CM0225	İzole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının stoklanması
4	Brucella Buyyon	BD	211088	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin transportu
5	Defibrine At Kanı	OXOID	SR0050C	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden <i>H. pylori</i> suşlarının izolasyonu ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının pasajlanması
6	Defibrine Koyun Kanı	OXOID	SR0051B	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
7	<i>Helicobacter pylori</i> Selective Supplement (DENT)	OXOID	SR0147E	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden <i>H. pylori</i> suşlarının izolasyonu ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının pasajlanması
8	Üre Agar	OXOID	CM0053B	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinde ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarında üreaz aktivitesinin belirlenmesi
9	Üre Solüsyonu	OXOID	SR0020K	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinde ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarında üreaz aktivitesinin belirlenmesi
10	Klaritromisin E-test	OXOID	508708	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
11	GasPak EZ Campy Container System	BD	260680	<i>H. pylori</i> 'nin üretilmesi için mikroaerofilik ortam oluşturulması
12	Petri kutusu	FıratMed		<i>H. pylori</i> suşlarının izolasyonu ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının pasajlanması, Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
13	Gliserol	Baked Analyzed	M77809	İzole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının stoklanması
14	Poly-l-lizinli lam	Isotherm		Formalin fikse parafine gömülü antrum ve korpus biyopsi örneklerine FISH yöntemi uygulanması
15	Ksilen	Riedel De Haen	16446	Formalin fikse parafine gömülü antrum ve korpus biyopsi örneklerine deparafinizasyon işleminin uygulanması

16	Etanol	AppliChem	A3678,2500	Formalin fikse parafine gömülü antrum ve korpus biyopsi örneklerine deparafinizasyon işleminin uygulanması
17	Şale	Sigma	S5766	FISH yönteminin deparafinizasyon, yıkama, durulama aşamalarında
18	Eppendorf tüp (1,5 ml)	Greiner bio-one	616201	Tüm analizler
19	Steril plastik öze	Greiner bio-one	731171	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden <i>H. pylori</i> suşlarının izolasyonu ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının pasajlanması
20	Steril eküvyon	Cultiplast	Q0020	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
21	Bistüri			Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin parçalanması
22	Steril apirojen su	Galen İlaç San. Tic. Aş	10501001	<i>Helicobacter</i> selective supplement (DENT)'in sulandırılması
23	Nitril eldiven	Galena	GT352R09P001	FISH analizleri
24	Pudrasız Eldiven	Beybi	011119031130A	Tüm analizler
25	PBS	BIOCHROM AG	L1825	FISH yöntemi durulama aşamasında
26	DNAaz RNAaz içermeyen steril deiyonize su	BIOCHROM AG	L0015	FISH yöntemi yıkama tamponu hazırlanması
27	Formaldehit	Fluka	47630	Koloni örneklerinin FISH yöntemi uygulanması için hazırlanması
28	8 bölmeli lam	SeaPrto	cF0580	Koloni örneklerinin FISH yöntemi uygulanması
29	Lamel	Isolab		FISH analizinde
30	Filtreli pipet ucu (0,5-10, 10-100, 100-1000µl)	Greiner bio-One		Tüm analizler
31	Rodajlı lam	Isotherm		Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin Modifiye karbol fuksin ve metilen mavisi ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarına Gram boyama uygulanması
32	Steril plastik pipet	LP ITALIANA	161010	Tüm analizler
33	Santrifüj tüpü (50 ml)	Greiner bio-One	227261	Tüm analizler
34	Yeşil kapaklı hibridizasyon tüpü	SeaPro		FISH Yöntemi hibridizasyon aşamasında
35	4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI/Antifade)	Cytocell	DFS500L	FISH Yöntemi mikroskopta görüntüleme
36	QIAamp DNA mini kit	QIAGEN	51306	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden

				DNA ekstraksiyonu
37	High Pure PCR Template kit	Roche		İzole edilen <i>H. pylori</i> suşlarından DNA ekstraksiyonu
38	Primerler	Tibmolbiol		Real-time PCR
39	Problar	Tibmolbiol		Real-time PCR
40	LB Broth			Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
41	XTRA Blue Plus			Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
42	<i>SacI</i> Restriksiyon Enzimi	Roche		Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
43	<i>KpnI</i> Restriksiyon Enzimi	Roche		Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
44	pBlue Script SK	Stratagene		Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
45	T4 DNA Ligaz	Roche		Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
46	pGEM-3Zf(+) vektörü	Promega	P2271	Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
47	JM109 kompetan hücre	Promega	L2001	Real-time PCR pozitif kontrol elde edilmesi
48	QIAprep Miniprep	QIAGEN		Plazmid ekstraksiyonu
49	LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (96 rxn)	Roche	03003248001	Real time PCR
50	Primerler	Sigma		PCR
51	Agaroz (500g)	Lonza	50004	PCR
52	TBE tamponu (x10 konst.) (1000ml)	AppliChem	A3945,1000	PCR
53	Taq DNA polimeraz (500U)	Fermentas QIAGEN	# EP0402 201203	PCR
54	dNTP set (Herbir setten 10mM 'lık)	Fermentas	# R0193	PCR
55	PCR tüpü 0.2 ml (düz kapaklı) (10x100 adet/poşet)	Greiner Bio-one		PCR
56	50 bp DNA Ladder	Fermentas	# SM0371	PCR
57	DNA Loading dye (X6 konsantre) 5x1 ml	Fermentas	# R0631	PCR
58	Etidyum bromür	Sigma	E7637-1G	PCR
59	Thermal Cycler	Techne	Techne TC-412	PCR
60	Isıtmalı soğutmalı su banyosu	PolyScience	9106A12E	FISH analizi
61	Jel Elektroforez Sistemi	Thermo	252436	PCR
62	Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat		PCR
63	Mikrodalga fırın	Roda	RD-7017P-A	PCR
64	-80°C ultra derin dondurucu	Thermo	705 REL#2 805797-117	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının saklanması
65	-20°C derin dondurucu	Beko		Malzemelerin ve DNA örneklerinin saklanması

66	Buzdolabı	Beko No-Frost		Malzemelerin saklanması
67	Etüv	Memmert INE 500	E509.04 76	<i>H. pylori</i> 'nin üremesi için gereken 37°C ısıtımın oluşturulması
68	Tartı	Adam Equipment Co. Ltd.	AE 326611770	Besiyeri hazırlanması
69	Otoklav	HICLAVE Hirayama	HV-85 000685748	Tüm analizler
70	Densimat	Biomerieux	IDN012764	McFarland bulanıklığının ayarlanması
71	Isı bloğu	Major Science	MC-01N 6214001	DNA ekstraksiyonu
72	Santrifüj	Hettich Zentrifuge n	1204-001003-01-00	DNA ekstraksiyonu
73	Pipet seti (10, 100, 1000µl)	Eppendorf	022474359	Tüm analizler
74	Işık Mikroskobu	Olympus	CX31RTSF	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin Modifiye karbol fuksin ve metilen mavisi boyalı preparatları ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının Gram boyama preparatlarının incelenmesi
75	Epifloresan Mikroskobu	Nicon	Nicon Eclipse E600	FISH analizi
76	Lightcyler 1.5	Roche		Real-time PCR analizi
77	Lightcycler Kapiller (20µl)	Roche	04929292001	Real-time PCR analizi
78	Anaerobik Jar 2.5 lt	OXOID	AG0025A	<i>H. pylori</i> 'nin üremesi için gereken mikroaerofilik ortamın oluşturulması
79	Burgulu kapaklı tüp (16x100 mm)	ISOLAB	07703001	McFarland bulanıklığının hazırlanmasında
80	Doku Homojenizatör	Sigma	749540-0000	Gastrik biyopsi örneklerinin homojenizasyonunda
81	Pellet pestle uç	Sigma	Z359947-100EA	Gastrik biyopsi örneklerinin homojenizasyonunda

3.6.2. Biyopsi Örneklerinin Hızlı Üreaz Testi (HUT) ile İncelenmesi

Bir gram üre 10 ml steril distile suda eritilerek hazırlanan karışımdan her test tüpüne 1'er ml dağıtıldı (pH <8.1). Korpus ve antrum örnekleri üre solüsyonu içeren birer test tüpüne konuldu ve üzerlerine ikişer damla % 1'lik fenol kırmızısı solüsyonu eklendi. Üreli solüsyon içerisindeki gastrik biyopsi örneği *H. pylori* ile enfekte ise, *H. pylori*'nin sahip olduğu üreaz enzimi aracılığı ile üre hidrolizi sonucunda açığa çıkan 2 NH₃ ve 2 CO₂ ile pH'nın değişmesi ile pH indikatörü fenol kırmızısı üreli solüsyonda pembe renk değişiminin görülmesi (pH

>8.1) pozitif, rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi. Karışımın rengine sarıdan pembeye değişimin görülmesi pozitif, sarı rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi. Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin HUT sonucu ilk 1 saat, 3 saat ve 24 saat gözlemlenerek değerlendirildi.

3.6.3. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi

Çalışmaya dahil edilen 234 hastanın herbirinden bir korpus ve bir antrumdan alınan, histopatolojik açıdan incelenecek biyopsi örnekleri hemen %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonu içeren şişelere alındı. Aynı ayrı şişelerde alınan bölgeler belirtilerek rutin histopatolojik inceleme ve “*Helicobacter-like organisms*” (HLO) incelenmesi istemi ile Patoloji Anabilim Dalı'na hasta tarafından ulaştırıldı.

İki yüz otuz dört hastanın histopatolojik antrum ve korpus toplam 468 biyopsi örneği gastrointestinal patoloji ile ilgili patoloji uzmanı tarafından Hematoksilen-Eozin, Alcian blue ve Giemsa boyaları ile boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon Mikroskop), morfolojik olarak HLO yönünden incelendi. Lamina propria'da, pitlerde enflamasyon, atrofi, intestinal metaplazi (IM) ve HPL her biri 0-3 [yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3)] arası olarak güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirildi (190).

3.6.4. Hastaların Helicobacter pylori Enfeksiyonu Yönünden Değerlendirilmesi

Alınan her bir korpus ve antrum biyopsi örneklerine uygulanan histopatolojik inceleme, HUT ve kültürün, en az ikisinin pozitif olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu pozitif; tümünün olumsuz olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu negatif kabul edildi.

3.6.5. Biyopsi Örneklerinin Kültürü

3.6.5.1. Besiyeri Hazırlığı

3.6.5.1.1. Transport Besiyerinin Hazırlanması

80 ml distile su içerisine 2.8 gr Brucella Buyyon (Beckton Dickinson) eklendi ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavlandıktan sonra gliserol solüsyonundan (Baked Analyzed) 20 ml eklendi. Steril ependorflara 1'er ml olacak şekilde alikotlandı ve buzdolabında +4°C'de saklandı.

3.6.5.1.2. Kùltür Besiyerlerinin Hazırlanması

i. %7 At Kanlı *Helicobacter pylori* Seçici besiyeri

▪ Columbia Blood Agar	19.5 gr/ml	}	500 ml besiyeri için
▪ Defibrine At Kanı	35 ml		
▪ <i>H. pylori</i> Selective Supplement (DENT)	1 vial		
▪ Distile su	465 ml.		

465 ml distile su içërisine 19.5 gr Columbia Blood Agar (Oxoid) ilave edildi ve 121°C’de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 50 °C’ye geldiğinde 35 ml steril defibrine at kanı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) ve 2 ml steril distile su içërisinde eritilen *H. pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid) ilave edildi. Daha sonra besiyeri 90 mm petrilere aseptik koşullarda döküldü. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için besiyerleri 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolabında +4°C’de saklandı.

ii. %5 Koyun Kanlı Trypticase Soy Agar*

%5 koyun kanlı Trypticase Soy Agar (TSAB) (Beckton Dickinson, Sparks MD, USA) New York Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Tıp ve Mikrobiyoloji Anabilim Dallarını (NYUSM, New York, USA) laboratuvarında protokolüne göre Assoc. Prof. Dr. Guillermo I. Perez-Perez ve Asalia Olivares tarafından hazırlanmıştır.

iii. %5 At Kanlı Skirrow Ortamı*

Trimetoprim, vankomisin ve polimiksin B antibiyotiklerini içëren %5 at kanlı Skirrow ortamını (Beckton Dickinson, Sparks MD, USA) New York Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Tıp ve Mikrobiyoloji Anabilim Dallarını (NYUSM, New York, USA) laboratuvarında protokolüne göre Assoc. Prof. Dr. Guillermo I. Perez-Perez ve Asalia Olivares tarafından hazırlanmıştır.

iv. *Brucella Broth* Besiyeri

100 ml distile su içërisine 2.8 gr *Brucella* Buyyon (Beckton Dickinson) ilave edildi ve 121°C’de 15 dakika otoklavlandı. Steril ependorflara 1’er ml olacak şekilde alıkotlandı ve buzdolabında +4°C’de saklandı.

v. %5 Koyun Kanlı Mueller Hinton Besiyeri

▪ Mueller Hinton Agar	1.9 gr/ml	} 50 ml besiyeri için
▪ Defibrine koyun kanı	2.5 ml	
▪ Distile su	47.5 ml	

47.5 ml distile su içerisine 1.9 gr Mueller Hinton Agar (Oxoid) ilave edildi ve 121°C’de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 50 °C’ye geldiğinde 2.5 ml steril defibrine koyun kanı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) besiyerine ilave edildi. Daha sonra besiyeri 90 mm petrilere aseptik koşullarda döküldü. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için besiyerleri 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolabında +4°C’de saklandı.

vi. Üre Besiyeri

95 ml distile su içerisine 2.1 gr Ure Agar (Oxoid) ilave edildi ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. 5 ml sıvı üre solüsyonu (Oxoid) eklendi. Steril ependorflara 1’er ml olacak şekilde alikotlandı ve buzdolabında +4°C’de saklandı.

3.6.5.1.3. Stok Besiyerinin Hazırlanması

Son hacim 100 ml olacak şekilde önce 30 ml distile su 20 ml gliserol karıştırılarak %40’lık gliserol solüsyonu hazırlandı. Başka bir yerde de, 100 ml için Brain Heart Infusion (BHI) buyyon tartıldı ve 40 ml distile suda eritildi. Hazırlanan solüsyon ve besiyeri 121°C’de 15 dakika otoklavlandı. Hazırlanan bu solüsyonlar birbiri ile karıştırıldı ve üzerine 56°C’de 30 dakika su banyosunda enkübe edilerek inaktive edilen steril insan serumundan (Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarları, Seroloji Laboratuvarında serolojik olarak taranmış) 10 ml eklendi. Hazırlanmış olan stok besiyeri steril ependorflara 1’er ml olacak şekilde alikotlandı ve buzdolabında +4 °C’de saklandı.

3.6.5.2. Kültür Protokolü**

Endoskopi esnasında her hastadan bir korpus ve bir antrumdan alınan biyopsi örnekleri %20 Gliserollü Brucella broth içeren *H. pylori* transport besiyeri ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’na 30 dakika içerisinde ulaştırıldı. Transport besiyeri içerisindeki gastrik biyopsi örnekleri aseptik koşullarda steril petrilere içerisine alındı ve biyopsi örnekleri steril

bistüri veya pellet pestle uç (Sigma Aldrich) ile kullanılan doku homojenizatörü (Sigma Aldrich) ile ezilip parçalandı. Biyopsi örneklerinin pasajı %7 Defibrine At Kanı (Defibrinated horse blood, Oxoid) ve *H. pylori* Selective supplement (DENT, Oxoid) içeren Columbia Blood Agar besiyerine ekim yapıldı ve ekim yapılan plaklar 3-7 gün 37°C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Beckton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik koşullarda enkübe edildi. Üremeyen koloniler için 10 güne kadar enkübasyon devam ettirildi. Aynı zamanda biyopsi örneklerinin her birinden kültürle eş zamanlı olarak ayrı ayrı steril ependorf içerisinde Christensen's Üreli Agar (Oxoid) besiyerine direkt biyopsiden üreaz testi için konuldu. Aynı zamanda direkt dokudan imprint preparat hazırlandı ve modifiye Gram boyaması ile boyandı. Doku hücrelerinin arasında *H. pylori* varlığı ve tipik morfoloji Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Helicobacter Laboratuvarında bulunan ışık mikroskopunda (Olympus CX31RTSF) 100X immersiyon objektifi ile incelendi. Üreyen koloniler tekrardan %7 Defibrine At Kanlı Columbia Agar besiyerine pasajlanarak subkültürleri yapıldı. Ayrıca enkübasyon sonrası üreyen *H. pylori* kolonilerine fresh bakı, katalaz testi, oksidaz testi, üreaz testi ve modifiye Gram boyaması yapıldı. Gram (-) *H. pylori* varlığı ve tipik morfolojisi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Helicobacter Laboratuvarında bulunan ışık mikroskopunda (Olympus, CX31 RTSF) 100X immersiyon objektifi ile incelendi. Subkültürden üreyen koloniler stok besiyeri (%20 gliserollü BHI buyyon) ile homojenize edilerek -80°C'de saklandı (77).

* Çalışmaya alınan 64 dispeptik yakınmalı hastanın antrum ve korpus biyopsi örnekleri New York Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıp ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalları, (NYUSM, New York, USA) laboratuvarında uygulanan sayfa 109'da belirtildiği gibi kültür ve antimikrobiyal duyarlılık test protokolüne göre Assoc. Prof. Dr. Guillermo I. Perez-Perez ve Asalia Olivares tarafından Prof. Dr. Özlem Yılmaz'ın diğer bir projesi kapsamında daha önceden çalışılmıştır.

** Victor Segalen Bordeaux 2 University, Campylobacter ve Helicobacter Referans Laboratuvarında (Bordeaux, Fransa) uygulanan kültür protokolü gereğince uygulanmıştır (FEMS Fellowship, 1 Mart 2008-30 Mayıs 2008).

3.6.5.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

3.6.5.3.1. Agar Dilüsyon Yöntemi

İçerik etkinliği bilinen saf toz halindeki klaritromisin (Bilim İlaç), TÜBİTAK 109M028 nolu doktora tez projesi kapsamında Prof. Dr. Funda Tıhmınlıoğlu'nun izni ile tarafımızca da kullanılmıştır.

i. Stok Klaritromisin Solüsyonu Hazırlanması:

Stok çözeltilerinin hazırlanmasında asetik asit ve metanol olmak üzere iki farklı çözücü kullanılmıştır.

Çözücü: Asetik Asit

Toz haldeki 12.8 mg klaritromisin (Bilim İlaç), 10 ml % 0,125 lik (v/v) seyreltik asetik asit (Merck) içerisinde çözüldü. Konsantrasyonu 100 µg/ml (w/v) lik stok ilaç solüsyonu hazırlandı ve 0,22 µm'lik steril filtreden (Sartorius Stedim) geçirilerek solüsyon steril edildi. Stok antibiyotik solüsyonundan 2 kat seri dilüsyonlar hazırlandı. Bunun için 9 adet steril cam tüpe 1'er ml steril PBS ilave edildi. Stok solüsyondan ilk tüpe 1 ml eklendi ve bu tüpten 1 ml çekilerek bir sonraki tüpe aktarıldı. Son tüpe ekleme yapıldıktan sonra bu tüpten 1 ml dışarı atıldı. Böylece tüplerde ilaç solüsyonu konsantrasyonu 50 µg/ml - 1.75 µg/ml aralığında 2 kat dilüsyonla azalan 9 ayrı konsantrasyon elde edildi. Hazırlanan 1 ml'lik bu ilaç solüsyonları 50 ml'lik besiyeri içerisinde 1 µg/ml – 0.0037 µg/ml ilaç konsantrasyonu içermektedir.

Çözücü: Metanol

Toz haldeki 25 mg klaritromisin 25 ml metanol (Merck) içerisinde çözüldü. Konsantrasyonu 100 µg/ml (w/v) lik stok ilaç solüsyonu hazırlandı ve 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilerek solüsyon steril edildi. Seri dilüsyonlar asetik asit çözeltilisindeki gibi hazırlandı.

ii. Besiyerinin Hazırlanması:

CLSI tarafından onaylanan metodoloji, bekletilmiş (>2 hafta) %5 Koyun kanı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) ilave edilerek hazırlanan Mueller Hinton Agar (Oxoid) besiyeri plaklarına klaritromisin antibiyotiğinin son konsantrasyonu 1 µg/ml – 0.0037 µg/ml olacak

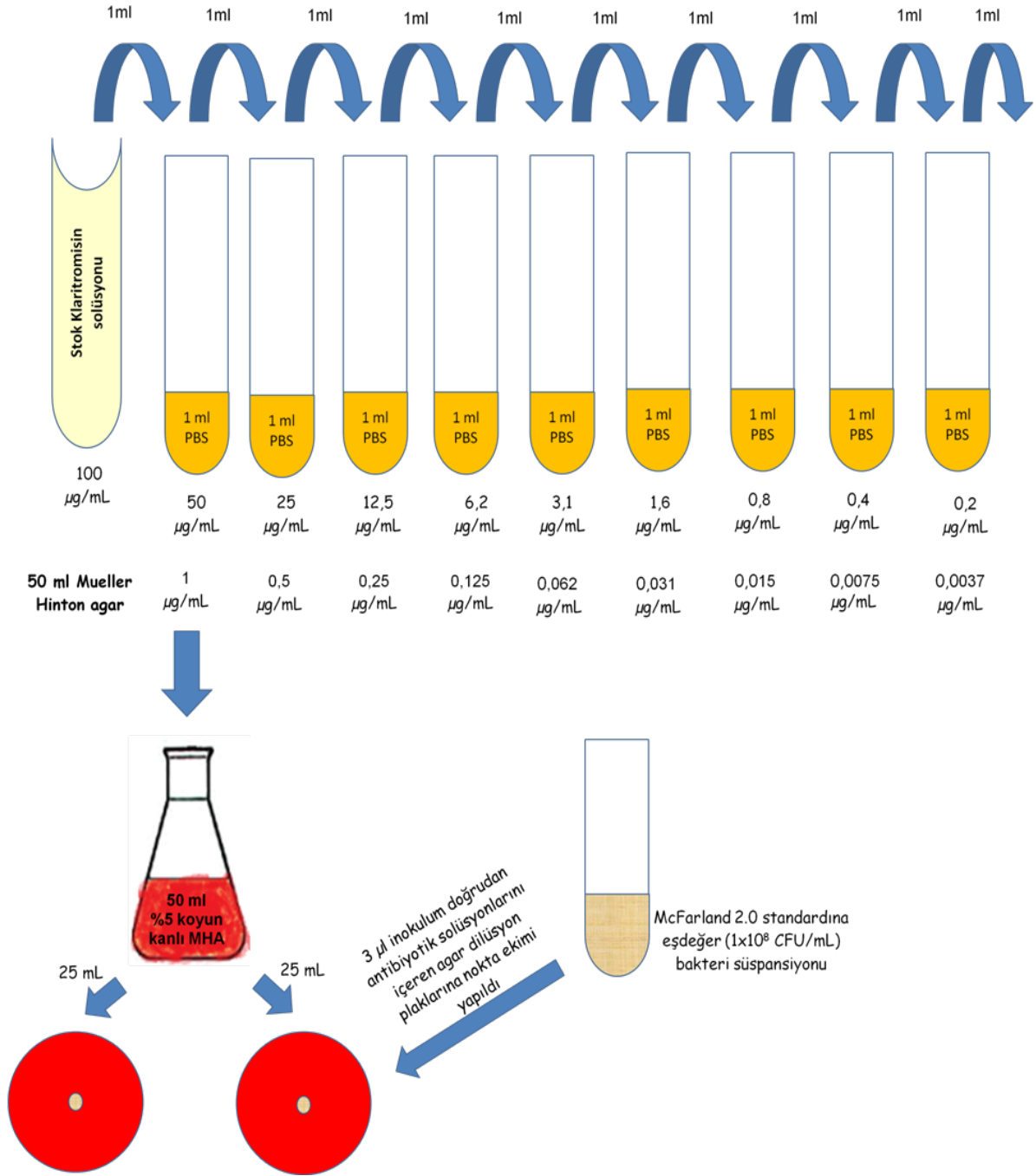
şekilde seri dilüsyonları eklenerek agar dilüsyon yöntemi prosedürüne göre “duplicate” olarak uygulandı. Kontrol besiyerine ilaç solüsyonu yerine 1 ml PBS eklendi.

iii. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması:

Subkültürü yapılan *H. pylori* suş kolonileri 5 ml Brucella Broth (Beckton Dickinson and Company) içerisinde süspanse edilerek bakteri süspansiyonu McFarland 2.0 standardına eşdeğer (1×10^8 CFU/mL) optik yoğunluk [Densimat (Biomerieux)] hazırlandı (247).

iv. Bakteri Süspansiyonunun İnokulasyonu:

McFarland 2.0 standardına eşdeğer (1×10^8 CFU/mL) *H. pylori* bakteri süspansiyonundan 3 µl alındı ve inokulum doğrudan antibiyotik solüsyonlarını içeren agar dilüsyon plaklarına nokta ekimi yapıldı (Şekil 21). Ekim yapılan plaklar 37 °C’de 3 gün anaerobik jar içerisinde GasPak Campy Container System (Beckton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. Enkübasyon sonunda *H. pylori* kolonileri gözlemlendi ve üremeyi inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu (MİK) belirlendi. CLSI’ya göre, agar dilüsyon yöntemi ile klaritromisin için MİK sınır değerleri $\leq 0,25$ µg/mL duyarlı (S), 0.5 µg/mL orta duyarlı (I) ve ≥ 1.0 µg/mL dirençli (R) olarak bildirilmiştir (Minumum kalite kontrol önerilerinde standart suş *Helicobacter pylori* ATCC® 43504 belirtilmiştir) (193). McFarland 2.0 standardına eşdeğer (1×10^8 CFU/mL) *Escherichia coli* bakteri süspansiyonu kullanılarak agar dilüsyon yöntemi kontrol edildi. Enkübasyon sonunda *Escherichia coli* kolonileri gözlemlendi ve üremeyi inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu (MİK) belirlendi.



Şekil 21. Stok klaritromisin solüsyonundan seri dilüsyonların hazırlanması ve agar dilüsyon yöntemi uygulanması

3.6.5.3.2. Gradyent Difüzyon (E-test) Yöntemi

H. pylori kolonileri 5 ml Brucella Broth içerisinde süspanse edilerek McFarland 3 (10^9 CFU/ml)'e göre hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarının optik yoğunlukları Densimat ile ölçüldü. McFarland 3 (10^9 CFU/ml)'e göre hazırlanmış bakteri

süspansiyonundan 100 µl alınarak inokulum %5 defibrine koyun kanlı Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine steril eküvyon ile yayıldı. Yüzey tamamen kuruduktan sonra E-test stripleri (AB Biodisk) her 90 mm'lik plak yüzeyine bir adet olacak şekilde yerleştirildi. Ekim yapılan plaklar 3-4 gün mikroaerofilik ortamda 37°C'de anaerobik jar içerisinde GasPak Campany Container System (Beckton Dickinson and Company) kullanılarak enkübe edildi. Enkübasyon sonunda E-test ile MİK belirlendi.

E-test yöntemi ile klaritromisin için MİK sınır değerleri ≤ 0.25 µg/mL duyarlı (S); 0.5 µg/mL intermediate (IM); >0.5 µg/mL dirençli (R) olarak değerlendirildi (79).

3.6.5.3.3. Disk Difüzyon Yöntemi

H. pylori kültür pozitif 78 hasta suşuna disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. *H. pylori* kolonileri 5 ml Brucella Broth içerisinde süspanse edilerek McFarland 3 (10^9 CFU/ml)'e göre hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarının optik yoğunlukları Densimat ile ölçüldü. McFarland 3 (10^9 CFU/ml)'e göre hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak inokulum %5 defibrine koyun kanlı Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine steril eküvyon ile yayıldı. Yüzey tamamen kuruduktan sonra klaritromisin (15 µg), levofloksasin (5 µg), metronidazol (80 µg), siprofloksasin (5 µg), amoksisilin diskleri (10 µg) (BD BBL Sensi-Disc, Beckton Dickinson and Company) her 90 mm lik plak yüzeyine yerleştirildi. Ekim yapılan plaklar 3 gün 37°C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Beckton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik koşullarda enkübe edildi. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinden disk difüzyon testi ile *H. pylori* duyarlı ve dirençli suşlar görünen inhibisyon bölgelerinin çaplarına göre belirlendi.

Klaritromisin için sınır inhibisyon zonu değeri 0.5 µg/mL MİK değerine göre 22 mm dirençli (R) olarak değerlendirildi (79). Levofloksasin için sınır inhibisyon zonu değeri <12 mm dirençli (R) olarak değerlendirildi (263). Sınır inhibisyon zonu değeri, amoksisilin için ≤ 18 mm, siprofloksasin için ≤ 30 mm, metronidazol için ≤ 16 mm dirençli (R) olarak değerlendirildi (264).

Klaritromisin (15 µg), levofloksasin (5 µg), metronidazol (80 µg), ciprofloksasin (5 µg), amoksisilin diskleri (10 µg) (BD BBL Sensi-Disc, Beckton Dickinson and Company) BD Türkiye distribütörü tarafından hediye edilmiştir.

3.6.6. Biyopsi Örneklerinin ve İzole Edilen Helicobacter pylori Koloni Örneklerinin FISH Yöntemi ile İncelenmesi

3.6.6.1. Biyopsi Örneklerinden İzole Edilen Helicobacter pylori Koloni Örneklerinin FISH Yöntemi ile İncelenmesi

3.6.6.1.1. Örneklerin Hazırlanması

Antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden %7 At Kanlı Columbia Blood Agar'da izole edilen koloniler 100 µl PBS içerisinde süspanse edildi ve üzerine %37'lik formaldehitten 10 µl eklendi. Oda ısında 15 dk inkübe edildi. 12000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Pellet üzerine 200 µl PBS eklenerek yeniden suspanse edildi. 12000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Pellet 100 µl PBS'de yeniden süspanse edildi, 100 µl etanol eklenip karıştırıldı ve örnek çalışılana kadar -20°C'de saklandı.

3.6.6.1.2. Dehidrasyon

Poly-L-Lysine kaplı lamlara PBS/etanol ile hazırlanan ve -20°C'de saklanan karışımın 40 µl'si eklendi. Havada kurutuldu ve her seferinde 1 sn alevde tutulup ya da 160-240 w 5 dk mikrodalga fırında ısıtılarak fikse edildi. Dehidrasyon için, her birinde 3 dk olmak üzere %50, %80 ve %96 etanolde lamalar inkübe edildi ve lamalar havada kurutuldu.

3.6.6.2 Formalin Fikse Parafine Gömülü Biyopsi Örneklerinin FISH Yöntemi ile İncelenmesi

3.6.6.2.1. Örneklerin Hazırlanması

%10'luk tamponlu formalinde tespit edilen korpus ve antrum biyopsi örneklerinden standart yöntemle parafin bloklar elde edilmiştir. Bu parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler Poly-L-Lysine kaplı lamlara alındı.

3.6.6.2.2. Deparafinizasyon

Poly-L-Lysine kaplı lamlara parafin bloklardan alınan 4 µm kesitlerden parafinin uzaklaştırılması için deparafinizasyon işlemi BACTfish *H. pylori* Combi Kit (Izinta Trading Co., Hungary) içerisinde belirtilen prosedüre göre uygulandı. Biyopsi kesitlerine 2x30 dakika

ksilen (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien) ve 2x30 dakika absolü etanol C₂H₆O (molecular biology grade/ethyl alcohol, AppliChem BioChemica) içeren şalelerde (Sigma S5766) deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Deparafinizasyonun her bir aşamasında taze solüsyon kullanıldı. Bu işlem uygulandıktan sonra lamalar havada kurutuldu.

