

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GASTRİK BİYOPSİ VE DİŞİ
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
HELICOBACTER PYLORI GENOMİK
DNA'SINDA KLARİTROMİSİN
VE LEVOFLOKSASİN DUYARLILIĞININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE
BELİRLENMESİ**

TUBA BECERİKLİ

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
İZMİR-2015**

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970078

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GASTRİK BİYOPSİ VE DİŞİ
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
HELICOBACTER PYLORI GENOMİK
DNA'SINDA KLARİTROMİSİN VE
LEVOFLOKSASİN DUYARLILIĞININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE
BELİRLENMESİ**

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TUBA BECERİKLİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Özlem YILMAZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2012.KB.SAG.071 sayı ile desteklenmiştir)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-201097007

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Tuba BECERİKLİ ‘GASTRİK BİYOPSİ VE DIŞKI
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *HELICOBACTER PYLORI* GENOMİK
DNA’SINDA KLARİTROMİSİN VE LEVOFLOKSASİN DUYARLILIĞININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ’ konulu Yüksek Lisans tezini
14.05.2015 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Özlem YILMAZ
BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY
ÜYE

Şifa Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Hale AKPINAR
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Müjde SOYTÜRK
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Aydan ÖZKÜTÜK
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Cem ERGON
YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Şöhret AYDEMİR
YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR.....	xi
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Tarihçe	7
2.2. <i>Helicobacter</i> Ailesi	10
2.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Yapısı ve Özellikleri	10
2.3.1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Yapısı.....	10
2.3.1.1. Flajellanın Yapısı.....	11
2.3.1.2. Hücre Duvar Yapısı.....	13
2.3.1.3. Genom Yapısı.....	14
2.3.2. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Epidemiyolojisi.....	15
2.3.3. Prevalans.....	16
2.3.4. Enfeksiyonun Kaynağı.....	17
2.3.5. <i>Helicobacter pylori</i> ilişkili Hastalıklar	17
2.4. <i>Helicobacter pylori</i> Virulans Faktörleri.....	18
2.4.1. Asidik Ortamda Yaşama-Üreaz Enzimi.....	18
2.4.2. Kolonizasyon ve Tutunma.....	19
2.4.2.1. Adezyon Molekülleri.....	20
2.4.3. Sitotoksin ilişkili gen A (CagA).....	22
2.4.4. Vakuol oluşturan sitotoksin A (VacA).....	23
2.5. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Tanısı.....	27
2.5.1. İnvaziv Testler.....	27
2.5.1.1. Kültür.....	27
2.5.1.2. Histopatolojik Tanı.....	30
2.5.1.3. Üreaz Testleri.....	31

2.5.1.4. Moleküler Yöntemler.....	31
2.5.1.4.1. <i>H. pylori</i> saptanması için kullanılan standart PCR yöntemi.....	32
2.5.1.4.2. Real-Time PCR.....	33
2.5.1.4.3. Genotype HelicoDR.....	33
2.5.2. Non-İnvaziv Testler.....	36
2.5.2.1. Üre Nefes Testi (UBT).....	36
2.5.2.2. Dışkı Testleri.....	37
2.5.2.2.1. Dışkı Kültürü.....	37
2.5.2.2.2. Dışkı PCR.....	37
2.5.2.2.3. Dışkı Real Time PCR.....	38
2.5.2.2.4. Dışkı Genotiplendirme.....	38
2.5.2.2.5. Dışkı Antijen Testleri.....	38
2.6. Tedavi.....	39
2.6.1. <i>H. pylori</i> Eradikasyonunda Kullanılan Ajanlar ve Etki Mekanizmaları.....	40
2.6.1.1. Amoksisilin Etki Mekanizması.....	41
2.6.1.2. Makrolid Etki Mekanizması.....	42
2.6.1.3. Florokinolon Etki Mekanizması.....	45
2.6.1.4. Tetrasiklin Etki Mekanizması.....	50
2.6.1.5. Metronidazol Etki Mekanizması.....	50
2.6.1.6. Rifabutin Etki Mekanizması.....	52
2.6.2. Antimikrobiyal Direnç.....	52
2.6.2.1. Amoksisilin Direnç Mekanizması.....	54
2.6.2.2. Makrolid Direnç Mekanizması.....	56
2.6.2.3. Florokinolon Direnç Mekanizması.....	59
2.6.2.4. Tetrasiklin Direnç Mekanizması.....	63
2.6.2.5. Metronidazol Direnç Mekanizması.....	65
2.6.2.6. Rifabutin Direnç Mekanizması.....	66
2.7. Antimikrobiyal Duyarlılığın Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	66
2.7.1. Fenotipik Yöntemler.....	67
2.7.1.1. Agar Dilüsyon.....	67
2.7.1.2. Broth Dilüsyon.....	67
2.7.1.3. Disk Difüzyon.....	67

2.7.1.4. Gradyent Difüzyon (E-test).....	67
2.7.1.5. “Breakpoint” Duyarlılık Testi.....	68
2.7.2. Genotipik Yöntemler.....	68
2.7.2.1. PCR- Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP).....	68
2.7.2.2. Floresan Rezonans Enerji Transfer (FRET)-Real-Time PCR.....	69
2.7.2.3. Diğer PCR Temelli Yöntemler.....	69
2.7.2.4. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi.....	70
2.7.2.5. Genotype HelicoDR.....	71
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	74
3.1. Araştırmanın Tipi.....	74
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	74
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme.....	74
3.4. Çalışma Materyali.....	74
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	75
3.6. Veri Toplama Araçları.....	76
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri.....	76
3.6.2. Hızlı Üreaz Testi (HUT)	80
3.6.3. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi.....	80
3.6.4. Hastaların <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu yönünden Değerlendirilmesi.....	81
3.6.5. Biyopsi Örneklerinin Mikrobiyolojik İncelenmesi.....	81
3.6.5.1. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	81
3.6.5.2. <i>Helicobacter pylori</i> Kültür Protokolü.....	84
3.6.5.3. Biyokimyasal Testler.....	85
3.6.6. Kültür Temelli Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	86
3.6.6.1. Gradyent Difüzyon Testi (E-test).....	86
3.6.6.2. Disk Difüzyon Testi.....	86
3.6.7. Uygulanan Moleküler Testler.....	87
3.6.7.1. DNA Ekstraksiyonları.....	87
3.6.7.2. DNA Örneklerinin Ölçümü.....	92
3.6.7.3. GenoType HelicoDR Testi.....	93
3.6.7.3.1. GenoType HelicoDR Amplifikasyon Basamağı.....	94

3.6.7.3.1.1. GenoType HelicoDR Multipleks PCR Karışımı Hazırlanması	94
3.6.7.3.2. GenoType HelicoDR Hibridizasyon Basamağı	97
3.6.7.3.3. GenoType HelicoDR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	99
3.6.7.4. FRET- real-time PCR	104
3.6.7.5. Konvansiyonel PCR Protokolleri	108
3.6.7.5.1. PCR Karışımının Hazırlanışı	108
3.6.7.5.2. Konvansiyonel PCR Karışımları ve PCR Döngüleri	110
3.6.7.5.3. Agaroz Jel Elektforezi	113
3.6.7.6. Pürifikasyon Protokolü	114
3.6.7.7. Sekans Analizi	115
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	116
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	116
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	117
3.10. Etik Kurul Onayı	117
4. BULGULAR	118
4.1. Demografik Bulgular	118
4.2. Hızlı Üreaz Testi (HUT) Bulguları	118
4.3. Histopatoloji Bulguları	119
4.4. <i>Helicobacter pylori</i> Kültür Bulguları	119
4.5. Hastalarda <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi	120
4.6. Gradient Difüzyon (E-test) Bulguları	120
4.6.1. Klaritromisin E-test Bulguları	120
4.6.2. Levofloksasin E-test Bulguları	121
4.7. HPU PCR Bulguları	122
4.8. GenoType® HelicoDR Bulguları	122
4.8.1. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örnekleri	123
4.8.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> Pozitifliği	123
4.8.1.2. <i>Helicobacter pylori</i> Klaritromisin Duyarlılığı	123
4.8.1.3. <i>Helicobacter pylori</i> Levofloksasin Duyarlılığı	124
4.8.2. Antrum ve Korpustan İzole Edilen <i>Helicobacter pylori</i> Suşları	125
4.8.2.1. <i>Helicobacter pylori</i> Pozitifliği	125

4.8.2.2. <i>Helicobacter pylori</i> Klaritromisin Duyarlılığı.....	125
4.8.2.3. <i>Helicobacter pylori</i> Levofloksasin Duyarlılığı.....	127
4.8.3. Dışkı Örnekleri.....	128
4.8.3.1. <i>Helicobacter pylori</i> Pozitifliği.....	132
4.8.3.2. <i>Helicobacter pylori</i> Klaritromisin Duyarlılığı.....	132
4.8.3.3. <i>Helicobacter pylori</i> Levofloksasin Duyarlılığı.....	132
4.9. FRET-real-time PCR Bulguları.....	133
4.9.1. Biyopsi Örnekleri.....	133
4.9.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> Pozitifliği.....	133
4.9.1.2. Klaritromisin Duyarlılığı.....	133
4.9.2. Dışkı Örnekleri.....	136
4.9.2.1. <i>Helicobacter pylori</i> Pozitifliği.....	136
4.9.2.2. Klaritromisin Duyarlılığı.....	136
4.10. 23S rRNA (<i>rrl</i>) ve <i>gyrA</i> PCR Bulguları.....	137
4.10.1. 23S rRNA (<i>rrl</i>) PCR.....	137
4.10.2. <i>gyrA</i> PCR.....	138
4.11. Yöntem Karşılaştırmaları.....	139
4.11.1. Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması.....	139
4.11.1.1. Gastrik biyopsi örnekleri.....	139
4.11.1.2. Dışkı örnekleri.....	140
4.11.2. İnvaziv ve Non-invaziv Moleküler Yöntemlerin Bulguları.....	141
4.11.3. Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerin Karşılaştırılması.....	143
4.12. Sekans Analizi Sonuçları.....	144
4.12.1. 23S rRNA (<i>rrl</i>).....	144
4.12.2. <i>gyrA</i>	149
5. TARTIŞMA	152
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	163
7. KAYNAKLAR	164
8. EKLER.....	184
8.1. Etik Kurul Onayı.....	184
8.2. Özgeçmiş.....	187

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. <i>H. pylori</i> 'de antimikrobiyal direnç ile ilişkili genler.....	54
Tablo 2. <i>rrl</i> geni ve <i>gyrA</i> genindeki mutasyonları saptamak için Genotype HelicoDR testinde kullanılan DNA sribine hibridize olan problemler.....	72
Tablo 3. <i>gyrA</i> genindeki mutasyonlar ve ilgili wild type ve mutasyon problemleri.....	101
Tablo 4. 23SrRNA genindeki mutasyonlar ve ilgili wild type ve mutasyon problemleri..	102
Tablo 5. FRET-real-time PCR yönteminde uygulanan LightCycler 1.5 programı.....	107
Tablo 6. <i>H. pylori</i> enfeksiyonu pozitif ve negatif hastaların demografik verileri.....	118
Tablo 7. Mutant allel içeren 41 antrum ve/veya doku DNA örneklerindeki mutasyon dağılımı.....	124
Tablo 8. GenoType® HelicoDR ile koloni DNA örneklerinde saptanan mutant 23S rRNA Profilleri.....	126
Tablo 9. GenoType® HelicoDR testi ile koloni ve biyopsi örneklerinin klaritromisin duyarlılıklarının karşılaştırılması.....	126
Tablo 10. Sekiz suşta saptanan mutant allellerin dağılımı.....	127
Tablo 11. GenoType® HelicoDR testi ile koloni ve biyopsi örneklerinin levofloksasin duyarlılıklarının karşılaştırılması.....	128
Tablo 12. Dışkı Genotype HelicoDR ile saptanan mutant suşların 23S rRNA profilleri.....	132
Tablo 13. Dışkı Genotype HelicoDR ile saptanan mutant suşların <i>gyrA</i> profilleri.....	133
Tablo 14. Antrum ve korpus biyopsi DNA örneklerinde FRET-real-time PCR ile saptanan 23S rRNA profilleri.....	135
Tablo 15. Dışkı DNA örneklerinde FRET-real-time PCR ile saptanan 23S rRNA profilleri.....	137
Tablo 16. Biyopsi DNA örnekleri ile klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde Genotype HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin karşılaştırılması	140
Tablo 17. Dışkı DNA örnekleri ile klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde Genotype HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin karşılaştırılması..	141
Tablo 18. FRET-real-time PCR metodu ile 49 hastanın hem biyopsi hem de dışkı örneklerinde saptanan klaritromisin duyarlılığının karşılaştırılması.....	142

Tablo 19. GenoType® HelicoDR yöntemi ile hem biyopsi hem de dışkı DNA örneklerinde <i>H. pylori</i> pozitif saptanan 54 hastanın klaritromisin duyarlılığı sonuçlarının karşılaştırılması.....	142
Tablo 20. GenoType® HelicoDR yöntemi ile hem biyopsi hem de dışkı DNA örneklerinde <i>H. pylori</i> pozitif saptanan 54 hastanın levofloksasin duyarlılığı sonuçlarının karşılaştırılması.....	143
Tablo 21. <i>H. pylori</i> pozitif 49 hastanın E-test, GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin klaritromisin duyarlılığının karşılaştırılması.....	144
Tablo 22. <i>H. pylori</i> pozitif 49 hastanın E-test ve GenoType® HelicoDR yöntemleri ile levofloksasin duyarlılığının karşılaştırılması.....	144
Tablo 23. Antrum ve/veya korpus biyopsi DNA örneklerinin 23S rRNA sekans analizi ve FRET-real-time PCR ile klaritromisin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.....	145
Tablo 24. Antrum ve/veya korpus biyopsi DNA örneklerinin 23S rRNA sekans analizi ve GenoType® HelicoDR metodu ile klaritromisin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.....	146
Tablo 25. Gastrik biyopsi DNA örneklerinin <i>gyrA</i> sekans analiz sonuçları.....	149
Tablo 26. <i>H. pylori</i> suşlarının <i>gyrA</i> sekans analiz sonuçları.....	150

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin flajel yapısı	12
Şekil 2. <i>H. pylori</i> 'nin <i>che</i> genleri ve sınıf I genlerinin operonik organizasyonu.....	13
Şekil 3. <i>H. pylori</i> 26695 standart suşunun dairesel genom yapısı.....	15
Şekil 4. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu ilişkili ve risk faktörü olduğu hastalıklar.....	18
Şekil 5. <i>H. pylori</i> 'nin kolonizasyon ve tutunmadaki virulans faktörleri	20
Şekil 6. VacA dodekamerinin yaklaşık 15-Å 3D yapılandırılması.....	23
Şekil 7. VacA allellerinin şematik gösterimi.....	24
Şekil 8. VacA allelik çeşitliliği ve yapısı.....	25
Şekil 9. Multi-fonksiyonel toksin, VacA.....	26
Şekil 10. Kültür ve biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu ve GenoType HelicoDR testi hibridizasyon öncesi aşamaları.....	34
Şekil 11. GenoType HelicoDR testinin hibridizasyon ve değerlendirme aşaması.....	34
Şekil 12. GenoType HelicoDR stribi.....	35
Şekil 13. Amoksisilin genel yapısı.....	41
Şekil 14. Klaritromisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı.....	42
Şekil 15. Klaritromisin etki mekanizması.....	44
Şekil 16. Levofloksasin'in kimyasal yapısı.....	45
Şekil 17. Florokinolon etki mekanizması.....	46
Şekil 18. DNA giraz-DNA kompleksinin yapısı.....	47
Şekil 19. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde florokinolon temel etki mekanizması.....	48
Şekil 20. Y904'ün kimyasal yapısı.....	49
Şekil 21. Tetrasiklin etki mekanizması.....	50
Şekil 22. Metronidazol etki mekanizması.....	51
Şekil 23. Klaritromisin direncine neden olan <i>H. pylori</i> 23S rRNA'sında meydana gelen nokta mutasyonlar.....	58
Şekil 24. Kinolon direnç mekanizması	59
Şekil 25. 16S rRNA'da primer tetrasiklin bağlanma bölgesindeki baz değişimleri.....	65
Şekil 26. GenoType® HelicoDR testi sonuç değerlendirme şablonu "template strip"	99
Şekil 27. Örnek bant paternleri ve bu paternlerin florokinolon ve/veya klaritromisin direnci ile ilgili değerlendirilmeleri.....	102

Şekil 28. GenoType® HelicoDR testi bant paternleri için örnekler ve değerlendirilmeleri.....	103
Şekil 29. %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agarda E-test yöntemi ile klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi.....	121
Şekil 30. %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agarda E-test yöntemi ile levofloksasin duyarlılığının belirlenmesi.....	121
Şekil 31. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinin HPU PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri.....	122
Şekil 32. <i>H. pylori</i> standart suşlarının GenoType® HelicoDR testi ile amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	125
Şekil 33. Dışkı DNA örneklerinin GenoType® HelicoDR testi ile ilk denemesinin her iki hastaya ait antrum biyopsi örnekleri ile amplifikasyon sonrası PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	129
Şekil 34. Dışkı DNA örneklerinin GenoType® HelicoDR testi ile optimizasyon denemesinde elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	130
Şekil 35. <i>gyrA</i> ve 23S-RNA genlerinin GenoType® HelicoDR testi ile optimize amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	130
Şekil 36. Aynı hastanın hibridizasyon sonrası antrum, korpus biyopsi ve dışkı DNA örneklerine ait GenoType® HelicoDR testi strip görüntüleri.....	131
Şekil 37. Aynı hastaya ait antrum, korpus biyopsi ve dışkı örneklerine ait strip görüntüleri.....	131
Şekil 38. FRET-real-time PCR yönteminde kullanılan kontroller.....	134
Şekil 39. FRET-real-time PCR yöntemi ile gastrik biyopsi örneklerinin klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi.....	135
Şekil 40. FRET-real-time PCR yöntemi ile dışkı örneklerinin klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi.....	136
Şekil 41. <i>H. pylori</i> standart suşlarının <i>rrl</i> PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri.....	137
Şekil 42. <i>rrl</i> PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri.....	138
Şekil 43. <i>gyrA</i> PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	139