3.6.6.3. Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması

FISH yönteminde pozitif kontrol olarak klaritromisin duyarlı *H. pylori* ATCC 43404 standart suşu kullanıldı (265). Ayrıca, pozitif kontrol olarak klaritromisin duyarlı *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu ve klaritromisin dirençli *H. pylori* hasta biyopsi kesiti kullanıldı (Şekil 17, Şekil 18). Firma tarafından temin edilen kalite kontrol referans suşlarından negatif kontrol olarak formalin ile fikse edilmiş *E. coli*, *Burkholderia cepacia* ve *Pseudomonas aeruginosa* kültür süspansiyonları kullanıldı. Ayrıca bilinen *H. pylori* enfeksiyonu pozitif ve negatif formalin ile tespit edilmiş parafine gömülü biyopsi kesitleri internal kalite kontrolü olarak kullanıldı. Ayrıca BACTfish *H. pylori* Combi Kit (Izinta Trading Co., Hungary) referans suşlar ile üretici tarafından kalite kontrole tabi tutulmuştur (265).

3.6.6.4. FISH Yönteminin Uygulanması

3.6.6.4.1. BACTfish *H. pylori* Combi Kit Uygulaması (Izinta Trading Co.)

FISH yöntemi BACTfish *H. pylori* Combi Kit (Izinta Trading Co., Hungary) içerisinde belirtilen prosedüre göre uygulanmıştır.

3.6.6.4.1.1 Test Reaktiflerinin Hazırlanması

i. DNA prob karışımının hazırlanması

Liyofilize DNA prob karışımı 2 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi ve 27 µl DNA tamponu ile rehidrate edildi, + 4 °C'de saklandı.

ii. DNA hibridizasyon solüsyonunun hazırlanması

5 µl rehidrate DNA prob karışımı 1.5 ml mikrosantrifüj tübüne (eppendorf, Greiner bio-one) aktarıldı ve 45 µl hibridizasyon tamponu eklendi. Kullanmadan önce tamamen karıştırıldı.

iii. Nemli ortamın hazırlanması

Yeşil kapaklı hibridizasyon tüpüne (SeaPro Theranostics International, Lelystad, The Netherlands) 2 ml hibridizasyon tamponu eklenerek tüp sıkıca kapatıldı.

iv. Yıkama tamponun hazırlanması

45 ml steril de-iyonize su (Ultra pure water for HPLC BIOCHROM AG), 5 ml 10X yıkama tamponuna eklenerek dilüe edildi ve 46°C’de gerekli miktarı önceden ısıtıldı.

3.6.6.4.1.2. Hibridizasyon

40 µl DNA hibridizasyon solüsyonu Poly-L-Lysine’li lam üzerinde deparafinize edilmiş korpus ve antrum biyopsi kesitlerinin üzerine eklendi. Hava kabarcıkları uzaklaştırılarak Poly-L-Lysine’li lamın üzerine lamel (24x50mm, ISOLAB) kapatıldı. Lamalar hazırlanan nemli ortama konuldu ve 90 dakika 46°C’de enkübe edildi. İnkübasyon sonrasında lamel atıldı. Lam önceden ısıtılmış 1-2 ml yıkama tamponu solüsyonu içeren özel şalenin (SIGMA S5766) içinde 2x15 dakika 46°C’de enkübe edildi. Enkübasyon sonunda 2 dk PBS (BIOCHROM AG) ile lam yıkandı ve havada kurutuldu. 8 µl 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI/Antifade- MC Q-BIOgene) solüsyonu ile korpus ve antrum biyopsi kesitleri kaplandı, üzeri lamelle kapatıldı ve 5 dakika oda ısısında enkübe edildi. Lamel uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı ve havada kurutuldu.

3.6.6.4.1.3. Görüntü Analizi ve Değerlendirme

Hibridizasyon aşaması tamamlandıktan sonra, FISH yöntemi uygulanan Poly-L-Lizin’li lam üzerinde bulunan antrum ve korpus biyopsi kesitleri ayrı ayrı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’ndan Doç. Dr. Oğuz Altungöz ve Araş. Gör. Sait Tümer tarafından mikroskopik kullanım ve inceleme alt yapı olanaklarının sağlanması ile DAPI, FITC, rhodamine, çift-bant (FITC ve rhodamine) ve üç-bant (DAPI, FITC ve rhodamine) filtre donanımı olan Nikon Eclipse E600 epifloresan mikroskobu (Nikon Corp, Tokyo, Japan) kullanılarak *H. pylori* varlığı ve klaritromisin duyarlılığı yönünden değerlendirildi. Analiz, 2005.KB.SAG.019 nolu yüksek lisans tez projesindeki protokole uygun olarak yapıldı (265).

Antrum ve korpus biyopsi kesitlerinin *H. pylori* varlığının saptanmasında, klaritromisin duyarlı ve dirençli *H. pylori* suşlarının değerlendirilmesinde DAPI filtreli 40x ve 100x objektifte incelendi. Yeşil floresan filtrede parlak yeşil floresan veren bir bakteri morfolojisi

H. pylori olarak değerlendirildi. Kırmızı floresan filtrede kırmızı floresan veren bakteri klaritromisin dirençli *H. pylori* olarak değerlendirildi. Dual band filtre kullanılarak yeşil ve kırmızı floresan veren bakteri sarı görüldü (Tablo 1). Ayrıca, *H. pylori* ile enfekte dokuda eş zamanlı olarak duyarlı ve dirençli bakteri kolonizasyonu (karışık populasyon) ve *H. pylori*'nin kokoid formunda saptandı. DAPI boyası da kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 1. FISH yönteminin epifloresan mikroskopunda değerlendirilmesi

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

* çift-bant kullanıldığında

3.6.7. Biyopsi ve Koloni Örneklerinin Real-time PCR Yöntemi ile İncelenmesi

3.6.7.1. Örneklerin Hazırlanması

i. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinin Hazırlanması

Her hastadan bir korpus ve bir antrumdan alınan gastrik biyopsi örnekleri steril ependorflara konularak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirildi. Aseptik koşullarda steril petrilere konularak alındı ve biyopsi örnekleri steril bistüri veya pellet pestle uç (Sigma Aldrich) ile kullanılan doku homojenizatör (Sigma Aldrich) ile ezilip parçalandı. 1 ml Brucella Buyyon içerisine konuldu ve buzdolabında -20°C'de DNA ekstraksiyonu yapılana kadar saklandı.

ii. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinden İzole Edilen *H. pylori* Koloni örneklerinin hazırlanması

Her hastadan alınan bir korpus ve bir antrum örneğinden kültürü yapılan %7 Defibrine At Kanlı *Helicobacter pylori* Columbia Blood (Oxoid) besiyerinde üreyen kolonilerin her birinden izole edilen *H. pylori* suşlarının tek kullanımlık steril öze (Greiner bio-one) ile 5 ml PBS (Biochrom AG) içeren steril burgulu kapaklı tüpte (Isolab) McFarland 2 (1×10^8 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonu otomatize Densimat (Biomérieux, France) cihazı kullanılarak hazırlandı ve buzdolabında +4°C'de DNA ekstraksiyonu yapılana kadar saklandı.

3.6.7.2. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinden Total DNA Ekstraksiyonu

3.6.7.2.1. QIAamp DNA Mini Kit Uygulaması (QIAGEN)

Brucella Buyyon içerisinde -20°C’de saklanan antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri 30 dk 14000 rpm’de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında supernatant atıldı. Pellet üzerine 180 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K eklendi. 10 sn vortekslendikten sonra bütün gece 55°C’de ısı bloğunda bekletildi.

- Bütün gece ısı bloğunda bekletildikten sonra 10 sn santrifüjlendi
- 200 µl buffer AL eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı.
- 10 dk 70°C ısı bloğunda inkübe edildi.
- Isı bloğundan çıkan örnek 10 sn santrifüjlendi.
- Isı bloğundan çıkan örnek üzerine 200 µl etanol eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı.
- Toplama tüpünün içine yerleştirilmiş olan QIAamp Spin kolonuna tüm örnek eklendi ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve QIAamp Spin kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
- QIAamp Spin kolonunun üzerine 500 µl Buffer AW1 eklendi ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve QIAamp Spin kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
- QIAamp Spin kolonunun üzerine 500 µl Buffer AW2 eklendi ve 13200 rpm’de 3 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve QIAamp Spin kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
- QIAamp Spin kolonu 13200 rpm’de 1 dk santrifüjlendi.
- QIAamp Spin kolonunun altına 1.5 ml hacimli ependorf tüpü yerleştirildi. Kolonun üzerine 70°C’de önceden ısıtılmış sudan 100 µl eklendi. 10 dk oda ısısında inkübe edildi. 13200 rpm’de 2 dk santrifüjlendi. Bu işlem sonunda QIAamp Spin kolonu atıldı. 1.5 ml ependorf tüpü içinde toplanan örnek ekstrakte edilen DNA’dır.

Ekstrakte edilen her bir DNA örneğinin miktarı Picodrop cihazı kullanılarak ölçüldü. Ekstrakte edilen DNA örneği -20°C’de saklandı.

Ayrıca, yukarıdaki protokole göre J99 ve 26695 *H. pylori* standart suşlarının DNA'ları ise pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere Victor Segalen Bordeaux 2 University, Campylobacter ve Helicobacter Referans Laboratuvarında (Bordeaux, Fransa) hazırlanmıştır (FEMS Fellowship, 1 Mart 2008-30 Mayıs 2008).

3.6.7.3. *Helicobacter pylori* DNA'sının Koloniden Ekstraksiyonu

3.6.7.3.1. Wizard Genomik DNA Purifikasyon Kiti Uygulaması (Promega)*

Çalışmaya alınan 64 hastanın kültür pozitif suşlardan içerisinde 1 ml distile steril su veya PBS bulunan ependorf tüplerine steril eküvyon ile toplanan kolonilerden süspansiyon hazırlanarak aşağıda belirtilen DNA ekstraksiyon protokolüne göre diğer proje kapsamında DNA ekstraksiyonu Assoc. Prof. Dr. Guillermo I. Perez-Perez tarafından *New York Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıp ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalları (NYUSM, New York, USA) Laboratuvarında protokolüne uygun şekilde daha önceden gerçekleştirilmiştir (77).

DNA Ekstraksiyonu Protokolü:

Hücre Lizis Aşaması:

- Hazırlanan bakteri süspansiyonu üzerine 600 µl nükleik lizis solüsyonu eklendi. Yavaşça karıştırıldı.
- Süspansiyon 5 dakika 80 °C de inkübe edildi, oda ısına gelene kadar beklendi.
- 3 µl RNase solüsyonu süspansiyona eklendi. Karıştırıldı, 37 °C'de 15-60 dakika enkübe edildi, oda ısısına gelene kadar beklendi.

Protein Presipitasyon Aşaması:

- Örnek üzerine 200 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi ve vorteks yapıldı.
- 5 dakika buzda enkübe edildi.
- 13000-16000 g de 3 dakika santrifüj edildi.

DNA Presipitasyon ve Rehidrasyon Aşaması:

- Supernatant, içinde 600 µl isopropanol bulunan temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı ve karıştırıldı.
- Örnek 2 dakika 13000-16000 g'de santrifüj edildi ve santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 600 µl %70 etanol eklendi ve karıştırıldı.
- Örnek 2 dakika 13000-16000 g de santrifüj edildi.

- Etanol aspire edildi ve 10-15 dakika kuruması için beklendi.
- Örnek üzerine 100 µl rehidrasyon solüsyonu eklendi ve 1 saat 65 °C'de veya 1 gece 4°C'de bekletildi.

3.6.7.3.2. High Pure PCR Template Hazırlama Kiti Uygulaması (Roche)

Hazırlanan McFarland 2 (1×10^8 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonunun 200 µl'si nükleaz içermeyen 1.5 ml mikrosantrifüj tüpünde (Greiner Bio-one) 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet üzerine 200 µl PBS eklendi. İyice karıştırıldı.

- 5 µl lizozim eklendi. 37 °C'de su banyosunda 15 dakika enkübe edildi.
- Su banyosunun sıcaklığı 70°C'ye çıkarıldı. Elüsyon tamponu kullanılıncaya kadar 70°C'de su banyosunda bekletildi. 200 µl bağlama tamponu ve 40 µl Proteinaz K karıştırılarak bir karışım (240 µl) hazırlandı. Bu iki maddenin önceden ayrı olarak karıştırılmasının nedeni homojenizasyonu tam olarak sağlamaktır. Daha sonra örnek üzerine hazırlanan bu karışım eklendi ve 70°C'de 10 dakika su banyosunda enkübe edildi.
- Su banyosundan çıkan örnek üzerine 100 µl isopropanol alkol ilave edildi ve karıştırıldı.
- Altında toplama tüpü olan saflaştırma kolonuna tüm sıvı örnek eklendi ve kapağı kapatılarak 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
- Saflaştırma kolonunun üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu ortamdaki DNAaz gibi inhibitörleri uzaklaştırmak için eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
- Saflaştırma kolonunun üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
- Saflaştırma kolonunun üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 12000 rpm'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 kolonunun altına 1.5 ml hacimli ependorf tüpü yerleştirildi. Saflaştırma tüpünün üzerine 70°C’de tutulan elüsyon tamponun’dan 200 µl eklendi ve kapağı kapatılarak 12000 rpm’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 -20°C’de saklandı.

Ayrıca, yukarıdaki protokole göre NCTC 11637 *H. pylori* standart suşunun DNA’sı da Real-time PCR yöntemi için pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.6.7.4. AnDiaTec® *Helicobacter pylori* (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile Real-time PCR Yönteminin Uygulanması

3.6.7.4.1. Test Reaktiflerinin Hazırlanması

Enzim karışımı (A1a) ve Enzim tamponu (A1b) 13000 rpm’de santrifüj edildi. Enzim karışımı (A1a) içerisine 60 µl Enzim tamponu (A1b) ilave edildi. Ayrıca primer prob karışımı (A2), MgCl₂ (A3), duyarlı (wt) pozitif kontrol (A4), dirençli (mut) pozitif kontrol (A5), negatif kontrol (A6) kullanıma hazır olduğundan direkt kullanıldı.

3.6.7.4.2. Amplifikasyon için Real-time PCR Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek için kapiller tüpüne, toplam hacim 20 µl olacak şekilde aşağıdaki reaktifler eklendi; işlemler sırasında malzemeler ve kapiller tüpleri real-time PZR soğutucu blokta tutuldu.

Enzim karışımı (A1)	2 µl
Primer- Prob karışımı (A2)	14.4 µl
MgCl ₂	1.6 µl
DNA kalıbı	2 µl

* Enzim Tamponu (A1b) dNTP karışımı içerir.

3.6.7.4.3. Real-time PCR Programı

Her bir örnek ve pozitif kontroller için hazırlanmış olan kapiller tüpleri LightCycler (Roche) yerleştirildi. Tüm amplifikasyon ve melting curve analizi işlemleri aynı cihazda yapıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Andiatec® *Helicobacter pylori* (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile Real-time PCR yönteminde uygulanan LightCycler programı

	Isı	Süre	Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	Yakalama Modu	Döngü
Denatürasyon	95°C	10 dk			
Kantifikasyon	95°C	0 sn		Tek	45
	55°C	10 sn	20		
	72°C	15 sn			
Melting Curve	95°C	0 sn		Devamlı	
	50°C	5 sn	0.10		
	80°C	0 sn			

3.6.7.4.4. Real-time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

LightCycler 4.1 Front Screen Software (Roche) programı kullanılarak real-time PCR sonuçları değerlendirildi. 530 floresans kanalı ve melting analiz programı seçilerek pozitif ve negatif kontrol örneklerinin pik oluşturduğu sıcaklıklar göz önüne alınarak hasta örneklerinin mutasyona sahip olup olmadığı açısından incelendi.

3.6.8.5 in house Real-time PCR Yönteminin Uygulanması

3.6.8.5.1. Primerlerin Hazırlanması

Hpy-S 5'- AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC -3'

Hpy-A 5'- CGCATGATATTCCCATAGCAGT -3' (197).

Kuru (liyofilize) halde gelen öncüller, kalite sertifikasındaki belirtilen oranlarda, Hpy-S: 199 µl, Hpy-A: 208 µl steril, nükleaz içermeyen distile su ile çözüldü. Böylece her ikisinin de konsantrasyonu 20 pmol/µl oldu.

3.6.8.5.2. Probların hazırlanması

HpyRED 5'- LC640 -GGCAAGACGGAAAGACC- PH-3'

Anchor FL 5'- TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC- FL- 3' (197).

Kuru (liyofilize) halde gelen öncüller, kalite sertifikasındaki belirtilen oranlarda, Sensor prob: 50 µl, Anchor prob: 50 µl steril, nükleaz içermeyen distile su ile çözüldü. Böylece her ikisinin de konsantrasyonu 20 pmol/µl oldu.

3.6.8.5.3. Pozitif Kontrollerin Hazırlanması*

i. Pozitif Kontrol Suşları

Klaritromisin duyarlı genotipe sahip *H. pylori* CIP 101260 suşu ile klaritromisin dirençli genotipe sahip 23S rRNA geninde A2142C mutasyonuna sahip *H. pylori* 825 suşu, 23S rRNA geninde A2142G mutasyonuna sahip *H. pylori* 683 suşu ve 23S rRNA genindeki A2143G mutasyonuna sahip *H. pylori* 677 suşu kullanıldı.

ii. Luria Buyyon (LB) Agar Hazırlanması

500 ml su içerisine 17 gr olarak tartılan LB Agar ilave edildi. İyiçe homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. İçerisine 250 µl ampisilin (son konsantrasyon 50µg/ml) eklendi. Hazırlanmış olan besiyeri steril petrilere 20'şer ml olacak şekilde paylaştırıldı. Besiyerleri donduktan sonra üzerine 100 µl XTRA Blue Plus eklenip petri yüzeyine yayıldı. +4°C'de saklandı.

iii. LB Buyyon Hazırlanması

500 ml su içerisine 10 gr olarak tartılan LB Buyyon ilave edildi. İyiçe homojenize olması sağlandı. Uygun olarak paketlenerek 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. +4°C'de saklandı.

iv. İnsert DNA'nın Plazmide Aktarılması

Pozitif kontrol suşlarının DNA örnekleri *SacI* (5'-TAAGAGCTCAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3') ve *KpnI* (5'-TATGGTACCCGCATGATATTCCCATAGCAGT-3') restriksiyon bölgelerini içeren HPYA ve HPYS primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Amplifiye PCR ürünleri %95 etanol ile presipite edildi ve iki kez %70 etanolde yıkandı. Bütün gece *SacI* ve *KpnI* (Roche Diagnostics) restriksiyon enzimleri ile parçalandı. Parçalanmış ürünler etanol ile presipite edildi ve iki kere yıkandı. PCR ampliconları direkt olarak pBluescriptII SK (Stratagene) içine T4 DNA ligaz (Roche) ile ligasyonlandı.

Ligasyon için pGEM-3Zf (+) vektörü (Promega) (1 volüm) ve kontrol insert DNA (3 volüm) (wild type A2142C, A2142G, A2143G'a ait PCR ürünleri), T4 DNA ligaz kullanıldı. pGEM-3Zf vektörü β -galaktosidaz bölgesini kodlayan α -peptit içerisinde çoklu klonlama bölgesi yanında yer alan SP6 ve T7 RNA polimeraz promotor bölgesini taşımaktadır. α -peptitin insersiyonal inaktivasyonu ile oluşan rekombinant klonlar indikatör plaklarda renk taraması ile direkt olarak identifiye edilmektedir.

1 μ l plazmid ürünü 1,5 ml'lik ependorflara eklendi. Her birinin üzerine kompetan özellikte JM109 eklendi. 20 dk buz üzerinde bekletildi. 45-50 sn 42°C su banyosunda ısı şokuna maruz bırakıldı. Sonrasında 2 dk buz üzerinde tutuldu. 950 μ l LB Broth eklendi ve 1 saat 37°C'de çalkalamalı şekilde (150 rpm) etüvde bekletildi. 100 μ l LB agar bu karışımdan eklendi ve 37°C'de 1 gün bekletildi. Bir gün sonra plaklar incelendi. Eklenen XTRA Blue Plus içerisindeki IPTG galaktozu parçalamış ise koloniler mavi renkte görüldü. Klonlanan *Escherichia coli* içerisinde ise protein üretimi yapılmadığından IPTG galaktozu parçalamaz ve beyaz renkte koloni görülür. Plaktaki her bir koloni içerisinde 5 ml LB Broth olan ayrı bir tüp içine ekildi ve üzerine 2,5 ml ampisilin eklendi. 37°C'de çalkalamalı şekilde (250 rpm) etüvde 1 gün bekletildi.

v. Plazmid ekstraksiyonu

Üreme gözlenen tüplerden plazmid ekstraksiyonu QIAprep Miniprep (QIAGEN) kiti ile yapıldı.

- 3 ml üreme gözlenen tüpten alınan sıvı 2 adet 2ml'lik tüp içerisine eklendi ve 10 dk full speedde santrifüjlendi.
- Supernatant atıldıktan sonra oda ısısında ağzı açık bir şekilde pelletin kuruması beklendi.
- Tüplerden birine 250 μ l Buffer P1 eklendi ve iyice homojenize edildikten sonra ikinci tüpe konuldu ve yeniden homojenize edildi.
- 250 μ l Buffer P2 eklendi ve tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- 350 μ l Buffer N3 eklendi ve tüp alt üst edilerek karıştırıldı
- 10 dk full speed de santrifüjlendi.
- Supernatant QIAprep spin kolonuna eklendi.
- 30-60 sn santrifüjlendi.

- QIAprep spin kolonuna 0.5 ml Buffer Pb eklenerek yıkandı ve 30-60 sn santrifüjlendi.
- Sonrasında 0.75 ml Buffer PE eklenerek kolon yıkandı ve 30-60 sn santrifüjlendi.
- Yıkama tamponundaki rezidüler kalmışsa uzaklaşsın diye yeniden 1 dk santrifüjlendi.
- QIAprep spin kolonu steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 50 µl steril su eklendi ve 10 dk oda ısısında enkübe edildi ve 1 dk santrifüjlendi.

Bundan sonra %1 lik agaroz jelde örnekler yürütölüp bandlar gözlemlendi ve aynı zamanda real-time PCR ile örneklerin sahip olduğu mutasyonlar kontrol edildi. Klonlanan plazmidlerin 1/100 dilüsyonları hazırlandı ve pozitif kontrol olarak kullanıldı.

* Real-time PCR pozitif kontrol suşları *H. pylori* CIP 101260 suşu (WT), *H. pylori* 825 suşu (A2142C), *H. pylori* 683 suşu (A2142G), *H. pylori* 677 suşu (A2143G); Victor Segalen Bordeaux 2 University, Campylobacter ve Helicobacter Referans Laboratuvarında (Bordeaux, Fransa) uygulanan protokole göre plazmide aktararak hazırlanmıştır (FEMS Fellowship, 1 Mart 2008-30 Mayıs 2008).

3.6.8.5.4. Amplifikasyon için Real-time PCR Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek için kapiller tüpüne, toplam hacim 8 µl olacak şekilde aşağıdaki reaktifler eklendi; işlemler sırasında malzemeler ve kapiller tüpleri real-time PZR soğutucu blokta tutuldu.

Steril distile su	5.28 µl
MgCl ₂	0.64 µl
Hpy A (20 pmol/µl)	0.16 µl
Hpy S (20 pmol/µl)	0.16 µl
HpyRED (20 pmol/µl)	0.08 µl
Anchor FL (20 pmol/µl)	0.08 µl
Tampon 10x*	0.80 µl
DNA kalıbı	0.80 µl

* Light Cycler Fast Start Enziminin 10X Tamponu; FastStart Taq DNA Polimeraz, reaksiyon tamponu dNTP karışımı ve 10 mM MgCl₂ içerir.

3.6.8.5.5. Real-time PCR Programı

Her bir örnek ve pozitif kontroller için hazırlanmış olan kapiller tüpleri LightCycler (Roche) yerleştirildi. Tüm amplifikasyon ve melting curve analizi işlemleri aynı cihazda yapıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Real-time PCR yönteminde uygulanan LightCycler programı

	Isı	Süre	Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	Yakalama Modu	Döngü
Denatürasyon	95°C	10 dk	20		
Kantifikasyon	95°C	0 sn	20	Tek	50
	60°C	10 sn	20		
	72°C	12 sn	20		
Melting Curve	95°C	0 sn	20		
	38°C	50 sn	20		
	80°C	0 sn	0.10	Devamlı	
Soğutma	40°C	30 sn	20		

3.6.8.5.6. Real-time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

LightCycler 4.1 Front Screen Software (Roche) programı kullanılarak real-time PCR sonuçları değerlendirildi. 530 floresans kanalı ve melting analiz programı seçilerek pozitif ve negatif kontrol örneklerinin pik oluşturduğu sıcaklıklar göz önüne alınarak hasta örneklerinin mutasyona sahip olup olmadığı açısından incelendi.

3.6.9. *Helicobacter pylori* varlığı, *cagA* ve *vacA* PCR Uygulaması

3.6.9.1. Test Reaktiflerinin Hazırlanmaları

10 mM dNTP karışımı; 10 µl dNTP (Sigma) karışımı (dNTP tüpü içerisinde her birinden 10 mM olarak: dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) 40 µl steril distile su içerisinde 1:5 oranında homojenize edildi.

Qiagen Taq DNA Polimeraz (250 units) (Qiagen) ve **Taq DNA Polimeraz** (500 units) (Fermentas) kullanıma hazır olarak temin edildi.

Primerler (HPLC saflıkta) :

HPU-1; 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3' (forward primer)

HPU-2; 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3' (reverse primer) (TıbbiMolBiol) (205)

cagA2530S; 5'-GTTAARAATRGTGRAAYGG-3' (forward primer)

cagA3000AS; 5'-TTTAGCTTCATACGC-3' (reverse primer) (Sigma) (152)

vacA m region; 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' (forward primer)

vacA m region; 5'-TGAGGTTGTTGATATTGAC-3' (reverse primer) (Sigma) (266)

vacA s region; 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' (forward primer)

vacA s region; 5'- CCTGAGACCGTTCCTACAGC-3' (reverse primer) (Sigma) (266)

Liyofilize primerler, kalite belgesindeki belirtilen oranlarda, HPU-1: 491 µl, HPU-2: 589 µl, cagA2530S: 881 µl, cagA3000AS: 886 µl, vacA m region forward: 295 µl, vacA m region reverse forward: 285 µl, vacA s region forward: 281 µl, vacA s region reverse: 310 µl steril, nükleaz içermeyen de-iyonize distile su (ultra pure water for HPLC Biochrom AG) (pH 7) ile sulandırıldı. Hazırlanan bu stok solüsyonlardan 20 µl alıp, 180 µl distile su ile karıştırılarak karışım hazırlandı. Öncüller bittiğinde aynı işlem ana stoktan tekrarlandı.

GeneRuler™ 50 bp DNA ladder (50µg) (Fermentas #SM0371) 5 µl DNA Ladder, 5 µl 6x loading dye ve 20 µl distile su karıştırılarak hazırlandı.

Seakem ® LE Agaroz (Lonza,USA)

Etidium bromid (10 mg/ml (Sigma); 0.1 gr etidium bromid 10 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Tris Borik Edta (TBE) 10X tamponu (Applichem); 100 ml TBE 10X solüsyonu ve 900 ml distile su karıştırılarak 1X TBE tamponu elde edildi.

6X Orange DNA Loading dye (Fermentas #RO631)

3.6.9.2. DNA'nın Coğaltılması (Amplifikasyon)

3.6.9.2.1. Amplifikasyon için PCR Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek için 0.2 ml'lik ependorf tüpüne (Greiner bio-one) toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu; işlemler sırasında malzemeler ve ependorf tüpleri buz üzerinde tutuldu.

HPU PCR

Steril distile su	32 µl
10X PCR Tamponu*	5 µl
dNTP	5 µl
HPU-1	1 µl
HPU-2	1 µl
Fermentas Taq DNA Polimeraz*	1 µl
MgCl ₂	4 µl
DNA kalıbı	1 µl

*Fermentas Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu; MgCl₂ içermemektedir.

cagA PCR

Steril distile su	37.75 µl
10X PCR Tamponu*	5 µl
dNTP	4 µl
cagA-2530S	1 µl
cagA3000AS	1 µl
Taq DNA Polimeraz*	0.25 µl
DNA kalıbı	1 µl

* Qiagen Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu: MgCl₂ içerdiğinden ilave edilmemiştir.

vacA m region PCR

Steril distile su	32 µl
10X PCR Tamponu*	5 µl
dNTP	5 µl
vacA m region forward	1 µl
vacA m region reverse	1 µl
Fermentas Taq DNA Polimeraz*	1 µl
MgCl ₂	4 µl
DNA kalıbı	1 µl

*Fermentas Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu; MgCl₂ içermemektedir.

vacA s region PCR

Steril distile su	32 µl
10X PCR Tamponu*	5 µl
dNTP	5 µl
vacA s region forward	1 µl
vacA s region reverse	1 µl
Fermentas Taq DNA Polimeraz*	1 µl
MgCl ₂	4 µl
DNA kalıbı	1 µl

*Fermentas Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu; MgCl₂ içermemektedir.

Pozitif kontrol olarak NCTC 11637 ve J99 standart *H. pylori* suşları kullanıldı. Negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşları ve steril, nükleaz içermeyen de-iyonize distile su (ultra pure water for HPLC Biochrom AG) kullanıldı.

3.6.9.2.2. Termal Cycler PCR Programı

Her bir örnek ve negatif kontrol için hazırlanmış olan küçük PCR ependorf tüpleri termal cycler'a (Techne TC-412) yerleştirildi. Tüm amplifikasyon işlemleri aynı cihazda yapıldı.

HPU PCR için;

Başlangıç aktivasyon basamağı: 95 °C'de 3 dakika

Toplam 35 döngü olacak şekilde;

Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C	1 dakika
Primer bağlanması (Annealing)	45 °C	1 dakika
DNA zincirinin uzaması (Elongasyon)	72 °C	1 dakika
Son uzama (Son Elongasyon)	72 °C	10 dakika

cagA PCR için;

Başlangıç aktivasyon basamağı: 94 °C'de 5 dakika

Toplam 35 döngü olacak şekilde;

Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C	30 saniye
Primer bağlanması (Annealing)	50 °C	45 saniye
DNA zincirinin uzaması (Elongasyon)	72 °C	45 saniye

Son uzama (Son Elongasyon)	72 °C	5 dakika
----------------------------	-------	----------

***vacA* PCR için;**

Başlangıç aktivasyon basamağı: 95 °C’de 3 dakika

Toplam 35 döngü olacak şekilde;

Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C	30 saniye
Primer bağlanması (Annealing)	52 °C	30 saniye
DNA zincirinin uzaması (Elongasyon)	72 °C	2 dakika
Son uzama (Son Elongasyon)	72 °C	5 dakika

3.6.9.2.3. Agaroz Jel Hazırlanması

PCR ürünlerinin saptanması için 1X TBE içerisinde % 1-2’lik agaroz jel hazırlandı. 100 ml 1X TBE tamponu içine 1 gr ve 2 gr agaroz tartılarak konuldu. Mikrodalga fırında 350 Watt’da 1.5 dakika tutularak eritildi. Karışımın sıcaklığı 60°C’ye düştüğünde 3 µl etidyum bromid (Sigma) eklendi. Elektroforez tankının jel kalıbı distile suyla silinip temizlendi ve kenarları sızdırmayacak şekilde tank içine yerleştirildi, jel kalıbın tarağı yerleştirildi. Hazırlanan jel karışımı kalıba döküldü. Donması beklendi. Donduktan sonra jel kalıbının şekli değiştirildi ve tarak çıkartıldı.

3.6.9.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Büyüklik belirleyici olarak kullanılan “DNA ladder” ve incelenecek PCR ürünlerinden 10’ar µl olacak şekilde parafilm üzerine aktarıldı. Her örnek için birer µl olmak üzere “loading dye” yükleme tamponu eklendi, karıştırıldı. Her birinden 10’ar µl alarak jele aktarıldı. 1 X TBE içinde 120 volt’da (Thermo Scientific Owl Easycast™ B2) 40 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilluminatörde (EAGLE EYE II ve VILBER LOURMAT) Infinity Capt programı kullanılarak incelendi. PCR ürünü büyüklükleri DNA ladder ile karşılaştırıldı.

3.6.9.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

ureA için 411 bp, *vacA* m1 bölgesi için 290 bp, m2 bölgesi için 350 bp; *vacA* s1 bölgesi için 176 bp, s2 bölgesi için 200 bp; *cagA* için 370-570 bp ürün varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

3.7. Araştırma Planı

2006-2011	Hasta Örneklerinin Toplanması
2008-2012	Yöntemlerin Standardizasyonu
2008- 2012	Yöntemlerin Uygulanması
Ocak-Temmuz 2012	Sonuçların Değerlendirilmesi
Mayıs- Aralık 2012	Yayın haline getirme
Ekim 2008 - Kasım 2012	Tez Yazımı

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Uygulanan testlerin geçerliliği (tanı değeri) için dört gözlü düzenek oluşturuldu. Alınan her bir korpus ve antrum biyopsi örneklerine uygulanan histopatolojik inceleme, HUT ve kültürün, en az ikisinin olumlu olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu olumlu; tümünün olumsuz olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz 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: $d/(c+d).100$

FISH metodu ve real-time PCR ile altın standart yöntemin karşılaştırılmasında duyarlılık, seçicilik, olumlu ve olumsuz öngörü değeri ve tanısal doğruluk kullanıldı. McNemar Ki-kare testi uygulandı (SPSS Version 15.0 for Windows).

Yaş ve cinsiyet dağılımının tüm test yöntemleri ile değerlendirildiğinde *H. pylori* pozitifliği/negatifliği ile arasındaki ilişki varlığı t test ve McNemar ile değerlendirildi. Histopatolojik bulguların ve endoskopik bulguların değerlendirilmesinin; FISH ve real-time PCR pozitifliği/negatifliği ve klaritromisin duyarlılığı arasında ve ayrıca CagA pozitifliği/negatifliği, VacA genotipleri ve klaritromisin duyarlılığı arasındaki ilişki varlığı McNemar, Fisher Exact test ve kappa tutarlılık testi ile değerlendirildi (SPSS Version 15.0 for Windows). $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma ile ilgili sınırlamalara tartışma kısmında değinilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu 13 Temmuz 2006 tarih ve 08/15/06 nolu toplantısında, 166 protokol numaralı “**Dispeptik yakınmalı ve mide kanserli hastalarda *Helicobacter pylori* varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değerlendirilmesi**” isimli doktora tezi araştırma projesinin uygulanması onayı, 13.07.2006 tarih ve 179 sayılı yazı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı’na bildirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğine üst sindirim sistemi yakınmaları ile 2006-2011 tarihleri arasında başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 65 (%27.8) erkek ve 169 (%72.2) kadın toplam 234 hasta çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hastalar 17 ile 83 yaş grubunda olup yaş ortalaması 43.8 ± 14.0 bulundu.

H. pylori enfeksiyonu olumluluğu ile kadın ve erkek cinsiyeti arasında anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 testi, $p=0,206$). *H. pylori* enfeksiyonu olumluluğu ile yaş arasında anlamlı bir fark saptanmadı (t test, $p=0,721$). *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olan hastalarda yaş ortalaması 44.0 ± 13.3 saptanırken, *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olan hastalarda yaş ortalaması 43.1 ± 15.6 saptandı (Tablo 4).

Tablo 4. *H. pylori* enfeksiyonu açısından 234 dispeptik hastanın demografik verileri

	<i>H. pylori</i> enfeksiyonu (n=234)	
	Olumsuz	Olumlu
Sayı	70	164
Ortalama Yaş	43.1 ± 15.6	44.0 ± 13.3
Medyan yaş	43.5	46
Yaş Oranı	20-83	17-75
Kadın:Erkek Oranı	2.89	2.49

4.2. Endoskopik Bulgular

İki yüz otuz dört hasta endoskopik açıdan; özofagusta özofajit, özofagus ülseri, hiatal hernie varlığı, midede eritamatöz gastrit, korpus ülser, antrum ülser varlığı ve duodenumda ise duodenal ülser, bulbit, bulbusta ülser varlığı açısından değerlendirildi.

İki yüz otuz dört hastanın özofagusunda; 95 (%40.6)'inde özofajit, 2 (%0.9)'sinde özofagus ülseri, 7 (%3.0)'sinde hiatal hernia, 44 (%18.8)'ünde hem hiatal hernia hem de özofajit varlığı saptanırken, 86 (%36.8)'sında normal endoskopik bulgular saptandı.

İki yüz otuz dört hastanın midesinde; 204 (%87.1)'ünde eritamatöz gastrit, iki (%0.9)'sinde korpus ülser, 12 (%5.1)'sinde hem antrum ülser hemde eritamatöz gastrit, üç (%1.3)'ünde hem korpus ülser hemde eritamatöz gastrit ve 13 (%5.6)'ünde normal endoskopik bulgular saptandı.

İki yüz otuz dört hastanın duodenumunda; bir (%0.4)'inde duodenal ülser, 30 (%12.8)'unda bulbit, sekiz (%3.4)'inde bulbus ülser, 10 (%4.3)'unda hem bulbus ülser hem de bulbit varlığı ve 185 (%79.1)'inde normal endoskopik bulgular saptandı.

4.3. Hızlı Üreaz Testi (HUT) Bulguları

İki yüz otuz dört hastanın toplam 468 antrum ve korpus biyopsi örneğine hasta başı hızlı üreaz testi uygulandı: Toplam 234 hastanın 159 (%67.9)'sı HUT olumlu; bunlardan 117 (%73.6)'si antrum ve korpus HUT pozitif, 27 (%17.0)'si sadece antrum HUT pozitif ve 15 (%9.4)'i sadece korpus HUT pozitif; 75 (%32.1)'i olumsuz saptandı.

4.4. Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine Göre Histopatolojik Bulgular

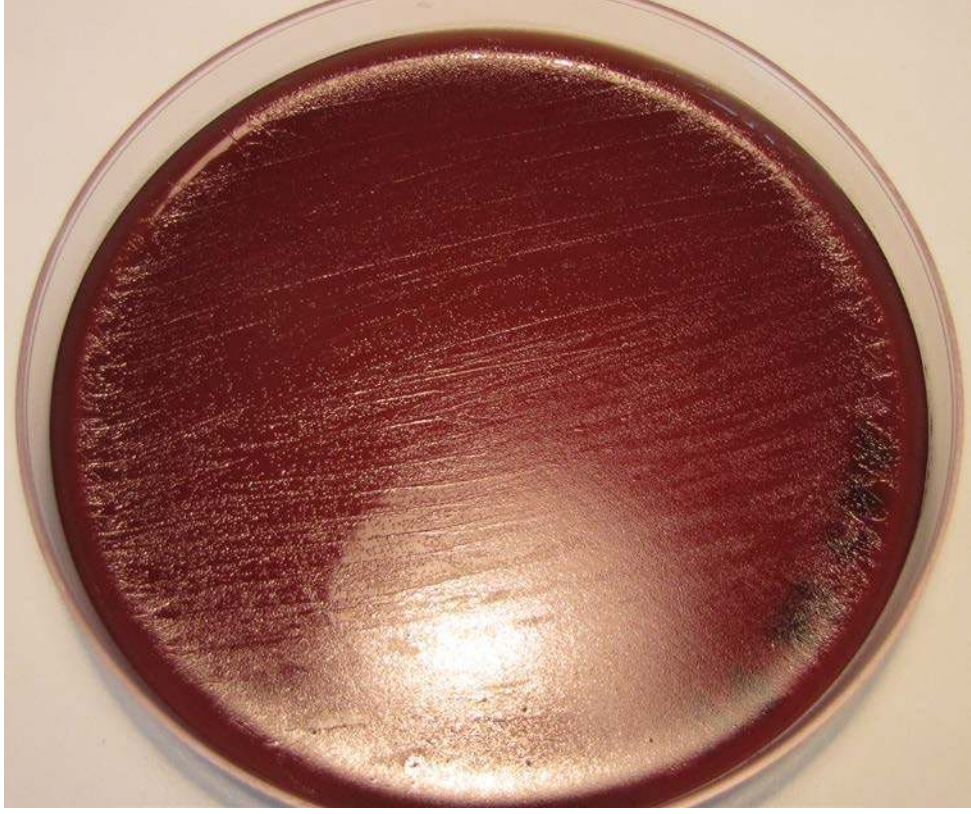
İki yüz otuz dört hastanın histopatolojik antrum ve korpus toplam 468 biyopsi örneği Patoloji Anabilim Dalı'nda gastrointestinal patoloji ile ilgili patoloji uzmanı tarafından gastrik aktivite açısından; lamina propiada, pitlerde enflamasyon, atrofi, intestinal metaplazi ve HPL her biri 0-3 arası olarak güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre incelendi (246).

Histopatolojik incelemede *H. pylori* enfeksiyonu yönünden; 234 hastadan 160 (%68.4)'ı histopatolojik incelemeye göre *H. pylori* enfeksiyonu olumlu; bunlardan 130 (%81.3)'ü antrum ve korpus histopatoloji pozitif, 17 (%10.6)'si sadece antrum histopatoloji pozitif, 13 (%8.1)'ü sadece korpus histopatoloji pozitif; 74 (%31.6)'ü *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olarak saptandı.

Histopatolojik inceleme ile 160 *H. pylori* olumlu hastanın 156 (%97.5)'sında gastrit, 20 (%12.5)'sinde atrofi, 38 (%23.8)'inde intestinal metaplazi, iki (%1.3)'sinde normal mide bulguları saptandı. Histopatolojik inceleme ile 74 *H. pylori* olumsuz hastanın 66 (%89.2)'sında gastrit, 13 (%17.6)'ünde atrofi, 11 (%14.9)'inde intestinal metaplazi, 9 (%12.2)'unda normal mide bulguları saptandı.

4.5. Kültür Bulguları

Toplam 468 antrum ve korpus biyopsi örneğinin kültür sonuçları değerlendirildi. 234 hastanın 114 (%48.7)'si *H. pylori* kültürü olumlu; bunlardan 84 (%73.7)' antrum ve korpus olumlu, 18 (%15.8)'i antrum olumlu, 12 (%10.5)'si korpus olumlu ve 120 (%51.3)'si *H. pylori* kültürü olumsuz saptandı (Şekil 22). Antrum biyopsi örneklerinden; 102 (%43.6)'si *H. pylori* olumlu, 132 (%56.4)'si *H. pylori* olumsuz olarak değerlendirildi. Korpus biyopsi örneklerinden; 96 (%41.0)'sı *H. pylori* olumlu, 134 (%57.3)' *H. pylori* olumsuz olarak değerlendirildi.

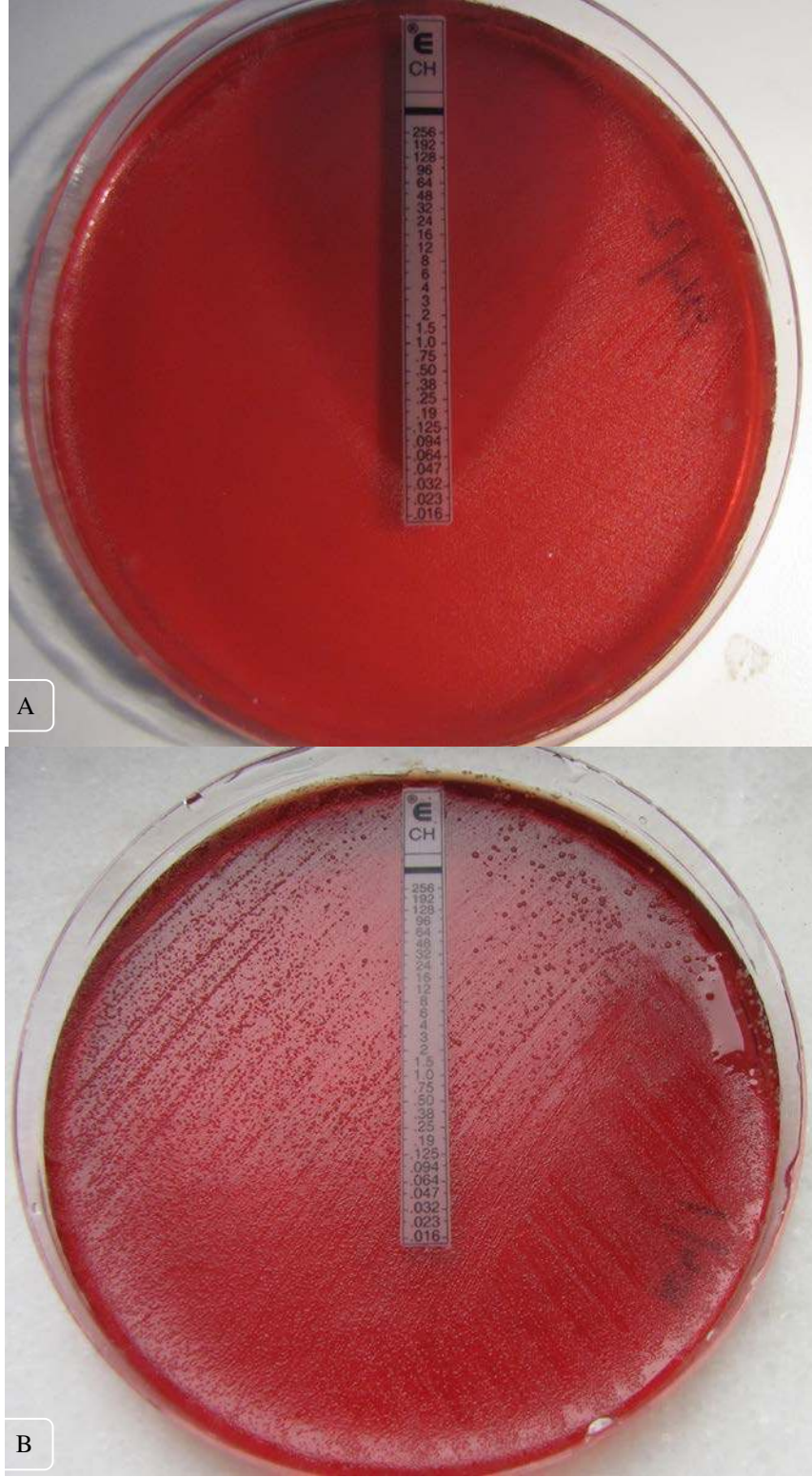


Şekil 22. *Helicobacter pylori* kolonilerinin %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerindeki görüntüsü

4.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Bulguları

Agar dilüsyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testlerinde, 1 - 0.037 µg/ml arasındaki farklı konsantrasyonlarda klaritromisin içeren plaklar incelendiğinde NCTC 11637 suşunun üremenin olduğu en yüksek klaritromisin konsantrasyonu 0.062 µg/mL olarak saptandı. Çözücü olarak metanol ya da seyreltik asetik asit kullanılması sonucu etkilemedi. 0.125 µg/mL klaritromisin içeren plakta üreme olup olmadığı katalaz, oksidaz, üreaz testleri ve Gram boyama ile değerlendirildi. Bu plakta üreme olmadığı belirlendi. Ayrıca çözücü olarak kullanılan metanol ve %0.125'lik asetik asitin inhibisyon etkisi göstermediği görüldü. Bu konsantrasyonun üzerindeki asetik asitin inhibisyon etkisi gösterdiği, altındaki oranlarda ise klaritromisinin çözünmediği belirlendi. *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun agar dilüsyon yöntemi ile klaritromisin MİK değeri 0.125 µg/mL, E-test yöntemi ile klaritromisin MİK değeri <0.016 µg/mL olarak saptandı. Ayrıca, randomize seçilen 10 hastanın antrum ve korpus örneklerinden izole edilen ve E-test yöntemi ile klaritromisin duyarlı ve klaritromisin dirençli saptanan *H. pylori* suşlarına agar dilüsyon yöntemi de uygulanmıştır. E-test yöntemi ile sonuçlar uyumlu saptanmıştır.

H. pylori kültürü olumlu 114 hastanın 84 (%73.7)'ü antrum ve korpus olumlu, 18 (%15.8)'i sadece antrum olumlu, 12 (%10.5)'si sadece korpus olumlu saptanan hastalar E-test yöntemi ile değerlendirildi. Antrum ve korpus olumlu 84 hastanın, 58 (%69.1)'i antrum ve korpus klaritromisin duyarlı, 14 (%16.7)'ü antrum ve korpus klaritromisin dirençli, 9 (%10.7)'u antrum klaritromisin dirençli ve korpus klaritromisin duyarlı, 3 (%3.6)'ü antrum klaritromisin duyarlı ve korpus klaritromisin dirençli saptandı. Antrum olumlu 18 hastanın, 15 (%83.3)'i klaritromisin duyarlı, 3(%16.7)'ü klaritromisin dirençli saptandı. Korpus olumlu 12 hastanın, 9(%75)'u klaritromisin duyarlı, 3(%25)'ü klaritromisin dirençli saptandı. Toplamda antrum olumlu 102 hastanın, 76 (%74.5)'sı klaritromisin duyarlı, 26 (%25.5)'sı klaritromisin dirençli olarak saptandı. Korpus olumlu 96 hastanın, 76 (%79.2)'sı klaritromisin duyarlı, 20 (%20.8)'si klaritromisin dirençli olarak saptandı. Antrum ve korpus birlikte değerlendirildiğinde E-test yöntemi ile 114 kültür pozitif hastanın, 82 (%72.0)'si klaritromisin duyarlı, 20 (%17.5)'si klaritromisin dirençli, 12 (%10.5)'si klaritromisin duyarlı-dirençli (miks enfeksiyon) olarak saptandı (Şekil 23). Klaritromisin direnci %28.1 saptandı.



Şekil 23. Gradyent difüzyon (E-test) yöntemi ile klaritromisin duyarlılığının saptanması **A-** Klaritromisin duyarlı *Helicobacter pylori* **B-** Klaritromisin dirençli *Helicobacter pylori*

Disk difüzyon yöntemi ile klaritromisin duyarlılık sonuçları, E-test ve agar dilüsyon yönteminin sonuçları ile uyumlu saptandı (Şekil 24). Daha ucuz olması nedeni ile gerekli olduğunda kullanılabilir sonucuna varıldı. Diğer antimikrobiyallerin (levofloksasin, metronidazol, siprofloksasin, amoksisilin) disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık test sonuçları daha sonra bir başka çalışma kapsamında yayınlanacaktır (data not shown).



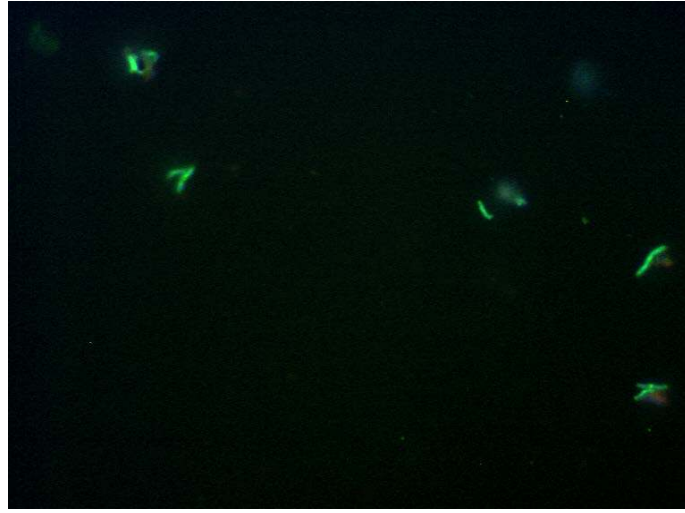
Şekil 24. Disk difüzyon yöntemi ile klaritromisin duyarlılığının saptanması

4.7. Hastaların *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Yönünden Değerlendirilmesi

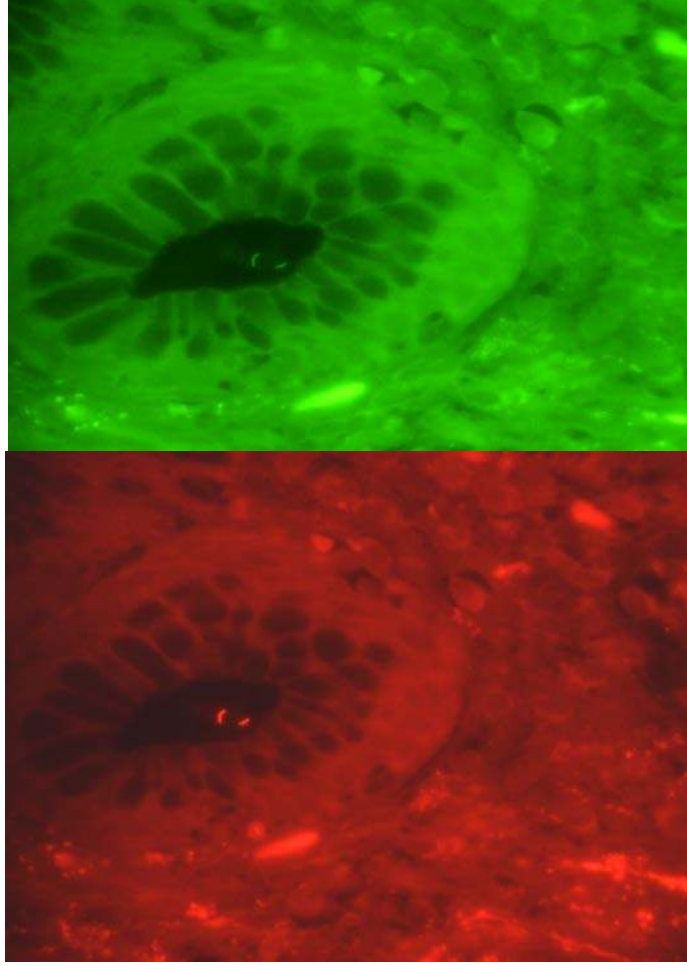
Alınan her bir korpus ve antrum biyopsi örneklerine uygulanan histopatolojik inceleme, HUT ve kültürün, en az ikisinin olumlu olduğu 164 (%70.1) hasta *H. pylori* enfeksiyonu olumlu; tümünün olumsuz olduğu 70 (%29.9) hasta *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz kabul edildi.

4.8. FISH Bulguları

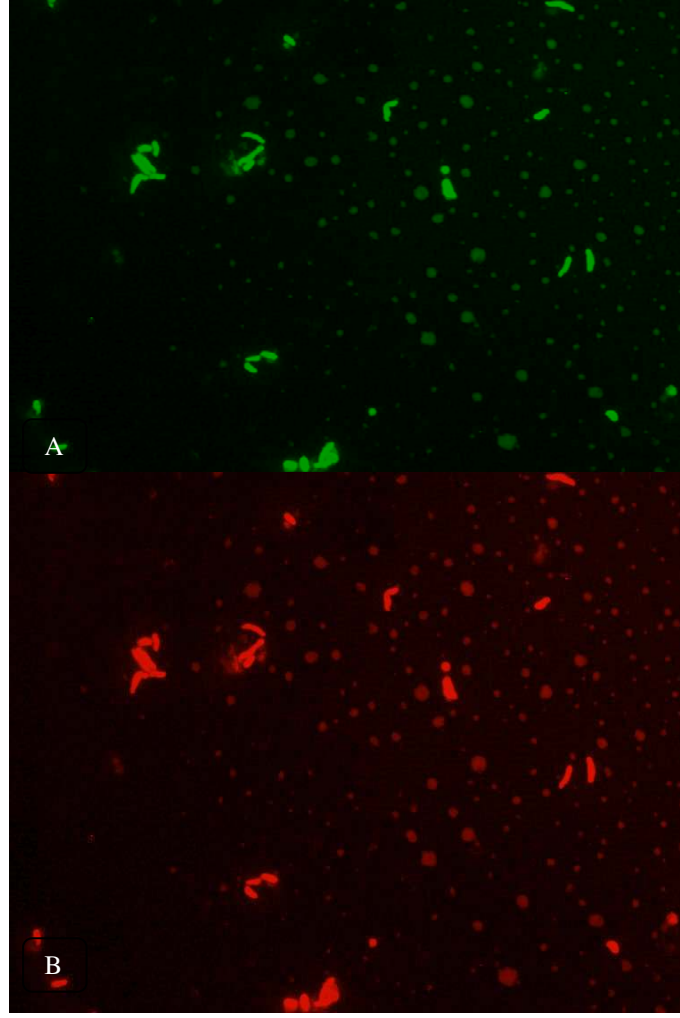
İki yüz otuz dört hastanın formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş antrum ve korpus biyopsilerinden hazırlanan toplam 468 histolojik kesitleri deparafinize edildi ve FISH yöntemi ile değerlendirildi. Gastrik antrum ve korpus hasta biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşları ve *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu FISH yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 25, Şekil 26). Koloni örneklerinin FISH sonuçları, formalin fikse parafine gömülü biyopsi örneklerinin FISH sonuçları ile uyumlu saptandı (Şekil 27).



Şekil 25. Pozitif kontrol (klaritromisin duyarlı *Helicobacter pylori* NCTC 11637 standart suşu)



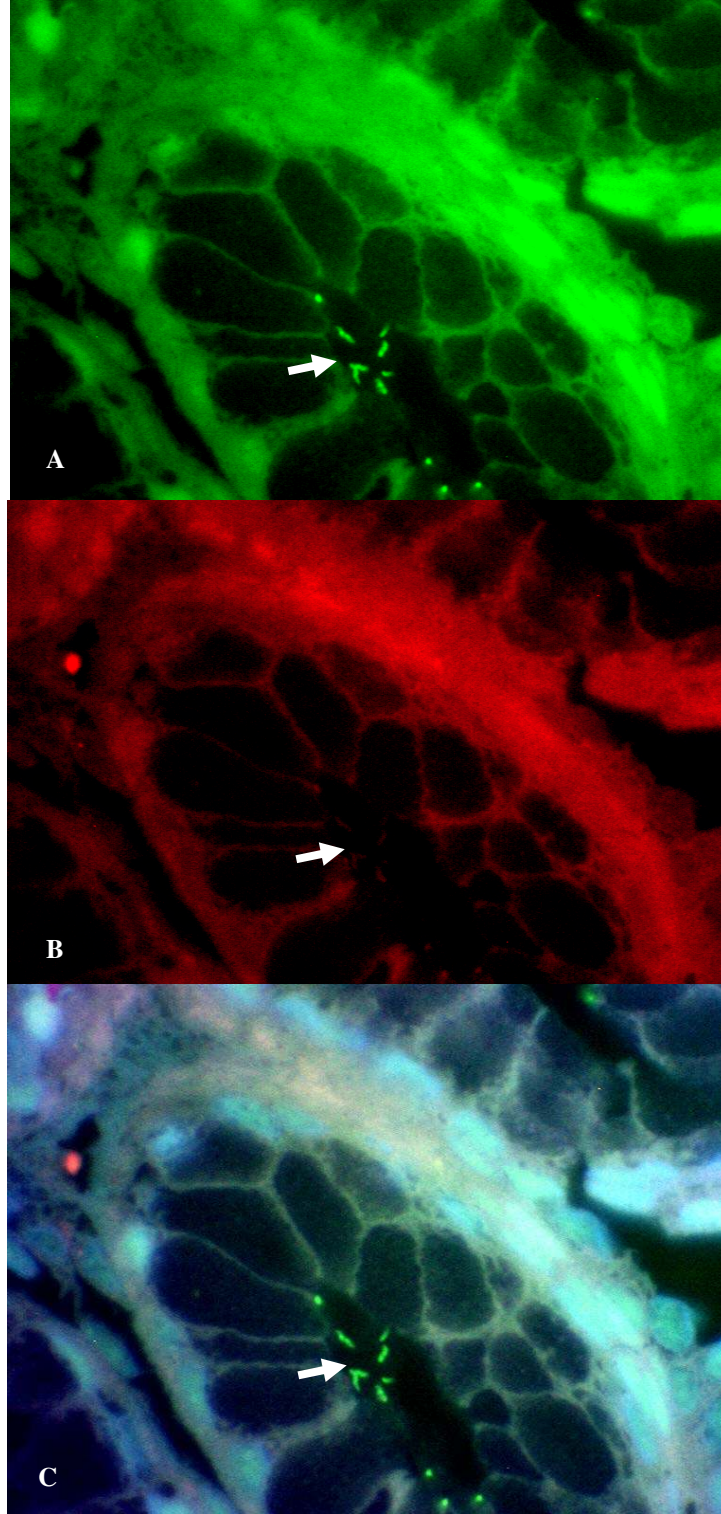
Şekil 26. Pozitif kontrol (klaritromisin dirençli *Helicobacter pylori* hasta suşu)



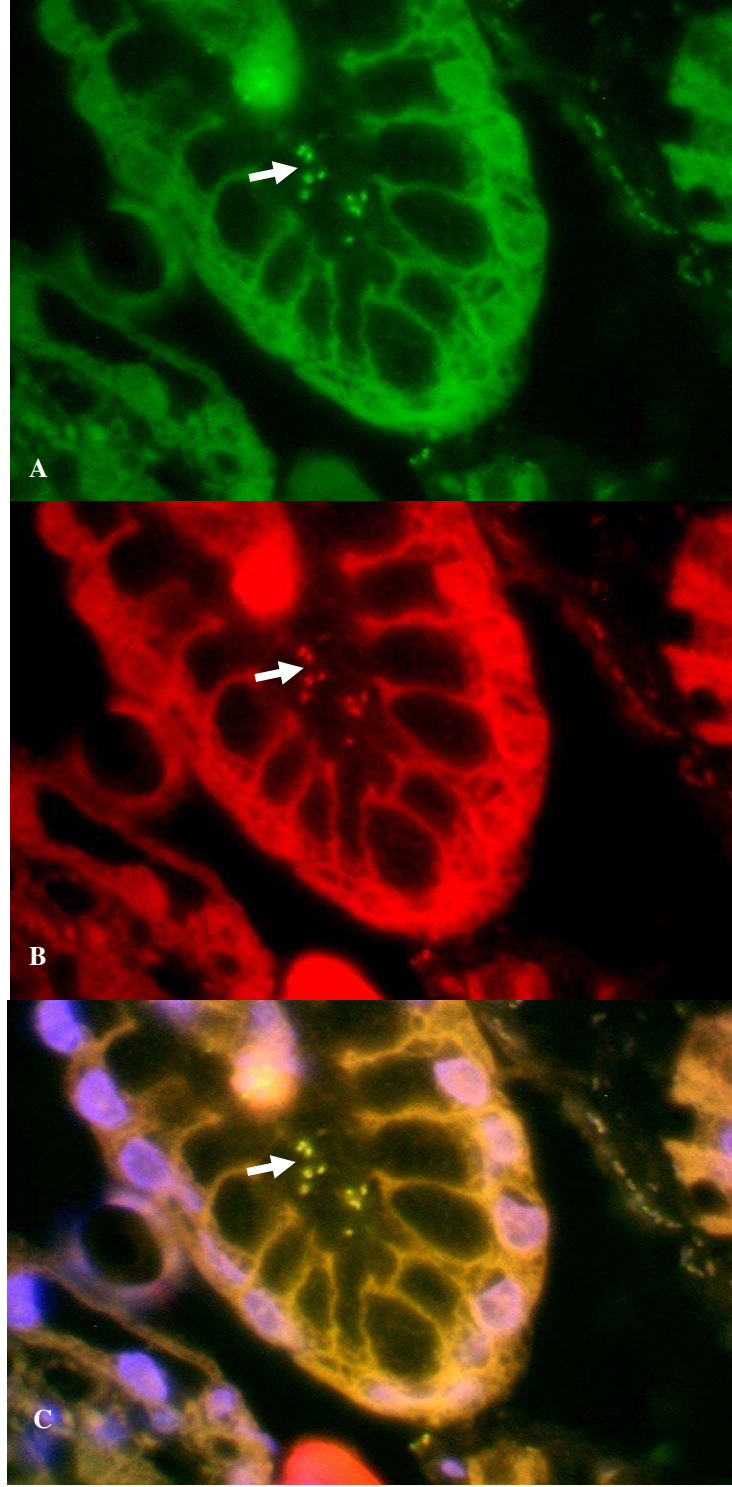
Şekil 27. Klaritromisin dirençli *Helicobacter pylori* suşunun görüntülenmesi **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile görüntülenme (kırmızı floresan: klaritromisin direnci) (objektif büyütme:100x)

İki yüz otuz dört hastanın antrum biyopsi örneğinden; 130 (%55.6)'u *H. pylori* olumlu, 104 (%44.4)'ü *H. pylori* olumsuz olarak saptandı. İki yüz otuz dört hastanın korpus biyopsi örneğinden; 135 (%57.7)'i *H. pylori* olumlu, 99 (%42.3)'u *H. pylori* olumsuz olarak saptandı. Sonuç olarak 234 hastanın 143 (%61.1)'ü *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 91 (%38.9)'i *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olarak değerlendirildi.