Şekil 44. Aynı hastanın antrum ve korpustan izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının DNA örneklerinde 23S rRNA PCR ürünlerinin sekans analizi sonucunda saptanan üç hastadaki üç yeni mutasyon.....	148
Şekil 45. <i>gyrA</i> geninde levofloksasin direncine neden olan mutasyonların sekans analizi sonuçlarına örnekler.....	151

KISALTMALAR

<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
MALT	: Mukoza ilişkili lenfoid doku
HUT	: Hızlı üreaz testi
UBT	: Üre nefes testi
PCR	: Polimeraz zincir tepkimesi
PPI	: Proton pompa inhibitörü
<i>gyrA</i>	: gyrase A
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
PNL	: Polimorfonükleer lökositler
NIH	: National Institutes of Health
IACR	: International Agency for Cancer Research
TIGR	: The Institute for Genomic Research
T4SS	: Tip III sekresyon sistemi
HAP	: Kanca ilişkili protein
LPS	: Lipopolisakkarit
OMP	: Dış membran proteinleri
BabA	: Kan grup antijeni bağlayan adezin
SabA	: Siyalik asit bağlayan adezin
OipA	: Dış membran inflamatuvar protein A
Hop gen	: Dış membran ilişkili gen
iceA	: Epitel ile etkileşim tarafından indüklenen gen
AlpAB	: Aderans ilişkili lipoprotein
bp	: Baz çifti
<i>cagPAI</i>	: Cag patojenite adası
<i>cagA</i>	: Sitotoksin ilişkili gen A
EPIYA	: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala
VacA	: Vakuol oluşturan sitotoksin
PBP	: Penisilin bağlayan protein
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
POR	: Piruvat oksidoredüktaz kompleksi

MLS	: Makrolid, linkozamid ve streptogavin
erm	: Eritromisin ribozomal metilaz
RND	: Resistance-nodulation cell division
EPI	: Efflux pompa inhibitörleri
PAβN	: Phe-Arg-β-naftilamid
SOS	: Son of sevenless
PMQR	: Plazmid aracılı kinolon direnci
QRDR	: Kinolon direnç belirleme bölgesi
CFU	: Koloni oluşturan ünite
EUCAST	: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
FRET	: Floresan rezonans enerji transfer
OLA	: Oligonükleotid ligasyon testi
DEIA	: DNA enzim immun testi
LİPA	: Line prob testi
DPO	: Dual priming oligonükleotid
AP	: Alkalın fosfataz
WT	: Wild type
HLO	: Helicobacter like organisms
DENT	: <i>Helicobacter pylori</i> selective supplement
BHI	: Brain Heart Infusion

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen, bilimsel desteklerinin yanısıra her türlü desteğini ve sonsuz sevgisini esirgemeyen ve beni yurtdışı bilimsel dünya ile tanıştıran, bilgisi ve anlayışıyla her zaman yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Özlem YILMAZ'a,

Bilimsel vizyonumu genişleten, tezimin gelişmesinde emeği geçen ve her zaman destek gördüğümüz Prof. Dr. Francis MEGRAUD'a,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, manevi destekleri ile yanımda olan yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına,

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi bana her zaman destek olan sevgili ailem Sevil BECERİKLİ ve Burhan BECERİKLİ'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan İzmir'deki ailem KOCAİRİ ailesine ve tez yazım süresince bıkmadan beni motive eden ve yanımda olan Oğuz SANDIKÇI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tuba BECERİKLİ

GASTRİK BİYOPSİ VE DIŞKI ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *HELICOBACTER PYLORI* GENOMİK DNA'SINDA KLARİTROMİSİN VE LEVOFLOKSASİN DUYARLILIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ

**Tuba BECERİKLİ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İnciraltı-İzmir**

ÖZET

Klaritromisin ve levofloksasin direnci, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu tedavi başarısızlığının en önemli nedenidir. Çalışmamızda GenoType HelicoDR testinin, fenotipik duyarlılık testi ve moleküler metodların yanısıra eş zamanlı olarak *H. pylori* saptanması ve klaritromisin ve levofloksasin duyarlılığının belirlenmesindeki etkinliğinin ve dışkı örneklerine uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Dispeptik yakınmalı 58 (40K, 18E; 41.1 ± 13.5 yaş) hasta çalışıldı. Çalışmamızda uygulanan tüm metodlar hem antrum hem de korpus biyopsi örneklerine ve hastaların dışkı örneklerine uygulandı. Kültür, histopatoloji ve hızlı üreaz testinin en az ikisinin pozitifliğinde *H. pylori* pozitif olarak değerlendirildi. Klaritromisin ve levofloksasin duyarlılıkları konvansiyonel E-test yöntemi ile saptandı. *H. pylori* saptanması, klaritromisin ve levofloksasin duyarlılığının belirlenmesinde GenoType HelicoDR testi non-invaziv bir moleküler metod olarak dışkı örnekleri için modifiye edildi ve aynı zamanda GenoType HelicoDR testi gastrik biyopsi örneklerine de uygulandı. Ayrıca, FRET-real-time PCR *H. pylori* saptanması ve klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde hem biyopsi hem de dışkı örneklerine uygulandı. Farklı metodlar ile klaritromisin ve levofloksasin duyarlılık sonuçları farklı olan hastaların biyopsi ve koloni DNA örnekleri sekans analizine gönderildi. Elli bir (%87.9) hasta *H. pylori* pozitif saptandı. Kırk dokuz (%84.5) kültür pozitif saptandı. Klaritromisin ve levofloksasin için E-test metodu ile 35 (%71.4), 35 (%71.4) hasta duyarlı, 10 (%20.4), 9 (%18.4) hasta dirençli ve 4 (% 8.2), 5 (%10.2) hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneğinde miks enfeksiyon (duyarlı ve dirençli bakteri) saptandı. Tüm hastalar GenoType HelicoDR testi ile *H. pylori* pozitif saptandı; klaritromisin ve levofloksasin için 37 (%63.8), 33 (%56.9) hasta duyarlı; 5 (%8.6), 11 (%19) hasta dirençli; 16 (27.6%), 14 (24.1%) hastada miks enfeksiyon saptandı. GenoType HelicoDR testi dışkı örneklerine de adapte edilmiştir. Dışkı GenoType HelicoDR testi ile 54 (%98.2) hasta *H. pylori* pozitif, 1 (%1.8) hasta *H. pylori* negatif saptandı. Dışkı ve doku GenoType HelicoDR testi sonuçları klaritromisin için 35 (%63.6) hastada, levofloksasin için 40 (%72.7) hastada uyumlu saptandı. Dışkı GenoType HelicoDR testinin duyarlılığı %100 (κ

= 0.225) saptandı. FRET-real-time PCR ve GenoType HelicoDR metodlarının uyumu dışkı örneklerinde %81.0 ve doku örneklerinde % 66.7 saptandı. Üç hastanın sekans analizinde üç yeni mutasyon (C2136T, C2310A, C2428T) saptandı ve bu hastalarda klaritromisin direnci ile ilişkili bilinen üç nokta mutasyon açısından sekans analizi ile wild type saptandı. Bu üç hasta aynı zamanda E-test yöntemi ile de klaritromisin dirençli saptandı. GenoType HelicoDR ve FRET-real-time PCR; hızlı ve kültürden bağımsız, direkt biyopsi örneklerinden çalışılabilen ve hem wild type hem de dirençli *H. pylori* suşlarını içeren miks enfeksiyonları saptayabilen yöntemlerdir. Bununla birlikte, GenoType HelicoDR testinin en önemli avantajlarından biri özellikle klaritromisin direncinin yüksek olduğu bölgelerde levofloksasin duyarlılığının eş zamanlı klaritromisin ile birlikte saptanabilmesidir. Non-invaziv bir yöntem olarak GenoType HelicoDR testinin dışkı örneklerinde uygulanabilmesi, klinik yaklaşımda antimikrobiyal duyarlılığın tedavi öncesi invaziv girişim olmadan saptanmasını sağlaması nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Helicobacter pylori*, Genotype HelicoDR, Real-time PCR, klaritromisin ve levofloksasin direnci

DETERMINATION OF CLARITHROMYCIN AND LEVOFLOXACIN SUSCEPTIBILITY
BY MOLECULAR METHODS IN *HELICOBACTER PYLORI* GENOMIC DNA
ISOLATED FROM GASTRIC BIOPSY AND STOOL SPECIMENS

**Tuba BECERİKLİ, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylül University Faculty of
Medicine, Department of Medical Microbiology İnciraltı-İzmir**

ABSTRACT

Clarithromycin and levofloxacin resistance are the most important cause for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. We aimed to assess the efficacy of GenoType HelicoDR method and its applicability for stool specimens to detect *H. pylori* and determine clarithromycin and levofloxacin susceptibilities, simultaneously besides the phenotypic susceptibility testing and molecular methods. Fifty-eight patients with dyspepsia (40F, 18M; 41.1 ± 13.5 years) were studied. All tests used in this study were performed to both antrum and corpus biopsy specimens and stool specimens of these patients. *H.pylori* positivity was defined according to at least two positivity of culture, histopathology and rapid urease test. Clarithromycin and levofloxacin susceptibilities were determined by E-test as a traditional method. We modified GenoType HelicoDR test for stool specimens as a non-invasive molecular method to detect *H. pylori* and to determine clarithromycin and levofloxacin susceptibilities. GenoType HelicoDR test was also performed to gastric biopsy specimens. Furthermore, FRET-real-time PCR was performed to both biopsy and stool specimens for molecular detection of *H. pylori* and determination of clarithromycin susceptibility. Biopsy and colony DNA specimens of the patients which had discrepant clarithromycin and levofloxacin susceptibility results among used different methods were sent for sequencing. Fifty-one (87.9%) patients were *H.pylori* positive. Forty-nine (84.5%) patients were culture positive. Thirty-five (71.4%), 35 (71.4%) patients were susceptible; 10 (20.4%), 9 (18.4%) were resistant; 4 (8.2%), 5 (10.2%) patients' antrum and corpus presented a double population of susceptible and resistant bacteria by E-test for clarithromycin and levofloxacin, respectively. All patients were *H. pylori* positive by GenoType HelicoDR; 37 (63.8%), 33 (56.9%) were susceptible; 5 (8.6%), 11 (19%) were resistant; 16 (27.6%), 14 (24.1%) presented a double population for clarithromycin and levofloxacin, respectively. GenoType HelicoDR test was adapted successfully for stool specimens. Fifty-four (98.2%) patients were positive and 1 (1.8%) patient was negative for *H. pylori* by stool Genotype HelicoDR. Stool GenoType HelicoDR results of 35 (63.6%) and 40 (72.7%) patients were correlated with the

gastric biopsy results of GenoType HelicoDR for clarithromycin and levofloxacin, respectively. The sensitivity of stool GenoType HelicoDR was 100% ($\kappa = 0.225$). Correlation between FRET-real-time PCR and GenoType HelicoDR methods to determine clarithromycin susceptibility was 81.0 % and 66.7 % in gastric biopsy and stool specimens, respectively. Three new mutations (C2136T, C2310A, C2428T) were determined in three patients' sequence analyses conferring wild type for known main three mutations associated with clarithromycin resistance. E-test results of these patients were also resistant for clarithromycin. GenoType HelicoDR and FRET-real-time PCR methods are rapid and culture independent tests with the ability to study directly from biopsy specimens and also has capability for detection of mixed infections including both wild type and resistant *H. pylori* strains. However, molecular determination of levofloxacin susceptibility simultaneously with clarithromycin susceptibility is the best advantage of GenoType HelicoDR test especially in the region which is clarithromycin resistance is high. As a non-invasive molecular method, ability of using stool GenoType HelicoDR is very valuable in clinical setting providing to determine antimicrobial susceptibility prior to the treatment without invasive sampling.

Key Words: *Helicobacter pylori*, GenoType HelicoDR, real-time PCR, clarithromycin and levofloxacin resistance

1. GİRİŞ VE AMAC

Helicobacter pylori (*H. pylori*) spiral yapıda, mikroaerofilik, 4-6 unipolar kılıflı flajele sahip Gram negatif bir bakteridir (1). *H. pylori*'nin gastrik mukozada kolonize olup kronik gastrit ve peptik ülser hastalığına neden olduğu ayrıca, gastrik adenokarsinoma ve mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (2-5). *H. pylori* enfeksiyonunda insandan insana (anneden bebeğe), fekal-oral, oral-oral, gastro-oral (içme suyu kaynağı) ve solunum damlacıkları yolu ile bulaş bildirilmektedir (6,7).

H. pylori enfeksiyonunun tanısında endoskopi gerektiren invaziv ve endoskopi gerektirmeyen non-invaziv yöntemler kullanılmaktadır. İnvaziv yöntemler kültür, histopatolojik inceleme, hızlı üreaz testi (HÜT) ve ayrıca biyopsi temelli moleküler metodlardır. Non-invaziv testler ise üre nefes testi (ÜNT), dışkı testleri (dışkı kültürü, dışkı örneklerinde polimeraz zincir tepkimesi (PCR), dışkıda *H. pylori* antijeni), serumda ve idrarda *H. pylori* antikoruna saptanmasıdır (8,9). Kültür, *H. pylori* enfeksiyonu tanısında altın standart yöntemdir (10). Dışkı örneklerinde *H. pylori*'nin PCR ile saptanmasının kolay ve güvenilir invaziv olmayan bir yöntem olduğu bildirilmiştir (11-13).

Proton pompa inhibitörü (PPI) veya ranitidin bizmut sülfat ile birlikte klaritromisin ve amoksisilin veya metronidazol ilk basamak üçlü tedavi olarak önerilmektedir (14-16). İkinci basamak tedavide levofloksasin temelli üçlü tedavi, dördümlü tedaviye göre çok daha etkili olduğu gösterilmiştir. Klaritromisin ya da levofloksasin temelli üçlü tedavinin başarısızlığının temel nedeni klaritromisin ya da levofloksasin direncidir (15,17).

Makrolid grubu bir antibiyotik olan klaritromisin, diğer kullanılabilecek antibiyotiklere göre en güçlü *in vitro* bakteriyostatik etkiye sahip olması nedeniyle *H. pylori* tedavisinde ilk seçenek antibiyotik olarak bilinmektedir (1). Klaritromisinin antibakteriyal aktivitesi diğer makrolidlerle benzerdir, ancak klaritromisin gastrik mukus tabakasında daha iyi absorbe olur, aside daha dayanıklıdır ve bu nedenle *H. pylori* suşlarına karşı daha etkilidir (16,18-20). *H. pylori* suşlarında makrolid direnci, 23S rRNA'nın V domain'inin peptidiltransferaz bölgesindeki nokta mutasyonlar ile hedef bölgenin modifikasyonu sonucu makrolidlerin bakteriyal ribozomun 23S rRNA komponentine bağlanamamasından kaynaklanır (21-23). *H. pylori* iki 23S rRNA geni içerir ve mutasyonlar genellikle her iki kopyada da bulunur (20,24). En sık görülen üç mutasyon 2143 pozisyonundaki A→G dönüşümü, 2142 pozisyonundaki A→G dönüşümü ve 2142 pozisyonundaki A→C değişimidir (14,22,25,26). Ayrıca daha nadir

olarak A2115G, G2141A, T2182C mutasyonları da *H. pylori* suşlarında klaritromisin direnci ile ilişkilendirilmiştir (27-29).

Kinolonlar *H. pylori*'de DNA giraz enzimini inhibe ederek antimikrobiyal aktivite gösterirler (30-34). *H. pylori* suşlarının kinolon grubu bir antibiyotik olan levofloksasine karşı geliştirdikleri direncin gyrase A (*gyrA*) geninin en sık 87 ve 91 pozisyonlarındaki nokta mutasyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (8,35-37). Daha nadir olarak 88 ve 130 pozisyonlarında da mutasyonlar saptanmıştır (38).

Antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi için fenotipik ve genotipik yöntemler mevcuttur. Fenotipik yöntemler agar dilüsyon, sıvı dilüsyon, disk difüzyon ve E-test'tir. Agar dilüsyon metodu *H. pylori* için diğer tekniklerle karşılaştırılması açısından "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) tarafından önerilen referans bir metottur (8). Genotipik yöntemler ise temel olarak standart polimeraz zincir tepkimesi (PCR) temelli yöntemler (39-41), real-time PCR (13,18,42,43) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH)'dur (8,18,43).

Son zamanlarda geliştirilen GenoType HelicoDR; *Helicobacter pylori* 23S rRNA geninin spesifik bölgesi ile *H. pylori* varlığının, klaritromisin direncinin (2146 (2142) ve 2147 (2143) pozisyonlarındaki mutasyonlar) ve florokinolon direncinin (*gyrA* geninin kinolon direnç bölgesindeki 87 ve 91 pozisyonundaki mutasyonlar) saptanmasını sağlayan, hibridizasyon ve PCR yöntemlerini birleştiren bir moleküler yöntemdir (36).

Bu çalışmanın amacı; dispeptik yakınmalı hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığının, klaritromisin ve levofloksasin direncinin multipleks PCR ve hibridizasyon temelli GenoType HelicoDR testi ile saptanması, fenotipik olarak kültür ve E-test yöntemleri ile, genotipik olarak FRET-real-time PCR yöntemi ile karşılaştırılması, bu yöntemler ile farklı duyarlılık profili saptanan örneklerin ise sekans analizine gönderilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, dışkı örnekleri için henüz bir protokolü bulunmayan DNA strip teknolojisine dayanan GenoType HelicoDR testinin dışkı örneklerinde non-invaziv bir yöntem olarak uygulanabilirliğinin gastrik biyopsi örnekleri ile birlikte optimizasyonunun ve validasyonunun araştırılması; aynı zamanda *H. pylori* varlığı ve klaritromisin direncinin saptanmasında non invaziv bir yöntem olarak dışkı FRET-real-time PCR moleküler yöntemi ile karşılaştırılması 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 (44).