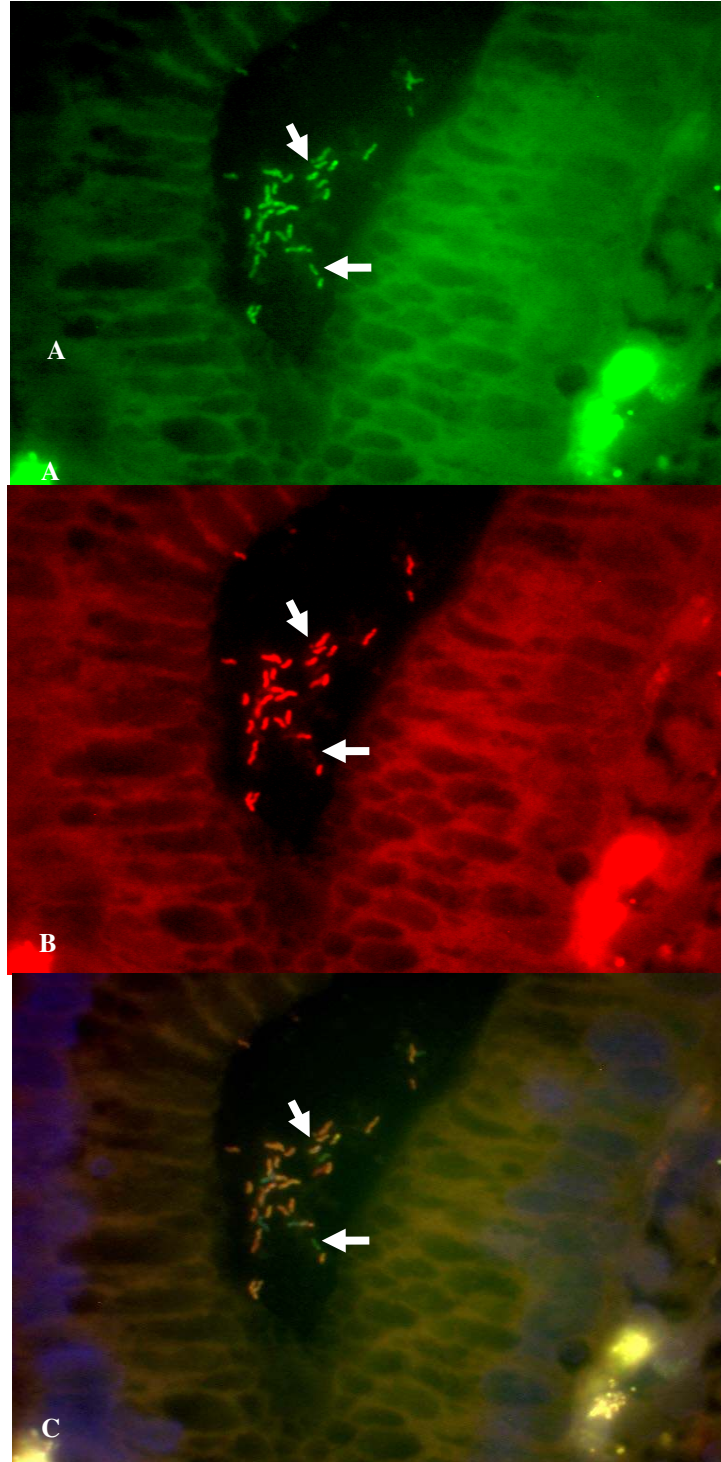
Klaritromisin direnci yönünden, 130 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu antrum kesitin; 111 (%85.4)'i duyarlı, 15 (%11.5)'i dirençli ve 4 (%3.1)'ü duyarlı/dirençli olarak saptandı. Yüz otuz beş *H. pylori* enfeksiyonu olumlu korpus kesitin; 115 (%85.2)'i duyarlı, 16 (%11.9)'sı dirençli ve 4 (%2.9)'ü duyarlı/dirençli olarak saptandı (Şekil 28-30).



Şekil 28. Korpus kesitinde klaritromisin duyarlı *Helicobacter pylori*'nin görüntülenmesi **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile (kırmızı floresan: klaritromisin direnci negatif) **C.** FITC/Rhodamin/DAPI triple band filtre görüntülenme (yeşil floresan: klaritromisin duyarlı *H. pylori*, mavi floresan: DAPI) (objektif büyütme:100x)



Şekil 29. Korpus kesitinde klaritromisin dirençli *Helicobacter pylori*'nin görüntüleri **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile görüntülenme (kırmızı floresan: klaritromisin direnci) **C.** FITC/Rhodamin/DAPI triple band filtre ile görüntülenme (sarı floresan: klaritromisin dirençli *H. pylori*, yeşil floresan: klaritromisin duyarlı *H. pylori*, mavi floresan:DAPI) (objektif büyütme:100x)



Şekil 30. Antrum kesitinde klaritromisin duyarlı ve dirençli *Helicobacter pylori*'nin (karışık populasyon) görüntülenmesi **A.** FITC özgül tek band filtre ile (yeşil floresan: *H. pylori*) **B.** Rhodamin özgül tek band filtre ile (kırmızı floresan: klaritromisin direnci) **C.** FITC/Rhodamin/DAPI triple band filtre ile görüntülenme (sarı floresan: klaritromisin dirençli *H. pylori*, yeşil floresan: klaritromisin duyarlı *H. pylori*) (objektif büyütme:100x)

HUT, histopatoloji ve kültürün en az ikisinin olumlu olduğu 164 *H. pylori* olumlu hastanın 137 (%83.5)'si FISH yöntemi ile *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olarak saptandı. FISH yönteminin duyarlılığı %83.5, spesifikliği %91.4, olumlu öngörü değeri %95.8 ve olumsuz öngörü değeri ise %70.3 olarak saptandı (Kappa=0.690). Klaritromisin direnci yönünden 111 (%81.0) hasta duyarlı, 11 (%8.0)'i dirençli ve 15 (%11.0)'i duyarlı/dirençli olarak saptandı. FISH yöntemi ile klaritromisin direnci %19.0 olarak saptandı.

FISH yönteminin klaritromisin direncinin saptanmasındaki etkinliği altın standart yöntem olan E-test sonuçları ile karşılaştırıldı (Tablo 5). E-test ve FISH yöntemi arasındaki uyum %89.5 olarak saptandı.

Tablo 5. Kültür olumlu 114 hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinin E-test ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması

FISH Sonuçları	Suş sayısı	E-test		
		R	S	S/R
<i>H. pylori</i> olumlu + klaritromisin dirençli	9 (%7.9)	9 (%100.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı	87 (%76.3)	6 (%6.9)	75 (%86.2)	6(%6.9)
<i>H. pylori</i> olumlu + klaritromisin duyarlı/dirençli	14 (%12.3)	5 (%35.7)	4 (%28.6)	5 (%35.7)
<i>H. pylori</i> olumsuz	4 (%3.5)	0 (%0.0)	3 (%75.0)	1 (%25.0)

S=duyarlı, R= dirençli, S/R= duyarlı ve dirençli

Antrum ve korpus biyopsi örnekleri ayrı ayrı FISH ve E-test sonuçları açısından değerlendirildi (Tablo 6, Tablo 7).

Tablo 6. *Helicobacter pylori* olumlu 102 antrum biyopsi örneklerinde E-test ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması

FISH Sonuçları	Suş Sayısı	E-test	
		R	S
<i>H. pylori</i> olumlu + klaritromisin dirençli	11 (%10.8)	11 (%100)	0 (%0.0)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı	83 (%81.4)	11 (%13.3)	72 (%86.7)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı/dirençli	4 (%3.9)	2 (%50.0)	2 (%50.0)
<i>H. pylori</i> olumsuz	4 (%3.9)	2 (%50.0)	2 (%50.0)

S=duyarlı, R= dirençli, S/R= duyarlı ve dirençli

Tablo 7. *Helicobacter pylori* olumlu 96 korpus biyopsi örneklerinde E-test ve FISH sonuçlarının karşılaştırılması

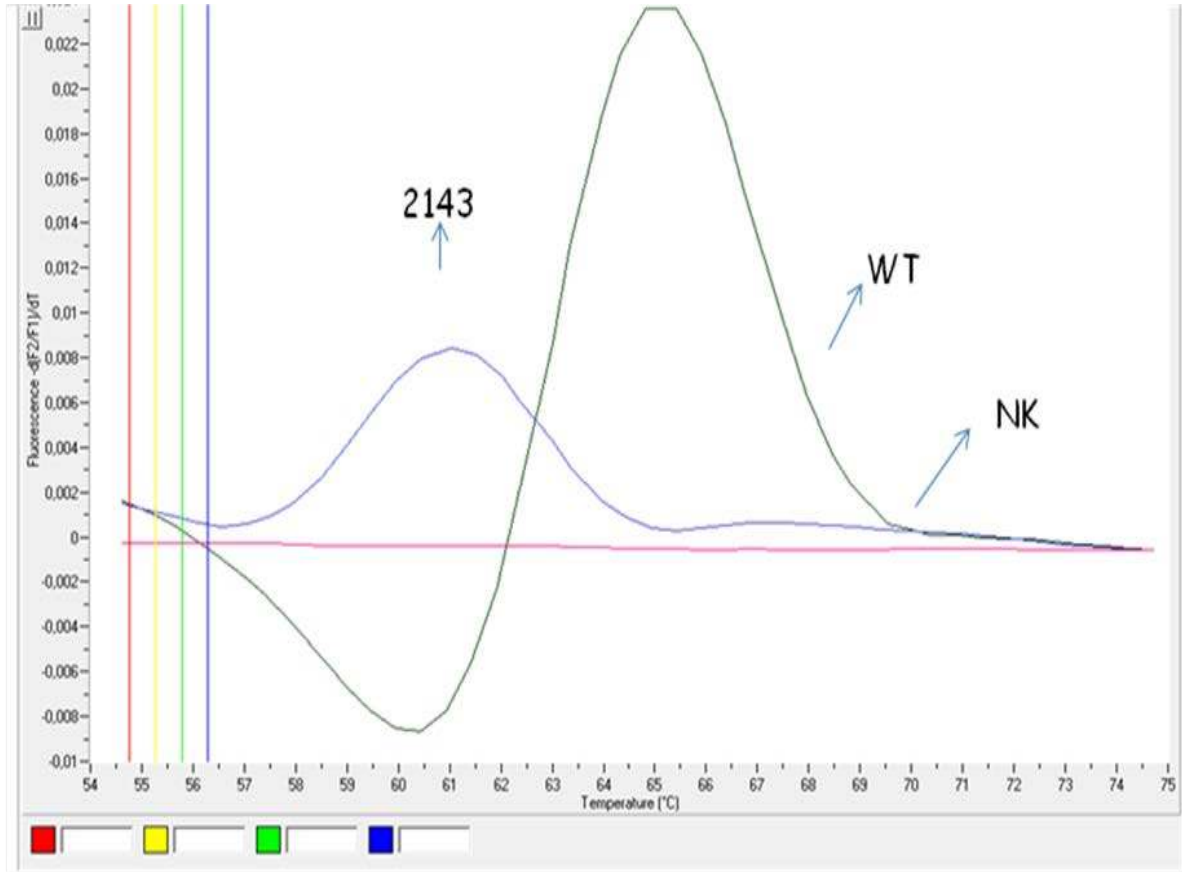
FISH Sonuçları	Suş Sayısı	E-test	
		R	S
<i>H. pylori</i> olumlu + klaritromisin dirençli	11 (%11.5)	10 (%90.9)	1 (%9.1)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı	73 (%76.1)	7 (%9.6)	66 (%90.4)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı/dirençli	4 (%4.2)	2 (%50.0)	2 (%50.0)
<i>H. pylori</i> olumsuz	8 (%8.3)	1 (%12.5)	7 (%87.5)

S=duyarlı, R= dirençli, S/R= duyarlı ve dirençli

4.9. Andiatec® *Helicobacter pylori* (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile Real-time PCR Bulguları

On beş hastanın antrum ve korpus biyopsi kesitlerine *AnDiaTec® Helicobacter pylori* (clarithromycin resistance) PCR kiti ve *in house* real-time PCR uygulanarak karşılaştırıldı. *H.*

pylori enfeksiyonu yönünden 15 hastanın 10 (%66.7)'u pozitif saptandı. *AnDiaTec® H. pylori* (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile melting analizinde pozitif ve negatif kontrol örneklerinin pik oluşturduğu sıcaklıklar göz önüne alınarak hasta örnekleri incelendi (Şekil 31).



WT: Wildtype
NK: Negatif Kontrol

Lightcycler 1.5

Şekil 31. Andiatec® *Helicobacter pylori* (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile Real-time PCR pozitif ve negatif kontrol örneklerinin oluşturduğu pikler [Klaritromisin duyarlı (WT, yeşil); klaritromisin dirençli (2143, lacivert), negatif kontrol (pembe)]

AnDiaTec® H. pylori (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile 13 (%86.7) hasta pozitif saptandı. *in house* Real-time PCR ile 14 (%93.3) hasta pozitif saptandı. Klaritromisin duyarlılığı her iki Real-time PCR yöntemi ile; 7 (%46.7)'si antrum ve korpus duyarlı, 1 (%6.7)'i antrum duyarlı, 1 (%6.7)'i antrum ve korpus dirençli, 1 (%6.7)'i antrum duyarlı korpus dirençli, 1 (%6.7)'i antrum dirençli korpus duyarlı, 3 (%20)'ü ise uyumsuz saptandı. *AnDiaTec®* ile 2143 mutasyonu ile birlikte farklı bir mutasyon saptanan iki antrum ve/veya korpus DNA'sında *in house* yöntemle birinde A2142G diğeri A2143G mutasyonu

saptandı (Tablo 8) (Şekil 32) . *in house* real-time PCR ve *AnDiaTec® Helicobacter pylori* (clarithromycin resistance) PCR kiti ile benzer sonuçlar elde edilmesine karşın, *AnDiaTec® Helicobacter pylori* (clarithromycin resistance) PCR kiti ile klaritromisin direnci için 23S rRNA gen bölgesindeki nokta mutasyonlarından sadece 2143 pozisyonunun belirtilmesi ancak tiplendirilmesinin yapılamaması, diğer mutasyonların (2142 pozisyonu) saptanamaması ve maliyetinin yüksek olması nedeni ile kullanılmamasına karar verildi.

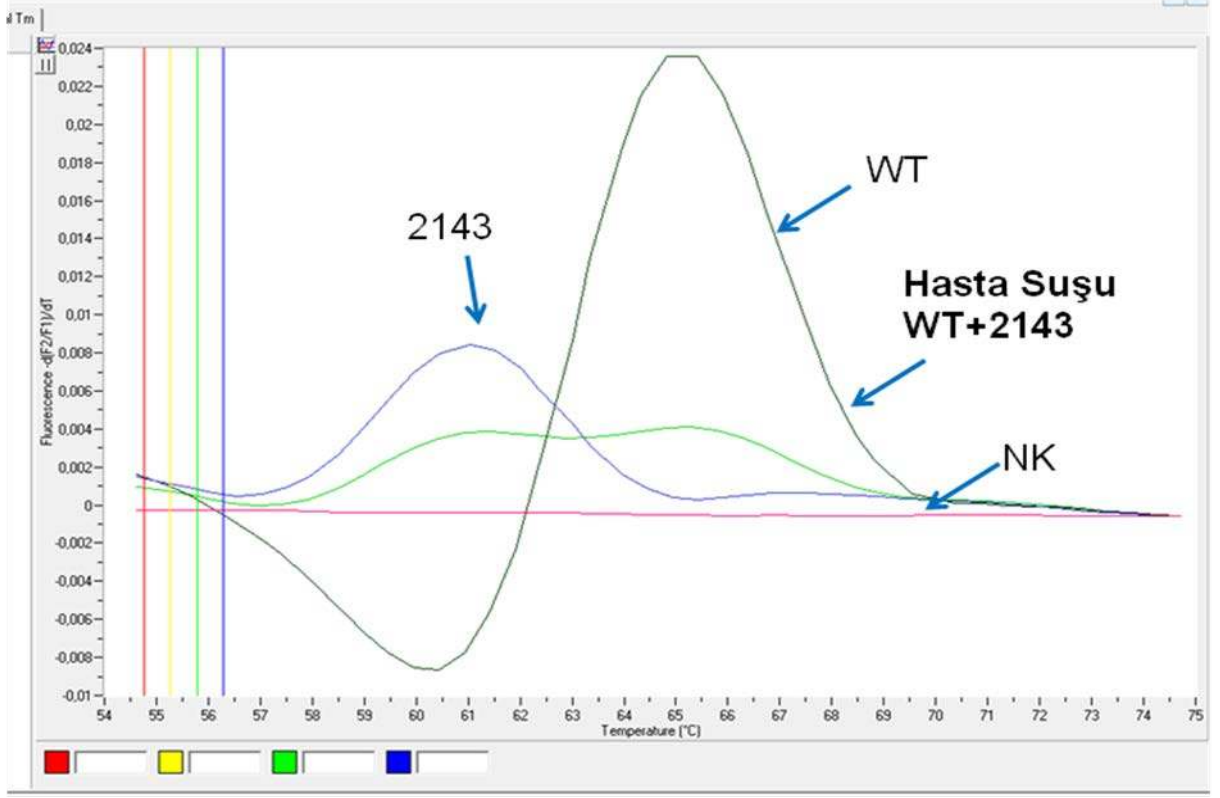
Tablo 8. *AnDiaTec® Helicobacter pylori* (clarithromycin resistance) PCR kiti Real-time PCR yöntemi ile *in house* real-time PCR yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

No	HUT		Histopatoloji		Kültür		<i>in house</i> RT		<i>AnDiaTec®</i> RT	
	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
1	+	-	+	-	+	-	WT	WT	WT	WT
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	WT	-	WT	-
4	+	+	+	-	+	+	A2143G	A2143G	2143	2143
5	-	+	+	+	+	+	WT	A2142G	WT	2143 (Miks enfeksiyon)
6	-	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
7	+	+	+	+	+	+	A2143G	WT	2143	WT
8	+	+	+	+	-	+	A2143G	A2143G	WT	2143 (Miks enfeksiyon)
9	+	+	+	+	+	+	WT	WT	WT	WT
10	+	+	+	+	+	+	WT	WT	WT	WT
11	+	+	+	+	+	-	WT	WT	WT	WT
12	-	-	-	-	-	-	WT	WT	WT	WT
13	-	-	-	-	-	-	WT	-	-	WT
14	-	-	-	-	-	-	WT	WT	WT	WT
15	+	+	+	+	-	+	WT	WT	WT	WT

A: antrum

K: korpus

WT: wild tip



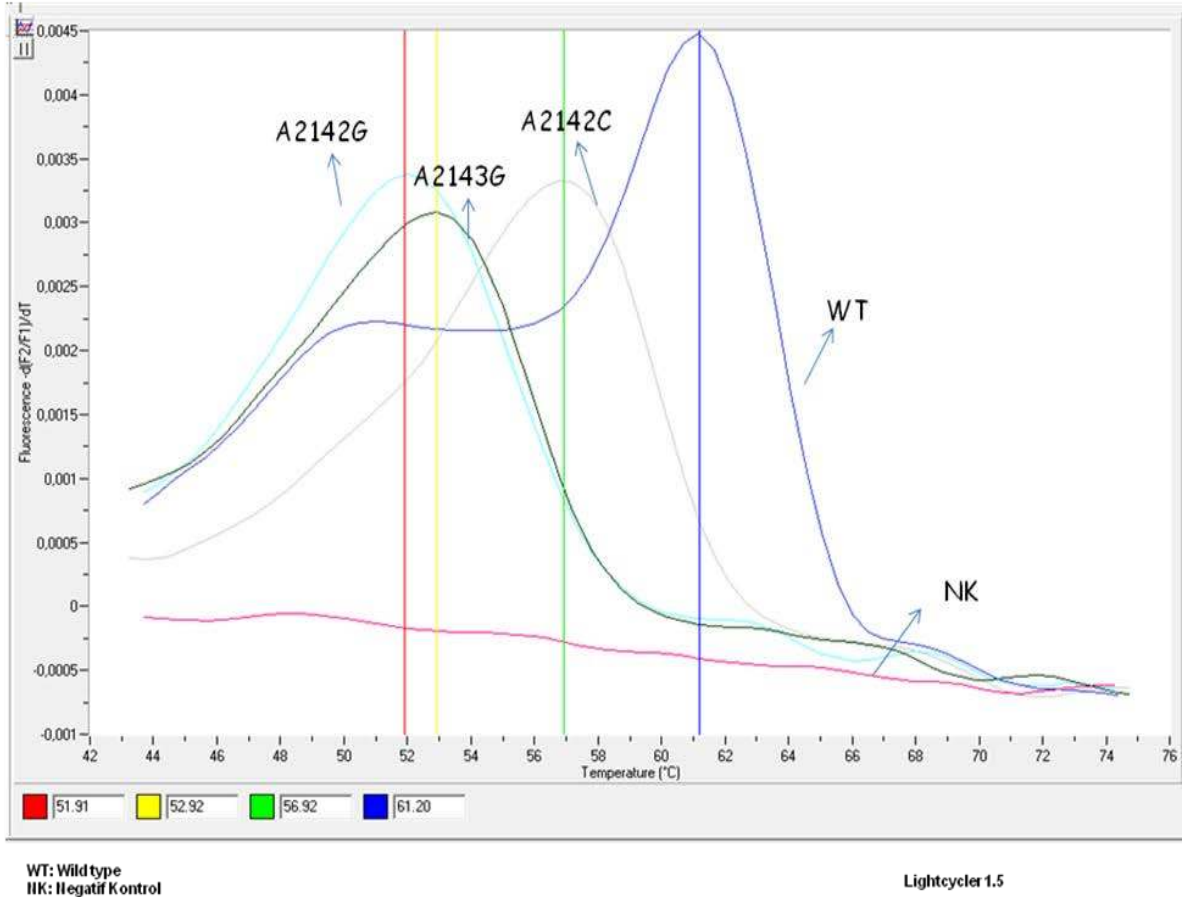
WT: Wildtype
NK: Negatif Kontrol

LightCycler 1.5

Şekil 32. Andiatec ® *Helicobacter pylori* (Clarithromycin resistance) PCR kiti ile klaritromisin duyarlı ve klaritromisin dirençli (karışık populasyon) hasta sonucunun değerlendirilmesi [Klaritromisin duyarlı (WT, yeşil); klaritromisin dirençli (2143, lacivert), klaritromisin duyarlı dirençli hasta suşu (WT+2143, yeşil) ve negatif kontrol (pembe)]

4.10. in house Real-time PCR Bulguları

İki yüz otuz dört hastanın toplam 468 antrum ve korpus biyopsi örneği ve *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu real-time polimeraz zincir reaksiyonu uygulanması için hazırlandı ve melting analizi ile pozitif ve negatif kontrol piklerinin oluşturduğu sıcaklıklar göz önüne alınarak hasta örneklerinin real-time PCR sonuçları değerlendirildi (Şekil 33). *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu klaritromisin direnci yönünden klaritromisin duyarlı olarak saptandı.

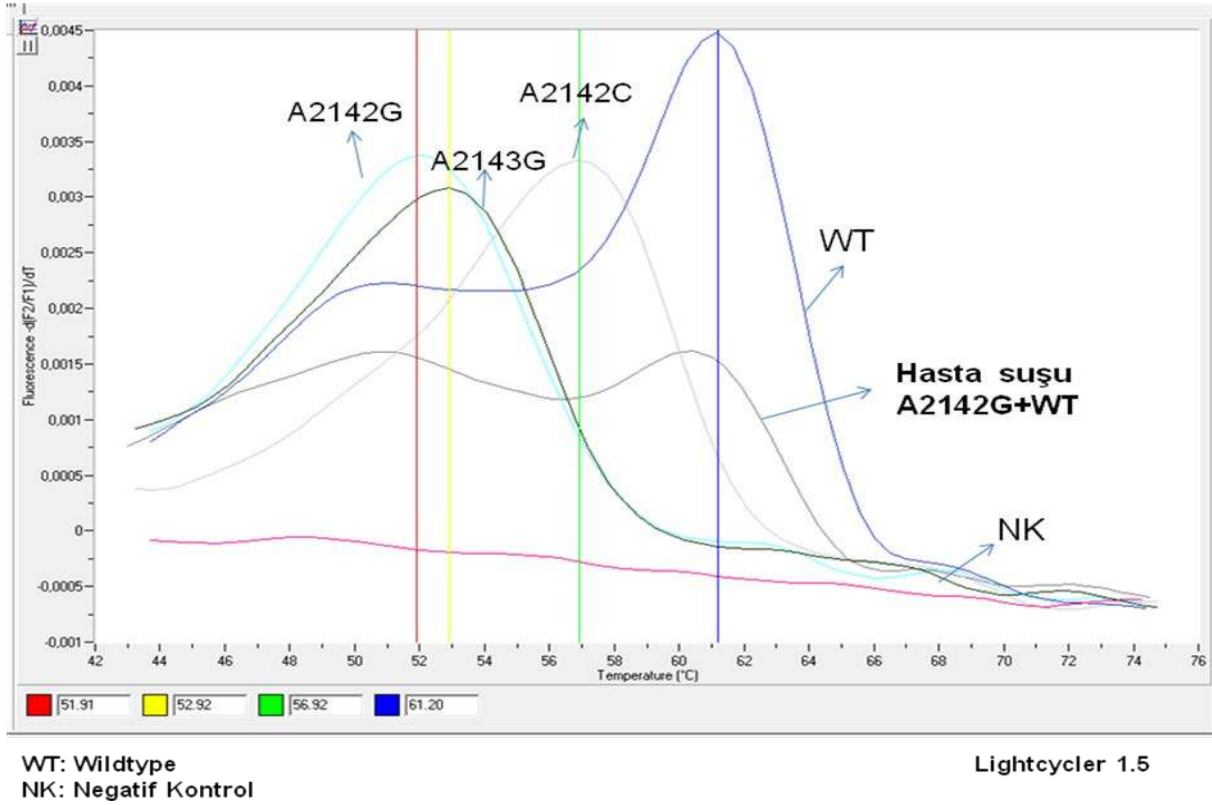


Şekil 33. Real-time PCR pozitif ve negatif kontrol örneklerinin oluşturduğu pikler [Klaritromisin duyarlı *H. pylori* CIP 101260 suşu (WT, lacivert); klaritromisin dirençli *H. pylori* 825 suşu (A2142C, gri), *H. pylori* 683 suşu (A2142G, mavi) ve *H. pylori* 677 suşu (A2143G, yeşil), negatif kontrol (pembe)]

İki yüz otuz dört hastanın antrum biyopsi örneğinden; 168 (%71.8)'i *H. pylori* olumlu, 66 (%28.2)'sı *H. pylori* olumsuz olarak saptandı. İki yüz otuz dört hastanın korpus biyopsi örneğinden; 170 (%72.6)'i *H. pylori* olumlu, 64 (%27.4)'ü *H. pylori* olumsuz olarak saptandı. Sonuç olarak 234 hastanın 178 (%76.1)'i *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 56 (%23.9)'sı *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olarak değerlendirildi.

Klaritromisin direnci yönünden, 168 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu antrum biyopsi örneğinden; 116 (%69.1)'sı duyarlı, 35 (%20.8)'i dirençli ve 14 (%8.3)'ü duyarlı/dirençli olarak saptandı. Üç hastanın (%1.8) antrum biyopsi örneği kaybolduğu için real-time PCR yöntemi uygulanamadı *H. pylori* enfeksiyonu olumlu 170 korpus kesitin; 120 (%70.6)'si duyarlı, 35 (%20.6)'i dirençli ve 15 (%8.8)'i duyarlı/dirençli olarak saptandı.

Yüz altmış dört *H. pylori* olumlu hastanın 157 (%95.7)'si real-time PCR yöntemi ile *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olarak saptandı. Real-time PCR yönteminin duyarlılığı %95.7, spesifikliğı %70.0, olumlu öngörü değeri %88.2 ve olumsuz öngörü değeri ise %87.5 olarak saptandı (Kappa=0.697). Klaritromisin direnci yönünden 103 (%65.6) hasta duyarlı, 26 (%16.6) hasta dirençli ve 28 (%17.8) hasta duyarlı/dirençli olarak saptandı (Şekil 34). En yaygın mutasyon A2143G, orta düzeyde yaygın mutasyon A2142G, en nadir mutasyon A2142C olarak saptandı. Real-time PCR yöntemi ile klaritromisin direnci %34.4 olarak saptandı.



Şekil 34. Real-time PCR yöntemi ile klaritromisin duyarlı ve klaritromisin dirençli (karışık popülasyon) hasta sonucunun değerlendirilmesi [Klaritromisin duyarlı *H. pylori* CIP 101260 suşu (WT, lacivert); klaritromisin dirençli *H. pylori* 825 suşu (A2142C, gri), *H. pylori* 683 suşu (A2142G, mavi) ve *H. pylori* 677 suşu (A2143G, yeşil), klaritromisin duyarlı ve dirençli hasta suşu (WT+A2142G, mor) negatif kontrol (pembe)]

Real-time PCR yönteminin klaritromisin direncinin saptanmasındaki etkinliğı altın standart yöntem olan E-test sonuçları ile karşılaştırıldı (Tablo 9). E-test ve Real-time PCR yöntemi arasındaki uyum %75.4 olarak saptandı.

Tablo 9. Kültür olumlu 114 hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinin E-test ve Real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Real-time PCR Sonuçları	Suş sayısı	E-test		
		R	S	S/R
<i>H. pylori</i> olumlu + klaritromisin dirençli	18 (%15.8)	11 (%61.1)	6 (%33.3)	1 (%5.6)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı	75 (%65.8)	4 (%5.3)	64 (%85.4)	7 (%9.3)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı/dirençli	20 (%17.5)	5 (%25.0)	11 (%55.0)	4 (%20.0)
<i>H. pylori</i> olumsuz	1 (%0.9)	0 (%0.0)	1 (%100.0)	0 (%0.0)

S=duyarlı, R= dirençli, , S/R= duyarlı ve dirençli

Antrum ve korpus biyopsi örnekleri ayrı ayrı olarakta Real-time PCR ve E-test sonuçları açısından değerlendirildi (Tablo 10, Tablo 11).