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 sıçanlarının midesinde gözlemledi. 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 (45).

Balfour 1906'da maymun ve köpeklerin gastrik ülser örneklerinde, Krienitz gastrik kanserli bir hastanın gastrik örneklerinde spiral mikroorganizmaları tanımladı (46). Luck ve Seth midedeki üreaz aktivitesini tanımladılar ve antibiyotik tedavisi ile kaybolduğunu bildirdiler, ancak 1984'e kadar gastrik mikroorganizmalar ile arasındaki ilişki kurulamadı. 1938 yılında Doenges, otopsi örneklerinin %43'ünün midesinde spiral mikroorganizmaları saptadı. Örneklerin postmortem toplanmış olması ve kontaminasyon riski nedeniyle bu bulgular şüpheyle karşılandı. İki yıl sonra mide ülserli ve kanserli hastaların cerrahi örneklerinde de spiroket görüldüğü, mikroorganizmanın bir postmortem kontaminant olmadığı ve gastrik bir patojen olduğu bildirildi (47).

Freedburg ve Barron, 1940 yılında midede kıvrımlı mikroorganizmaları, Fitzgerald ve Murphy ise 1950 yılında peptik ülser hastalığı ile mukoza yüzeyindeki üreaz aktivitesi arasında ilişkiyi gösterdi (48). 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 neden olduğu düşünüldü. 1910 yılında Schwartz'ın “**no acid no ulcer**” kavramı kabul edildi (47).

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 (48).

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* üredi. Dört yıl sonra Fung ve arkadaşları kronik gastritli hastaların gastrik mukozalarında histolojik ve yapısal olarak bakteriyi gösterdiler. Ancak mukozal lezyonlarla ilişkisi saptanamadı (48).

J. Robin Warren ise *Campylobacter jejuni*’ye benzeyen spiral bakterinin mide hastalıklarıyla ilişkisini ve midenin steril olmadığını bildirdi. J. Robin Warren ve Barry Marshall biyopsi örneklerini *Campylobacter* ve nonselektif besiyerinde 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 (47,49).

1983’te Barry Marshall *H. pylori* enfeksiyonunun gastrik kanser ile ilişkisi olabileceğini ileri sürdü. Ancak hiçbir bilim adamı enfeksiyon ile gastrik kanser arasında bu ilişkinin olabileceğine inanmadı (50). 1984’de bu bakteriyi Warren ve Marshall *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırdı (51). 1986’da bakterinin fazla miktarda üreaz salgıladığı kanıtlandı (47). 1987’de *Campylobacter pylori* adını aldı (46). 1989’da Goodwin ve arkadaşları bakterinin sahip olduğu farklı fonksiyonel ve enzimatik özellikleri nedeniyle *Campylobacter* ailesine ait olmadığını bildirdi ve *Helicobacter pylori* adı verildi (46,52).

1994’de “National Institutes of Health” (NIH) *H. pylori*’nin peptik ülserin birincil nedeni olduğunu; “International Agency for Cancer Research” (IACR) de sınıf I karsinojen olduğunu bildirdi (51, 53-56). 1997 yılında “The Institute for Genomic Research” (TIGR) tarafından *H. pylori*’nin tam genom haritası yayınlandı (57).

2005’de J. Roben Warren ve Barry Marshall “*Helicobacter pylori* bakterisi ve peptik ülser ve gastritte rolü” nü göstererek “**Nobel Tıp Ödülü**” nü aldılar (58,59).



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.)*



*60 numaralı referanstan alınmıştır

2.2. *Helicobacter* Ailesi

Helicobacteraceae ailesi *Helicobacter* ve *Wolinella* genuslarından oluşmakta olup (8), 24 tür içermektedir (59). *Helicobacteraceae* ve *Campylobacteraceae* aileleri *Epsilonproteobacteria* sınıfı içindedir (8). *Helicobacteraceae* ailesi 0.3-1.0 µm genişliğinde, 1.5-10 µm boyda spiral veya kıvrımlı basiller içermektedir. *Helicobacter* türleri Gram-negatif bakterilerdir ve spor oluşturmazlar. Uzamış kültürlerde ve uygun olmayan üreme şartlarında kokoid forma dönüşebilmektedirler. Hareket özellikleri genellikle tekli veya çoklu bipolar kılıflı flajelleri sayesinde olmaktadır. Diğer *Helicobacter* türlerinden farklı olarak *H. pylori* suşlarının çoklu monopolar kılıflı flajelleri bulunmaktadır. Bazı *Helicobacter* türleri (*H. pullorum*, *H. rodentium*, *H. mesocricatorum*, *H. canadensis* ve *H. winthamensis*) *Campylobacter*'lere benzer şekilde kılıfsız flajele sahiptir (45). *Helicobacter* türleri insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde bulunmaktadır (61). Hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunan *Helicobacter* türleri (*H. bizzozeronii*, *H. felis* ve *H. salomonis*) ve insan-hayvan gastrik patojeni *H. heilmannii* ışık ve transmission elektron mikroskobu ile incelendiğinde diğer türlerden ayırıcı spiral morfolojiye sahiptir (45).

Tüm *Helicobacter* türleri oksidaz pozitif ve *H. pylori*'de karbohidrat katabolik yollarının varlığı gösterilmiştir (45).

2.3. *Helicobacter pylori*'nin Yapısı ve Özellikleri

2.3.1. *Helicobacter pylori*'nin Yapısı

Spiral morfolojiye sahip *H. pylori* (0.6x3.5 µm) mikroaerofilik, Gram-negatif bir bakteridir (61-64). Katı besiyerindeki kültürlerden hazırlanan preparatlarda basile benzer yapıda görülür, spiral şekli nadir görülür veya hiç görülmez. Katı veya sıvı besiyerindeki uzamış kültürlerden yapılan preparatlarda ise kok yapısı daha fazla görülür. U şeklinde basil yapının iki kolunun da membranöz bir yapıyla bağlanarak kok yapısını oluşturduğu elektron mikroskobu incelemelerinde görülmüştür. Metabolik olarak aktif olan kok formu, *in vitro* kültürde üretilemez (55,62). *H. pylori* basil formdan kokoid forma yaklaşık bir hafta içerisinde dönüşebilmektedir. *H. pylori* kültürlerinin %80'i normal atmosfer şartları altında 24 saat içerisinde kokoid forma dönüşmektedir. Katalaz, superoksit dismutaz (SOD) ve üreaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri, bu dönüşüm sırasında azalmaktadır. *H. pylori* %7 O₂ varlığında basil form yapısında gözlenir, aerobik (%21 O₂) ya da anaerobik (< %1 O₂) şartlar altında kültüre edildiğinde kokoid forma dönüşmektedir (65).

2.3.1.1. Flajellanın Yapısı

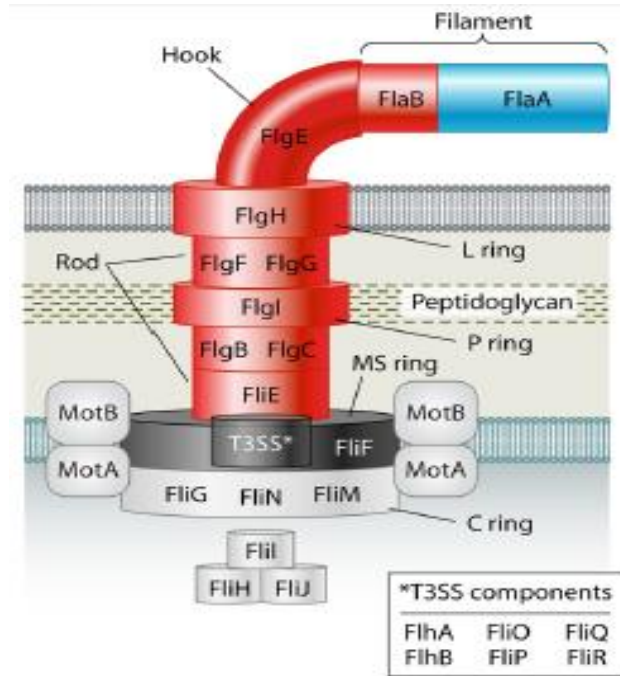
H. pylori mide asiditesinden korunmak için, flajeli ile tirbüşon benzeri hareketi sayesinde hızlı bir şekilde viskoz mukus tabakası içerisinde ilerleyerek gastrik epitel hücreye ulaşmalıdır. Flajellar hareketin mukus tabakasından geçiş için gerekli olduğu, hareketsiz bakterilerin midede kolonize olamadığı gösterilmiştir (66,67). Ayrıca unipolar yerleşimli flajeller, kılıfları sayesinde midenin asidik ortamı nedeni ile oluşacak hasarlardan korunmaktadır (61). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda *H. pylori*'nin mide mukozasına kolonizasyonunda ve enfeksiyonun sürekliliğinde hareketin önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* özellikle viskozitesi yüksek ortamlarda hareketlidir ve hareketi pH'a bağlıdır. pH 4'ün altında bakteri hareketsizdir. Bu sebeple *H. pylori* mide lümeninde kolonize olamaz; ancak gastrik mukozayı kaplayan musin tabakasında oldukça iyi kolonize olur (68,69).

H. pylori unipolar kılıflı üç-yedi flajele sahiptir. Her bir flajel, birçok farklı protein içeren temel olarak 53 kDa FlaA ve 54 kDa FlaB flajellinden oluşan bir filament içermektedir (70-72). FlgE, flajellar kanca proteini olup bazal gövdede hareket aparatı için filament ile ilişkili esnek bir yapıdır. *flgE* geni yoksun mutant *H. pylori* suşlarında flajellar protein olan flajellinin üretiminin engellendiği gösterilmiştir (71). *H. pylori* fliD proteininin flajellar filamentlerin bir araya gelmesi, hareket ve kolonizasyon için gerekli olduğu bildirilmiştir (72,73).

Her bir flajel, yaklaşık 30 µm uzunluğunda, 2.5 nm kalınlığındadır ve bazal cisim, flajellar çengel, flajellar filament olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Flajellar filament, bir flajellar kılıf ile sarılıdır. Flajellar kılıf fosfolipid, lipopolisakkarit ve proteinden oluşan, bakteriyel dış membrana benzeyen tipik çift katlı bir membrandır. Flajellar kılıfın görevi flajellar filamentini mide asiditesinden korumak, diğer bir muhtemel fonksiyonu da flajelline karşı oluşan antikorların bakterinin hareketini engellemesini önlemektir (68).

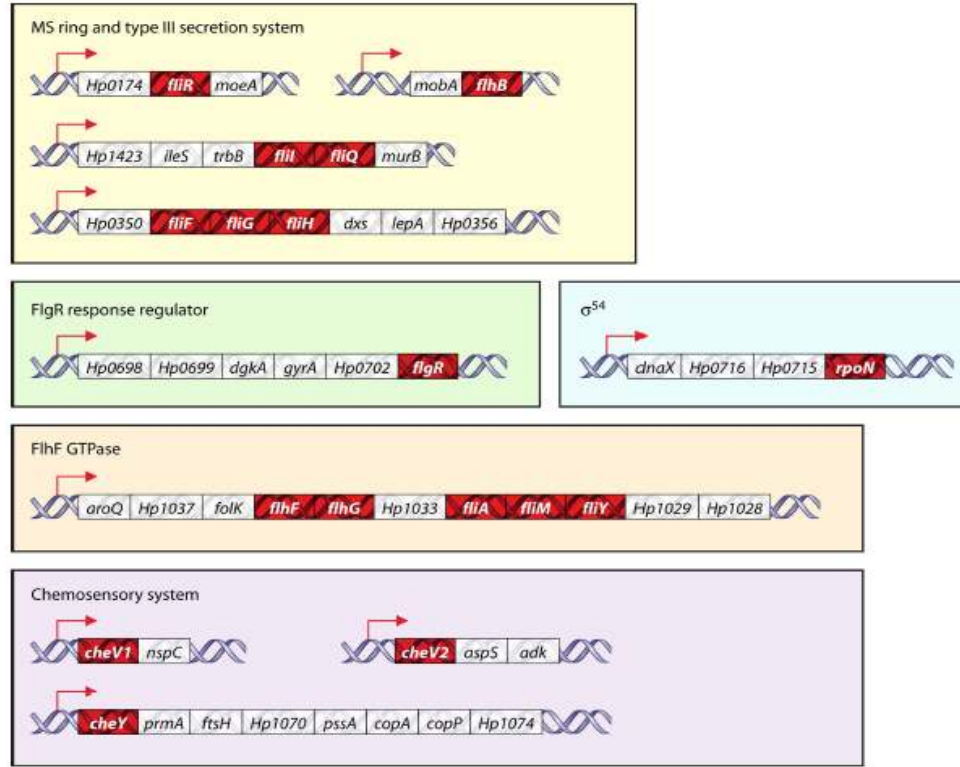
Flajel, kanca-bazal body kompleksi ve ekstrasellüler filament olarak iki ayrı yapıdan oluşmaktadır. Flajellar bazal yapı MS halkası, flajellar T3SS, sitoplazmik C halkası ya da “switch” kompleksi ve motor bölgesini içermektedir. İç membrandaki MS halkası, halkanın merkez membranı içerisinde fonksiyonel flajellar T3SS (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ ve FliR'yi içerir) ile FliF'nin homomultimeridir. Bazal yapının motor bileşenleri, flajelin durağan bileşeni ve bir proton kanalını oluşturan MotA ve MotB'dir; bu bileşenler

flajellar hareket için proton akışı ve dönme momenti oluşumu ile ilişkili fonksiyon göstermektedir (Şekil 1) (67,74,75).



Şekil 1. *Helicobacter pylori*'nin flajel yapısı. Flajeller yapının proteinleri, flajellar transkripsiyonel hiyerarşide bulunan ilgili genlerin hangi sınıfa ait olduğuna göre renkler ile kodlanmıştır; siyah (sınıf 1), kırmızı (sınıf 2), mavi (sınıf 3) ve gri (flajellar transkripsiyonel hiyerarşi dışında). Flajellar biyosentez için gerekli tüm proteinler, transkripsiyonel regülatör kaskadlar ve yapılar ile karşılaştırılarak gösterilmektedir (75)

H. pylori kompleks flajellar aparatının ekspresyonu, sekresyonu ve bir araya getirilmesi için 50 den fazla protein gereklidir. Bu proteinlerin 20 den fazlası flajellar bazal cisim, kanca ve filament için yapısal komponentleri oluşturmaktadır. Filament, flajellin alt üniteleri olan FlaA ve FlaB'den oluşmuştur. FlaA predominant alt tip ve FlaB minör alt tiptir, yakın lokalize olurlar. Tam hareketlilik için flaA ve flaB'nin her ikisi de gereklidir. *flgE*, kancanın yapısal proteinini kodlar. *fliD*, kanca ile ilişkili proteini (HAP2) kodlar, flajellar filamentin büyümesinde flajellin monomerlerinin katılmasını teşvik eder (76,77). Flajel biyosentezi transkripsiyonel bir hiyerarşi içinde olur ve flajellar gen ekspresyonu ile bir araya gelme eşgüdümlü sağlanır (Şekil 2) (75-77).



Şekil 2. *Helicobacter pylori*'nin *che* genleri ve birçok sınıf I genlerinin operonik organizasyonu. Flajellar genler kırmızı olarak gösterilmiştir. Gen gösterimleri *H. pylori* 26695 standart suşunun genomik sekansına dayanmaktadır (75)

FlaA ve FlaB proteinleri flajelin farklı bölgelerinde yerleşmiştir ve flajellar genlerin regülasyonları da lokalizasyonları ile koordinelidir. Bu iki proteinin konsantrasyonundaki değişikliklerin bakterinin enfeksiyon oluşturması ile persistan kalması gibi farklı durumlara uyumunda etkili olduğu düşünülmektedir (77).

2.3.1.2. Hücre Duvar Yapısı

H. pylori Gram negatif hücre duvar yapısına sahiptir. Diğer Gram negatif bakterilerin hücre duvarı gibi *H. pylori* de dış membranda endotoksinler olarak adlandırılan ve toksik fosforillenmiş glikolipidlerin bir ailesi olan lipopolisakkaritler (LPSs) içerir (78). *H. pylori* LPS'si diğer Gram negatif bakterilerle karşılaştırıldığında 500 kat daha az endotoksik aktivite göstermektedir (73). Genel olarak LPS tabakası fiziksel bütünlük ve bakteriyal dış membranın işleyişi için gereklidir. Gram negatif bakterilerin temel yüzey antijenleri (O-antijenleri) çevreleri ve diğer daha kompleks organizmalar ile etkileşimlerinde önemli bir rol oynar. LPS tabakası lipid bileşeninden (lipid A) dolayı etkili bir immünomodülatör ve immünostimülatör bileşiktir. Bu bileşik ailesi aynı zamanda antikorlar ve non-immünoglobulin serum faktörleri

için bağlanma bölgeleri içerir. LPS örneğin Gram negatif bakterilerin patojenik potansiyellerine katkıda bulunan pirojenite ve letal toksisite gibi geniş yelpazeli bir endotoksik özelliğe sahiptir. Bakteriye patogeneze LPS'nin önemine karşın diğer bakteriyel patojenler ile karşılaştırıldığında *H. pylori* LPS'si daha az dikkat çekmiştir. Diğer Gram negatif bakterilere benzer özelliklerine rağmen, *H. pylori* LPS'si benzersiz biyolojik özelliklere sahiptir (78). *H. pylori* LPS'sinin, kültüre edilmiş gastrik hücrelerin parahücrel geçirgenliğini arttırdığı bildirilmiştir. *In vivo*'da benzer bir etkinin epitelyal bariyer fonksiyonlarında ve patolojide önemli bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (79).