Tablo 10. *Helicobacter pylori* olumlu 102 antrum biyopsi örneklerinde E-test ve Real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Real-time PCR Sonuçları	Suş Sayısı	E-test	
		R	S
<i>H. pylori</i> olumlu + klaritromisin dirençli	20 (%19.6)	11 (%55.0)	9 (%45.0)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı	70 (%68.6)	12 (%17.1)	58 (%82.9)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı/dirençli	8 (%7.8)	3 (%37.5)	5 (%62.5)
<i>H. pylori</i> olumsuz	4 (%4.0)	0 (%0.0)	4 (%100.0)

S=duyarlı, R= dirençli

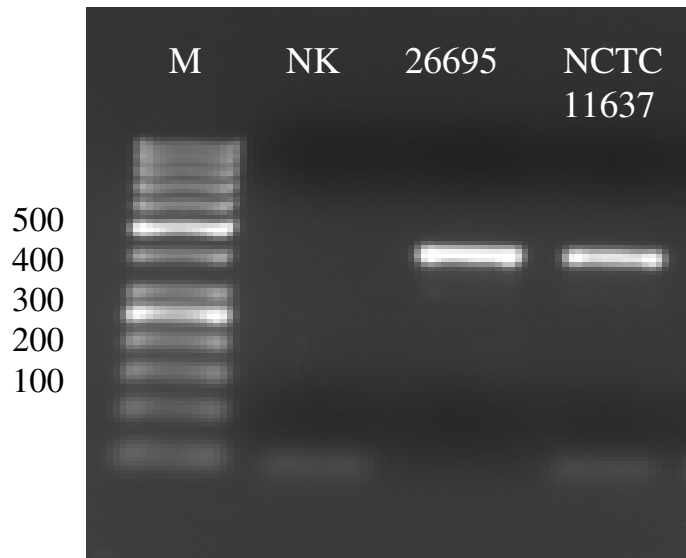
Tablo 11. *Helicobacter pylori* olumlu 96 korpus biyopsi örneklerinde E-test ve Real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Real-time PCR Sonuçları	Suş Sayısı	E-test	
		R	S
<i>H. pylori</i> olumlu + klaritromisin dirençli	19 (%19.8)	11 (%57.9)	8 (%72.7)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı	65 (%67.7)	4 (%6.2)	61 (%93.8)
<i>H. pylori</i> olumlu+ klaritromisin duyarlı/dirençli	9 (%9.4)	4 (%44.4)	5 (%55.6)
<i>H. pylori</i> olumsuz	3 (%3.1)	1 (%33.3)	2 (%66.7)

S=duyarlı, R= dirençli

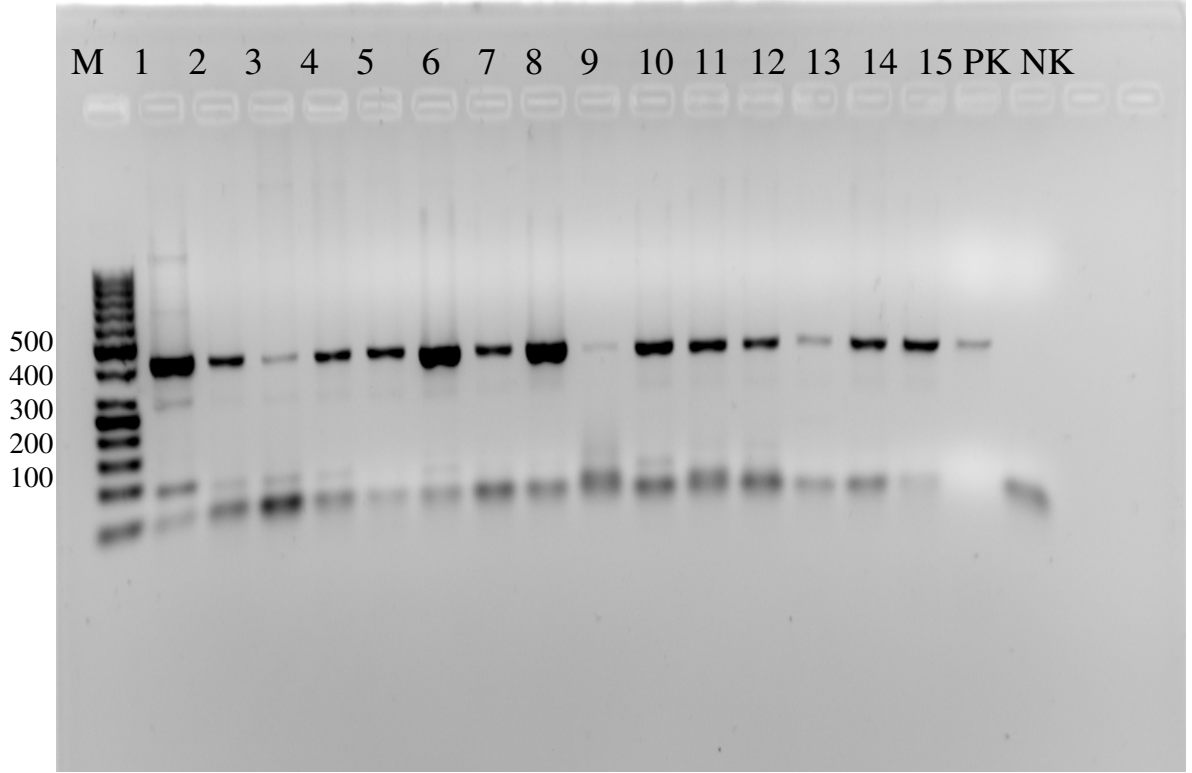
4.11. HPU PCR Bulguları

H. pylori 26695 standard suşu ve *H. pylori* NCTC 11637 standard suşunun HPU PCR ile *H. pylori* pozitif olduğu gösterildi ve HPU PCR yöntemi standardize edildi (Şekil 35). *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşlarının HPU PCR ile negatif olduğu gösterildi.

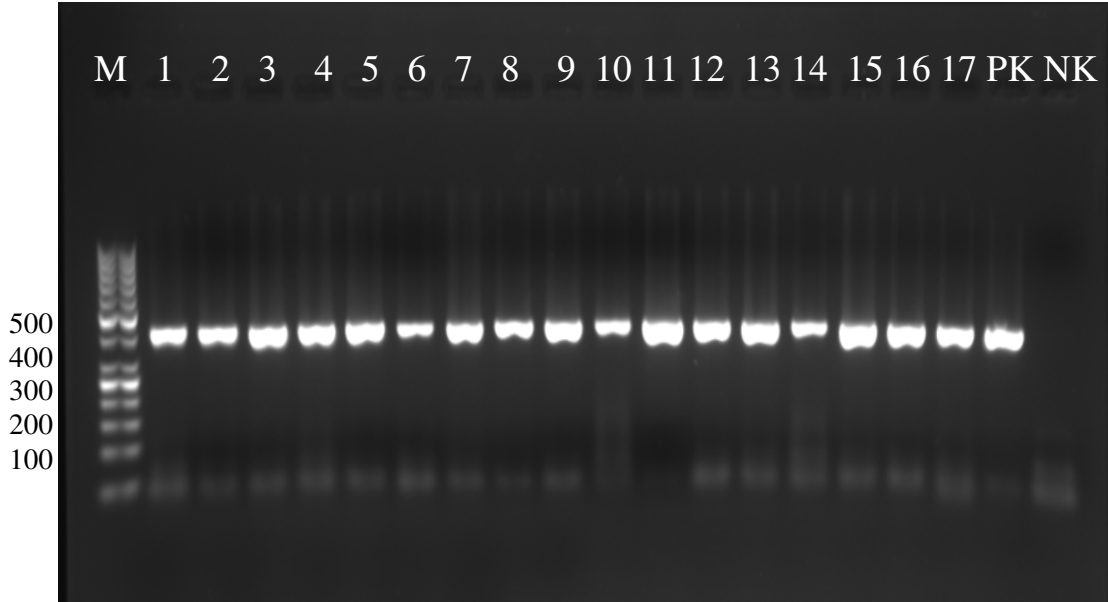


Şekil 35. *Helicobacter pylori* standart suşlarından izole edilen DNA örneklerinin HPU PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü 411 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, NK:Negatif kontrol

İki yüz otuz dört hastanın antrum ve korpus toplam 468 örneği HPU PCR ile *H. pylori* olumlu saptandı (Şekil 36). Yüz on dört kültür olumlu hastanın izole edilen koloni örneklerinde HPU PCR ile *H. pylori* olumlu saptandı (Şekil 37).



Şekil 36. Gastrik biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen *Helicobacter pylori* DNA örneklerinin doku HPU PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü 411 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder 1-15: Hasta örnekleri, PK: Pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637), NK:Negatif kontrol

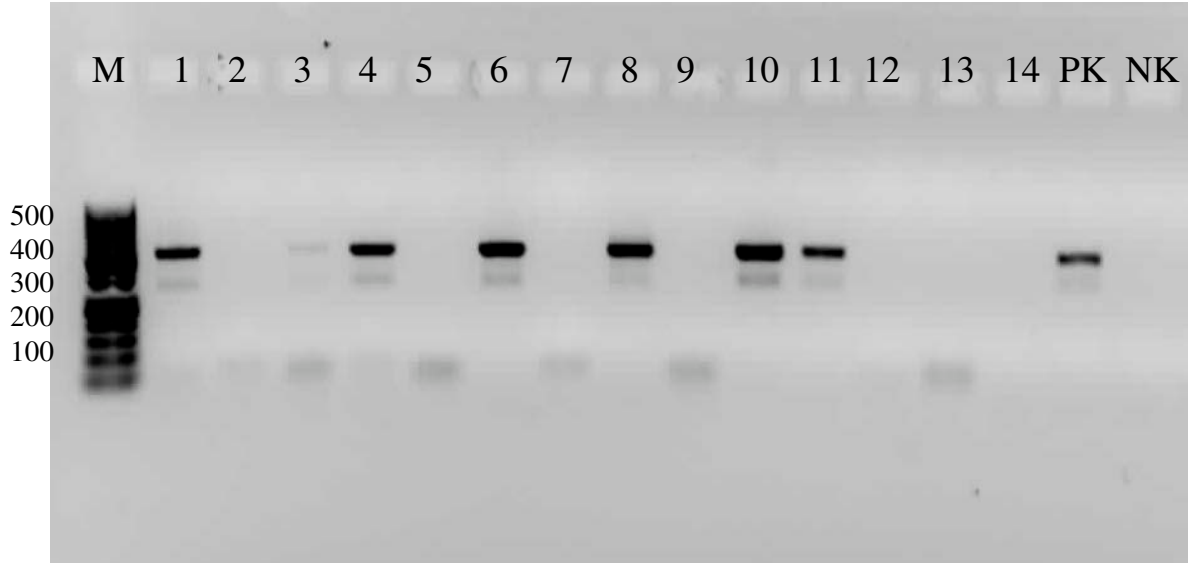


Şekil 37. *Helicobacter pylori* klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin HPU PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü 411 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder 1-17: Hasta örnekleri, PK: Pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637), NK:Negatif kontrol

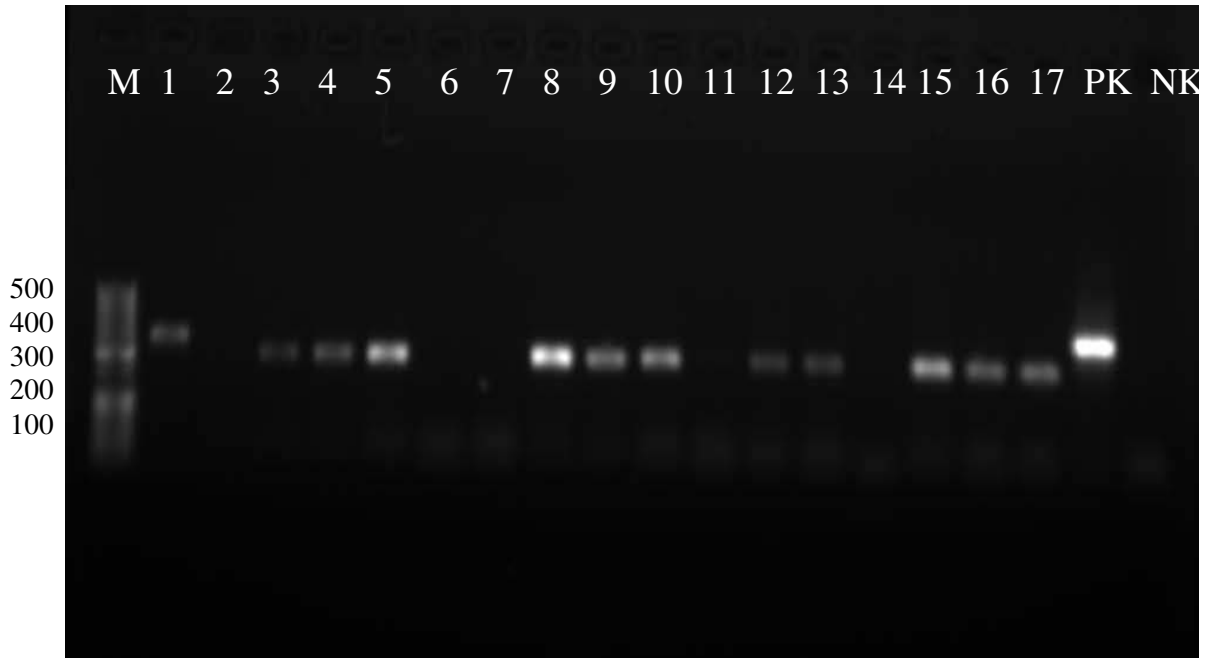
4.12. *cagA* PCR Bulguları

cagA PCR ile 114 kültür olumlu hastanın 53 (%46.5)'ü *cagA* olumlu, 61 (%53.5)'i *cagA* olumsuz saptandı (Şekil 38, Şekil 39). Kültür olumlu 102 antrum biyopsi örneğinden; 44 (%43.1)'ü *cagA* olumlu, 58 (%56.9)'i *cagA* olumsuz olarak değerlendirildi. Kültür olumlu 96 korpus biyopsi örneğinden; 37 (%38.5)'si *cagA* olumlu, 59 (%61.5)'u *cagA* olumsuz olarak değerlendirildi.

*New York Üniversitesi Veterans Affairs Laboratuvarında Guillermo I. Perez-Perez tarafından kültürü yapılan 64 hastadan 35'i kültür olumlu saptanmıştır ve *cagA* PCR ile 2009.KB.SAG.055 proje numaralı yüksek lisans tez projesi kapsamında danışman Prof. Dr. Özlem Yılmaz'ın onayı ile Meryem Güvenir tarafından 35 hastanın antrum ve/veya korpusundan izole edilen *H. pylori* suşları New York Üniversitesi Veterans Affairs Laboratuvarında; diğer 62 hastanın kültür pozitif olan 27 antrum ve/veya korpusundan izole edilen *H. pylori* suşları ise Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çalışılmıştır (77). Diğer 108 hastanın antrum ve/veya korpusundan izole edilen *H. pylori* suşları ise doktora tezi kapsamında çalışılmıştır.



Şekil 38. Gastrik biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen *Helicobacter pylori* DNA örneklerinin *cagA* PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü 370-570 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11: *cagA* pozitif hasta örnekleri, 2, 5, 7, 9, 12, 13, 14: *cagA* negatif hasta örnekleri PK: pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637), NK:Negatif kontrol



Şekil 39. *Helicobacter pylori* klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin *cagA* PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü 370-570 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17: *cagA* pozitif hasta örnekleri, 2, 6, 7, 11, 14: *cagA* negatif hasta örnekleri PK: pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637), NK:Negatif kontrol

Antrum ve korpus biyopsi örneklerinde *cagA* pozitif ve negatif suşlarda klaritromisin duyarlılığı arasındaki ilişki değerlendirildi (Tablo 12). Hastaların *cagA* pozitifliği ile FISH pozitifliği arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Fisher Exact Test, $p=1.000$). Hastaların *cagA* pozitifliği ile antrum ve korpus klaritromisin duyarlı ve dirençli suşlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Fisher Exact Test, antrum için $p=1.000$; korpus için $p=1.000$).

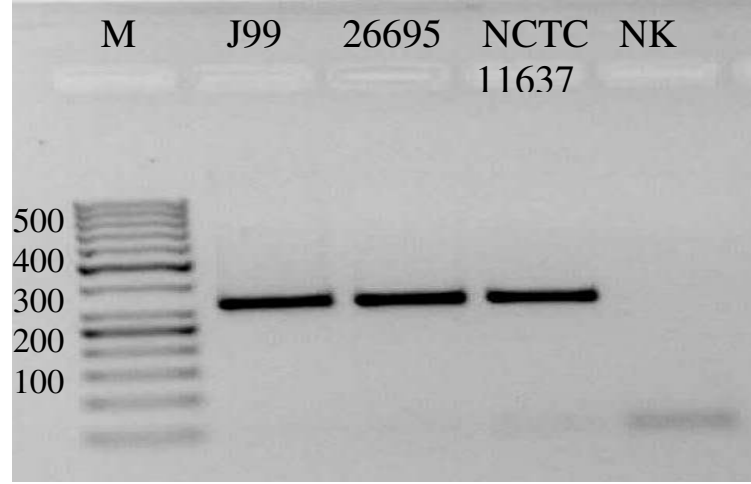
Tablo 12. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinde *cagA* pozitifliği ve klaritromisin duyarlılığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

		<i>cagA</i> pozitif		<i>cagA</i> negatif	
		Antrum (n)	Korpus (n)	Antrum (n)	Korpus (n)
FISH	Duyarlı	38	29	44	43
	Dirençli	4	3	7	8
	Duyarlı /Dirençli	1	2	3	2
Kültür	Duyarlı	35	29	41	47
	Dirençli	8	8	16	12
	Duyarlı /Dirençli	1	0	1	0

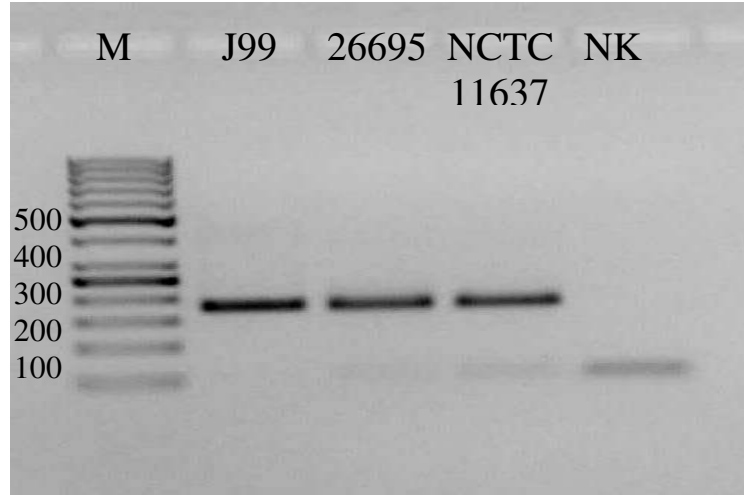
cagA pozitifliği ile histopatolojik bulgular (Atrofi, IM, Pitlerde enflamasyon, Lamina propriada enflamasyon, bakteriyel dansite) arasındaki ilişki değerlendirildi. Antrumda, *cagA* pozitifliği ile atrofi (χ^2 $p=0.037$), pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (χ^2 $p=0.043$) arasında; korpusta, pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (χ^2 $p=0.020$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı.

4.13. *vacA* PCR Bulguları

H. pylori J99 standard suşu, *H. pylori* 26695 standard suşu ve *H. pylori* NCTC 11637 standard suşunun *vacA* m bölgesi PCR ile *vacA* m1s1 olduğu saptandı (Şekil 40, Şekil 41).

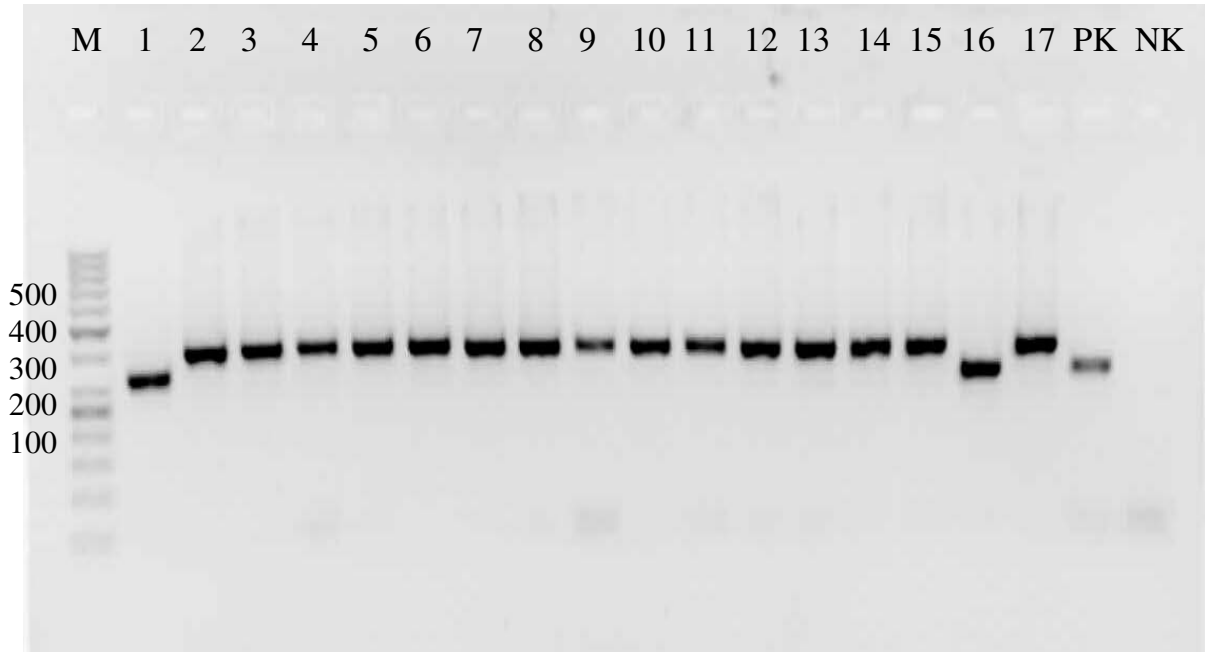


Şekil 40. *Helicobacter pylori* standart suşlarından izole edilen DNA örneklerinin *VacA* m bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü m1 bölgesi için 290 bp, m2 bölgesi için 350 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, *Helicobacter pylori* J99 standard suşu, 26695 standard suşu, *Helicobacter pylori* NCTC 11637: *vacA* m1, NK:Negatif kontrol

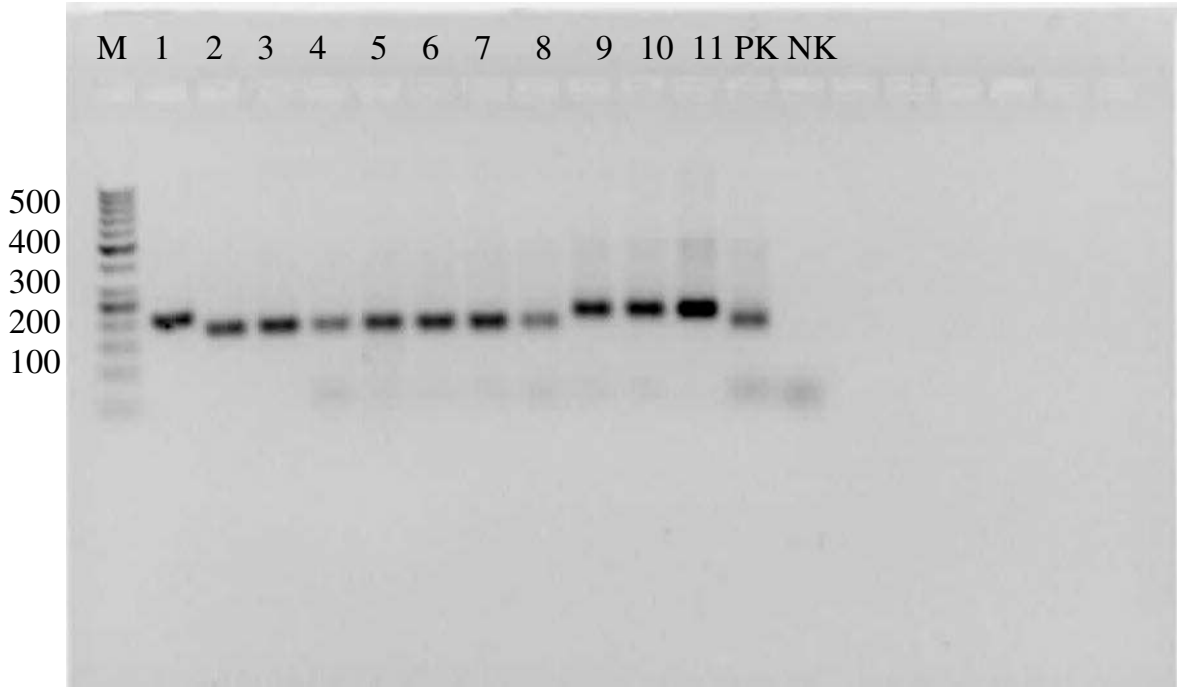


Şekil 41. *Helicobacter pylori* standart suşlarından izole edilen DNA örneklerinin *VacA* s bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü s1 bölgesi için 176 bp, s2 bölgesi için 200 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, *Helicobacter pylori* J99 standard suşu, 26695 standard suşu *Helicobacter pylori* NCTC 11637: *vacA* s1, NK:Negatif kontrol

vacA PCR ile 114 kültür olumlu hastanın tümü *vacA* olumlu saptandı (Şekil 42, Şekil 43). Kültür olumlu 102 antrum biyopsi örneğinden; 29 (%28.4)'u *vacA* m1s1, 33 (%32.4)'ü *vacA* m2s1, 39 (%38.2)'u *vacA* m2s2, 1 (%1.0)'i *vacA* m1s2 olarak değerlendirildi. Kültür olumlu 96 korpus biyopsi örneğinden; 27 (%28.1)'si *vacA* m1s1, 31 (%32.3)'i *vacA* m2s1, 37 (%38.6)'si *vacA* m2s2, 1 (%1)'i *vacA* m1s2 olarak değerlendirildi. Antrum ve korpus birlikte değerlendirildiğinde, 29 (%25.4) hastada *vacA* m1s1 genotipi (20 CagA+); bir (%0.9) hastada m1s2 genotipi; 40 (%35.1) hastada m2s2 genotipi (4 CagA+), 35 (%30.7) hastada m2s1 genotipi (25 CagA+) saptanmıştır. Dokuz (%7.9) hastanın ise miks suş içerdiği saptandı: 4 (%44.5) hastada hem m1s1 hem de m2s1 genotipi, 3 (%33.3) hastada hem m2s1 hem de m2s2 genotipi, 1 (%11.1) hastada hem m1s1 hem de m2s2 genotipi, 1 (%11.1) hastada hem m1s2 hem de m2s2 genotipi saptandı.



Şekil 42. *Helicobacter pylori* klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin *VacA* m bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü m1 bölgesi için 290 bp, m2 bölgesi için 350 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder 1, 16, PK: *vacA* m1 pozitif hasta örnekleri, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17: *vacA* m2 pozitif hasta örnekleri PK: pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637 m1s1), NK:Negatif kontrol



Şekil 43. *Helicobacter pylori* klinik suşlarından izole edilen DNA örneklerinin *VacA* s bölgesi PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri (Beklenen ürün büyüklüğü s1 bölgesi için 176 bp, s2 bölgesi için 200 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder; 1, 3, 4, 6, 8, 10, 16, PK: *vacA* s1 pozitif hasta örnekleri; 2, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17: *vacA* s2 pozitif hasta örnekleri; PK: pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637 m1s1), NK:Negatif kontrol

Hastaların *vacA* genotipleri ile antrum ve korpus klaritromisin duyarlı ve dirençli suşlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Fisher Exact Test, antrum için $p=1.000$; korpus için $p=1.000$).

Hastaların *vacA* genotipleri ile *cagA* pozitifliği arasında anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 testi, $p=1.000$). *vacA* m1s1 ve m2s1 genotiplerinin *cagA* pozitifliği, *vacA* m2s2 genotipinin ise *cagA* negatifliği ile ilişkili olduğu saptandı (Tablo 13).

Tablo 13. Kültür olumlu 114 hastanın *cagA* pozitifliği ve *vacA* s ve m bölgesi genotiplerinin değerlendirilmesi

<i>cagA</i>	VacA s & m genotipleri					Toplam
	m1s1	m1s2	m2s2	m2s1	Miks	
Pozitif	20	0	4	25	4*	53 (%46.5)
Negatif	9	1	36	10	5**	61 (%53.5)
Toplam	29 (%25.4)	1 (%0.9)	40 (%35.1)	35 (%30.7)	9 (%7.9)	114 (%100)

* 2 hastada m1s1 ve m2s1; 2 hastada m2s2 ve m2s1

**2 hastada m1s1 ve m2s1, 1 hastada m2s2 ve m2s1, 1 hastada m1s1 ve m2s2, 1 hastada m2s2 ve m1s2

vacA genotipleri ile histopatolojik bulgular (Atrofi, IM, Pitlerde enflamasyon, Lamina propriada enflamasyon, bakteriyel dansite) arasındaki ilişki değerlendirildi. Antrumda, *vacA* genotipleri ile pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (χ^2 p=0.021) ve atrofi ve intestinal metaplazi (χ^2 p=0.029) arasında; korpusta ise pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (χ^2 p=0.004) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. *vacA* m1s1 genotipinin antrumda pitlerde enflamasyonun yokluğunda daha yüksek miktarda bulunduğu saptandı. *vacA* m2s2 genotipinin antrumda atrofi ve intestinal metaplazinin yokluğunda daha yüksek miktarda bulunduğu saptandı. Ayrıca, *vacA* s ve m bölgeleri ile histopatolojik bulgular (Atrofi, IM, Pitlerde enflamasyon, Lamina propriada enflamasyon, bakteriyel dansite) arasındaki ilişki değerlendirildi. *vacA* s genotipi ile atrofi ve intestinal metaplazi varlığı arasında antrumda (χ^2 p=0.064) ve korpusta (χ^2 p=0.083) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ancak *vacA* s genotipinin atrofi ve intestinal metaplazi varlığında yüksek olduğu gözlemlendi. Antrumda, *vacA* s genotipi ile pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (χ^2 p=0.011) arasında; korpusta ise pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (χ^2 p=0.001) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. *vacA* s1 genotipi antrum ve korpusta pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) varlığında daha yüksek miktarda olduğu saptandı. Antrum ve korpusta *vacA* m genotipi ile histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

5. TARTIŞMA

H. pylori'nin neden olduğu birçok hastalık (ülser, peptik ülser, MALT lenfoma ve mide kanseri) olduğu yapılan çalışmalarda kesine yakın anlaşılmıştır. Ancak en çok tartışmalara neden olan non ülser dispepsi konusunda etiyoloji ve tedaviye yönelik hala bir takım çelişkiler vardır. Bunun özellikle *H. pylori*'nin direnç ve virulans faktörleri ile ilişkisi özellikle ülkemizde belirlenmemiştir. Biz bu çalışmamızda *H. pylori*'nin virulans faktörlerinin adı geçen hastalıkla ilişkisini belirlemek, ülkemizdeki bölgesel ve başka ülkelerle olan farklılıkları göstermek istedik. Yine bu tedavinin *H. pylori* tedavisinde kullanılan ilaçların özellikle klaritromisin ve buna karşı artan direncin ve önümüzdeki yıllarda değiştirilecek tedavi protokollerinin saptanması için bu çalışmanın yararlı olacağına inanmaktayız. Ayrıca hastanemizde gastroenterologların yaygın olarak kullandıkları klaritromisine karşı gelişen direnç konusunun saptanmasında fenotipik ve genotipik yöntemler arasında en yararlı olan FISH yönteminin de yararlarını burada ortaya koymaya çalıştık.

H. pylori enfeksiyonu tanısında invaziv ve invaziv olmayan testler kullanılmaktadır. İnvaziv testlerin avantajı organizmanın izole edilmesine ve bakterinin karakterize edilmesine olanak tanımasıdır. Ancak, *H. pylori* enfeksiyonunun patchy dağılım göstermesi ve bakterinin canlandırılma olasılığının artması için aynı hastanın çalışılan biyopsi örneklerinin sayısının artırılması gerekliliği gibi temel kısıtlılıkları bulunmaktadır (79).