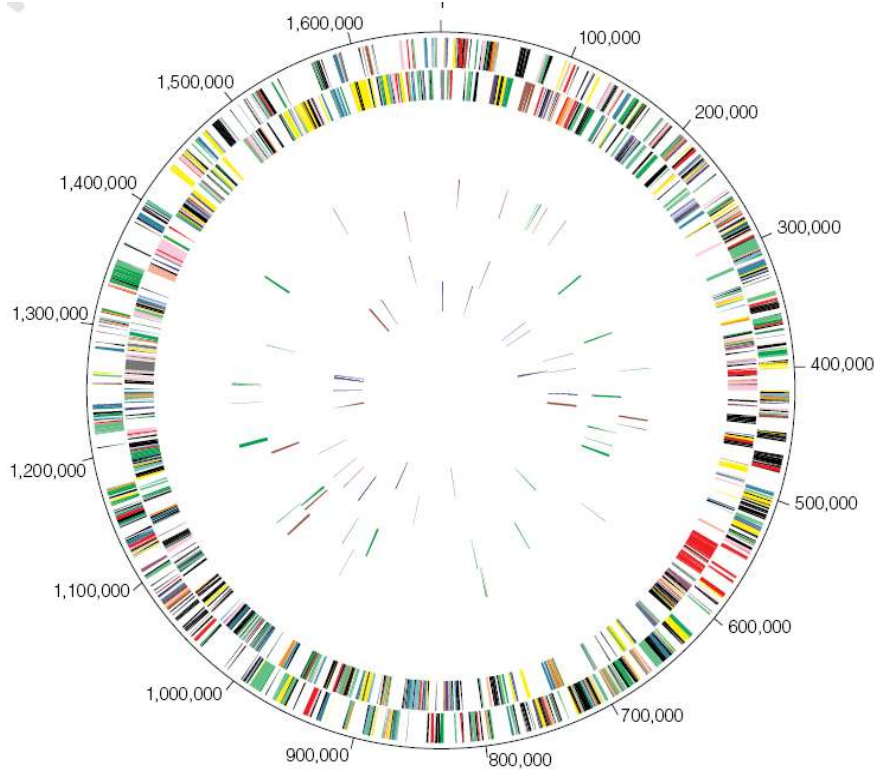
H. pylori'de moleküler ağırlığı 31-80 kDa arasında değişen dış membran proteinleri (OMPs) tanımlanmıştır (55). *H. pylori* genomu dış membran proteinlerini kodlayan yaklaşık 30 dış membranla ilişkili gen (Hop gen) paraloğu içerir (80). *H. pylori*'nin Hop proteinlerinden olan BabA ("blood group antigen-binding adhesin"), SabA ("sialic acid-binding adhesin"), OipA ("outer inflammatory protein"), HopZ, IceA ("induced by contact with epithelium"), AlpA ve AlpB ("adherence associated lipoproteins") tutunma (adezyon) faktörleri olarak tanımlanır (81,82).

2.3.1.3. Genom Yapısı

H. pylori genomu metabolik genlerin az bir kısmını içeren oldukça küçük, 1.67 Mb boyutlarındadır (63). *H. pylori* J99 ve 26695 suşlarının tam genom sekansları bildirilmiştir (83). *H. pylori* 26695 suşu 1.667.867 baz çifti (bp) bulunan 1.590 gen dizisi içerir. G+C içeriği ortalama %39'dur (Şekil 3) (57). *H. pylori*'nin proteom bileşenleri fonksiyonel olarak aktif genleri, subsellüler proteinler, hastalık ilişkili proteinler ve immunoreaktif proteinlerin identifikasyonu için araştırılmıştır (83).

H. pylori genomu yaklaşık 1600 "open-reading frame"(ORF) içermektedir. Proteom analizi ile, kodlanan ve eksprese edilen proteinlerin 200'den fazlası saptanmıştır. Isı şok protein 60 (GroEL), 50S ribozomal proteinler ve katalazı içeren 30'dan fazla immunojenik protein identifiye edilmiştir (83). *H. pylori* suşlarının yaklaşık %40'ı 1.5-23.3 kb boyutlarında plazmid içermektedir (55). *H. pylori* kromozomu 16S ve 23S rRNA genlerinden iki kopya içerir (55,57). *H. pylori*'deki genetik çeşitlilik diğer birçok bakterinin genetik çeşitliliğinden daha fazla olduğu ve insan popülasyonundaki genetik çeşitlilikten 50 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (56). *H. pylori* genomunda değişik lokalizasyonlarda bulunan genler tarafından üreaz, flajellin, VacA ve CagA proteinleri sentezlenir (57). Bilinmeyen bir kaynaktan

horizontal transfer ile *H. pylori* genomuna dahil olduğu düşünölen ve bir ucunda *cagA* geninin lokalize olduğu *cag* patojenite adası (*cagPAI*)’nın, yaklaşık 40 kb uzunluğunda bir bölge olduğu bildirilmiştir (56).



Şekil 3. *Helicobacter pylori* 26695 standart suşunun dairesel genom yapısı (57,74)

2.3.2. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Epidemiyolojisi

Barry Marshall ve J. Robin Warren 1982 yılında gastrik patojen *Campylobacter pyloridis*’ i ilk izole ettiklerinde, gastroenterologlar 20 yıl sonrasını öngörebilselerdi bu bakteri en yaygın bakteriyal enfeksiyonlardan biri ve üst gastroduodenal hastalıkların çoğunun etiyolojik ajanı olarak gösterilebilirdi. *H. pylori*’nin akut gastrit, kronik gastrit ve peptik ülser hastalığında majör patojen olduğu aynı zamanda gastrik karsinoma ve B-hücre mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma’ya zemin hazırlayan bir faktör olduğu bilinmektedir (84). Direkt bireyden bireye bulaş oral-oral, fekal-oral ya da gastro-oral bulaş ya da dekontaminasyonu doğru yapılmamış endoskopik aletler ile bulaş henüz bilinen bulaş yollarıdır (61,63,85). Oral-oral bulaş öpme, annenin çocuğa gıdayı önce kendi ağzından çiğneyip yumuşatarak vermesi ile olur (46). İnsandan insana geçiş enfekte sekresyonlarla

temas aracılığı ile gerçekleşmektedir (86). *H. pylori* tükürük, kusmuk ve dental plakta da izole edilmiştir (63,87).

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 taşıdıkları bildirilmiştir (63). Genotipik metotlar kullanılarak, aile üyelerinin *H. pylori* suşlarının arasındaki ilişki incelenmiş ve Japonya’da çalışma populasyonunun %69’unda, Bangladeş’de %46’sında, Peru’da %30’unda anne ve çocuk suşları arasındaki eşleşme gerçekleşmiştir. Farklı yaşam şartları, yaş ve spesifik enfeksiyon paternlerinin bir sonucu olarak gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde anneden çocuğa geçişin değiştiği bildirilmiştir (85).

2.3.3. Prevalans

H. pylori enfeksiyonu hem kadın hem de erkeklerde görülen yaygın bir enfeksiyondur. *H. pylori* enfeksiyonu tüm dünya da yaygın olarak görülmesine rağmen enfeksiyonun prevalansı hem ülke içinde hem de ülkeler arası oldukça farklıdır (84).

Genellikle *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı, gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha düşüktür. Prevalanstaki bu farklılık *H. pylori*’nin çocukluk çağında kazanılımı oranı ile ilişkili bulunmuştur (84). Enfeksiyonun prevalansı, ülkeler arasında ve aynı ülkedeki populasyon grupları arasında büyük farklılık göstermektedir (36). Gelişmekte olan ülkelere prevalans %90, gelişmiş ülkelere %25’dir (36,64). Düşük eğitim düzeyi, düşük sosyoekonomik düzey, kalabalık yaşam, etnik ve genetik yatkınlık enfeksiyon için risk faktörlerini oluşturmaktadır (88,89). Yaş enfeksiyonun prevalansı ile ilişkili en önemli değişkendir. Bir yaştan altındaki çocuklarda seropozitiflik oranı %20, 10 yaşındaki çocuklarda ise %50 olarak bildirilmektedir. Adolesan dönemde, enfeksiyonun prevalansı artış göstermekte ve 20 yaş populasyonun %70’inin enfekte olduğu bildirilmektedir (88).

Güney Afrika’da (“African Enigma”), Güney ve Güneydoğu Asya’da (“Asian Enigma”) *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı yüksek, gastrik kanser insidansı düşük olduğu bildirilmiştir (59). Afrika’da *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı yüksek olmasına rağmen, peptik ülser hastalığı ve gastrik kanserin nadir olduğu, Afrika’da *H. pylori* ilişkili hastalıkların düşük prevalans göstermesinin olası nedeninin de endemik yüksek parazitik hastalık salgınının T helper 2 (Th2) yanıtına belirgin bir artışla neden olduğu ve bu yanıtın da *H. pylori*

enfeksiyonuna sahip bireyleri peptik ülser ve gastrik kanser gelişiminden korumakta olduğu bildirilmiştir (90).

2.3.4. Enfeksiyonun Kaynağı

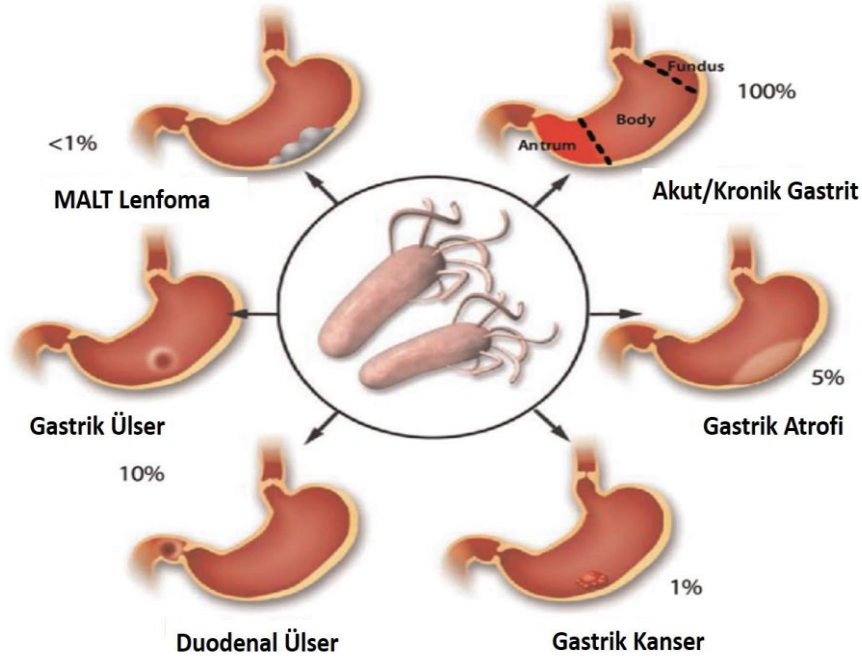
H. pylori'nin bilinen tek rezervuarı insandır. Su, evcil kediler ve karasineğin *H. pylori*'nin diğer rezervuarları olduğu düşünülmektedir (91).

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. (85). Nehir suyunda, deniz suyu, yeraltı suları, lağım suyu ve içme suyu gibi çevresel örneklerde üretilmesi zor olduğundan *H. pylori* varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmiştir (91).

2.3.5. *Helicobacter pylori* ilişkili Hastalıklar

H. pylori enfeksiyonu dünyada en yaygın görülen bakteriyal enfeksiyonlardan biridir; kronik gastrit ve peptik ülserle neden olmaktadır, ayrıca gastrik kanserler (adenokarsinoma ve MALT lenfoma) için temel risk faktörüdür (43).

H. pylori ile enfekte bireylerin çoğu asemptomatik olup ancak enfekte olan bireylerin %10'unda gastrit ya da duodenal ülser gelişmektedir. Enfeksiyonda bakteriyal faktörler, konak faktörleri ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (92). *H. pylori* enfeksiyonu ilişkili hastalıklardan gastrit en yüksek insidansa sahiptir ve diğer hastalıkların insidansı ise azalan oranda sırasıyla; peptik ülser hastalıkları (duodenal veya gastrik ülser), gastrik atrofi, risk faktörü olduğu gastrik kanser ve MALT lenfomadır (Şekil 4) (93).



Şekil 4. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ilişkili ve risk faktörü olduğu hastalıklar (93)

2.4. *Helicobacter pylori* Virulans Faktörleri

H. pylori enfeksiyonunun değişken sonuçları konağa, çevresel ve besinsel faktörlere ek olarak diğer olası neden *H. pylori* suşlarının virulans faktörlerindeki farklılıklar ile ilişkilidir. *H. pylori*'nin *cagA*, *vacA*, *oipA*, *babA*, *hopQ* ve *homA/B* gibi birçok virulans faktörleri gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve farklı klinik bulgular ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Çoğu virulans faktörü birbirleri ile ilişkilidir; *cagA*-pozitif suşlar aynı zamanda *vacA* s1/m1 bölge tipine sahiptir ve ayrıca *babA*'nın varlığı ya da *oipA*'nın "on" durumu ile de yakından ilişkilidirler (94).

2.4.1. Asidik Ortamda Yaşama-Üreaz Enzimi

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 (95). Gnotobiotik domuz modelinde, üreaz ve flajel genlerini taşımayan "knockout" mutantların kolonizasyonunda eksiklik olduğu gösterilmiştir (63). Kollajenazın bakterinin hareketine olanak tanıyacak şekilde mukus tabakayı parçaladığı düşünülmektedir. Sonuç olarak kolonizasyonda; flajel bakterinin hareketi için, üreaz enzimi asidik pH'yı tamponlamak için, kollajenaz ise mukusu parçalamak için gereklidir (96). Uzamış 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 (65).

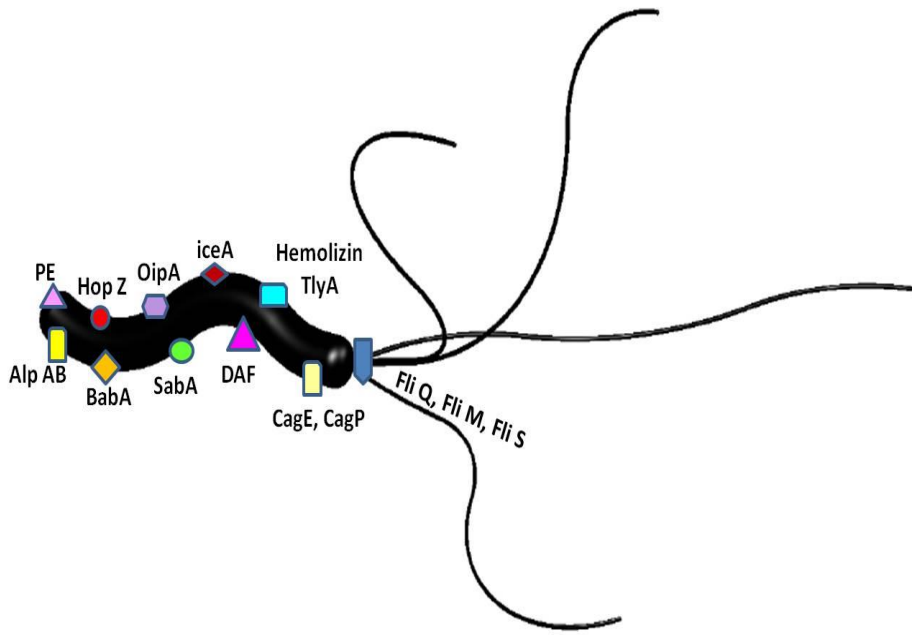
H. pylori'nin gastrik mukozada yaşayabilmesi, üreaz enzimi üretebilme yeteneğine bağlıdır. Bu enzim üreyi karbondioksit (CO₂) ve amonyağa (NH₃) parçalamakta ve bu sayede *H. pylori*, midenin asidik ortamının asiditesini azaltmaktadır (86,97). Bu enzim gastrik mukus viskozitesini değiştirmeye çalışarak bakteriyal harekete yardımcı olmaktadır (86).

Üreaz enzimi *H. pylori*'nin hem yüzeyinde hemde sitozolünde bulunmaktadır (66,71,92). Üreaz enziminin biyosentezi için *ureA* ve *ureB* yapısal genleri, *ureC* ve *ureD* yardımcı genleri ve nikel gereksinim duyan *ureEFGHI* genleri gereklidir (51,95,98). Üreaz kompleksi multifonksiyonel özelliktedir ve bu proteinin yüzey özellikleri *H. pylori*'nin kolonizasyonu ve hayatta kalabilmesi için çok önemlidir (97). 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 (66,99). 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 (100). 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 (98,99). *in vitro* olarak *H. pylori*, üre varlığında pH 1'de birkaç saat canlılığını sürdürebilmektedir. Bakteriyal sitoplazmada üreaz aktivitesi "proton-gated" üre kanalı UreI tarafından regüle edilmektedir. Asidik pH'da, UreI aktive olmakta ve en fazla NH₃ 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 (99).

2.4.2. Kolonizasyon ve Tutunma

Gastrik epitel hücre yüzeylerinde eksprese edilen membran bağlı müsin *H. pylori*'ye karşı koruyucu bir bariyer oluşturmaktadır (79). 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 (92).

H. pylori'nin insan midesinde kolonizasyonunda yeni genler hayvan modellerinde tüm-genom mikroarray ve transpozon 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 (101). *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelere tutunmasının efektör moleküllerin girişini kolaylaştırdığı ve enfeksiyonun oluşması için gerekli olduğu düşünülmektedir. *H. pylori*'de BabA, SabA, OipA, HopZ, iceA, AlpA ve AlpB adezyon faktörleri olarak tanımlanır (Şekil 5) (82,102).