Uzman patoloğlar tarafından gastrik biyopsiler değerlendirildiğinde, *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için histopatolojinin duyarlılık ve özgüllüğü çok yüksek olabilmektedir (10). Uygun şartlar altında histopatolojik değerlendirmenin duyarlılığı %95'e ulaşmaktadır. Ancak, biyopsi kalitesi, patoloğun deneyimi, PPI ve diğer ilaçlara bağlı olarak bakteriyel yükün azalması gibi bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Histopatolojik değerlendirmenin özgüllüğü %95 olabilmektedir, fakat bazen mukozada atipik morfoloji gösteren bakterilerin varlığı nedeni ile yanlış pozitif sonuç vermektedir. HUT gibi diğer testlerin duyarlılığında bakteriyel yüke bağlıdır. HUT pozitif sonuç için en azından 10^5 bakteriye gerek duyulduğu bildirilmiştir. Bakteriyel yük düşük ise, HUT yanlış negatif sonuç verebilmektedir. Aynı zamanda PPI ile tedavi ve intestinal metaplazi varlığı da yanlış negatif sonuçlar ile ilişkilidir. Ayrıca, bazı endoskopistler HUT sonucunu daha erken okuduğundan dolayı duyarlılığın azalmasına (%20) neden olmaktadır. *H. pylori* tanısında invaziv metotlar zayıf duyarlılığa ve özgüllüğün açıklanabildiği patchy dağılım problemine sahip olmasına rağmen, kültür gibi

yüksek özgüllüğe sahip olan metotlar da vardır. *H. pylori*'nin üreme başarısı, bakterinin *in vitro* üremesinde yavaşlık, bakteriyal yükü etkileyen PPI ve diğer ilaçlara karşı duyarlılık gibi *H. pylori* izolasyonunun duyarlılığını etkileyen birçok faktöre bağlıdır (79). Bütün bu faktörler göz önüne alındığında çok az sayıda spesifik laboratuvar tarafından gastrik biyopsilerden organizmanın kültür yöntemi ile izolasyonu yapılabilmektedir (10).

Maastricht III-2005 Konsensus raporunda, *H. pylori* eradikasyonu için yedi ya da daha fazla gün üçlü tedavi önerilmektedir. Üçlü tedavi bir PPI ile amoksisilin, klaritromisin ya da metronidazolü içeren iki antibiyotik kombinasyonunu içermektedir (2, 6, 26, 209, 213, 226, 267). Antibiyotik direnci enfeksiyon hastalıklarında özellikle *H. pylori* enfeksiyonunda tedavi başarısızlığının muhtemelen birincil nedenidir. Son 20 yılda, populasyonun genelinde antibiyotiklerin (solunum yolu enfeksiyonları için klaritromisin kullanımı) kullanımının yaygınlaşması primer *H. pylori* direncinde artışa neden olmaktadır. Sonuç olarak, standart üçlü tedavinin etkisi kabul edilemez düzeylerde dereceli olarak düşmektedir (6, 236). *H. pylori*, tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanabilmektedir (168). Ayrıca, antimikrobiyallere karşı duyarlılıkta doğru bilgi *H. pylori* eradikasyon başarısı için klinik laboratuvar ve gastroenterologlar için büyük bir önem taşımaktadır.

Her toplumda özellikle tedavi uygulandığı sırada duyarlılık verileri olmadığı zamanlarda *H. pylori*'nin klaritromisine karşı direncinin önemli olduğu bildirilmiştir. Bazı hastalar tedaviden önce klaritromisin dirençli suşlara sahiptir ve bazı klaritromisin duyarlı suşa sahip hastalarda tedavi esnasında klaritromisin dirençli suşlar gelişmektedir (237). Tüm bu nedenlerden dolayı, bir çok vakada tedavi başarısını garantilemek için *H. pylori*'nin kültüre edilmesi ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi gereklidir. Ayrıca, dünyada *H. pylori* suşlarında klaritromisin direnci artmakta ve bu bakterinin eradikasyon tedavisi daha zor bir hale gelmektedir (251). Yüksek klaritromisin direncine rağmen, *H. pylori* enfeksiyonunda antimikrobiyal duyarlılık testleri nadiren uygulanmakta ve klinisyen *H. pylori* tedavisi için empirik tedaviyi başlatmaktadır (11).

H. pylori enfeksiyonu tedavisi için antibiyotikler, antibiyotik testlerin düşük güvenilir sonuçları nedeniyle duyarlılık testleri ile seçilmemektedir (32). Ayrıca, klinisyenlerin hastanın antibiyotik kullanım geçmişini, yerel ve bölgesel ilaç direnç paternini bilmesi gerekmektedir (11). Maastricht III-2005 Konsensus raporunda, klaritromisin direncinin %15-20 olduğu populasyonlarda klaritromisinin kullanılmaması ya da klaritromisin duyarlılık testlerinin yapılması gerektiği bildirilmiştir (26). Maastricht IV Sonuç Raporu'na göre, primer

klaritromisin direnci %20'den yüksek olan coğrafik bölgelerde *H. pylori* kültürü ve antimikrobiyal tanı testleri uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca ilk eradikasyon tedavisi başarısızlığından sonra ikinci basamak tedavi uygulanmadan önce bütün bölgelerde kültür uygulanması önerilmiştir. Maastricht IV Sonuç Raporu'nda kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanmasının mümkün olmadığı durumlarda FISH yöntemi gibi moleküler yöntemlerin *H. pylori* varlığı ve klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir (191). Bu yüzden, klaritromisin direncinin yüksek olduğu popülasyonlarda *H. pylori*'nin saptanması ve klaritromisin direncinin belirlenmesi için FISH yöntemi oldukça uygun bir yöntemdir.

Çalışmamızda, FISH ve kültür karşılaştırıldığında FISH yöntemi ile *H. pylori* saptanmasındaki duyarlılığın (%83.5), kültür duyarlılığına (%69.5) göre daha yüksek olduğu saptandı ($p=0.004$). Ayrıca, FISH yönteminin özgüllüğü %91.4 olarak saptandı. Samarbafe-Zadeh ve arkadaşları, *H. pylori* saptanmasında FISH duyarlılığını %98 ve özgüllüğü %100 olarak saptamıştır (268) ve aynı zamanda SeaFAST kullanılarak yapılan çalışmalarda formalin fikse parafin gömülü bloklarda *H. pylori* saptanmasında duyarlılık >%92 ve %97 olarak saptanmıştır (6, 267).

Çalışmamızda, 32 hasta kültür ile *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz saptanırken, FISH yöntemi ile *H. pylori* olumlu olarak saptandı. *H. pylori*'nin kültürde üretilmemesi diğer bakterilerle kontaminasyon ya da midedeki patchy dağılım gibi farklı nedenlere bağlı olabilmektedir (28). Düşük bakteriyel yük, kontaminasyon, kokoid form ya da transportta gecikmeden dolayı kültürde üretilmemesi duyarlılık testlerinin yapılamamasına neden olmaktadır (269). Ayrıca *H. pylori*'nin canlı fakat kültüre edilemeyen (VBNC) formları nedeniyle duyarlılık testleri uygulanamamaktadır (92). Transport esnasında biyopsi materyalinde *H. pylori*'nin stabilitesi kültür için kısıtlayıcı bir faktördür fakat FISH sonuçlarını etkilememektedir (2). Ayrıca, bu kültür olumsuz hastalarda, FISH yöntemi ile klaritromisin duyarlılığı saptanabilmektedir ve bu nedenle FISH yöntemi *H. pylori* enfeksiyonu tedavisinin yönetiminde kültür yönteminden daha kullanışlıdır.

Çalışmamızda ilginç olarak aynı zamanda dört hasta FISH yöntemi ile *H. pylori* olumsuz saptanırken, kültür yöntemi ile *H. pylori* olumlu saptanmıştır. Bunun nedeni *H. pylori* enfeksiyonunun patchy dağılımı ya da düşük düzeyde kolonizasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Rüssmann ve arkadaşları, kültür yöntemi ile olumlu olan ancak FISH ile *H. pylori* saptanamayan biyopsilerdeki tutarsızlığının nedeninin, biyopside 10

CFU'den daha az *H. pylori* varlığının saptanmasında FISH yönteminin başarısız olabileceğini bildirmişlerdir (2).

Çalışmamızda, FISH yöntemi ve E-test ile elde edilen klaritromisin duyarlılık sonuçları karşılaştırıldı. E-test ile klaritromisin direnci %28.0 ve FISH yöntemi ile %20.2 olarak saptandı. Ayrıca, her iki metot arasında iyi bir korelasyon (%89.5) saptandı. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, Vega ve arkadaşları, dondurulmuş gastrik dokuda E-test ve FISH yöntemini karşılaştırmışlar ve FISH yönteminin duyarlılığını %90 ve özgüllüğünü %100 olarak saptamışlardır. FISH ve E-test arasında iki farklı sonuç bulmuşlardır: FISH yöntemi ile klaritromisin duyarlı, E-test yöntemi ile klaritromisin orta duyarlı olarak saptanmıştır. Ayrıca onlar kültür yöntemi ile olumsuz olan hastalara FISH yöntemini uygulamamışlardır (269). Rüsman ve arkadaşları, FISH, E-test ve disk difüzyon yöntemleri arasında hiçbir farklılık saptamamışlardır (236). Çalışmamızda, E-test yöntemi ile klaritromisin duyarlı fakat FISH yöntemi ile hem klaritromisin duyarlı hem de klaritromisin dirençli olan dört vakada farklılık saptandı. Bu farklı sonuçlar E-test yöntemi ile saptanamayan dirençli populasyonun düşük konsantrasyonda olabilmesi ile açıklanabilmektedir. Bu dört vakanın real-time PCR ile üçünde hem klaritromisin duyarlı hem de klaritromisin dirençli *H. pylori* suşu (karışık populasyon) saptandı. Ayrıca 12 vaka da farklı olarak E-test yöntemi ile klaritromisin dirençli fakat FISH yöntemi ile klaritromisin duyarlı saptandı. FISH yöntemi ile 23S rRNA'nın yalnızca 2143 ve 2144 pozisyonlarındaki mutasyonlara bağlı klaritromisin direnci saptanmaktadır. Bu nedenle, bu suşların klaritromisin direncinin 2143 ve 2144 pozisyonundan farklı yerdeki nokta mutasyonu ile ilişkili olma olasılığı bulunmaktadır. Bu suşlar analizden dışlandığında, FISH ve E-test arasındaki uyum daha yüksek olmaktadır.

Bu çalışmada, 137 FISH olumlu hastada, 111 (%81.0) hastanın klaritromisin duyarlı suş ile, 11 (%8.0) hastanın klaritromisin dirençli suş ile ve 15 (%11.0) hastanın ise hem klaritromisin duyarlı hem de klaritromisin dirençli suş ile enfekte olduğu saptandı. *H. pylori*'nin 23S rRNA geninden iki kopya içermesi bu sonuçların olası açıklamasıdır. Mutasyonlu 23S rRNA geninin her iki kopyası sıklıkla aynı mutasyonu içermektedir, fakat bazen az sayıda heterozigot (bir kopyada wild-tip ve bir kopyada mutasyon) gözlemlenmektedir (226, 230). Toracchio ve arkadaşları, aynı coğrafik bölgedeki aynı hastalarda hem mutant hemde vahşi tip *H. pylori* suşları ile kolonizasyon varlığını bildirmişlerdir (39). Ayrıca Raymond ve arkadaşları, aynı hastada 23S rRNA gen klonlarında

iki farklı mutasyon taşıdığını göstermişlerdir (240). Caristo ve arkadaşları ise, çocuklarda klaritromisin duyarlı ve klaritromisin dirençli *H. pylori* suşlarının birlikte hem aynı biyopside, hemde aynı hastanın farklı gastrik bölgeye ait bölgesinde lokalize olduğunu göstermişlerdir (261). Bu çalışmada, aynı hastada hem klaritromisin duyarlı hemde klaritromisin dirençli suş olduğunda klinik olarak hasta klaritromisin dirençli olarak değerlendirildi. Sonuç olarak, FISH yöntemi ile 87 hasta (%76.3) klaritromisin duyarlı suşa sahipken, 23 (%20.2) hastanın klaritromisin dirençli suşa sahip olduğu saptandı. FISH kültüre göre daha üstün olabilmektedir. Antrumda dirençli bir suş olduğu zaman, bu lokalizasyona bağlı olarak farklı hastalıkları (duodenal ülser); korpusta dirençli bir suş olduğunda ise lokalizasyona bağlı olarak farklı hastalıkları (IM, kanser, gastrik ülser) indükleyebilmektedir. Eğer dirençli suş hem antrumda hem korpusta bulunuyorsa MALT lenfoma'ya neden olabilmektedir. Bu nedenle lokalizasyonların klinisyen için önemli olduğunu ve bu suşların dirençli olduğu göz önünde bulundurularak tedavinin yönlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Trebesius ve arkadaşları, FISH yöntemi ile midede kültür dirençli kokoid formları saptayabildiklerini bildirmişlerdir (3). Çalışmamızda, FISH yöntemi ile *H. pylori* olumlu saptanan fakat kültürde üretilmeyen iki hastada klaritromisin dirençli kokoid form saptandı fakat aynı zamanda FISH ve kültür yöntemi ile *H. pylori* olumlu olan iki hastada da klaritromisin duyarlı kokoid form saptandı. Böylece kokoid formlar ile klaritromisin direnci arasında bir ilişki gözlenmedi.

H. pylori'nin saptanması ve aynı zamanda klaritromisin direncine neden olan en yaygın nokta mutasyonlarının belirlenmesinde Real-time PCR yöntemi de kullanılmaktadır. Bu metot prob hibridizasyonu ve melting curve analizi ile biyopsi örneğinden direkt olarak mutasyonları saptamaktadır. Bu yöntem ile A2142G, A2143G, A2142C ve wild tip genotip saptanabilmektedir (197). Kargar ve arkadaşları, 200 dispeptik yakınmalı hastanın gastrik biyopsi örneklerine bakteri konsantrasyonunun saptanması ve klaritromisin direncinin belirlenmesi için *TaqMan* Real-time PCR yöntemi uygulamışlardır. Bu yöntemde bilinen dört nokta mutasyonunu (A2144G, A2143G, A2143C, A2142G) saptamak için proplar dizayn edilmiştir (270). Matsumura ve arkadaşları, 186 hastanın gastrik biyopsi örneklerine uyguladıkları real-time PCR yönteminde A2143G ve A2144G mutasyonlarını saptamışlardır (271). Oleastro ve arkadaşları, 41 vakada aynı biyopside iki farklı genotip saptamışlardır (197). Kargar ve arkadaşları, 164 gastrik biyopsi örneğinde, 105 (%64)'ini klaritromisin duyarlı, 59 (%36)'unu klaritromisin dirençli saptamışlardır. On altı (%9.8) örnekte ise iki

farklı mutasyon ve wild type saptamışlardır (270). Matsumura ve arkadaşları, karışık popülasyonda wild type'ın %10'dan daha az olduğu durumda bile saptanabildiğini göstermişlerdir (271). Burucoa ve arkadaşları, 61 suş ile yaptıkları çalışmada üç hastada miks popülasyon saptamışlar ve kullandıkları yöntem ile karışık popülasyonda iki farklı suşun, bir allelin en az kısmı %5 olduğunda bile saptanabildiğini göstermişlerdir (272). Çalışmamızda klaritromisin direnci yönünden real-time PCR yöntemi ile 103 (%65.6) hasta duyarlı, 26 (%16.6) hasta dirençli ve 28 (%17.8) hasta duyarlı/dirençli olarak saptandı. Lascols ve arkadaşları, 196 hastada real-time PCR yöntemi ile klaritromisin direncini %18.5 olarak saptamışlardır (33). Tankovic ve arkadaşları, 518 hastada klaritromisin direncini %30 saptamışlardır (272). Schabereiter-Gurtner ve arkadaşları, endoskopiye alınan 92 hastada 45 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu saptamışlar ve klaritromisin direnç oranını %24.4 bildirmişlerdir (31). Çalışmamızda, real-time PCR yöntemi ile klaritromisin direnci %34.4 olarak belirlendi. Kargar ve arkadaşları, en yaygın mutasyonun A2143G olduğunu ve bunu sırasıyla A2142G, A2143C ve A2144G'nin izlediğini bildirmişlerdir (270). Çalışmamızda, en yaygın mutasyon A2143G, orta düzeyde yaygın mutasyon A2142G, en nadir mutasyon A2142C olarak belirlendi.

Tankovic ve arkadaşları, Real-time PCR yönteminin duyarlılığını %98.2, özgüllüğünü %97.5, olumlu öngörü değerini % 94.7 ve olumsuz öngörü değerini %99.1 bildirmişlerdir (273). Schabereiter-Gurtner ve arkadaşları, *H. pylori* enfeksiyonu saptanmasında biyopsi real-time PCR yöntemi için duyarlılığı %98, özgüllüğü %100, olumlu öngörü değerini %98, olumsuz öngörü değerini %100; klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde biyopsi real-time PCR yöntemi için duyarlılığı %100, özgüllüğü %82, olumlu öngörü değerini %100, olumsuz öngörü değerini %94 bildirmişlerdir (31). Çalışmamızda ise, Real-time PCR yönteminin duyarlılığı %95.7, spesifikliğı %70.0, olumlu öngörü değeri %88.2 ve olumsuz öngörü değeri ise %87.5 olarak saptandı (Kappa=0.697).

Oleastro ve arkadaşları, real-time PCR'ı E-test ve agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen klaritromisin duyarlılıkları ile karşılaştırmışlar ve %96.4 korelasyon saptamışlardır (197). Lascols ve arkadaşları, E-test ile real-time PCR arasındaki uyumu %98.2 saptamışlardır (33). Çalışmamızda ise E-test ve Real-time yöntemi arasındaki uyum %75.4 olarak saptandı. E-test ile uyumsuz olan sonuçlar FISH ile uyumlu saptandı. FISH yöntemi ile 23S rRNA'nın yalnızca 2143 ve 2144 pozisyonlarındaki mutasyonlara bağlı klaritromisin direnci, Real-time PCR yöntemi ile de 2142 ve 2143 pozisyonundaki mutasyonlara bağlı klaritromisin direnci

saptanmaktadır. Bu nedenle, bu suşların klaritromisin direncinin 2142, 2143 ve 2144 pozisyonundan farklı yerdeki nokta mutasyonu ile ilişkili olma olasılığı bulunmaktadır.

Çalışmamızda aynı zamanda, *cagA*-pozitif suşların prevalansı %46.5 olarak saptandı. CagA prevalansının Türkiye’de neredeyse bizim çalışmamıza göre iki kat daha fazla %82 olduğu bildirilmektedir (274). Ancak bu çalışmada CagA prevalansının daha yüksek olması duodenal ülserli hastaların seçilmesinden kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda, dispeptik hastalar seçildiğinden, CagA prevalansının bu çalışma kadar yüksek olması beklenmemektedir, ancak hiçbir risk faktörü olmadığı halde *cagA*-pozitif suşların prevalansı oldukça yüksek bir oranda saptanmıştır. Avrupa ve Afrika’dan izole edilen suşların yaklaşık %20-40’ı *cagA* negatif iken, doğu Asya’dan izole edilen *H. pylori* suşlarının hemen hepsi *cagA*-pozitif olduğu bildirilmiştir. Batı ülkelerinde, *cagA* pozitif *H. pylori* suşları ile enfekte olan bireylerin peptik ülser veya gastrik kanser açısından büyük riske sahip olduğu bildirilmiştir (52). Çalışmamızda, CagA varlığı aynı zamanda klaritromisin duyarlılığı ile karşılaştırıldı. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinde *cagA* pozitifliği ile klaritromisin duyarlılığı arasında korelasyon saptanmadı (Fisher exact test, $p=1.000$). Camorlinga-Ponce ve arkadaşları, *in situ* hibridizasyon yöntemi ile CagA negatif bakterilerin mukus tabakasında ya da apikal epitel yüzeyde kolonize olduğunu, CagA pozitif bakterilerin ise hücreler arası boşlukta ya da epitel hücrelerin çevresinde kolonize olduğunu bildirmişlerdir (275). Çalışmamızda CagA varlığı, klaritromisin duyarlılığı ve kolonizasyon arasında korelasyon saptanmadı. CagA pozitif 17 hastanın aynı zamanda klaritromisin dirençli suşa sahip olduğu bulundu. Bu hastaların tedavilerinin yönetiminin gastrik kanserin önlenmesi için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Eğer klinisyen bu hastaların tedavisinde klaritromisin antibiyotiğini kullanırsa, bu hastaları tedavi edemeyeceği ve CagA pozitif *H. pylori* suşları gastrik mukoza hasarını indükleyerek peptik ülser ve gastrik kansere neden olabileceği düşünülmektedir. E-test üç gün enkübasyondan sonra sonuç verebilirken, parafin bloklara FISH uygulaması yaklaşık üç saatte sonuç verebilmektedir. Bu yüzden klinisyenler, CagA pozitif hastalar için uygun tedavi seçimine daha hızlı karar verebilmelidir.

cagA, *vacA*, *oipA*, *babA*, *hopQ* ve *homA/B* gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve ciddi klinik yaklaşımlarda rol oynamaktadır. Virulans faktörlerin çoğu birbiri ile ilişkilidir; CagA pozitif suşlar aynı zamanda *vacA* s1/m1 genotipine sahiptir ve *babA* ve *oipA* “on” statüsü ile yakın ilişkili olduğu bildirilmiştir (52). CagA ekspresyonu ve vakuol oluşturan sitotoksik aktivite arasında ilişki *in vitro* olarak *H. pylori* suşlarında gösterilmiştir. *cagA* varlığı ve *vacA*

s1 arasında güçlü bir genetik ilişki olduğu bildirilmiştir (276, 277). *vacA* s2 genotipi *in vitro* olarak vakuol oluşturan sitotoksik aktivite göstermez, sadece *vacA* s1 genotipi bu aktiviteyi göstermektedir. Ayrıca, *vacA* m bölgesi suşların sitotoksin aktivite düzeyleri ile bağımsız olarak ilişkilidir. m1 ve m2 arasındaki yapısal farklılık sitotoksin fenotipinde farklılıklara neden olmaktadır (277). *vacA* s1 genotipi ile peptik ülser hastalığı arasında güçlü bir ilişki vardır, ancak *vacA* s2 suşları peptik ülserasyon ile nadiren ilişkili olduğu bildirilmiştir (276, 277). Çalışmamızda VacA virulans faktörünün varlığı, VacA genotiplerinin belirlenmesi ve CagA virulans faktörü ile ilişkisi araştırılmıştır. Yirmi dokuz (%25.4) hastada *vacA* m1s1 genotipi (20 CagA+); bir (%0.9) hastada m1s2 genotipi; 40 (%35.1) hastada m2s2 genotipi (4 CagA+), 35 (%30.7) hastada m2s1 genotipi (25 CagA+) saptanmıştır. Dokuz hastada miks suş saptanmıştır. Sonuç olarak, *vacA* s1 genotipinin CagA pozitifliği ile *vacA* s2 genotipinin ise CagA negatifliği ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca, *vacA* genotipleri ile klaritromisin duyarlılığı arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, FISH yöntemi, biyopsi örneklerinden bakterinin saptanması için çok kullanışlıdır. Bu yöntemle sadece bakterinin saptanması değil, aynı zamanda kültür ve PCR gibi standart yöntemler ile mümkün olmayan bakterinin gastrik dokudaki lokalizasyonu ve morfolojisi de gözlenmektedir. FISH klinik mikrobiyologlar ve klinisyenlerin *H. pylori* varlığının saptanması ve eş zamanlı olarak klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip ideal bir tekniktir.

6. SONUCLAR VE ÖNERİLER

H. pylori enfeksiyonu prevalansı (%70.1) hastanemizde ortadoğu ülkeleri ile benzerdir. *H. pylori*'nin karakteristik özelliklerinden dolayı *H. pylori* tanısında tek bir yöntem kullanılamamaktadır. Bu nedenle klinik yönden uygun ve tedaviyi yönlendirebilecek yöntemler araştırılmalıdır. Maastricht IV Sonuç Raporu'na göre, primer klaritromisin direnci %20'den yüksek olan coğrafik bölgelerde *H. pylori* kültürü ve antimikrobiyal testlerin yapılması gerektiği ve ayrıca ilk eradikasyon tedavisi başarısızlığından sonra ikinci basamak tedavi uygulanmadan önce bütün bölgelerde kültür uygulanması önerilmiştir. Kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanmasının mümkün olmadığı durumlarda FISH yöntemi gibi moleküler yöntemlerin *H. pylori* varlığı ve klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir. Bu nedenle endoskopi endikasyonu konulan hastalardan alınan korpus ve antrum biyopsi örneklerinden hazırlanan bir preparatın histopatolojik incelemeye alınması, bir preparatın ise FISH yöntemiyle incelenmesinin sağaltım için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

H. pylori klaritromisin direnci prevalansı hastanemizde dünyadaki diğer ülkelere göre daha yüksektir. *H. pylori* klaritromisin direncinde real-time PCR yöntemi ile A2143G mutasyonu en sık görülmektedir. Hastanemiz populasyonunda *H. pylori*'ye karşı klaritromisin direnç oranının yüksek olarak saptanması nedeniyle, ilk eradikasyon tedavisi başarısızlığından sonra ikinci basamak tedavi uygulanmadan önce bütün bölgelerde kültür uygulanması, kültürün uygulanamadığı durumlarda ise FISH yönteminin uygulanması önerilmektedir.

Histopatolojik değerlendirme ile *cagA* statüsü ve *vacA* genotipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Klaritromisin direnç tipi/tiplerinin, histopatolojik bulgular ve virulans faktörleri ile aralarında ilişki olmadığı saptanmıştır. Antrum ve/veya korpus *H. pylori* kolonizasyonunun klinik açıdan önemli olabileceği, eradikasyon tedavisinde bir lokalizasyonda duyarlı bir lokalizasyonda dirençli saptanması durumunda klaritromisin dirençli olarak değerlendirilmesi gerektiğini, dispeptik hastaların antrum ve korpusundan izole edilen *H. pylori* suşlarının genetik olarak farklı olması ile miks enfeksiyon varlığının saptandığını, Endoskopi endikasyonu konulan hastalardan alınan korpus ve antrum biyopsi örneklerinden hazırlanan bir preparatın histopatolojik incelemeye alınması, bir preparatın ise FISH yöntemiyle incelenmesi gerektiği, klaritromisin direncinin %20'den yüksek olduğu ancak kültür ve duyarlılık testlerinin yapılamadığı durumlarda FISH yönteminin uygulanmasının *H. pylori* eradikasyon tedavi başarısızlığında kullanılacak hızlı, güvenilir ve

kültüre edilemeyen durumlarda başarılı bir yöntem olduğu ve rutin uygulamalarda da kullanılabileceği kanısına varıldı.

7. KAYNAKLAR

- 1) Vinette KMB, Gibney KM, Proujansky R, Fawcett PT. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients. BMC Microbiol 2004; 4: 5.
- 2) Rüssmann H, Kempf VAJ, Koletzko S, Heesemann J et al. Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 2001; 39: 304-308.
- 3) Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridization. Gut 2000; 46: 608-614.
- 4) Trebesius K, Adler K, Vieth M, Stolte M et al. Specific detection and prevalence of *Helicobacter heilmanii*-like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent *in situ* hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing. J Clin Microbiol 2001; 39: 1510-1516.
- 5) Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. J Med Microbiol 2001; 50: 1021-1029.
- 6) Jüttner S, Vieth M, Miehle S, Schneider-Barchert W et al. Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence *in situ* hybridization in formalin-fixed tissue. Mod Pathol 2004; 17: 684-689.
- 7) Makristathis A, Barousch W, Pasching E, Binder C et al. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. J Clin Microbiol 2000; 38: 3710-3714.
- 8) Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? Ann Med 2001; 33: 91-97.
- 9) Furuta T, Delchier JC. *Helicobacter pylori* and Non-malignant diseases. Helicobacter 2009; 14(Suppl. 1): 29-35.

- 10) Lehours P, Megraud F. *Helicobacter pylori* molecular diagnosis. Expert Rev Mol Diagn 2011; 11(4): 351-355.
- 11) Rimbara A, Fischbach LA, Graham DY. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. Gastroenterol Hepatol 2011; 8: 79-88.
- 12) Young KA, Akyon Y, Rampton DS, Barton SGRG et al. Quantitative culture of *Helicobacter pylori* from gastric juice: the potential for transmission. J Med Microbiol 2000; 49: 343-347.
- 13) Bardhan K. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. Clin Infect Dis 1997; 25: 973-978.
- 14) Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2007; 12 (Suppl. 1): 10-14.
- 15) de Jonge R, Pot RG, Loffeld RJ, van Vliet AHM et al. The functional status of the *Helicobacter pylori* sabB adesin gene as a putative marker for disease outcome. Helicobacter 2004; 9: 158-164.
- 16) Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. Int J Infect Dis 2008; 12: 30-36
- 17) Eslick GD. *Helicobacter pylori* infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. World J Gastroenterol 2006; 12(19): 2991-2999.
- 18) Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci 2005; 96: 835-843.
- 19) Satomi S, Yamakawa A, Matsunaga S, Ryuho M et al. Relationship between the diversity of the cagA gene of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Okinawa, Japan. J Gastroenterol 2006; 41: 668-673.

- 20) Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M et al. Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 44: 261-268.
- 21) Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S et al. EPIYA motif is a membrane-trafeging signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. J Biol Chem 2005; 280(24): 23130-23137.
- 22) De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. Ann Intern Med 2006; 144: 94-100.
- 23) Cover TL. Role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in gastroduodenal disease. J Infect Dis 2006; 194: 1343-1345.
- 24) O'Brien DP, Israel DA, Krishna U, Romero-Gallo J et al. The role of decay accelerating factor as a receptor for *Helicobacter pylori* and a mediator of gastric inflammation. J Biol Chem 2006; 281(19): 13317-13323.
- 25) Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010; 7(11): 629-641.
- 26) Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III consensus report. Gut 2007; 56: 772-781.
- 27) De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G et al. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. J Gastrointestin Liver Dis 2010; 19(4): 409-414.
- 28) Feydt-Schmidt A, Rüssmann H, Lehn N, Fischer A et al. Fluorescence *in situ* hybridization vs. epsilometer test for detection of clarithromycin-susceptible and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains in gastric biopsies from children. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 2073-2079.
- 29) Rüssmann H, Schmidt AF, Adler K, Aust D et al. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in shock-frozen gastric biopsy samples by fluorescent *in situ* hybridization. J Clin Microbiol 2003; 41: 813-815.

- 30) Debets-Ossenkopp YJ, Sparrius M, Kusters JG, Kolkman JJ et al. Mechanism of clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 1996; 142: 37-42.
- 31) Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. J Clin Microbiol 2004; 42: 4512-4518.
- 32) Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C et al. Evaluation of a new test, Genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2009; 47(11): 3600-3607.
- 33) Lascols C, Lamarque D, Costa J-M, Copie-Bergman C et al. Fast and Accurate Quantitative Detection of *Helicobacter pylori* and Identification of Clarithromycin Resistance Mutations in *H. pylori* Isolates from Gastric Biopsy Specimens by Real-Time PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 4573–4577.
- 34) Demiray E, Yılmaz Ö, Şarkış C, Soytürk M et al. Comparison of invasive methods and two different stool antigen tests for diagnosis of *H. pylori* infection in patients with gastric bleeding. World J Gastroenterol 2006; 12(26): 4206-4210.
- 35) Molnar B, Galamb O, Sipos F, Leiszter K et al. Molecular pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection: The role of bacterial virulence factors. Dig Dis 2010; 28: 604-608.
- 36) Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(7): 2753-2759.
- 37) Garrido L, Toledo H. Novel genotypes in *Helicobacter pylori* involving domain V of the 23S rRNA gene. Helicobacter 2007; 12: 505-509.
- 38) Xuan SH, Zhou YG, Shao B, Cui YL et al. Enzymic colorimetry-based DNA chip: a rapid and accurate assay for detecting mutations for clarithromycin resistance in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 2009; 58: 1443-1448.