Şekil 5. *Helicobacter pylori*'nin kolonizasyon ve tutunmadaki virulans faktörleri (74,95)

2.4.2.1. Adezyon Molekülleri

Kan grup antijen bağlayan adezin (BabA) (HopS), insan gastrik epitel hücre yüzeyindeki fukosillenmiş glikokonjugatlar içeren Lewis b (Le^b) kan grubu antijenine (α -1,3/4 difukosillenmiş) *H. pylori*'yi bağlayan adezin BabA, *babA* geni tarafından kodlanan 75-kDa'luk bir adezyon proteini/molekölüdür (63,64,103-105). BabA *H.pylori*'nin en önemli adezinidir. BabA eksprese eden suşlar gastrik epitel hücrelere daha sıkı adhere olmaktadır ve BabA ekspresyonu hastalık şiddetini etkileyebilmektedir (61,106). *H. pylori* J99 suşunda BabA eksprese edilirken, *H. pylori* 26695 suşunda eksprese edilmediği bildirilmiştir (107). Üç *bab* alleli vardır: *babA1*, *babA2* ve *babB*, bunlardan yalnızca *babA2* Le^b 'ye

bağlanabilmektedir (64,82). Yalnızca *babA2* alleli aktif bir adezin kodlayabilmektedir (105). *BabA2*'nin ülser ve adenokarsinoma gelişimi için yüksek risk oluşturduğu ve *vacAs1* ve *cagA* genotipiyle güçlü ilişkisi olduğu gösterilmiştir, ancak hastalık belirteci olmayabilir, diğer çalışmalar ise *babA2* ya da *cagA* ile klinik bulgular arasında bir korelasyon olmadığını göstermiştir (82,108). *babA2* ekspresyon paterni antrum ve korpus arasında farklılık göstermekte, *bab* adezin geninin metastabil olduğu, antrumda daha fazla eksprese edildiği ve konak çevresindeki değişikliklere *babA* geninin adapte olabildiği bildirilmiştir (108). *BabA* duodenal ülserler ve gastrik kanser gibi hastalık belirtileri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (86).

Sialik asit bağlayan adezin (SabA) (HopP) (HP0725), eritrositler, nötrofiller, ekstrasellüler matriks proteini laminin ve inflame gastrik dokuda eksprese edilen sialik asit içeren glikokonjugatlara *H. pylori*'nin bağlanmasını düzenlemektedir. *SabA* sialil-Le^x ve sialil-Le^a antijenlerine bağlanır ve nötrofillerin aktivasyonunda görev alır. *H. pylori*'nin indüklediği gastrik karsinoma sialillenmiş Le^x ve sialillenmiş Le^a tarafından sialillenmemiş Lewis antijenlerinin yer değiştirmesi ile ilişkilidir (99,109). Ayrıca, *H. pylori*'nin aderansı için fonksiyonel reseptördür (110). *sabA* ekspresyonu pH 5'te azalır, intestinal metaplazi ve gastrik atrofide yükselir (111).

Dış membran inflamatuvar proteini (OipA) (HopH) (HP0638), peptik ülser ya da kansere neden olan gastrik mukozanın farklı patolojik hasarı ve bakteriyel adezyona neden olan geniş bir dış membran protein, "Hop protein" ailesinin 34-kDa'luk proinflamatuvar yanıt indükleyen protein olarak tanımlanan bir üyesidir (109,112). Bütün *H. pylori* suşlarında bulunmakta fakat ekspresyonunda suşlar arası *oipA* geninin 5' ucundaki değişken sayıda CT dinükleotit tekrarları aracılığı ile varyasyon bildirilmektedir (109). *OipA*'nın fonksiyonu hala daha tam olarak bilinmemekle birlikte, *OipA*'nın ekspresyonunun *cagPAI*, *vacAs1* ve *babA* virulans faktörlerinin varlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (103,113). *OipA*'nın IL-8 üretimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (109).

Aderans-ilişkili lipoprotein (AlpA ve AlpB) gastrik kolonizasyon için efektör bir proteindir. *AlpA* ve B, *H. pylori*'nin gastrik dokuya bağlanmasında gereklidir. *AlpA* tipik lipoprotein sinyal sekansı, *AlpB* ise karakteristik standart sinyal sekansı taşır. Konakla *H. pylori* arasındaki bağlanmada rol alan reseptör tam olarak tanımlanamamıştır (114). *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 (81).

Diğer bir adezyon molekülü *epitel ile etkileşim tarafından indüklenen gen (iceA)*'dır. *H. pylori* ve insan epitel hücresi arasındaki ilişki ile *iceA1* ekspresyonu upregüle olur (61,64,82). *iceA1* ve *iceA2* genin allelik varyantıdır. Peptik ülser ile ilişkili olan *iceA1* pozitif suşta IL-8 üretimi artmaktadır (82,88,106). *iceA1* ekspresyonu konak mukozal yanıt ile ilişkilidir ve *iceA2* ekspresyonunun tekrarlayan protein yapısına sahip gen ile etkilenebildiği bildirilmiştir (82). Bir diğer *H. pylori* dış membran proteini **HopZ** ise, vital adezin proteinidir ve primer olarak bakteri yüzeyinde yerleşir. *hopZ* geni belirgin olarak *H. pylori* yoğunluğu ve kolonizasyon yeteneği ile ilişkilidir (115).

2.4.3. Sitotoksin ilişkili gen A (*CagA*)

Oldukça immünojenik bir protein (*CagA*) kodlayan *cagA* geni, en kapsamlı çalışılmış olan *H. pylori* virulans faktörüdür. *cagA* geni *cag* patojenite adası (PAI)'nın bir ucunda lokalize yaklaşık 40-kbp'lik bir bölgedir (56). G+C içeriği (%35) genomun tümünün G+C içeriğinden (%39) farklı olduğu için başka organizmalardan horizontal transfer ile kazanıldığı düşünülmektedir (116). *cag* PAI tarafından kodlanan 18 protein, *CagA*'nın, peptidoglikanın ve diğer bakteriyal faktörlerin konak hücrelere aktarıldığı, şırınga şeklindeki yapısı ile gastrik epitel hücrelere penetre olabilme yeteneğine sahip tip IV sekresyon sistemini oluşturur (56,109).

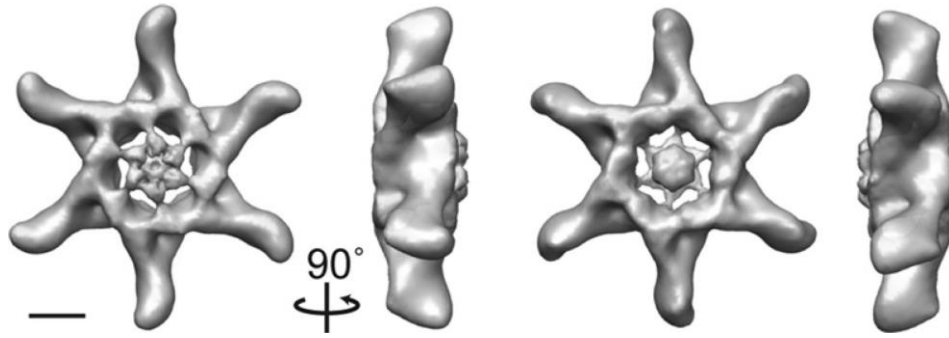
cag PAI'nin sağ ucu delesyon, insersiyon ve değişim motiflerine göre beş alt tipe ayrılır. Tip I etnik Avrupa grupları ve Afrika suşlarında en yaygındır; tip II Doğu Asya ve tip III ise Güney Asya suşlarında predominanttır. Tip IV çok nadir olmakla birlikte spesifik bir coğrafik bölgede görülmemektedir. Tip V ise Calcutta, Hindistan'da birkaç suşta yeni bulunmuştur (56).

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 (117). Avrupa ve Afrika'dan izole edilen suşların yaklaşık %20-40'ı *cagA*-negatif, doğu Asya'dan izole edilen *H. pylori* suşlarının çoğunun *cagA*-pozitif olduğu bildirilmiştir (56,118). Batı ülkelerinde, *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 (56,119,120). EPIYA-A ve EPIYA-B bölgesi primer olarak CagA ile membranın ilişkisinden sorumludur (117). EPIYA motiflerinin sayısı ile farklı gastroduodenal hastalıklar arasında korelasyon olmadığı gösterilmiştir (118).

2.4.4. Vakuol oluşturan sitotoksin A (*VacA*)

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 (Şekil 6) (21,51,63,119). VacA toksini AB grubu toksinlerdendir, A-alt ünitesi enzimatik aktiviteden sorumlu, B-alt ünitesi ise hedef hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlanma ve tanımadan sorumludur (51).



Şekil 6. VacA dodekamerinin yaklaşık 15- Å 3D yapılandırılması. Yapı, önemli iki özellik içerir: distal uçta ince bir kıvrım ile genişletilmiş düz “kollar” ve daha ince bir yoğunlukluk ile ayrılan, iki farklı globüler domainden oluşan merkezi bir jant teli-benzeri yoğunluk. Yapı, dikey eksen etrafında 90° döndürülmüştür (120)

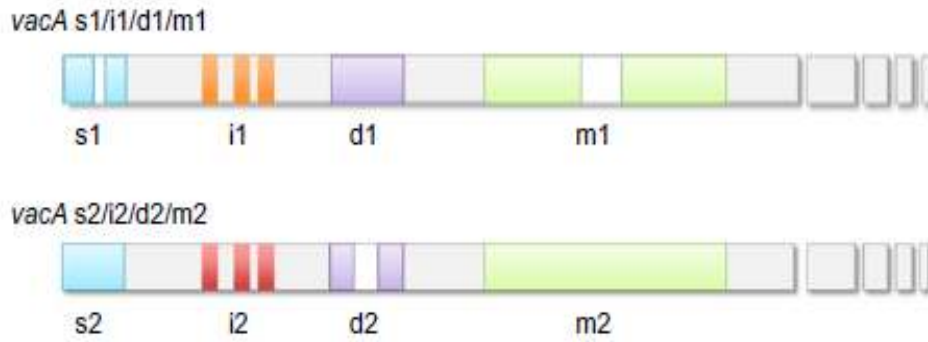
VacA, ikinci en kapsamlı çalışılan *H. pylori* virulans faktörüdür. *cagA*'dan farklı olarak tüm *H. pylori* suşları vakuol oluşturan sitotoksin üreten *vacA* genine sahiptir. VacA vakuol oluşumunu, membran-kanal oluşumunu, apoptozise yol açan mitokondriden sitokrom c salınımını, proinflatuar yanıtın başlangıcı ile devam eden hücre-membran reseptörlerine bağlanma gibi birden çok hücrel aktiviteyi indükleyebilir (56).

vacA yapısındaki sinyal (s) bölgesindeki farklılıklar (s1 ve s2) ve orta (m) bölgesindeki farklılıklar (m1 ve m2) farklı *H. pylori* suşlarının vakuol oluşturma aktivitesindeki varyasyonlara neden olduğu bildirilmektedir (Şekil 6). *in vitro* deneyler s1m1 ve sonrasında

s1m2 suşlarının en sitotoksik özellikte olduğunu göstermiştir. s2m2 suşlarının sitotoksik aktivite göstermedikleri, s2m1 suşlarının ise çok nadir sitotoksik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (56).

vacA'nın üçüncü hastalık ilişkili bölgesi ise s ve m bölgeleri arasında tanımlanan “intermediate” (i) bölgesidir (Şekil 6-7). s1m1 ve s2m2 suşları sırasıyla i1 ve i2 olarak sınıflandırılmalarına rağmen s1m2 suşları ya i1 ya da i2 olarak sınıflandırılır ve i1 suşlarının daha patojenik olduğu gösterilmiştir (56).

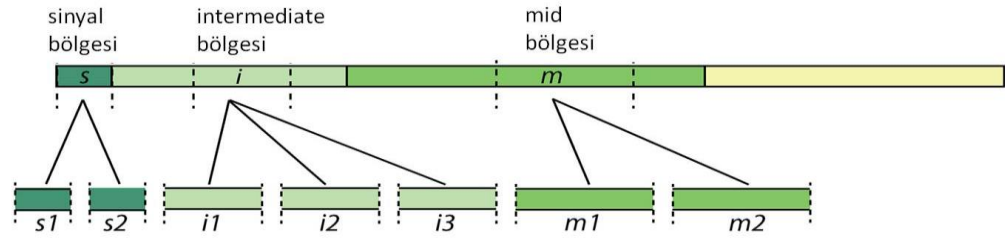
Dördüncü ve olası hastalık-ilişkili bölge ise i ve m bölgeleri arasında lokalize olan delesyon (d) bölgesidir (Şekil 7). d bölgesi de d1 (delesyonsuz) ve d2 (69-81 bp'lik delesyon) alt bölümlerine ayrılabilir. i ve d bölgelerinin rolleri hala tartışmalıdır, m bölgesinin tipi gastrik kanser için en iyi marker olabileceği bildirilmiştir (56).



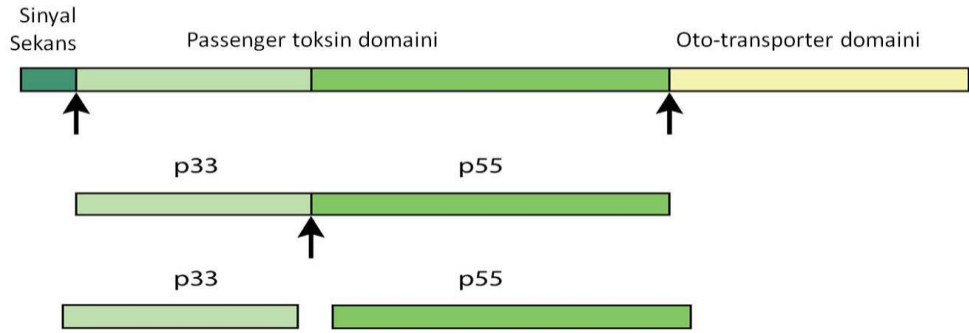
Şekil 7. *vacA* allellerinin şematik gösterimi (56)

vacA geni, 140 kDA'luk pro-toksin kodlar. Pro-toksin; bir sinyal sekansı, bir “passenger” domain ve bir oto-taşıyıcı domain içermektedir (Şekil 8).

A Gen Yapısı

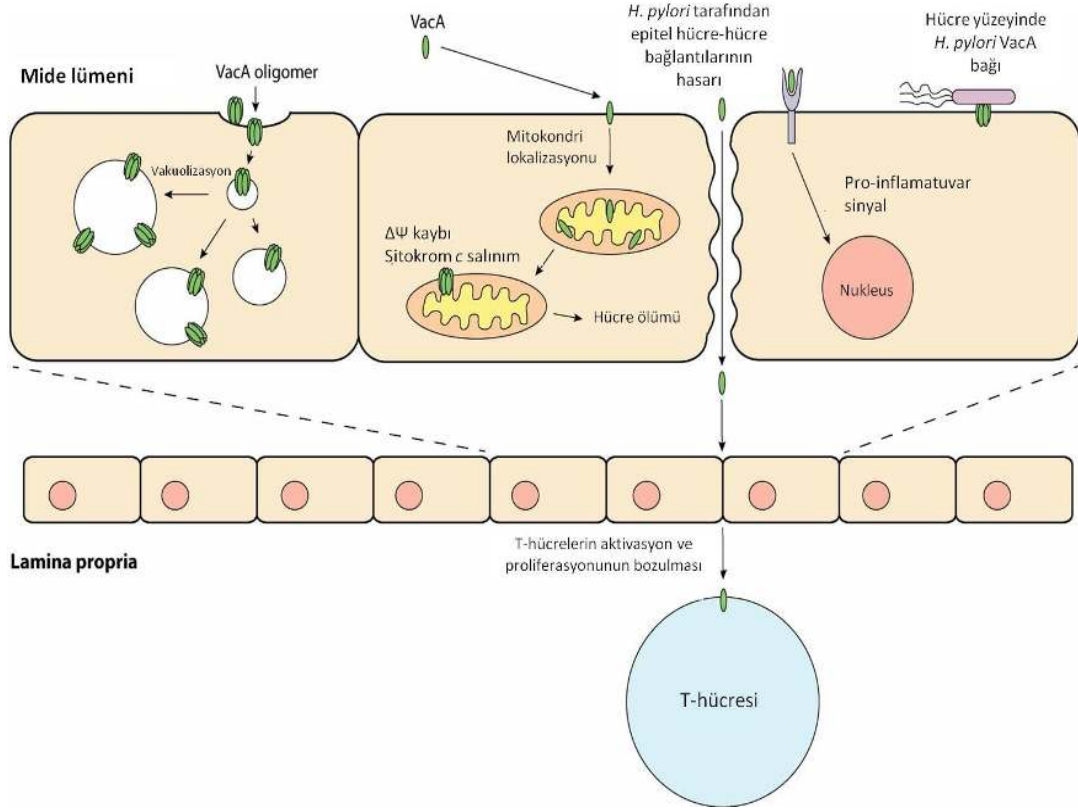


B Protein Yapısı



Şekil 8. VacA allelik çeşitliliği ve yapısı. A: *vacA* gen yapısı, B: *vacA* geninin kodladığı 140 kDa'luk pro-toksin (74,119)

VacA, epitel hücre membranlarının depolarizasyonu, vakuolizasyon, membran kanal formasyonu, apoptoz, epitel hücre bağlanması inhibisyonu ve T hücre aktivasyonunun inhibisyonu gibi hücresel aktiviteleri indüklemektedir (Şekil 9) (54,56,86,105). *vacA*'nın üreaz aktivitesini artırarak *H. pylori* patojenitesini arttırabildiği düşünülmektedir (121).



Şekil 9. Multi-fonksiyonel toksin, VacA (119)

vacA geni tüm *H. pylori* suşlarında bulunur ancak, *H. pylori* suşlarının hepsi VacA proteinini salgılamazlar. VacA proteini salgılanması, CagA proteini varlığı ile ilişkilidir (54). Suşların %50-65'i sitotoksin üretir ve *in vitro* olarak HeLa hücrelerinde ve *in vivo* gastrik epitel hücrelerde vakuolizasyonu indüklemektedir (122). VacA pozitif *H. pylori* suşlarının çözünabilir formda bir sitotoksin salgıladığı ve dış membran vezikülleri (OMV) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu küçük membranöz yapılar *in vitro* ve *in vivo* olarak *H. pylori*'nin yüzeyinden oluşmaktadır (123). *vacA* m1 alleli sıklıkla epitelyal hasar, atrofik gastrit ve intestinal metaplaziyi içeren gastrik değişiklikler ve gastrik karsinoma ile ilişkilidir. Ayrıca, hem s1 hem de m1 allellerini taşıyan suşların da insan gastrik mukozasında polimorfonükleer lökosit (PMN) infiltrasyonu ve bakteriyel yük artışı, duodenal ve gastrik ülserasyon, gastrik kanser ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (124).