- 39) Torachio S, Aceto GM, Mariani-Constantini RM, Battista P et al. Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2004; 9(5): 396-399.
- 40) Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA et al. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12): 3765-3769.
- 41) Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM et al. The peopling of the pacific from a bacterial perspective. *Science* 2009; 323: 527-530.
- 42) Fox JG, Megraud F. *Helicobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manuel, editors. Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. p. 947-962.
- 43) 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.
- 44) Özden A. *Helicobacter pylori*'nin yüzyıllık hikayesi. Özden A eds. *İşte Helicobacter pylori*. Ankara, Nurol Matbaacılık: Türk Gastroenteroloji Derneği yayını. 1995; 1-3.
- 45) Ovalı Ö, Baylan O. Klinik ve mikrobiyolojik açıdan *Helicobacter pylori*. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34: 135-146.
- 46) Heatley RV. *Helicobacter pylori* el kitabı. İkinci Baskı, İstanbul, Blackwell Science, CSA, 1998; 1-35.
- 47) Radosz-Komoniewska H, Bek T, Jozwiak J, Martirosian G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 602-610.
- 48) Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey&Scott's Diagnostic microbiology*. 12th edition. China, Mosby Elsevier, 2007;421-423.
- 49) Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M et al. *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(6): 791-796.

- 50) Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: What is new? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(8): 1865–1868.
- 51) Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-741.
- 52) Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol* 2012; 12(2): 203-213.
- 53) Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA et al. The complete genome sequences of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547.
- 54) Tsuji S. The “Costa Rican enigma” of *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer. *J Gastroenterol* 2006; 41: 716-717.
- 55) Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(19): 2979-2990.
- 56) Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328-1333.
- 57) Gatti LL, Modena JLP, Payao SLM, Smith MAC et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Tropica* 2006; 100: 232-240.
- 58) Siavoshi F, Saniee P, Atabakhsh M, Pedramnia S et al. Muroid *Helicobacter pylori* isolates with fast growth under microaerobic and aerobic conditions. *Helicobacter* 2011; 17: 62-67.
- 59) Dhar SK, Soni RK, Das BK, Mukhopadhyay G. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 207-215.
- 60) Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65: 389-410.
- 61) Skene C, Young A, Every A, Sutton P. *Helicobacter pylori* flagella: antigenic profile and protective immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 249-256.

- 62) Wu JJ, Sheu BS, Huang AH, Lin ST et al. Characterization of flgK gene and FlgK protein required for *H. pylori* colonization-from cloning to clinical relevance. World J Gastroenterol 2006; 12(25): 3989-3993.
- 63) O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. Microbes Infect 2000; 2: 1207-1214.
- 64) Sheu BS, Yang HB, Yeh YC, Wu JJ. *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric epithelium: A bug's first step is a novel target for us. J Gastroenterol Hepatol 2010; 25: 26-32.
- 65) Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HpsA and M(r)18,000 OMP from *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2003; 9: 1756-1761.
- 66) Costa AC, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2009; 14(Suppl. 1): 15-20.
- 67) Amieva MR, El-Omar EM. Host bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol 2008; 134: 306-323.
- 68) Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. World J Gastroenterol 2008; 14(27): 4265-4272.
- 69) Aspholm M, Olfat FO, Norden J, Sonden B et al. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. Plos Pathogens 2006; 2: 989-1001.
- 70) Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2005; 10 (Suppl. 1): 14-20.
- 71) 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 polymorphisms. J Infect Dis 2006; 194: 1346-1355.
- 72) Shao S-H, Wang H, Chai S-G, Liu L-M. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. World J Gastroenterol 2005; 11: 3011-3013.

- 73) Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect* 2000; 2: 55-60.
- 74) Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995; 63: 1567-1572.
- 75) Park JW, Song JY, Lee SG, Jun JS et al. Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains. *Helicobacter* 2006; 11: 533-543.
- 76) Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. Second, USA, ASM press, 2002; 339-351.
- 77) Güvenir M. *Helicobacter pylori* CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 2010; 82-89.
- 78) Alm RA, Ling LSL, Moir DT, King BL et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397:176-180.
- 79) Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(2): 280-322.
- 80) Cellini L, Grande R, Di Campli E, Traini T et al. Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 178-185.
- 81) Torres J, Lopez L, Lazcano E, Camorlinga M et al. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(8): 1874-1877.
- 82) Bağlan PH, Bozdayı G, Özkan M, Ahmed K et al. Clarithromycin resistance prevalence and *IceA* gene status in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *J Microbiol* 2006; 44(4): 409-416.

- 83) Das JC, Paul N. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. Indian J Pediatr 2007; 74: 287-290.
- 84) Hasni S, Ippolito A, Illei GG. *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. Oral Dis 2011; 17: 621-627.
- 85) Azevedo NF, Huntington J, Goodman KJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. Helicobacter 2009; 14(Suppl.1): 1-7.
- 86) Wilson WR, Sande MA. Current Diagnosis&Treatment in Infectious Diseases. International edition, USA, McGraw-Hill & Lange, 2001; 581-586.
- 87) Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Eng J Med 2002; 347: 1175-1186.
- 88) Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and related organisms. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE. editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th edition, New York: C. Livingstone; 2000. p. 2285-2293.
- 89) Malaty HM, Kumagai T, Tanaka E, Ota H et al. Evidence from a nine-year birth cohort study in Japan of transmission pathways of *Helicobacter pylori* infection. J Clin Microbiol 2000; 38: 1971-1973.
- 90) Simsek H, Balaban YH, Gunes DD, Haşcelik G et al. Alarming clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* in Turkish population. Helicobacter 2005; 10(4): 360-361.
- 91) Fidan I, Türet S. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda patogenezi ve tanı. Enfeksiyon Dergisi 1999; 13: 455-460.
- 92) Piqueres P, Moreno Y, Alonso JL, Ferrus MA. A combination of direct viable count and fluorescent *in situ* hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability. Res Microbiol 2006; 157: 345-349.
- 93) Blanchard TG, Czinn SJ. *Helicobacter pylori* acquisition and transmission: Where does it all begin? Gastroenterol 2001; 121: 483-490.

- 94) Liu Y, Yue H, Li A, Wang J et al. An epidemiologic study on the correlation between oral *Helicobacter pylori* and gastric *H. pylori*. *Curr Microbiol* 2009; 58(5): 449-453.
- 95) Raymond J, Thiberge JM, Kalach N, Bergeret M et al. Using Macro-Arrays to study routes of infection of *Helicobacter pylori* in three families. *PLoS ONE* 2008; 3(5): e2259.
- 96) Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Megraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2012; 17 (suppl. 1): 1-8.
- 97) Bergman MP, D'Elios MM. Cytotoxic T cells in *H. pylori*-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 104918.
- 98) Demiray E, Yilmaz O. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37(2): 112-117.
- 99) Covacci A, Rappuoli R. *Helicobacter pylori*: After the genomes, back to biology. *J Exp Med* 2006; 197(7): 807-811.
- 100) Clyne M, Dolan B, Reeves EP. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 268: 135-143.
- 101) Lee JS, Choe YH, Lee JH, Lee HJ et al. *Helicobacter pylori* urease activity is influenced by ferric uptake regulator. *Yonsei Med J* 2010; 51(1): 39-44.
- 102) Schoep TD, Fulurija A, Good F, Lu W et al. Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. *PLOS one* 2010; 11(5): e15042.
- 103) Montecucco C, Rappuoli R. Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Mol Cell Biol* 2001; 2: 457-466.
- 104) Krishnamurthy P, Parlow M, Zitzer JB, Vakil NB et al. *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infect Immun* 1998; 66(11): 5060-5066.
- 105) Purvi C, Panchal MD, Forman JS, Blumberg DR et al. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 4-10.

- 106) Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Kvetnaya AS. Antibacterial activity of Chamomilla recutita oil extract against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 2008; 22: 252-253.
- 107) Shoaee Hassani AR, Ordouzaadeh N, Ghaemi A, Amirmozafari N et al. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* urease with non and semi fermented Camellia sinensis. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27(1): 30-4.
- 108) Pastene E, Troncoso M, Figueroa G, Alarcon J et al. Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 416–424.
- 109) Backert S, Clyne M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2011; 16(Suppl 1): 19-25.
- 110) Torres J, Backert S. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2008; 13 (Suppl. 1): 13-17.
- 111) Prinz C, Schwendy S, Volland P. *H. pylori* and gastric cancer: Shifting the global burden. *World J Gastroenterol* 2006; 12(34): 5458-5464.
- 112) McNamara D, El-Omar E. *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of gastric cancer: A paradigm for host-bacterial interactions. *Dig Liv Dis* 2008; 40: 504-509.
- 113) Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Markovska R et al. Association of iceA and babA genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antony van Leeuwenhoek* 2010; 98(3): 343-350.
- 114) Henning EE, Allen JM, Cover TL. Multiple chromosomal loci for the babA gene in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2006; 74(5): 3046-3051.
- 115) Erzin Y, Köksal V, Altun S, Dobrucali A et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter* 2006; 11: 574-580.

- 116) Xie XF, Ito M, Sumii M, Tanaka S et al. *Helicobacter pylori*-associated gastritis is related to *babA2* expression without heterogeneity of the 3' region of the *cagA* genotype in gastric biopsy specimens. *Pathobiol* 2007; 74: 309-316.
- 117) Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters* 2009; 282: 1-8.
- 118) Linden SK, Wickström C, Lindell G, Gilshenan K et al. Four modes of adhesion are used during *Helicobacter pylori* binding to human mucins in the oral and gastric niches. *Helicobacter* 2008; 13: 81-93.
- 119) Colbeck JC, Hansen LM, Fong JM, 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.
- 120) Backström A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE et al. Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and Dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16923-16928.
- 121) Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006; 55: 775-781.
- 122) Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 449-490.
- 123) Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J et al. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 2005; 280: 15390-15397.
- 124) Markovska R, Boyanova B, Yordanov D, Gergova G et al. *Helicobacter pylori* oipA genetic diversity and its associations with both disease and *cagA*, *vacA* s, m and i alleles among Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 335-340.
- 125) Schumann C, Triantafilou K, Rasche FM, Möricke A et al. Serum antibody positivity for distinct *Helicobacter pylori* antigens in benign and malignant gastroduodenal disease. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 223-228.

- 126) Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. J Clin Microbiol 2002; 40: 239-246.
- 127) Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G et al. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Mol Microbiol 1999; 31(5): 1537-1548.
- 128) de Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ et al. Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. J Med Microbiol 2004; 53: 375-379.
- 129) Lu H, Wu JY, Beswick EJ, Ohno T et al. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesion of Western and East Asian strains. J Biol Chem 2007; 282: 6242-6254.
- 130) Berstad AE, Brandtzaeg P. Expression of cell membrane complement regulatory glycoproteins along the normal and diseased human gastrointestinal tract. Gut 1998; 42: 522-529.
- 131) Zhang ZW, Dorrell N, Wren BW, Farthing MJG. *Helicobacter pylori* adherence to gastric epithelial cells: a role for non-adhesin virulence genes. J Med Microbiol 2002; 51: 495-502.
- 132) Bury-Mone S, Mendz GL, Ball GE, Thibonnier M et al. Roles of α and β carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease- dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa. Infect Immun 2008; 76(2): 497-509.
- 133) Snelling WJ, Moran AP, Ryan KA, Scully P et al. HorB (HP0127) is a gastric epithelial cell adhesin. Helicobacter 2007; 12: 200-209.
- 134) Watanabe T, Tsuge H, Imagawa T, Kise D et al. Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor- α inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. J Cancer Res Clin Oncol 2010; 136(6): 911-921.

- 135) Kindermann A, Lopes AI. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter* 2009; 14(Suppl.1): 52-57.
- 136) Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* 2008; 10(8): 1573-1581.
- 137) Cendron L, Zanotti G. Structural and functional aspects of unique type IV secretory components in the *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island. *FEBS* 2011; 278: 1223-1231.
- 138) Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, Ertl C et al. *Helicobacter pylori* Type IV secretion apparatus exploits $\beta 1$ integrin in a novel RGD-Independent manner. *PLOS pathogens* 2009; 5(12): e1000684.
- 139) Azuma T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol* 2004; 39: 97-103.
- 140) Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H et al. Influence of EPIYA repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterol* 2006; 130: 1181-1190.
- 141) Angelini A, Tosi T, Mas P, Acajjaoui S et al. Expression of *Helicobacter pylori* CagA domains by library-based construct screening. *FEBS J* 2009; 276: 816-824.
- 142) Murata-Kamiya N. Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*. *Microb Infect* 2011; 13: 799-807.
- 143) Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. CagA protein of *Helicobacter pylori*: A hijacker of gastric epithelial cell signaling. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1697-1702.
- 144) Choi KD, Kim N, Lee DH, Kim JM et al. Analysis of the 3' variable region of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* isolated in Koreans. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 960-966.
- 145) Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. *Front Microbiol* 2010; 1: 115.

- 146) Hatakeyama M, Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006; 11 (Supl. 1): 14-20.
- 147) Ren S, Higashi H, Lu H, Azuma T et al. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in Cells. *J Biol Chem* 2006; 281(43): 32344-32352.
- 148) Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002; 295: 683-686.
- 149) Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *PNAS* 2002; 99: 14428-14433.
- 150) Ishikawa S, Ohta T, Hatakeyama M. Stability of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells. *FEBS Letters* 2009; 583: 2414-2418.
- 151) Lu H, Yamaoka Y, Graham YD. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 653-659.
- 152) Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A et al. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 488-495.
- 153) Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY, Lee YC et al. *Helicobacter pylori* stimulates gastric epithelial cell MMP-1 secretion via CagA-dependent and -independent ERK activation. *J Biol Chem* 2007; 282(26): 18722-18731.
- 154) Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Pestell RG et al. Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. *Cell Microbiol* 2006; 8(11): 1740-1752.
- 155) Brandt S, Kwok T, Hartig R, Konig W et al. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9300-9305.

- 156) Hirata Y, Maeda S, Ohmae T, Shibata W et al. *Helicobacter pylori* induces I κ B kinase nuclear translocation and chemokine production in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2006; 74: 1452-1461.
- 157) Cho SO, Kim KH, Kim H. Extracellular signal-regulated kinase induces phosphorylation of I κ B α in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial AGS cells. *Inflammopharmacology* 2007; 15: 26-30.
- 158) Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O et al. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(2): 181-186.
- 159) Goto Y, Ando T, Yamamoto K, Tamakoshi A et al. Association between serum pepsinogens and polymorphism of PTPN11 encoding SHP-2 among *Helicobacter pylori* seropositive Japanese. *Int J Cancer* 2006; 118: 203-208.
- 160) Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 1-9.
- 161) Gangwer KA, Mushrush DJ, Stauff DL, Spiller B et al. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(41): 16293-16298.
- 162) Galmiche A, Rassow J. Targeting of *Helicobacter pylori* VacA to mitochondria. *Gut Microbes* 2010; 1: 392-395.
- 163) Kim IJ, Blanke SR. Remodelling the host environment: Modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 37.
- 164) Ivie SE, McClain MS, Algoood HMS, Lacy DB et al. Analysis of a β -helical region in the p55 domain of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *BMC Microbiol* 2010; 10: 60. Torres VJ, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem* 2005; 280: 21107-21114.

- 165) Torres VJ, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. J Biol Chem 2005; 280: 21107-21114.
- 166) Sugimoto M, Yamaoka Y. The association of vacA genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 835-842.
- 167) Sugimoto M, Zali MR, Yamaoka Y. The association of vacA genotypes and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases in the Middle East. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28(10): 1227-1236.
- 168) Serrano C, Diaz MI, Valdivia A, Godoy A et al. Relation between *Helicobacter pylori* virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. Microb Infect 2007; 9: 428-434.
- 169) Geisse NA, Cover TL, Henderson RM, Edwardson JM. Targetting of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin to lipid raft membrane domains analysed by atomic force microscopy. Biochem J 2004; 381: 911-917.
- 170) Sundrind MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL. Inhibition of primary human T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of vacA effects on IL-2 secretion. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 7727-7737.
- 171) Müller A, Oertli M, Arnold IC. *H. pylori* exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. Cell Commun Signal 2011; 9: 25.
- 172) Domanska G, Motz C, Meinecke M, Harsman A et al. *Helicobacter pylori* VacA toxin/subunit p34: Targeting of an anion channel to the inner mitochondrial membrane. PLOS Pathogens 2010; 6(4): e1000878.
- 173) Janulaityte-Günther D, Kupcinskas L, Pavilonis A, Valuckas K et al. Combined serum IgG response to *Helicobacter pylori* VacA and CagA predicts gastric cancer. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50: 220-225.

- 174) Chitcholtan K, Hampton MB, Keenan JJ. Outer membrane vesicles enhance the carcinogenesis potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis* 2008; 29(12): 2400-2405.
- 175) Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakis KS, Petraki K et al. CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in *Helicobacter pylori*-Infected adults with peptic ulcer and non-peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 2010; 48(6): 2237-2239.
- 176) Wen S, Felley CP, Bouzourene H, Reimers M et al. Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Immun* 2004; 172: 2595-2606.
- 177) Yokota S, Okabayashi T, Rehli M, Fujii N et al. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides upregulate toll-like receptor 4 expression and proliferation of gastric epithelial cells via the MEK1/2-ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun* 2010; 78(1): 468-476.
- 178) Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Chen CC. *Helicobacter pylori*-induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol* 2005; 175: 8242-8245.
- 179) Tsai HF, Hsu PN. Interplay between *Helicobacter pylori* and immune cells in immune pathogenesis of gastric inflammation and mucosal pathology. *Cell Mol Immunol* 2010; 7(4): 255-259.
- 180) Cabral MMDA, Mendes CMC, Castro LPF, Cartelle CT et al. Apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis is related to *cagA* status. *Helicobacter* 2006; 11: 469-476.
- 181) Ashktorab H, Frank S, Khaled AR, Durum SK et al. Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2004; 53: 805-813.
- 182) Beswick EJ, Pinchuk IV, Suarez G, Sierra JC et al. *Helicobacter pylori* cagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD47 and stimulates procarcinogenic events. *J Immunol* 2006; 176: 6794-6801.

- 183) Galgani M, Busiello I, Censini S, Zappacosta S et al. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: role of the cag pathogenicity island. *Infect Immun* 2004; 72: 4480-4485.
- 184) Eguchi H, Carpentier S, Kim SS, Moss SF. P27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. *Gut* 2004; 53: 797-804.
- 185) 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.
- 186) Ganten TM, Aravena E, Sykora J, Koschny R et al. *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in T cells is mediated by the mitochondrial pathway independent of death receptors. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 117-125.
- 187) Ricci C. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21(2): 299-313.
- 188) Monteiro L, Oleastro M, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2009; 14(Suppl. 1): 8-14.
- 189) Sainsus N, Cattori V, Lepadatu C, Hofmann-Lehmann R. Liquid culture medium for rapid cultivation of *Helicobacter pylori* from biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 1209-1217.
- 190) 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: 1161-1181.
- 191) Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-The Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.

- 192) Piccolomini R, Di Bonaventura G, Festi D, Catamo G et al. Optimal combination of media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1541-1544.
- 193) Clinical Laboratory Standard Institute 2007 M7-MİK Tablo 2J, M100-S17; 27(1):134.
- 194) Ruzsovcics A, Molnar B, Tulassay Z. Review article: deoxyribonucleic acid-based diagnostic techniques to detect *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 2004; 19: 1137-1146.
- 195) Rimbara E, Tamura R, Tanuma M, Noguchi N et al. Evaluation of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* obtained from culture isolates, gastric juice, and feces. Helicobacter 2009; 14: 156-157.
- 196) Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 16-23.
- 197) Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 397-402.
- 198) Lehours P, Siffre E, Megraud F. DPO multiplex PCR as an alternative to culture and susceptibility testing to detect *Helicobacter pylori* and its resistance to clarithromycin. BMC Gastroenterol 2011; 11: 112.
- 199) Woo HY, Park DII, Park H, Kim MK et al. Dual-Priming Oligonucleotid-based multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with gastric biopsy specimens. Helicobacter 2009; 14: 22-28.
- 200) Hirschl AM, Makristathis A. Methods to detect *Helicobacter pylori*: From culture to molecular biology. Helicobacter 2007; 12(Suppl 2): 6-11.
- 201) Hirno S, Shumakov Y, Utt M, Wadström T. Genetic heterogeneity of *Helicobacter pylori* and strain typing. In: Moran AP, O'Morain CA eds. Pathogenesis and host response in *Helicobacter pylori* infections. Homburg Normed Verlag: Internarnational Medical Publishers. 1997;199-205.

- 202) 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.
- 203) 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.
- 204) Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. Eur J Pediatr 2010; 169(1): 15-25.
- 205) Sen N, Yılmaz Ö, Simsek İ, Küpelioglu AA et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. Helicobacter 2005; 10(4): 353-359.
- 206) Puz S, Innerhofer A, Ramharter M, Haefner M et al. A novel noninvasive genotyping method of *Helicobacter pylori* using stool specimens. Gastroenterol 2008; 135: 1543-1551.
- 207) 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.
- 208) Yamamoto S, Uemura N, Okamoto S, Yamaguchi S et al. A new rapid test for detecting anti-*Helicobacter pylori* antibody excreted into urine. Helicobacter 2000; 5: 160-164.
- 209) O'Connor A, Gisbert J, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2009; 14(Suppl. 1): 46:51.
- 210) Gerrits MM, van Vliet AHM, Kuipers E, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: Molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis 2006; 6: 799-709.
- 211) Şimşek I, Gökçekuyu B, Yılmaz O, Ellidokuz H et al. Increased resistance needs to change the first line treatment strategy for eradication of *Helicobacter pylori* in Turkey. European Helicobacter Study Group (EHSg) XXIVth International Workshop on

- Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 11-13,2011, Dublin, Ireland, P07.16. *Helicobacter* 2011; 16: 120.
- 212) Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori*'de antibiyotik direnci ve direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler. *Mikrobiyol Bült* 2005; 39: 399-409.
- 213) Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384.
- 214) De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World J Gastroenterol* 2011; 2(3): 35-41.
- 215) Hiyama H, Tanaka S, Masuda H, Shima H et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and metronidazole determined by 23S ribosomal RNA and *rdxA* gene analyses in Hiroshima, Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1202–1207.
- 216) Glocker E, Berning M, Gerrits MM, Kusters JG et al. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3166-3170.
- 217) Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 282-286.
- 218) Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Correlation between substitutions in penicilin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol* 2007; 51(10): 939-944.
- 219) Matteo MJ, Granados G, Olmos M, Wonaga A et al. *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 474-477.
- 220) Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 43-53.

- 221) Glocker E, Kist M. Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 2241-2246.
- 222) Glocker E, Bogdan C, Kist M. Characterization of rifampicin –resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 874-879.
- 223) McKenna S, Evans GA, the Canadian Infectious Disease Society Antimicrobial Agents Committee. Macrolides: A Canadian Infectious Disease Society position paper. Can J Infect Dis 2001; 12(4): 218-231.
- 224) Gaynor M, Mankin AS. Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. Cur Top Med Chem 2003; 3(9): 949-961.
- 225) Dinos GP, Connell SR, Nierhaus KH, Kalpaxis DL. Erythromycin, roxithromycin, and clarithromycin: use of slow-binding kinetics to compare their *in vitro* interaction with a bacterial ribosomal complex active in peptide bond formation. Mol Pharmacol 2003; 63: 617-623.
- 226) Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1): 1-12.
- 227) Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature 2001; 413: 814-821.
- 228) Sadeghi-Khomami A, Lumsden MD, Jakeman DL. Glycosidase inhibition by macrolide antibiotics elucidated by STD-NMR spectroscopy. Chem Biol 2008; 15: 739-749.
- 229) Rodvold KA, Piscitelli SC. New oral macrolide and fluoroquinolone antibiotics: An overview of pharmacokinetics, interactions, and safety. Clin Infect Dis 1993; 17(Suppl 1): S192-199.
- 230) Taylor DE. Pathophysiology of antibiotic resistance: Clarithromycin. Can J Gastroenterol; 14(10): 891-894.

- 231) Mamelli L, Prouzet-Mauleon V, Pages JM, Megraud F et al. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 491-497.
- 232) Rimbara E, Noguchi N, Kijima H, Yamaguchi T et al. Mutations in the 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Japan. *Int J Anmicrob Agents* 2007; 30: 250-254.
- 233) Wang GE, Jiang Q, Taylor DE. Genotypic characterization of clarithromycin-resistant and –susceptible *Helicobacter pylori* strains from the same patient demonstrates existence of two unrelated isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9): 2730-2731.
- 234) Wilson DN, Nierhaus KH. The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42: 187-219.
- 235) Calvino-Fernandez M, Parra-Cid T. *H. pylori* and mitachondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stres. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102(1): 41-50.
- 236) Rüssmann H, Adler K, Haas R, Gebert B et al. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4142-4144.
- 237) Chen S, Li Y, Yu C. Oligonucleotide microarray: A new rapid method for screening the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* for single nucleotide polymorphisms associated with clarithromycin resistance. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 126-131.
- 238) De Francesco V, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F et al. Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(2): 327-332.
- 239) Howlett M, Menheniott TR, Judd LM, Giraud AS. Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1793: 1623-1633.
- 240) Raymond J, Burucoa C, Pietrini O, Bergeret M et al. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from French children: Prevalance of the different

- mutations and coexistence of clones harboring two different mutations in the same biopsy. *Helicobacter* 2007; 12: 157-163.
- 241) Wang GE, Taylor DE. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(8): 1952-1958.
- 242) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameter Version 2.0, 2012-01-01.
- 243) Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. Fifth edition. Philadelphia, New York, Lippincott, 1992; 333-338.
- 244) Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 178-186.
- 245) Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002; 50: 285–289.
- 246) Simola-Grant JL, Taylor DE. Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS* 2004;112: 886-97.
- 247) Prokhorenko IA, Malakhov AD, Kozlova AA, Momynaliev K et al. Phenylethynylpyrene-labeled oligonucleotide probes for excimer fluorescence SNP analysis of 23S rRNA gene in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains. *Mutation Research* 2006; 599: 144-151.
- 248) Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, Jardim T et al. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). *Int J Mol Sci* 2008; 9: 1944-1960.
- 249) Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique. *Biotechniques* 2008; 45(4): 385-409.

- 250) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 1995; 59(1): 143-169.
- 251) Yılmaz Ö, Demiray E. The clinical role and importance of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in the eradication therapy of gastric patients. World J Gastroenterol 2007; 13(5): 671-675.
- 252) Guimaraes N, Azevedo NF, Figueiredo C, Keevil CW et al. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 3089-3094.
- 253) Stender H, Lund K, Petersen KH, Rasmussen OF et al. Fluorescence *in situ* hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous Mycobacterium species in smears of Mycobacterium cultures. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 2760-2765.
- 254) Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ et al. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Fluorescent *in situ* Hybridization with peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 4138-4141.
- 255) Gunasekara TS, Dorsch MR, Slade MB, Veal DA. Specific detection of *Pseudomonas* spp. In milk by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNA directed probes. J Appl Microbiol 2003; 94: 936-945.
- 256) Poppert S, Haas M, Yildiz T, Alter T et al. Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by Fluorescence *in situ* Hybridization. J Clin Microbiol 2008; 46(6): 2133-2136.
- 257) Poppert S, Essig A, Marre R, Wagner M et al. Detection and differentiation of Chlamydiae by Fluorescence *in situ* Hybridization. Appl Environ Microbiol 2002; 68(8): 4081-4089.

- 258) Vesey G, Ashbolt N, Fricker EJ, Deere D et al. The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labeling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Appl Microbiol 1998; 85: 429-440.
- 259) Dorsch MR, Veal DA. Oligonucleotide probes for specific detection of *Giardia lamblia* cysts by fluorescent *in situ* hybridization. J Appl Microbiol 2001; 90: 836-842.
- 260) Wellinghausen N, Nöckler K, Sigge A, Bartel M et al. Rapid detection of *Brucella* spp. in blood cultures by fluorescence *in situ in situ* hybridization. J Clin Microbiol 2006; 44(5): 1828-1830.
- 261) Caristo E, Parola A, Rapa A, Vivenza D et al. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from children' gastric antrum and fundus as assessed by fluorescent *in situ* hybridization and culture on four sector agar plates. Helicobacter 2008; 13: 557-563.
- 262) Drossman DA. Rome III: The new criteria. Chin J Dig Dis 2006; 7; 181-185.
- 263) Yu C, Li L, Chen W, Jiao Y et al. Levofloxacin susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in China: Comparison of E-test and disc diffusion method. Helicobacter 2011; 16: 119-123.
- 264) Mishra KK, Srivastava S, Garg A, Ayyagari A. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* clinical isolates: Comparative evaluation of disk method and E-test methods. Curr Microbiol 2006; 53: 329-334.
- 265) Demiray E. *Helicobacter pylori* ve klaritromisin direncinin paraffin bloklarda Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi ile belirlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006; 7-56.
- 266) Chung C, Olivares A, Torres E, Yılmaz O et al. Diversity of VacA intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world. J Clin Microbiol 2010; 48(3): 690-696.
- 267) Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG, Bruden DL et al. Evaluation of seaFAST, a rapid fluorescent *in situ* hybridization test, for detection of *Helicobacter pylori* and

- resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3494–3496.
- 268) Samarbaf-Zadeh AR, Tajbakhsh S, Moosavian SM, Sadeghi-Zadeh M et al. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. *Med Sci Monit* 2006; 12(10): CR426-430.
- 269) Vega AE, Alarcon T, Domingo D, Lopez-Brea M. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in frozen gastric biopsies from pediatric patients by a commercially available fluorescent *in situ* hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 421-423.
- 270) Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Souod N. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* quantification and detection of clarithromycin resistance in gastric tissue from patients with gastrointestinal disorders. *Research Microbiol* 2012; 163: 109-113.
- 271) Matsumura M, Hikiba Y, Ogura K, Togo G et al. Rapid detection of mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* that confers resistance to clarithromycin treatment to the bacterium. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 691-695.
- 272) Burucoa C, Garnier M, Silvain C, Fauchere JL. Quadruplex real-time PCR assay using allele-specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2320-2326.
- 273) Tankovic J, Chaumette-Planckaert MT, Deforges L, Launay N et al. Routine use of real-time PCR for detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance mutations. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 792-795.
- 274) 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.
- 275) Camorlinga-Ponce M, Romo C, Gonzalez-Valencia G, Munoz O et al. Topographical localisation of cagA positive and cagA negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an *in situ* hybridization study. *J Clin Pathol* 2004; 57: 822-828.

- 276) Lopes AIC, Palha A, Monteiro L, Oleastro M et al. *Helicobacter pylori* genotypes in children from a population at high gastric cancer risk: No association with gastroduodenal histopathology. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2113-2122.
- 277) Silva Rossi-Aguiar VP, Navarro-Rodriguez T, Mattar R, Siqueira de Melo Peres MP et al. Oral cavity is not a reservoir for *Helicobacter pylori* in infected patients with functional dyspepsia. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 255-259.