2.5. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Tanısı

H. pylori enfeksiyonu ile ilişkili olan peptik ülser hastalığı ve gastrik MALT lenfomanın doğru tedavisinde efektif tanı metodları gereklidir. *H. pylori* enfeksiyonu tanısında endoskopi gerektiren invaziv ve gerektirmeyen non-invaziv yöntemler kullanılmaktadır (8).

2.5.1. İnvaziv Testler

İnvaziv testler *H. pylori* tanısında kullanılan ilk testlerdir. Mideye genellikle fiber optik endoskopi ile girişim yapılır ve biyopsi örnekleri gereklidir. Diğer daha az invaziv yöntemler önerilmiştir örneğin; bir nazogastrik tüp kullanılarak gastrik sıvı eldesi mümkündür. Gastrik sıvı *H. pylori*'nin kültür, boyama, üreaz testi ve PCR testleri ile saptanmasına izin verir fakat gastrik biyopsi örneklerinden daha az güvenilirdir. Diğer bir daha az invaziv yöntem olarak oro-gastrik fırça önerilmiştir. Fırça mide mukozasına üç veya dört kez uzatılır ve geri çekilir. *H. pylori* tanısında hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (8).

2.5.1.1. Kültür

Kültür için en iyi örnekler endoskopi sırasında elde edilen biyopsi örnekleridir. Hastanın antibiyotik veya antisekretuar ilaçları (özellikle proton pompası inhibitörleri, PPI) almamış olması önemlidir. PPI'ların direkt antimikrobiyal etkisi olmasada indirekt olarak pH değişikliği ile midede *H. pylori* dağılımını etkiler ve böylece antrumda yok olmasına, görülmemesine yol açar. Antrumdan alınan tek bir biyopsi güvenilir bir tanı için etkili değildir çünkü *H. pylori* midede yama tarzı dağılım gösterir. Bu nedenle de daha fazla biyopsi örneğinin analiz edilmesi *H. pylori*'nin saptanma şansını artırır. Antrumdan iki biyopsi ve korpustan iki biyopsi (anterior ve posterior korpus) alınması önerilmektedir. Kültür için önemli kriterlerden birisi biyopsi örneklerinin endoskopi ünitesinden laboratuvara taşınmasıdır. Bu basamaktaki problemler birçok kültür başarısızlığının nedenleridir. *H. pylori* narin bir mikroorganizmadır, transport sırasında oksijenle temasından ve oda sıcaklığından korunmalıdır. Biyopsi örneklerinin bir transport ortamında taşınması gereklidir. Eğer taşıma koşulları uygun değilse biyopsi örneklerini -70 °C 'de veya sıvı nitrojende dondurmak daha iyidir. Bakteriler biyopsi örneklerinde homojen olarak dağılmadıkları için biyopsi örneklerini parçalayıp kültür için ekim yapmak gereklidir. Elektriksel/mekanik parçalayıcı ve bir miktar sıvı besiyeri kullanımı önerilmektedir. Diğer bir ihtimal ise tek kullanımlık bir materyal ile biyopsinin manuel olarak parçalanmasıdır (8).

H. pylori'nin üremesindeki zorluklardan dolayı kültür için kullanılan besiyeri tek bir içeriğe sahip değildir; agar, üreme destekleyici ve seçici supplementler içerir. Birçok agar *H. pylori*'nin üremesi için uygundur örneğin; beyin kalp infüzyon agar, Columbia agar, Wilkins Chalgren agar. Üremeyi güçlendirmek amacıyla birçok besin maddesi (vitaminler, oligoelementler vs.) içeren kan veya serum eklemek gereklidir. Kan veya serumun oranı %5, %7 veya %10 olabilir. Kan olarak koyun veya at kanı eklenebilir. Egg yolk, kömür, nişasta, bovin serum albümin (BSA), katalaz da üremeyi desteklemek için kullanılabilir. Kullanılabilecek diğer bir ek madde ise *H. pylori* kolonilerinin tanımlamada yardımcı olabilecek 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorid (40mg/lt) dir. Bu bileşik *H. pylori* tarafından çözilemeyen kırmızı formazan komplekslerine indirgenir ve kolayca ayırt edilebilen pigmentli altın koloniler oluşur. Seçici supplementler kontaminasyonu önlemek için önemlidir. Vankomisin veya teikoplanin Gram pozitif kokları inhibe etmek için; polimiksin, nalidiksik asit, kolistin, trimetoprim veya sefsulodin Gram negatif basilleri inhibe etmek için ve nistatin veya amfoterisin B ise fungusları inhibe etmek için kullanılır. DENT supplementi ticari olarak elde edilebilen seçici bir supplementtir (8).

Kültür için kritik noktalar nemin muhafaza edilmesi ve ışıktan korumasında kapalı kutularda 4°C'de saklanan taze besiyeri kullanımıdır (1 haftadan az). *Helicobacter* türleri mikroaerofilik ve kapnofilik bakterilerdir. Mikroaerobik atmosfer sağlamak için çeşitli sistemler kullanılabilir. Örneğin; mikroaerobik kabinet veya ayarlanabilir gaz seviyesi olan bir inkübatör, jar içinde H₂-CO₂ oluşturan paketler. Kültür için gereken optimal sıcaklık 37°C'dir. Primer kültür için optimal koşullarda koloniler üç günden sonra görülebilir. Bununla birlikte negatif kültür durumunda 7-10 gün inkübasyon önerilmektedir. Subkültürler sadece 2-3 gün inkübe edilir. Koloni az olduğunda subkültürün agar yüzeyinde küçük bir bölgeye yapılması önerilmektedir. *H. pylori* üreme eğrisine ulaştığında kokoid forma döner ve canlılığını yitirir, bu durum daha çok besin maddelerinin tükenmesinden kaynaklanır. Kültür desikasyona dayanır; hava ile temas ve sıcaklık koşulları optimum olduğunda duyarlılığı %95'e ulaşır. Özgüllüğü ise %100'dür; çünkü bakteri ürettiğinde tüm fenotipik ve genotipik testleri yapılabilir. *H. pylori*'nin fenotipik identifikasyonunda kültür yapıldıktan üç ile dört gün sonra küçük sirküler düzgün kolonilerin görülmesi önemli bir kriterdir. *H. pylori* kolonilerinin hemolitik aktivitesi yoktur fakat 4 °C'de birkaç gün sonra gözlenebilir (8).

Kültürde üreyen bakterilerin identifikasyonu bazı enzimlerin varlığı yardımıyla olur; sitokrom oksidaz, katalaz, üreaz. Sitokrom oksidaz *Epsilonproteobacteria* sınıfının tüm

üyelerinde bulunmaktadır. Bu enzim genellikle bir disk veya strivin üzerindeki özel reaktifler ile saptanır. Katalaz enzimi de tüm *Helicobacter* türlerinde bulunmaktadır ve bir öze dolusu bakterinin bir damla hidrojen peroksit içerisinde gaz kabarcıkları çıkarması ile saptanır. *H. pylori*'nin katalaz negatif mutantları da tanımlanmıştır. Üreaz identifikasyon için en önemli enzimdir. *H. pylori*, ekolojik nişinde yaşayabilmesi için fazla miktarda üreaz enzimi üretir ve asidik ortamda hayatta kalabilmesi için kendisine bir mikro çevre yaratır. Mobley ve arkadaşları, *H. pylori*'de total protein içeriğinin %6'sının üreazdan oluştuğunu bildirmişlerdir. Diğer tanı testleri ya hızlı üreaz testi ve üre nefes testi gibi doğrudan üreaza dayalıdır ya da seroloji ve PCR'da olduğu gibi üreaz genleri hedef alınarak kısmen üreaza dayalıdır (8).

Campylobacter türlerini ayırdetmek için tolerans testleri içinde, *H. pylori* 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorid (0.4 ve 1 mg/litre), sodyum selenit (%0.1), glisin (%1) ile üreyebilir fakat glikoz (%8) ve sodyum klorid (%3.5) ile üreyemez. *H. pylori* sefalotine duyarlıdır, nalidiksik aside bazı istisnalar dışında dirençlidir (8).

Bakteri gastrik biyopsi örneklerinden izole edildiğinde fenotipik testler kesin identifikasyon için yeterlidir. Fakat bakteri dışkı, salya ve çevre gibi diğer örneklerden izole edildiğinde fenotipik testler kesin identifikasyon için yeterli değildir. Çünkü aynı özellikleri taşıyan diğer bilinen veya bilinmeyen bakteriler de bulunabilir. İdentifikasyonu moleküler metodlar ile doğrulamak gereklidir. Eğer doğrulama için PCR metodu uygulanırsa en az iki farklı geni hedefleyen birkaç PCR reaksiyonu eş zamanlı olarak pozitif olmalıdır. Kültür, antimikrobiyal duyarlılık testlerini uygulamak ve gerekli olduğunda suş tiplendirilmesi için önemli bir basamaktır (8).

Kokoid formlar: Besin maddesi yetersizliğinde *H. pylori* spiral şeklini kaybeder ve kokoidal forma döner. Birçok kişi bu formların kültüre edilemeyen cansız formlar olduğunu savunmaktadır. Bununla birlikte diğerleri ise bazı kokoid formların canlı olabileceğini fakat kültüre edilemeyeceğini ve bakterinin bir dirençli formunu oluşturduğunu iddia etmektedir. Koloniler optimal büyüklüklerine ulaşır ulaşmaz subkültürlerinin yapılması önemlidir çünkü sonrasında ölebilirler (8).

Diğer Kültür Örnekleri: Gastrik sıvı tüm mideyi yansıtır ve elde edilmesi (ör; nazogastrik tüp uygulaması) biyopsi örneklerine göre daha kolaydır fakat yine bir invaziv prosedür gereklidir. *H. pylori* mide sıvısında bulunur fakat kültürün duyarlılığı biyopsi örneklerine göre çok daha düşüktür.

Kan örneklerinde ise ülserasyon ve hemoraji durumlarında *H. pylori* gastrik mukozadan kan dolaşımına geçebilir fakat regüler kan kültür sistemleri *H. pylori* 'nin üremesi için optimal olmayabilir (8).

2.5.1.2. Histopatolojik Tanı

Histopatolojik tanı için biyopsi örnekleri alınır alınmaz %10 formaldehit içerisine konulmaktadır. Herhangi bir transport problemi yoktur, materyal oda ısısında gönderilebilir ve enfeksiyöz değildir. Bu fiksatif bakterinin morfolojisini korumaktadır ve birçok boya kullanılabilir (8).

H. pylori'ye spesifik bir boya bulunmamaktadır. Rutin hematoksilin-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. *H. pylori*'ye özel hem bakteri hem de gastrit lezyonların gözlemlenebildiği Genta boyası önerilmiştir (8).

Güncelleştirilmiş Sydney sistemine göre erişkinde antrumdan iki biyopsi, korpustan iki biyopsi ve “incisura angularis”ten de bir biyopsi alınmalıdır. Gastrik aktivite açısından (0 ile 3 skalada); yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3) olarak *H. pylori* bakteriyel dansitesi ve gastrik mukozanın histolojik karakteristikleri (inflamasyon PNL, aktivite lenfositler, atrofi, intestinal metaplazi) yönünden Güncelleştirilmiş Sydney sistemine göre değerlendirilmektedir (8,125).

H. pylori enfeksiyonunun histopatolojik tanısı patoloğun deneyimine bağlıdır ve tanısı zaman almaktadır. Spesifik *H. pylori* antikoru ile immün boyama yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermektedir. Ayrıca, digoksinin ya da florosein ile işaretlenmiş 16S rRNA gen probu kullanılarak uygulanan floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) metodu geliştirilmiştir (8).

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 (8). Yüksek duyarlılığa sahip olmasına rağmen, biyopsinin alındığı bölge, biyopsi sayısı ve biyopsinin boyutu tanı kesinliğini etkilemektedir. “Patchy” dağılım nedeniyle yanlış tanıya neden olabilmektedir (126). Maastricht IV Konsensus Raporu'na göre, eğer mümkünse histopatoloji uygulanmadan iki hafta önce PPI kullanımının bırakılması gerektiği bildirilmiştir (127,128). Peptik ülserli kanamalı hastalarda *H. pylori* tanı testlerinin duyarlılığını kanamanın

azalttığı bilinmektedir, fakat Choi ve arkadaşları, kanama varlığında bile histopatolojinin oldukça güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (128).

2.5.1.3. Üreaz Testleri

Üreaz testleri basit, ucuz ve uygulaması kolay testler olduğundan yaygın bir şekilde kullanılır. Endoskopi sırasında uygulanabilir ve hızlıca sonuç verebilir (8).

H. pylori kuvvetli üreaz enzimi üreten bir bakteridir. Kandan gastrik mukozaya difüze olan üre konsantrasyonunun düşük olduğu ekolojik çevresine uyum sağlamak için *H. pylori* fazla miktarda üreaz üretir. *H. pylori* üreazı bakteriyal üreazlar içinde en yüksek spesifik aktiviteye (36 ± 28 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) sahiptir. Diğer üreaz-pozitif *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. gibi bakteriler de gastrik mukozada mevcuttur fakat daha düşük miktarda üreaz ürettikleri için kısa süreli saptama (<2 saat) için engel teşkil etmezler. Bu da metodu *H. pylori*'ye spesifik yapar. *H. pylori* içeren biyopsi örneği üre yönünden zengin bir ortama konulduğunda, *H. pylori*'nin üreaz enzimi üreyi karbondioksit ve amonyağa parçalar. Amonyum iyonları pH'ı yükseltir ve fenol red gibi bir pH indikatörü ortamın rengini sarıdan pembe ya da mora çevirir. Christensen's üreli besiyeri kullanılabilir. İlk kuşak ticari kitler agar temelliydi, örneğin; CLO test (Kimberley-Clark, Neenah, WI). Yeni nesil kitler ise strip temellidir (PyloriTek, Serim, Elkhart, IN) (8).

Üreaz testinin sonucunu etkileyen faktörler: Üreaz testinin sonucunu etkileyen faktörlerden birisi yeterli bir duyarlılık elde edebilmek için gerekli olan bakteriyal yüküdür. Geçerli bir sonuç için en az 10^5 bakteri gereklidir. Bu miktar eradikasyon tedavi başarısızlığından dört hafta sonra mevcut olmayabilir ki bu da testi tedavi sonrası takip için uygun olmadığını gösterir. Bu alandaki en büyük gelişme 1995 yılında strip temelli testlerin (PyloriTek) geliştirilmesidir. Histopatoloji referans metod olarak kullanılıp CLO test ile karşılaştırıldığında (2 saat sonunda değerlendirme ile) PyloriTek'in duyarlılığı % 99 özgüllüğü ise % 95 olarak saptanmıştır (8).

Gastrik biyopsi örneği dışındaki diğer örneklerin (örneğin oral örnekler) üreaz testi için kullanımından kesinlikle kaçınılmalı çünkü birçok diğer üreaz pozitif bakteri (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., vb) bulunabilir ve yanlış pozitif sonuçlar verebilir (8).

2.5.1.4. Moleküler Yöntemler

PCR metodu 1980'lerde geliştirilmiştir ve hemen sonrasında *H. pylori* saptanması için kullanılmıştır. *Thermophilus aquaticus* (*Taq polimeraz*)'dan elde edilen ısıya dayanıklı DNA

polimerazın kullanımıyla PCR DNA ile yapılan çalışmaların yönünü değiştirmiştir. *H. pylori*'de PCR uygulamaları sadece bakterinin saptanması için değil, aynı zamanda patogenezi ile ilgili spesifik genlerin (*cagA*) ve antimikrobiyal direnç ile ilişkili spesifik mutasyonların saptanması için kullanılır (8).

2.5.1.4.1. *Helicobacter pylori* saptanması için kullanılan standart PCR yöntemi

Primerlerin dizaynında *H. pylori* için spesifik fakat tüm suşlar için korunmuş olması gereken hedef bölgenin seçimi çok önemlidir. Bu nedenle hedefin DNA dizisinin bilinmesi gereklidir. İlk kullanılan hedef genler üreaz operonunun genleri olan *ureA*, önceleri *ureC* olarak bilinen *glmM* ve 16S rRNA genleridir. 16S rRNA genini hedef alan primerler ile yapılan PCR'da insan doku örnekleri ile de reaksiyon görülmüştür (8).

PCR yönteminin dezavantajları arasında reaksiyonun duyarlılığını azaltan *Taq* polimeraz inhibitörlerinin muhtemel varlığı ve reaksiyonun özgüllüğünü değiştiren ekzojen *H. pylori* (*H. pylori* DNA'sı harici başka bir DNA) ile klinik örneğin olası kontaminasyonu belirtilebilir. *Taq* polimeraz inhibitörlerinin gastrik biyopsi örneklerinde bulunması nadirdir. Bu yüzden DNA ekstraksiyon prosedürü basitleştirilebilir. En basit teknik bakterileri ortaya çıkarmak amaçlı biyopsinin parçalanması ve 100 °C'de kaynayan lizis tamponu içinde bakteriyel lizizi içermektedir. DNA ekstraksiyonunu geliştirmek, iyileştirmek için fenol ekstraksiyonu ya da özel ekstraksiyon kitleri (QIAGEN) kullanılarak PCR inhibitörlerini elimine etmek basit kaynatma yöntemine göre daha başarılıdır (8).

Amplikon saptanmasının duyarlılığını arttırmak için amplikonların standart büyüklüklerine göre saptandığı elektroforez yerine bir prob hibridizasyon metodu kullanılabilir. Duyarlılıkta önemli bir gelişme real-time PCR protokollerinin oluşturulması ile meydana gelmiştir. Yeni bir metod referans metoda göre daha duyarlı olduğunda, her zaman sonuçların yalancı pozitif olmadığını kanıtlamak gerekmektedir. Örneğin hastanın birkaç ay takibinin sürdürülüp enfeksiyonun gerçekliği konfirme edilebilir. Yalancı pozitiflikler endoskopların ya da laboratuvar da biyopsinin parçalandığı materyalin düzgünce temizlenmemesinden kaynaklanmaktadır. Bu tarz kontaminasyonları önlemek için endoskopi ünitesinde tamamiyle kesin kurallara uygun bir temizleme protokolünün uygulanması ve laboratuvar da biyopsiyi parçalamak için tek kullanımlık materyallerin kullanılması önerilmektedir. Kontaminasyon için önemli bir risk ise amplikonlar elektroforez ile analiz edildiğinde görülür. Bu sebepten PCR'ın farklı basamaklarının uygulandığı birbirinden

bağımsız üç ayrı odanın olması gerekmektedir. PCR yönteminin avantajı zorlu transport koşullarına ihtiyaç duymamasıdır (8).