8. EKLER

8.1. Hastalık Bilgilendirme ve Rıza Formu

Değerli Hastamız,

Bu form, yapmayı planladığımız çalışmaya gönüllü olduğunuz için düzenlenmiş temel amacı sizi bilgilendirmek olan bir belgedir. Katılacağınız çalışmada mide mukozasına yerleşen *Helicobacter pylori* adındaki mikroorganizmanın tanısında kullanılan biyopsiye dayalı yöntemlerle biyopsiye dayalı olmayan yöntemlerin etkinliği araştırılacaktır. Sizin muayeneniz ve değerlendirilmeniz sonucunda doktorunuz tarafından endoskopi yapılması gerekli bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen bakterinin varlığı, endoskopi sırasında alınan biyopsi örneğinin test edilmesiyle sizde de araştırılacaktır. Endoskopi sırasında yapılacak bu testle midenizde bakterinin var olduğu saptanırsa midenizden 4 adet daha biyopsi alınacak ve bu biyopsiler de bakterinin araştırılması için ileri incelemelerde kullanılacaktır. Kullanılacak olan yöntemlerin hiçbiri sizin için herhangi bir risk taşımamaktadır. Ayrıca, sizden endoskopi sonrasında bir defalık alınacak kan ve dışkı örneklerinde *Helicobacter pylori*'nin laboratuvar tanısında kullanılan testler uygulanacaktır. Bu konuda elde edilen bilgiler sizin tedavinizin yönlendirilmesinde de kullanılacaktır.

Çalışmaya katılmayı reddetme hakkınız vardır. Gönüllü olarak bu çalışmada yer alan tüm hastaların kişisel bilgileri gizli tutulacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul ettiğinizde halde, herhangi bir nedenle devam etmek istemediğinizde çalışmadan çıkabilirsiniz. Ayrıca araştırmacılar tarafından da sizin rızanız olmadan çalışma dışı bırakılabilirsiniz. Bu çalışmanın giderleri sizden ya da kurumunuzdan talep edilmeyecektir. Eğer çalışmaya katılmayı kabul ediyorsanız ilgili bölümü imzalamanız gerekmektedir.

Saygılarımızla

Endoskopi sonrası eşzamanlı izlenecek işlemler:

Kan alınması, serum ayrılması.

Dışkı örneklerinin alınması

Test sonuçlarının bildirilmesi: Hastaların kontrol ve tedavi altında oldukları bölüme bildirilecektir.

Hastaların araştırmaya gönüllü olarak katıldıklarının beyanı: 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.

Gönüllünün adı soyad, imzası:

Açıklamaları yapan araştırmacının adı soyadı, imzası:

Hastanın	
Adı Soyadı:	Adres:
Yaş, cinsiyet:	Tel:
Dosya No:	Patoloji No:

Endoskopi bulguları:					
Antrum bx:	☐	☐	Antrum üreaz:	☐	☐
Corpus bx:	☐	☐	Corpus üreaz:	☐	☐

Kan örneği	☐
Dışkı örneği	☐

Dışlama kriterleri: Koagülopati, gebelik, laktasyon, malignensiler, gastrik cerrahi geçirenler, son 6 ay içinde *H. pylori* eradikasyon tedavisi alanlar, son 1 ay içinde antibiyotik, anti sekretuar ilaç, bizmut tuzları, sukralfat kullananlar.

8.2. Hasta Gözlem Formu

Hasta Gözlem Formu

Tarih :

Dosya No :

Hasta Adı :

Yaş/Cinsiyet :

Adres :

Tel :

Hasta çalışma kriterlerine uygun mu?

☐

Evet

☐

Hayır

Bilgilendirilmiş onay formu verildi mi?

☐

Evet

☐

Hayır

Endoskopik biyopsi alındı mı?

☐

Evet

☐

Hayır

Kan örneği alındı mı?

☐

Evet

☐

Hayır

Dışkı örneği alındı mı?

☐

Evet

☐

Hayır

İmprint yapıldı mı?

☐

Evet

☐

Hayır

Üre nefes testi yapıldı mı?

☐

Evet

☐

Hayır

Eradikasyon tedavisi başlandı mı?

☐

Evet

☐

Hayır

Endoskopi Bulguları:

Biyopsi : ☐ Korpus (2 adet) ☐ Antrum (2 adet)

Üreaz testi ☐ Korpus ☐ Antrum

Histopatoloji Bulguları:

HLO : ☐ Pozitif ☐ Negatif

HP skoru : ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

Histopatolojik görünüm:

Kan örneğinin incelenmesi:

Serum Ig G : ☐ Pozitif ☐ Negatif

Absorbans değeri:

Dışkı örneğinin incelenmesi:

Örnekler ne zaman toplandı :

Dışkı örneği -20°C'ye kaldırıldı mı : ☐ Evet ☐ Hayır

8.3. Etik Kurul Onayı



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

El : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74

Fax : 0 232 - 259 05 41

İnciraltı 35340-İzmir

Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 970

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

14 Temmuz 2006

Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 13 Temmuz 2006 tarih ve 179 sayılı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen; 166 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Doktorlarından Doç.Dr.Özlem YILMAZ'ın sorumlu olduğu "Dispeptik yakınmalı ve mide Kanseri hastalarda *Helicobacter pylori* varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değiştirilmesi" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik kurulu kararı ve sonuç ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Şebnem ÖZKAN
Dekan

Ek:1 Adet Etik kurul kararı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 13.07.2006/179

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Prof. Dr. Uğur MUNGAN
Prof. Dr. Hüseyin İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Prof. Dr. Özgül SAĞOL
Prof. Dr. Görsev YENER
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yrd. Doç. Dr. Cenk ERDAL
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 13 Temmuz 2006 tarih ve 08/15/06 no.lu toplantısında, 166 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Doktorlarından Doç. Dr. Özlem YILMAZ'ın sorumlu olduğu "Dispeptik yakınmalı ve mide Kanseri hastalarda Helicobacter pylori varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değiştirilmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



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

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 677

26.11.2012

Sayın Prof.Dr.Özlem YILMAZ

Kurulumuz tarafından 22.11.2012 tarih ve 166/2006 protokol numaralı 2012/38-10 karar numarası ile görüşülen “Dispeptik Yakınmalı ve Mide Kanserli Hastalarda *Helicobacter Pylori* Varlığı, Direnç ve Virulans Faktörlerinin Moleküler Yöntemler ile Değerlendirilmesi” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.



Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/38-09	Tarih: 22.11.2012
	Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın sorumlusu olduğu "Dispeptik yakınmalı ve mide Kanseri hastalarda Helicobacter pylori varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değiştirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait 15.11.2012 tarihli araştırıcı tarafından gönderilen yazıya ilişkin; Çalışma isminin "Dispeptik yakınmalı ve mide Kanseri hastalarda Helicobacter pylori varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değerlendirilmesi" olarak değiştirilmesinin etik açıdan uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Besti</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Doç.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>

8.4. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Araştırma Görevlisi EBRU DEMİRAY GÜRBÜZ

TC Kimlik No / Pasaport No:	46765448688
Doğum Yılı:	1982
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dekanlık Binası Kat 4 Inciraltı 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	0232 412 45 16
e-posta :	ebru.demiray@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Anadolu Üniversitesi	Açık Öğretim Fakültesi	İşletme	Lisans	2007
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2006
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2003

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıp Fakültesi	Araştırma Görevlisi	2012 -
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Görevlisi	2005-2012

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Sağlık Bilimleri

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
<i>Helicobacter pylori</i> ve klaritromisin direncinin parafin bloklarda floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle belirlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	24113	13.06.2005-13.06.2007	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Dispeptik yakınmalı ve mide kanserli hastalarda <i>Helicobacter pylori</i> varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değerlendirilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	63000	04.04.2007-31.12.2012	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
<i>Helicobacter pylori</i> CagA EPIYA Motiflerinin Klaritromisin Direnci, Gastropatolojik ve Klinik İlişkisinin Araştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	7000	11.10.2009-11.10.2011	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
<i>Helicobacter pylori</i> tanısında kullanılan Hızlı Üreaz testinin pozitifleşme süresinin araştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	01.01.2009-01.01.2010	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Çocuklarda <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunda klaritromisine karşı primer antibiyotik direncinin moleküler yöntemler ile belirlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	20000	03.08.2010-03.08.2011	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu tanısında idrar antikor testleri ile invaziv metodların karşılaştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	06.09.2005-06.09.2008	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
<i>Helicobacter pylori</i> eradikasyon kontrolünde idrarda <i>Helicobacter pylori</i> antikorunun etkinliği	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	04.10.2005-04.10.2007	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
<i>Helicobacter pylori</i> eradikasyonunda etkili uçucu yağların ve veya klaritromisinin kitosan bazlı mikrokürelerden kontrollü salınımı	Dokuz Eylül Üniversitesi	24955	01.08.2009-01.08.2010	Diğer	Ulusal

<i>Helicobacter pylori</i> eradikasyonunda ilk sıra tedavi olarak levofloksasin içeren üçlü tedavi protokolünün etkinliği	Dokuz Eylül Üniversitesi	12000	30.01.2009-30.03.2011	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Plasma levels of pepsinogen I (P-PGI), pepsinogen II (P-PGII), gastrin-17 (P-G-17), and H. pylori IgA IgG-antibodies (P-HpAb) An ELISA test panel intended for diagnosis of <i>H.pylori</i> infection and atrophic gastritis and related risks as well as for the risk of assessment of the risk of the complications of gastroesophageal reflux disease	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	01.01.2008-01.01.2011	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Birinci Basamak Sağlık Hizmeti Veren Hekimlerin ve DEÜ Tıp Fakültesi Dönem 6 Öğrencilerinin Dispepsi Yakınması ile Gelen Hastaya ve <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonuna Yaklaşımı	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	01.01.2006-01.01.2007	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Gastrik biyopsi ve Dışkı Örneklerinden İzole Edilen <i>Helicobacter pylori</i> Genomik DNA'sında Klaritromisin ve Levofloksasin Duyarlılığının Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	30000	16.02.2012-16.02.2014	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Farklı gastrointestinal yakınmalar ile başvuran çölyak ön tanılı çocuk hastalarda <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunun görülme sıklığı ve demir eksikliği anemisi ile ilişkilendirilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	16.02.2012-16.06.2012	Araştırmacı/ Uzman	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			54
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)		Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Üyelik Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Araştırma Bursu Kazanma 01.03.2008-30.05.2008 Victor Segalen Bordeaux 2 University, National Reference Laboratory of Campylobacter and Helicobacter, Bordeaux, Fransa’da “Dispeptik ve Gastrik Kanserli Hastalarda <i>Helicobacter pylori</i> Direnç ve Virulans Faktörlerinin Moleküler Metodlarla değerlendirilmesi” konusunun yanı sıra <i>Campylobacter</i> ve <i>Helicobacter</i> konusunda eğitim (Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Araştırma Bursu)	

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Yayın Teşvik Ödülü	TÜBİTAK Ulusal Akademik Ağ ve Bilgi Merkezi (ULAKBİM)	2013
Proje İkincilik Ödülü	Kimyevi Maddeler ve Mamülleri Sektörü 2. AR-GE PROJE PAZARI (Uluslararası katılımı) Proje Adı: <i>Helicobacter pylori</i>’nin eradikasyonuna yönelik biyobozunur polimer bazlı kontrollü salım yapabilen mikrokürelerin geliştirilmesi” isimli proje ile Duygu Altıok, Funda Tıhminlioğlu, Ebru Demiray Gürbüz, Neslihan Bekmen, Özlem Yılmaz	2012

Yayın Teşvik Ödülü	TÜBİTAK Ulusal Akademik Ağ ve Bilgi Merkezi (ULAKBİM)	2007
Yüksek Lisans Mezuniyet Üçüncülük Ödülü	Dokuz Eylül Üniversitesi	2006

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

DEMİRAY E, YILMAZ Ö. <i>Helicobacter pylori</i> 'de antibiyotik direnci ve direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler. Mikrobiyol Bült 2005;39:399-409.
DEMİRAY E, YILMAZ Ö, ŞARKIŞ C, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ. Comparison of invasive methods and two different stool antigen tests for diagnosis of <i>Helicobacter pylori</i> infection in patients with gastric bleeding. World J Gastroenterol 2006;12(26):4206-10.
YILMAZ Ö, DEMİRAY E. The clinical role and importance of fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) method for the diagnosis of <i>Helicobacter pylori</i> infection and determination of clarithromycin resistance in the eradication therapy of gastric patients. World J Gastroenterol 2007;13(5):671-675.
YILMAZ Ö, DEMİRAY E, TÜMER S, ALTUNGÖZ O, YÖRÜKOĞLU K, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ. Detection of <i>Helicobacter pylori</i> and determination of clarithromycin susceptibility using formalin-fixed parafin-embedded gastric biopsy specimens by Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization. Helicobacter 2007;12(2):136-141.
DEMİRAY E, BEKMEN N. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu ve fagositoz. Mikrobiyol Bült 2008;42:177-184.
DEMİRAY GÜRBÜZ E, GÖNEN C, BEKMEN N, DÖLEK D, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. The diagnostic accuracy of urine IgG antibody tests for the detection of <i>Helicobacter pylori</i> infection in Turkish dyspeptic patients. Turk J Gastroenterol 2012;6: -
ERDUR B, ÖZTÜRK Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö. Comparison of Sequential and Standard Therapy for <i>Helicobacter pylori</i> Eradication in Children and Investigation of Clarithromycin Resistance. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012; 55(5):530-533.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

DEMİRAY E, YILMAZ Ö. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2007;37(2):112-117.
DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin yaşama stratejisi. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2011;41(2):49-56. (2012 yılında basılmıştır)

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

ERDUR B, ÖZTÜRK Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö. Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi <i>Helicobacter pylori</i> 'nin saptanmasında ve klaritromisin duyarlılığının gösterilmesinde kültüre alternatif olabilir mi? Olgu Sunumu. 9. Ulusal Çocuk Gastroenteroloji Hepatoloji ve Beslenme Kongresi:83/PS-034, 18-21 Ekim 2012, The Marmara Oteli, Antalya
ERDUR B, ÖZTÜRK Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö. Çocuklarda <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu eradikasyonunda standart ve ardışık tedavinin etkinliğinin karşılaştırılması ve primer klaritromisin direncinin araştırılması. 9. Ulusal Çocuk Gastroenteroloji Hepatoloji ve Beslenme

Kongresi:53/SS-11, 18-21 Ekim 2012, The Marmara Otel, Antalya
ÖZKAN H, TIRAŞ HI, KARA E, METERİS A, BAŞERDEM O, BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, DOĞAN Y, ELLİDOKUZ H, ÖZTÜRK Y, YILMAZ Ö. Çocukluk çağında anemiye neden olabilen çölyak hastalığı ve <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu arasında ilişki var mı? 9. Ulusal Çocuk Gastroenteroloji Hepatoloji ve Beslenme Kongresi:184/PS-205, 18-21 Ekim 2012, The Marmara Otel, Antalya
SARIOĞLU S, ADALI Y, AKPINAR H, DEMİRAY GÜRBÜZ E, MERYEM G, SAĞOL Ö, NESLIHAN B, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Gastrik biyopsilerde APCA pozitifliği ve mide biyopsi bulguları. 22. Ulusal Patoloji Kongresi: 7-11 Kasım 2012, Manavgat, Antalya
BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, TÜKEL S, YILMAZ Ö. Gastrik biyopsi örneklerinde <i>Helicobacter pylori</i> 'nin direkt imprint preparat incelenmesinde modifiye gliserin-jelatin preparat kaplama tekniği. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 410/P408, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.
DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, ERCİ T, DOĞAN Y, YILMAZ Ö. <i>Helicobacter pylori</i> dışkı antijen test sonuçlarının değerlendirilmesi. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 410/P407, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.
ÖZKAN H, TIRAŞ HI, KARA E, METERİS A, BAŞERDEM O, BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, DOĞAN Y, ELLİDOKUZ H, ÖZTÜRK Y, YILMAZ Ö. Çocukluk çağında anemiye neden olabilen çölyak hastalığı ve <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu arasında ilişki var mı? XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 410/P406, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.
SARIOĞLU S, EKMEKÇİ S, DEMİRAY GÜRBÜZ E, GÜVENİR M, YILMAZ Ö, OLİVARES A, GÖNEN C, SOYTÜRK M, ELLİDOKUZ H, PEREZ-PEREZ GI. <i>Helicobacter pylori</i> boyunun gastrit ile ilişkisi. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 407/P401, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.
DOĞAN Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, ÇELEBİ D, BECERİKLİ T, YILMAZ Ö, BAHAR İH. Çölyak hastalığı tanısında serolojik testlerin etkinliğinin değerlendirilmesi. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 401/P387, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.
DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö, OLİVARES A, GÖNEN C, SARIOĞLU S, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, PEREZ-PEREZ GI. Dispeptik yakınmalı hastalarda klaritromisin dirençli <i>Helicobacter pylori</i> suşlarının Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) yöntemi ile değerlendirilmesi. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 263/P091, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.
BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, GÖKÇEKUYU BM, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen <i>Helicobacter pylori</i> suşlarının klaritromisin ve levofloksasine karşı antimikrobiyal duyarlılığının değerlendirilmesi. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 260/P087, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.
ÖZKAN H, TIRAŞ HI, KARA E, METERİS A, BAŞERDEM O, BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, DOĞAN Y, ELLİDOKUZ H, ÖZTÜRK Y, YILMAZ Ö. Çocukluk çağında anemiye neden olabilen çölyak hastalığı ve <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu arasında ilişki var mı? VI. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, 37/P-AR9, 28 Eylül 2012, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir
ERDUR B, OZTURK Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö. Comparasion of sequential and classical therapies for <i>Helicobacter pylori</i> eradication in children and investigation of clarithromycin resistance. The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Update 2012. April 27-28, 2012, Stockholm, Sweden, 1416.
PEREZ PEREZ GI, DEMİRAY-GÜRBÜZ E, OLİVARES A, YILMAZ O, GÖNEN C, SARIOĞLU

S, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ İ, UĞUR KANTAR F, Evaluation of <i>Helicobacter pylori</i> infection and clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization (FISH) in Turkish dyspeptic patients, International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms. Vancouver, Canada, 28.Aug. -01.Sep.2011
DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, DOĞAN Y, GÖNEN C, ŞİMŞEK İ. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu tanısı ve klaritromisin direncinin saptanmasında iki farklı real-time PCR yönteminin karşılaştırılması. Gülhane Mikrobiyobioloji Günleri 2010 272/ P-72, 20-22 Nisan 2010, Askeri Müze, İstanbul.
DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö, SOYTÜRK M, SARIOĞLU S, DOĞAN Y, GÖNEN C, ŞİMŞEK İ. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve Real-time PCR yöntemleri ile <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu tanısı ve primer klaritromisin direncinin değerlendirilmesi. Gülhane Mikrobiyobioloji Günleri 2010 270-271/ P-71, 20-22 Nisan 2010, Askeri Müze, İstanbul.
DEMİRAY GÜRBÜZ E, SOYTÜRK M, YILMAZ Ö, BEKMEN N, GÜVENİR M, ELLİDOKUZ H, DÖLEK D, ŞİMŞEK İ. The importance of stool antigen test for the diagnosis of <i>Helicobacter pylori</i> infection and eradication follow-up. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. May 16-19,2009, Helsinki, Finland, P1166.
AKYUZ IE, DEMİRAY E, BEKMEN N, ELLİDOKUZ H, OZBEK A, YILMAZ Ö. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde <i>H. pylori</i> IgG Seropozitifliğinin Saptanması. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 478/ P258, 12-16 Eylül 2006, Antalya
DEMİRAY E, TÜMER S, YILMAZ Ö, ALTUNGÖZ O, YÖRÜKOĞLU K, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ. <i>Helicobacter pylori</i> ve klaritromisin direncinin Floresan in situ hibridizasyon metodu (FISH) ile saptanması. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: 412/ P62, 12-16 Eylül 2006, Antalya.
YILMAZ Ö, DEMİRAY E. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu tanısında indirek floresan antikor testinin değerlendirilmesi. KLİMİK 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi:261/ P04-17, 16-20 Kasım 2005, Antalya.
DEMİRAY E, YILMAZ Ö, ŞARKIŞ C, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu tanısında iki farklı dışkı antijen testinin invaziv yöntemlerle karşılaştırılması. KLİMİK 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi:260/ P04-16, 16-20 Kasım 2005, Antalya.
DEMİRAY E, YILMAZ Ö, ŞARKIŞ C, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ. Comparison of invasive methods and two different stool antigen tests for diagnosis of <i>Helicobacter pylori</i> infection in patients with gastric bleeding. Bridging Meeting 2005 and EAGE Postgraduate course November 24th-26th Magdeburg, Germany.

Diğer Yayınlar

DOĞAN Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö, BAHAR İH. Çölyak Hastalığı Serolojik Tanı Testleri. Çölyak Hastalığı ile Yaşam El kitapçığı. Sy:14-18. Avrupa Bilim ve Eğlence Günü Full Science 28 Eylül 2012, Uluslararası İzmir Fuarı
BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, GÖKÇEKUYU BM, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Antimicrobial susceptibility of <i>Helicobacter pylori</i> strains isolated from gastric biopsies to clarithromycin and levofloxacin currently used in our hospital. European <i>Helicobacter</i> Study Group (EHSG) XXVth International Workshop on <i>Helicobacter</i> and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15,2012, Ljubljana, Slovenia, P4.38. <i>Helicobacter</i> 2012;17 (Suppl. 1):107-108.

DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö, OLÍVARES A, GÖNEN C, SARIOĞLU S, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK I, PEREZ-PEREZ GI. Assessment of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* strains in Turkish dyspeptic patients. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15,2012, Ljubljana, Slovenia, P4.37. Helicobacter 2012;17 (Suppl. 1):107.

ERDUR B, OZTURK Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö. Is FISH alternative to culture to detect *H. pylori* and clarithromycin susceptibility in a pediatric patient? European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15,2012, Ljubljana, Slovenia, P2.43. Helicobacter 2012;17 (Suppl. 1):95.

ÖZKAN H, TIRAŞ HI, KARA E, METERİS A, BAŞERDEM O, BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, DOĞAN Y, ELLİDOKUZ H, ÖZTÜRK Y, YILMAZ Ö. Is there any relationship between *Helicobacter pylori* infection and celiac disease which causes iron deficiency anemia in childhood? European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15,2012, Ljubljana, Slovenia, P2.30. Helicobacter 2012;17 (Suppl. 1):92.

DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, ERCİ T, DOĞAN Y, YILMAZ Ö. Evaluation of *Helicobacter pylori* stool antigen test results required from different outpatient clinics at university hospital. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15,2012, Ljubljana, Slovenia, P2.09. Helicobacter 2012;17 (Suppl. 1):87.

DEMİRAY GÜRBÜZ E, PEREZ-PEREZ G, OLÍVARES A, SOYTÜRK M, SARIOĞLU S, ŞİMŞEK I, YILMAZ Ö. Prevalance of alleles in *Helicobacter pylori* strains isolated in Turkey. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15,2012, Ljubljana, Slovenia, P1.28. Helicobacter 2012;17 (Suppl. 1):85.

ERDUR B, OZTURK Y, YILMAZ Ö, DEMİRAY GÜRBÜZ E. Comparasion of sequential and classical therapies for *Helicobacter pylori* eradication in children and investigation of clarithromycin resistance. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXIVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 11-13,2011, Dublin, Irland, P07.20. Helicobacter 2011;16:121.

SEN N, DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ Ö, KÜPELİOĞLU A, ŞİMŞEK I. Comparing the accuracy of stool antigen tests for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Turkish dyspeptic patients. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXIVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 11-13,2011, Dublin, Irland, P06.13. Helicobacter 2011;16:114.

DEMİRAY GÜRBÜZ E, PEREZ PEREZ G, OLÍVARES A, YILMAZ O, GONEN C, SARIOĞLU S, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK I, UĞUR KANTAR F. Simultaneous detection of *Helicobacter pylori* infection and clarithromycin resistance by fluorecence in situ hybridization (FISH) in Turkish dyspeptic patients. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXIVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 11-13,2011, Dublin, Irland, P06.04. Helicobacter 2011;16:112.

DEMİRAY GÜRBÜZ E, YILMAZ O, GONEN C, SARIOĞLU S, UĞUR KANTAR F, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK I. Evaluation of fluorecence in situ hybridization (FISH) and real-time PCR for molecular determination of clarithromycin resistance and detection of *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXIVth International Workshop on

Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 11-13,2011, Dublin, Irland, P06.03. Helicobacter 2011;16:11
ALTIOK D, DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, YILMAZ Ö, TIHMINLIOĞLU F. Genipin crosslinked clarithromycin loaded chitosan microspheres for eradication of Helicobacter pylori. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXIVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 11-13,2011, Dublin, Irland, P10.06. Helicobacter 2011;16:132.
DOGAN Y, DAVOUDİ OSKOEİ D, BİNİCİER Ö, DEMİRAY GÜRBÜZ E, SOYTÜRK M, ELLİDOKUZ H, AKPINAR H, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Is antibiotic supplemented culture medium inhibits recovery of H. pylori from gastric biopsy specimens? European helicobacter study group (EHSG) XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P4.13. Helicobacter 2010;15:362.
ALTIOK D, BEKMEN N, DEMİRAY GÜRBÜZ E, TIHMINLIOĞLU F, YILMAZ Ö. Antimikrobial activity of essential oils against H. pylori. European helicobacter study group (EHSG) XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P1.11. Helicobacter 2010;15:335-336.
ALTIOK D, DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, TIHMINLIOĞLU F, YILMAZ Ö. A natural antioxidant: Trans-resveratrol against H. pylori. European helicobacter study group (EHSG) XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P1.08. Helicobacter 2010;15:334-335.
YILMAZ Ö, GÜVENİR M, DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, AKPINAR H, ŞİMŞEK İ. Immunity marker of Helicobacter pylori in adult patients with dyspepsia: Autoantibodies against parietal cells (PCA). European helicobacter study group (EHSG) XXIIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal, P01.11. Helicobacter 2009;14:341.
YILMAZ Ö, DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, OSKOEİ DD, TÜMER S, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, AKPINAR H, ŞİMŞEK İ. Helicobacter pylori detection and susceptibility testing: histopathology through culture to FISH. European helicobacter study group (EHSG) XXIIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal, P101.19. Helicobacter 2009;14:344.
TÜRKOĞLU E, KESİCİ S, MEŞEN A, YENER E, DEMİRAY GÜRBÜZ E, GÜVENİR M, BEKMEN N, NAMLI Ş, SAĞOL Ö, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. The importance of the positivity duration for rapid urease test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection at Endoscopy Unit. European helicobacter study group (EHSG) XXIIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal, P01.21. Helicobacter 2009;14:345
DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, GÜVENİR M, OSKOEİ DD, YILMAZ Ö. The effect of 50 Hz electromagnetic field (EMF) on Helicobacter pylori. European helicobacter study group (EHSG) XXIIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal P08.09. Helicobacter 2009;14:390-91.
DÖLEK D, SOYTÜRK M, BEKMEN N, GÖNEN C, YILMAZ Ö, SARIOĞLU S, DEMİRAY E, ELLİDOKUZ H, ŞİMSEK İ. Urine-based ELISA testing for the diagnosis and confirmation of eradication of Helicobacter pylori infection. European helicobacter study group (EHSG) XXIst

International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P105. Helicobacter 2008; 10:452.
PEREZ PEREZ GI, YILMAZ Ö, OLÍVARES A, TUMER S, DEMİRAY E, SAĞOL Ö, GÖNEN C, SOYTÜRK M, SİMSEK I. Detection of H. pylori and clarithromycin susceptibility by FISH and traditional methods. European helicobacter study group (EHSG) XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, W7.7. Helicobacter 2008;
OSKOEİ DD, BEKMEN N, DEMİRAY E, SOYTÜRK M, SARİOĞLU S, YILMAZ Ö. Comparison of different blood supplements in culture media for isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens. European helicobacter study group (EHSG) XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P117. Helicobacter 2008; 10:456
YILMAZ Ö, DEMİRAY E, SOYTÜRK M, PEREZ PEREZ GI, SAĞOL Ö, BEKMEN N, SİMSEK I, AKPINAR H. The effect of H. pylori eradication on serum pepsinogen I and II levels, gastrin-17 and Helicobacter pylori antibodies in patients with dyspepsia. European helicobacter study group (EHSG) XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P110. Helicobacter 2008; 10:453
YILMAZ Ö, DEMİRAY E, SOYTÜRK M, PEREZ PEREZ GI, SAĞOL Ö, BEKMEN N, SİMSEK I, AKPINAR H. Evaluation of serum pepsinogen I and II levels, gastrin-17 and Helicobacter pylori antibodies in patients with dyspepsia. European helicobacter study group (EHSG) XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P112. Helicobacter 2008; 10:454
BEKMEN N, DEMİRAY E, GÖNEN C, DÖLEK D, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, GÜVENİR M, SİMSEK I, YILMAZ Ö. Determination of Helicobacter pylori antigenic frequency by Western blot technique in adult patients with dyspepsia. European helicobacter study group (EHSG) XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P106. Helicobacter 2008; 10:452
DEMİRAY E, YILMAZ Ö, SOYTURK M, BEKMEN N, GÖNEN C, GÜVENİR M, SAĞOL Ö, DOLEK D, SİMSEK I. A perspective for the detection of Helicobacter pylori infection by four noninvasive tests. European helicobacter study group (EHSG) XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P102. Helicobacter 2008; 10:450.
DOLEK D, SOYTURK M, BEKMEN N, YILMAZ Ö, DEMİRAY E, SARİOĞLU S, ELLİDOKUZ H, SİMSEK I. Urine-based ELISA testing for the diagnosis and confirmation of eradication of Helicobacter pylori infection. European helicobacter study group (EHSG) XXth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation. September 20-22, 2007, İstanbul, Turkey, P108. Helicobacter 2007;12:444.
BEKMEN N, DEMİRAY E, DÖLEK D, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, YILMAZ Ö. Importance of anti-Helicobacter pylori CagA IgG for Helicobacter pylori infection in 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, P107. Helicobacter 2007;12:444.
DEMİRAY E, GÖNEN C, BEKMEN N, DÖLEK D, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, YILMAZ Ö, ŞİMŞEK İ. 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

YILDIZ B, İZMİRLİ M, ÖZDEMİR E, AKKAYA N, ALAGÖZ S, DEMİRAY E, BEKMEN N, DAVOUDİ D, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, YILMAZ Ö. A questionnaire survey to test and treat strategy of *Helicobacter pylori* infection by the second year medical school students. European helicobacter study group (EHSg) XXth International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation. September 20-22, 2007, İstanbul, Turkey, P115. *Helicobacter* 2007;12:447.

DEMİRAY E, TÜMER S, PEREZ PEREZ Gİ, OLİVARES AZ, SAĞOL Ö, ALTUNGÖZ O, SOYTÜRK M, YILMAZ Ö. A new approach in the determination of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* infection. European helicobacter study group (EHSg) XXth International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation. September 20-22, 2007, İstanbul, Turkey, W4.05. *Helicobacter* 2007;12:389.

PEREZ PEREZ Gİ, OLİVARES AZ, DEMİRAY E, YILMAZ Ö, BEKMEN N, SOYTURK M, SARIÖGLU S. Isolation and characterization of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients of Izmir, Turkey. European helicobacter study group (EHSg) XXth International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation. September 20-22, 2007, İstanbul, Turkey, W5.07. *Helicobacter* 2007;12:393.

AKYUZ İE, DEMİRAY E, BEKMEN N, ELLİDOKUZ H, OZBEK A, YILMAZ Ö. *Helicobacter pylori* IgG Antibody Positivity at Dokuz Eylül University Hospital, Turkey. European helicobacter study group XIX International Workshop September 7-9, 2006, Wrocław, Poland, 04.09. *Helicobacter* 2006;11:34

YILMAZ Ö, DEMİRAY E, GÖNEN C, DÖLEK D, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, BEKMEN N, AKYÜZ İE, ŞİMŞEK İ. Detection of *Helicobacter pylori* infection by invasive methods and two different urine antibody tests in Turkish dyspeptic patients. European helicobacter study group XIX International Workshop September 7-9, 2006, Wrocław, Poland, 10.14. *Helicobacter* 2006;11:384

DEMİRAY E, TÜMER S, YILMAZ Ö, ALTUNGÖZ O, YÖRÜKOĞLU K, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ. Detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization (FISH) method in Turkish dyspeptic patients. European helicobacter study group XIX International Workshop September 7-9, 2006, Wrocław, Poland, 13.10. *Helicobacter* 2006;11:399