2.5.1.4.2. Real-Time PCR

Real-time PCR'ın ilk denemeleri 1999 ve 2001 yıllarında “LightCycler thermocycler” (Roche Diagnostics) ve DNA çift zinciri spesifik fluorofofor SYBR green 1 ile *H. pylori* suşları için gerçekleştirilmiş ve daha sonra gastrik biyopsi örneklerine uyarlanmıştır (43). Real-time PCR'ın prensibi gerçek zamanlı oluşan amplikonların artışının izlenmesidir. SYBR green I boyası gibi bir DNA bağlayan boya eklenerek ya da floresan rezonans enerji transfer (FRET) ilkesi kullanılarak gerçekleştirilebilir (8).

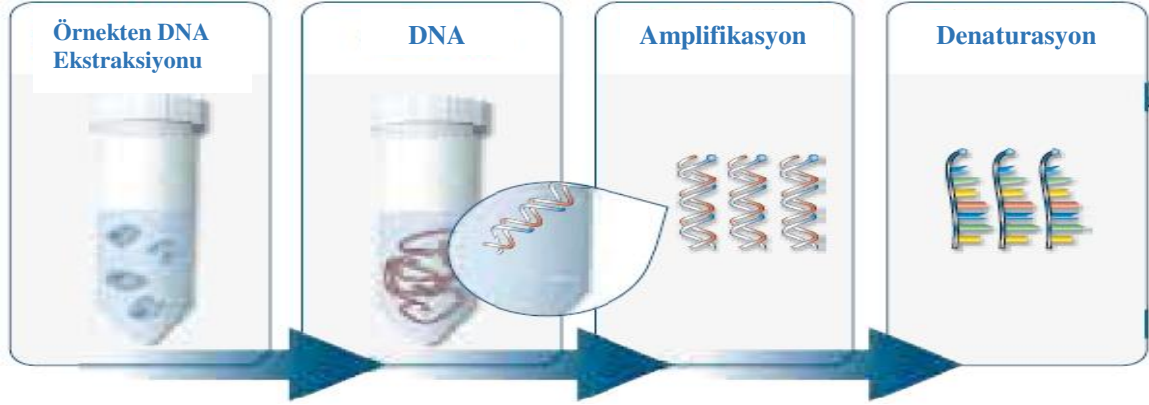
H. pylori'nin saptanması ve aynı zamanda klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarını belirlemek için “LightCycler thermocycler” ile FRET teknolojisi ve erime eğrisi analizi kullanılan biprob moleküler testler tanımlanmıştır. Bu biprob PCR metodlarının fenotipik metodlar ile elde edilen *in vitro* makrolid duyarlılığı ile çok iyi bir uyum gösterdiği, duyarlılık ve özgüllüğün de %95'ten yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda aynı zamanda, çok az sayıda *H. pylori* enfeksiyonunun kültür ile saptanamayıp sadece bu PCR yöntemleri ile saptanabildiği bildirilmiştir. 2004 yılında tanımlanan diğer biprob real-time PCR yöntemi ise, aynı cihaz kullanılarak hem gastrik biyopsi hem de dışkı örneklerine uygulanabilen, *H. pylori ureA* ve 23S rDNA'sının saptanmasına dayanan bir protokoldür (43).

2.5.1.4.3. GenoType HelicoDR Moleküler Testi

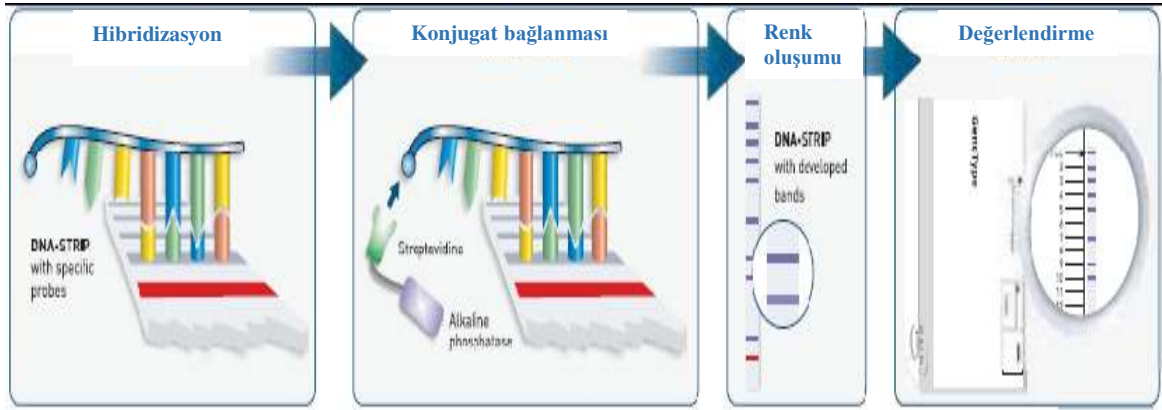
GenoType HelicoDR testi, kültür ve biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin saptanmasını, aynı zamanda 23S rRNA geni 2146 ve 2147 pozisyonlarında klaritromisin ve/veya *gyrA* geni 87. ve 91'inci kodonda florokinolon direncine neden olan en yaygın mutasyonların belirlenmesini sağlayan, iki tanısal testi tek bir prosedürde birleştiren multipleks PCR ve DNA-strip hibridizasyon teknolojisine dayanan ilk moleküler genetik testtir (43,129).

GenoType HelicoDR testi; kültür ya da biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu (Şekil 10), biyotinlemiş primerler ile multipleks PCR, “reverse” hibridizasyon aşamalarını içermektedir. Hibridizasyonda; amplifikasyon ürünlerinin kimyasal denatürasyonu, tek iplikli ve biyotin işaretli amplikonların strip membranına bağlı problara hibridizasyonu, hibridize olan amplikonların “stringent” solüsyonu ile daha kuvvetli bağlanması ve bağlanmayan amplikonların uzaklaştırılması, konjugat streptavidin/alkalin fosfataz ile alkalin fosfataz aracılı reaksiyon sonucunda DNA strip membranındaki bant paternlerine göre *H. pylori*

varlığı, klaritromisin ve/veya florokinolon duyarlılıkları değerlendirilmektedir (Şekil 11) (130).



Şekil 10. Kültür ve biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu ve GenoType HelicoDR testi hibridizasyon öncesi aşamaları (131)

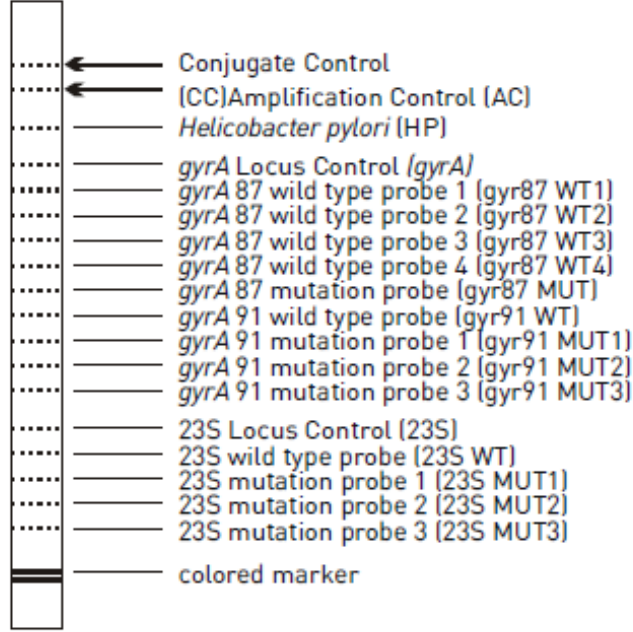


Şekil 11. GenoType HelicoDR testinin hibridizasyon ve değerlendirme aşaması (131)

DNA stripleri amplifiye edilen nükleik aside (amplikon) komplementer olan spesifik problemlerle kaplıdır. Denatürasyondan sonra tek iplikli amplikon problemlere bağlanır (hibridizasyon) ve enzimatik renk reaksiyonu ile görünür hale gelerek, DNA stribinin üzerinde spesifik bant paterni oluşmaktadır (Şekil 11). Her stripte bulunan konjugat kontrol bantı renk reaksiyonunun etkinliğini gösterir, amplifikasyon kontrolü ise testin doğru uygulandığını gösterir (131).

Stripler üzerinde toplam 18 reaksiyon bölmesi bulunmaktadır. Bunlardan dördü testin doğru performansını ve solüsyonların çalıştığını valide edilmesini sağlayan dört kontrol bölgesidir: konjugatın stribe bağlandığını ve doğru kromojenik reaksiyonu kontrol etmek için

bir konjugat kontrol bölgesi (CC), başarılı bir amplifikasyon reaksiyonunu kontrol etmek için bir amplifikasyon kontrol bölgesi (AC) ve reaksiyonun test edilen gen lokusları için optimal sensitivitesini kontrol eden iki lokus kontrol bölgesi (23S rRNA ve *gyrA*) (Şekil 12) (130).



Şekil 12. GenoType HelicoDR stribi

GenoType HelicoDR, *H. pylori*'nin kültür ve biyopsi örneklerinden hızlı ve güvenilir saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. *H. pylori* eradikasyon tedavi başarısızlıklarını en aza indirmek için direkt biyopsi örneğinden beş saat içerisinde klaritromisin ve/veya florokinolonlara duyarlılıklarını göz önünde bulundurarak hemen tedaviye başlanabilir. Konvensiyonel metodlar ile karşılaştırıldığında kültür temelli metodlara kıyasla GenoType HelicoDR canlı bakteri gerektirmediği için örneklerin transportu ve saklanması daha az kritiktir ve zaman kazandırıcı, güvenli, basit ve hızlı bir testtir (129).

GenoType HelicoDR testinin izole edilen suşlara ya da direkt biyopsi örneklerine uygulandığında kültüre etkili bir alternatif olabileceği bildirilmiştir. Bu testin ayrıca gastrik biyopsi örneklerinde birden fazla, farklı genotiplerde *H. pylori* suşlarını ya da biyopsi örneğinde saptanan bir *H. pylori* suşunda (aynı suşta) hem “wild type” hem de mutant allellerin varlığını saptamakta etkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, DNA stribinde elde edilen bantların bazen zayıf olması sonucunda suş karakterizasyonunu belirlemenin zor olabileceğine dikkat çekilmiştir ve bunun stripte hibridize olan ampikon miktarının standardizasyonunun olmayışından ve/veya hibridizasyon koşullarındaki (sıcaklık gibi) bazı

minör modifikasyonlardan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Diğer bir limitasyon ise *gyrA* mutasyonlarının 23S rDNA sekansında bulunanlardan çok daha çeşitli “diverse” olmasıdır. Aynı pozisyondaki bazı mutasyonlar florokinolon direncinde yer alırken, bazı mutasyonlar yer almamaktadır. Bu nedenle florokinolon direncini belirlemek için bir DNA sribi dizaynı oldukça zordur. Fransa’da çok merkezli bir çalışmada, suşların coğrafik orijininin de *gyrA* geni mutasyonlarının seçiminde göz önünde bulundurularak DNA sribi üzerinde yer alması gerekliliği bildirilmiştir (43).

2.5.2. Non-İnvaziv Testler

H. pylori’nin endoskopi aracılı direk tanısının çok kıymetli olduğu kanıtlanmış olmasına ve özellikle kültür optimal koşullarda uygulandığı zaman referans metod olarak değerlendirilmesine rağmen non-invaziv metodların gelişimini stimüle eden birçok dezavantajı vardır. Temel problem yöntemin invaziv girişimidir. Nazogastrik endoskoplar gibi küçük endoskopların bulunmasına rağmen invaziv testler birçok hastanın uzak durmak istediği rahatsızlığa neden olur. Anestezi kullanılabilir fakat çok düşük olsa da riskleri göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca endoskopinin masrafı yüksektir; tek kullanımlık forseplere ihtiyaç vardır, hastalar bir veya daha fazla iş gününü harcarlar. Diğer bir limit ise olası işleme hatalarına ve birden fazla biyopsi ihtiyacına neden olan midenin sadece küçük bir kısmının (800 cm² total yüzey alanının birkaç mm²’si) incelenebilmesidir. Endoskopi gerektirmeyen tanısallık testlerin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. *H. pylori* enfeksiyon ajanı olarak tanımlandığında ilk kullanılan test seroloji olmasına rağmen optimal özgüllük elde edilmesindeki zorluklar nedeniyle ÜNT, dışkı antijen testi gibi diğer metodlar önerilmiştir (8).

2.5.2.1. Üre Nefes Testi (ÜNT)

ÜNT altın standart yöntemlerden biridir (46). 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 ile salınmaktadır. Kişi *H. pylori* ile enfekte değil ise, işaretsiz CO₂ üretilmekte ve izotopların çoğu idrar ile atılmaktadır. ¹³C üre kullanıldığında, örnek test yapılmadan önce ve sindirimden 30 dk sonra toplanmaktadır. ¹³C/¹²C oranı her iki örnekte de ölçülmektedir ve sonuçlar bu iki ölçüm arasındaki farka göre ölçülmektedir. Bireyin diyetine göre nefesinde varolan ¹³C 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 (8). ^{13}C doğal olarak elde edilen kararlı bir izotop olduğundan çocuklarda ve hamilelerde kullanılabilir (126).

ÜNT, eradikasyon tedavisinin izleminde de kullanılmaktadır. Midedeki diğer üreaz pozitif bakteriler (*H. heilmannii*, *Proteus* spp.) pozitif sonuca neden olabilmektedir. Kanamalı ülser varlığında ya da gastrik biyopsi alınımından hemen sonra test yalancı negatif sonuç verebilmektedir (8). Antibiyotik tedavisi, ranitidin bizmut tuzlarının kullanımı veya PPI kullanımı ise yalancı negatif sonuçlara neden olabilir (126). 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 (132). Maastricht IV Konsensus Raporuna göre, yüksek tanı kesinliğine sahip olması ve kolay uygulanması açısından ^{13}C -UBT testinin *H. pylori* enfeksiyonu tanısında en iyi test olduğu bildirilmiştir (127).

2.5.2.2. Dışkı Testleri

Dışkı testleri, kolayca elde edilen dışkı örneğinde bakteri ya da bakterinin DNA'sı/antijeninin saptanması nedeniyle direkt non-invaziv test olmasının avantajına sahiptir. Midede *H. pylori* varsa dışkı örneğinde de olması beklenir (8).

2.5.2.2.1. Dışkı Kültürü

H. pylori safra tuzlarına (özellikle deoksikolik asit) ve diğer bakterilerden kaynaklanan vital kompetisyona duyarlı olduğu için kültüre edilemeyen formunda olabilir. Bu nedenle dışkı kültürü oldukça zordur. Ayrıca *H. pylori*'nin kültür örneklerinden izole edilebilmesi transport zamanına bağlıdır (8).

2.5.2.2.2. Dışkı PCR

Genellikle *H. pylori*'nin yaşayan tek bakteri olduğu gastrik biyopsi örneklerinin aksine, oldukça önemli olan PCR öncesi basamakları (örneğin; DNA ekstraksiyonu) dışkı örneklerinde ise çok komplekstir. Hedef DNA'nın az miktarda olması ve polimeraz reaksiyonunu inhibe eden maddelerin olmasının dışkı PCR başarısızlıklarından sorumlu olduğu bildirilmiştir (8). Bu inhibitörler hedef DNA amplifikasyonundan önce örnekten uzaklaştırılmalıdır. PCR inhibisyonunun dışkı süspansiyonunun dilüsyonu ile ortadan kaldırılabilirliği 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 (133). Esas olarak bitkisel orjinli kompleks polisakkaritler

olarak tanımlanan bu inhibitörler 48 saat sebzesiz diyet ile elimine edilmektedir. Bu bileşikleri önlemek için çeşitli metodlar önerilmiştir. Makroporlu polipropilen filtreler kullanılan QIAGEN ticari kitleri ile ekstrakte edilen DNA örneklerinde polisakkarit konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca *H. pylori*'yi hedefleyen spesifik gen bölgeleri kullanılması gerekmektedir çünkü dışkıda *H. cinadei*, *H. pullorum* ve *H. canis*'de bulunabilmektedir (8).

2.5.2.2.3. Dışkı Real Time PCR

Biprob teknolojisi kullanılarak dışkı örneklerinde *H. pylori* enfeksiyonunun saptanması ve klaritromisin direncinin belirlenmesinde real-time PCR tekniği kullanılmaktadır (8,11,135). *glmM* ve *recA* housekeeping genlerini hedefleyen biprob lar florofor Cy5 ile işaretlenmiş sekans spesifik problardır (11). Dışkı real-time PCR testi ("*H. pylori* ClariRes assay") *H. pylori*'yi saptayan duyarlılığı %69, özgüllüğü %100 ve klaritromisin duyarlılığını belirleyen (duyarlılık %83.3, özgüllük %100) invaziv olmayan ticari testtir (128).

2.5.2.2.4. Dışkı Genotiplendirme

Puz ve arkadaşları, dışkı örnekleri kullanılarak *H. pylori glmM* ve *recA* genlerini hedefleyen iki *H. pylori* spesifik biprob real-time PCR yöntemine dayanan noninvaziv bir genotiplendirme metodu geliştirmişlerdir. Suşlar arası farklılıklar ampikonların erime "melting" ısısındaki değişkenlikler ile belirlenmektedir. Dışkı örneklerinde bu testin duyarlılığı %92.2 ve spesifikliğı %100 olarak bildirilmiştir (11).

2.5.2.2.5. Dışkı Antijen Testleri

H. pylori antijenlerini dışkı örneklerinde saptamak için poliklonal ve monoklonal anti-*H. pylori* dışkı antijen testleri kullanılmaktadır. Avrupa'da 11 endoskopi ünitesinde çok merkezli çalışmada, dışkı antijen testinin duyarlılığı %94.1, özgüllüğü %91.8 saptanmıştır (8). Poliklonal enzim immünassay (EZ-STEP *H. pylori*)'in atrofik gastritli ve intestinal metaplazili hastalarda güçlü tanı performansına sahip olduğu ve TestMate pylori enzim immunoassay®'in ise PPI kullanımında bile güvenilir ve kullanışlı bir test olduğu bildirilmiştir (128). Monoklonal antikor temelli, dışkı örneklerindeki antijeni saptanmasını sağlayan antijen immünassay (Premier Platinum HpSA PLUS) testi duyarlılığı %96.6 ve özgüllüğü %94.9 bildirilmiştir (135). Monoklonal antikorların kullanıldığı, katalaz antijenini

saptayan Rapid TPAg, hızlı bir dışkı antijen testidir ve *H. pylori* eradikasyonunun belirlenmesi için tanı kesinliği %98 bildirilmiştir (128).

Dışkı antijen testlerinin bazı kısıtlılıkları vardır. Kabızlık antijenlerin parçalanmasına neden olurken, önemli bir dilüsyon faktörü var olmadıkça, kısa transport süresi değiştirilmemiş antijenlerin eliminasyonunu önlemektedir. Dışkıdaki en düşük konsantrasyon 24 saat bekletilme sonrasında saptanamayabilir. Pozitif örneğin saptanması için “cut-off” değerinin belirlenmesi önemlidir. Bu testler oldukça spesifik olmasına rağmen, dışkıda ender bulunan diğer *Helicobacter* türlerini de saptayabilmektedir (8).

Maastricht IV Konsensus Raporuna göre, dışkı antijen testleri için poliklonal antikorlar yerine monoklonal antikor testleri önerilmektedir (127,128).

2.6. Tedavi

H. pylori enfeksiyonu bireylerin yaklaşık %20'sinde semptomatiktir ve bu nedenle tedavi önerilmektedir. Genel olarak *H. pylori* tedavisinde PPI veya ranitidin bizmut sülfat ile birlikte iki antibiyotik olmak üzere üçlü tedavi kullanılmaktadır (136).

H. pylori çoğu antimikrobiyale *in vitro* duyarlıdır fakat *in vivo*, sadece birkaç antimikrobiyal enfekte hastaların tedavisinde kullanılabilmektedir. Bunun nedenleri; ilaç konsantrasyonlarının gastrik mukus tabakasında uygun seviyelere erişmesindeki yetersizlik, ilaçların düşük pH'da inaktivasyonu ve *H. pylori*'nin yavaş üremesidir (18). Eradikasyon oranının non-ülser dispepsiye göre peptik ülser hastalığında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (137).

“Maastricht Consensus Raporu” her beş yılda bir dünya çapında uzmanlar tarafından revize edilerek *H. pylori* enfeksiyonu tedavi seçenekleri belirlenmekte ve *H. pylori*'de antibiyotik direncine göre empirik tedavi değerlendirilmektedir (43). İlk Maastricht konferansından itibaren *H. pylori* enfeksiyonunu tedavi etmek için önerilen PPI-klaritromisin ve amoksisilin ya da metronidazol içeren üçlü tedavi oldukça yaygınlaşmış, evrenselleşmiştir fakat son zamanlardaki veriler, bu kombinasyonun etkinliğini kaybettiğini ve genellikle hastaların maksimum %70'inin sağaltımını sağlayabildiğini göstermiştir. Bu oranın ise başlangıçta amaçlanan %80'in altında ve bir enfeksiyon hastalığı için beklenenin çok altında olduğu bildirilmiştir (127).

Standart üçlü tedavinin etkinliğinin azalmasında tedavi uyumsuzluğu, yüksek gastrik asidite, bakteriyel yük, suş tipi gibi birçok açıklama bildirilmiştir fakat en önemli nedenin *H.*

pylori'de klaritromisin direncindeki artış olduğu belirtilmiştir. Klaritromisin içeren üçlü tedavinin başarı oranı klaritromisin direncinden dolayı çok düşüktür (%10-30 aralığındadır) (127).

2.6.1. *Helicobacter pylori* Eradikasyonunda Kullanılan Ajanlar ve Etki Mekanizmaları

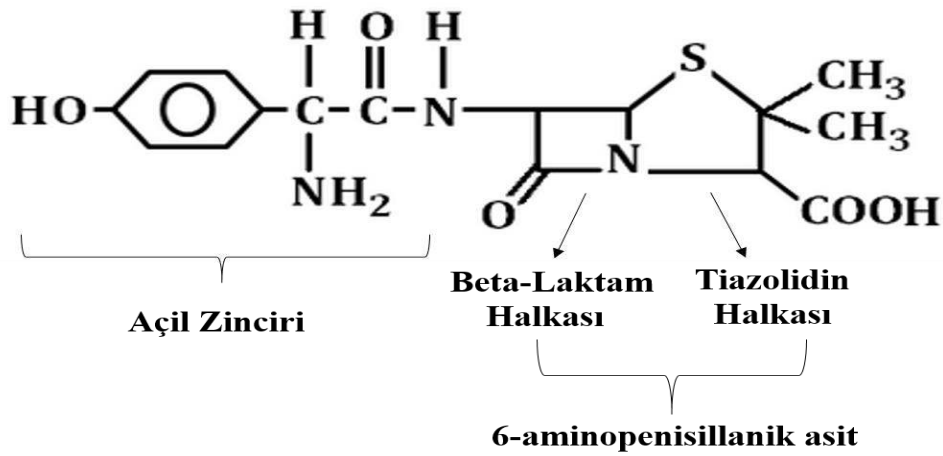
H. pylori ile ilişkili hastalıkların tedavisinde temel olarak asit giderici, antisekretuar ajanlar ve antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır. H₂ reseptör antagonistleri geniş kullanımı olan antisekretuar ajanlardır. Pariyetal hücrelerde H₂ reseptöründe histaminin geri dönüşümlü inhibitörleridir. H₂ reseptör antagonistleri *H. pylori*'ye karşı antibakteriyal aktivite göstermezler (46).

PPI, gastrik pariyetal hücrelerin luminalinde hidrojen potasyum ATPaz pompasında asit sekresyonunu bloke etmektedir. Bu pompa, hidrojen iyonlarının gastrik lümene salınmasını ve gastrik salgının düşük pH ortamı yaratarak parietal hücre mikrovillus membranında potasyum iyonu ve hidrojen iyonu değişimini sağlamaktadır. PPI intraluminal gastrik pH'yı arttırarak ATPaz'a bağlanmakta ve inhibe etmektedir. PPI *H. pylori*'ye karşı direkt antibakteriyal aktiviteye sahip değildir ve tek başına kullanıldığında enfeksiyonu tedavi edememektedir (46). PPI'lar *in vivo*'da ulaşamayacak çok yüksek konsantrasyonlarda anti-*H. pylori* aktivitesi gösterir (8).

1996'dan beri *H. pylori* eradikasyonu için PPI ile birlikte iki antibiyotik kombinasyonu ilk basamak tedavi olarak kullanılır. Avrupa ve Kuzey Amerika'da yayınlanan kılavuzlarda önerilen birinci basamak tedavi PPI ile amoksisilin ve/veya metronidazol, klaritromisin kombinasyonunu içermektedir. 2000 yılına kadar yapılan çalışmalarda standart üçlü tedavinin eradikasyon oranının %90'ın üstünde olduğu bildirilmektedir. Son zamanlarda bu oran %60-70'e düşmüştür. Standart üçlü rejimin eradikasyon oranı klaritromisin duyarlı suşlarda %87.8, klaritromisin dirençli suşlarda ise %18.3 saptanmıştır (132). Standart üçlü tedavinin yalnızca klaritromisine karşı duyarlılık bilindiğinde iyi bir tedavi seçeneği olabileceği bildirilmiştir (136). Standart üçlü tedavide kullanılan klaritromisin ve amoksisilin dışında *H. pylori* tedavi protokollerinde kullanılan antibiyotikler levofloksasin, metronidazol, tetrasiklin ve rifampisindir (8).

2.6.1.1. Amoksisilin Etki Mekanizması

Amoksisilin penisilin grubuna ait aside dayanıklı, yarı sentetik, bakterisidal bir β -laktam antibiyotiktir. Temel bileşenleri *Penicillium chrysogenum* küfünün kültüründen elde edilen bir β -laktam halkası ve bir organik asittir. Küf tarafından 6-aminopenisillanik asit (β -laktam halkası tiazolidin halkası ile birleşir) üretilir (Şekil 13). Bu ara ürün asit labilitesini azaltır ve gastrointestinal sisteme absorpsiyonu artırır (45). Amoksisilin konsantrasyonu antral mukozada en yüksek düzeydedir, korpus mukozasında ve mukus tabakada daha düşük düzeylerde (46).



Şekil 13. Amoksisilin genel yapısı (138)

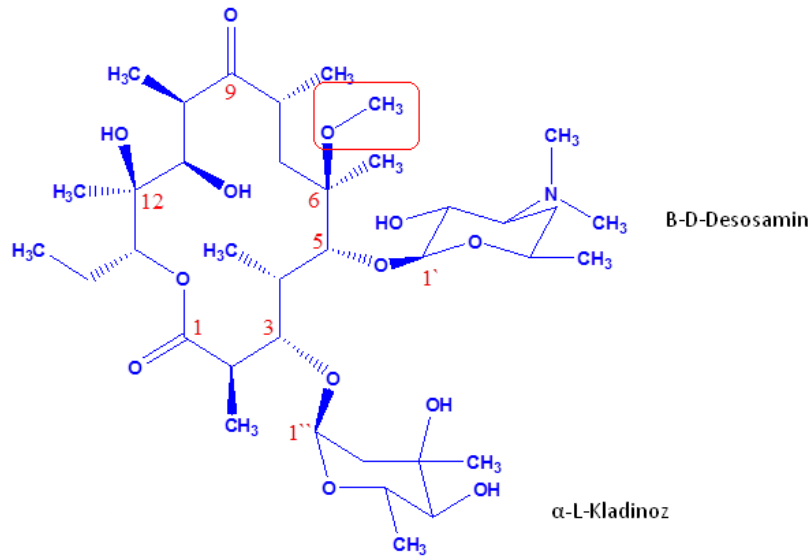
Bakterisidal aktiviteleri genellikle hücre duvarını yok eden membran-ilişkili otolitik enzimleri tetikleme yetenekleri ile ilgilidir. Temel antibakteriyal etkisi sitoplazmik membrandaki penisilin-bağlayan proteinleri (PBP) inhibe etme yeteneğidir. PBP'ler bir glikozil transferaz-açıl transpeptidaz aktivitesi ile bakteri hücre duvarının peptidoglikan tabakasının sentezinde görev alan enzimlerdir. Bu enzimatik aktivite üç farklı motifte (SKN₃₆₈₋₃₇₁, SNN₄₃₃₋₄₃₅, KTG₅₅₅₋₅₅₇) PBP'lerin C-terminal bölgesinde lokalizedir. SKN₃₆₈₋₃₇₁, merkezde, katalitik çatalda/bölgede (cleft) yer almakta, SNN₄₃₃₋₄₃₅ ve KTG₅₅₅₋₅₅₇ motifleri ise dışarıda lokalizedir. PBP1, PBP2 ve PBP3'ün yüksek moleküler, PBP4'ün ise düşük moleküler protein olduğu bildirilmiştir. PBP'lere β -laktam bağlanmasının, peptidoglikan tabakasının sentezinin durmasına neden olarak ve aynı zamanda da ozmotik bakteriyel şok ile bakterisidal bir etkiye neden olduğu bildirilmiştir (27).

PBP'ler peptidoglikan biyosentezinin ana basamakları olan karboksipeptidasyon ve transpeptidasyonda görevlidir. Amoksisilin PBP'ye bağlanarak peptidoglikan sentezini engellemektedir. Ayrıca penisilinler bazı bakterilerde RNA sentezini inhibe edebilir ve hücre lizizi olmadan ölüme neden olur. Diğer minör etki mekanizmaları ise bakteriyal hücre büyümesi için gerekli enzimler bakteriyal endopeptidaz ve glikosidazın inhibisyonudur (35,139). Amoksisilin diğer penisilinlere göre gastrik sıvıda daha iyi bir salınımı vardır ve asidik ortamda daha stabildir (18).

H. pylori'de antimikrobiyal direncin belirlenmesinde standart sınır değerler olmadığından, birçok çalışmada direnç sınır MİK değerleri daha önceki bir çalışmaya göre belirlenmektedir (140). Amoksisilin MİK değerlerinin, amoksisilin duyarlı *H. pylori* suşlarında 0.06-0.25 mg/L arasında değişkenlik gösterdiği, amoksisilin direnci ise ≥ 1 mg/L MİK değerleri (1-8 mg/L) ile bildirilmiştir (27). Ancak, farklı çalışmalarda amoksisilin direnci için >0.5 mg/L (4,8,141,142), ≥ 0.5 mg/L (143), >0.12 mg/L (144,145), >1 mg/L (3,146), ≥ 2 mg/L (147), EUCAST'ın 01.01.2015 tarihinden itibaren geçerli olan son versiyonunda (ver 5.0) ise MİK sınır değeri amoksisilin için >0.125 mg/L belirtilmiştir (148).

2.6.1.2. Makrolid Etki Mekanizması

Protein sentezini inhibe ederek etki gösteren makrolid grubu bir antibiyotiktir. Kimyasal yapısı desozamin ve kladinoz şekerlerine bağlı bir makrosiklik lakton halkasından oluşmaktadır (Şekil 14) (149).

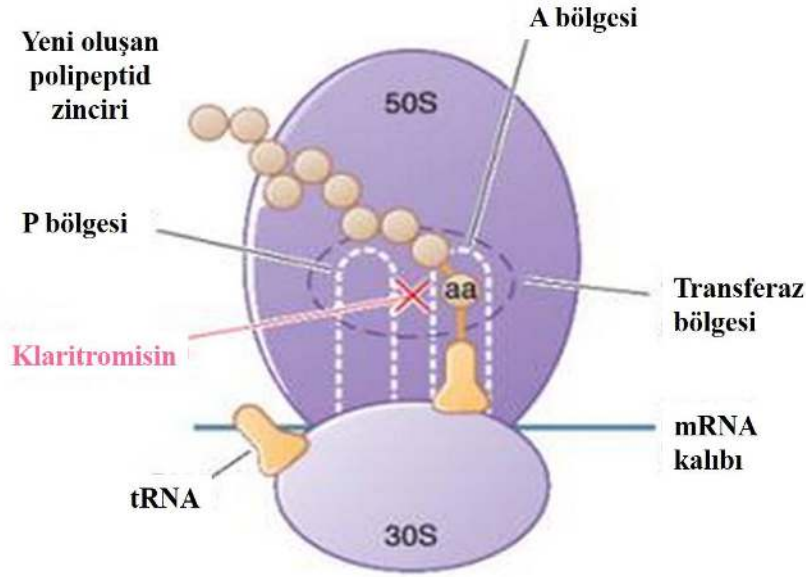


Şekil 14. Klaritromisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı (149)

Bakteriostatik bir antibiyotik olmakla beraber yüksek ilaç konsantrasyonlarında ve bakterinin az inokulümünde bakterisidal olabilir. Antibakteriyal aktivitesi diğer makrolidler ile hemen hemen aynıdır fakat klaritromisin gastrik mukus tabakasında daha iyi absorbe edilir ve aside daha dayanıklıdır (18,133).

Klaritromisinin diğer moleküllere kıyasla en düşük MİK değerleri ile *H. pylori*'ye karşı en etkili antibiyotik olduğu bildirilmiştir. *H. pylori*'de antimikrobiyal direnci belirlemede standart sınır değerler olmadığından, birçok çalışmada direnç sınır MİK değerleri daha önceki bir çalışmaya göre belirlenmektedir (140). MİK değerleri genellikle 0.016-0.5 mg/L arasında rapor edilmiştir, antibiyotik direncinin ise ≥ 1 mg/L (2-256 mg/L) MİK değerleri ile bilinmekte olduğu bildirilmiştir (27). Klaritromisin MİK değerleri duyarlı suşlarda 0.25 mg/L, dirençli suşlarda >0.5 mg/L ve orta düzey dirençli suşlar için 0.5 mg/L bildirilmiştir. Duyarlı, orta düzeyde dirençli ya da dirençli olarak belirtmek için örneğin klaritromisin'de 1 mg/L ya da iki farklı konsantrasyon (0.25 ve 1 mg/L) kullanıldığı bildirilmektedir (8). Ancak farklı çalışmalarda klaritromisin direncinin belirlenmesinde >0.5 mg/L (8,145), ≥ 0.5 mg/L (36,141,144), >1 mg/L (3,4,140,142,143,146) ≥ 1 mg/L (22,24,28,42,150), ≥ 2 mg/L (147) farklı MİK değerleri kullanılmıştır. EUCAST'ın 01.01.2015 tarihinden itibaren geçerli olan son versiyonunda (ver 5.0) ise MİK sınır değeri klaritromisin direnci için >0.5 mg/L belirtilmiştir (148).

Makrolidler, 70S ribozomun 50S ribozomal alt ünitesinde bulunan 23S rRNA'nın V domainindeki peptidil transferaz bölgesine bağlanır (8,20,27,40). Etkilerini 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesine (peptidil-tRNA bağlanma bölgesi) geri dönüşümlü bağlanarak gösterirler ve yeni sentezlenen peptidil-tRNA molekülünün ribozomdaki alıcı "acceptor" bölgesinden peptidil bölgesine translokasyonunu engelleyip polipeptid zincir elongasyonunu bloke ederek protein sentezini inhibe ederler (Şekil 15). (8,38).



Şekil 15. Klaritromisin etki mekanizması (151)

Makrolidler yeni peptid bağlarının oluşmasını inhibe ederek peptid zincirinin uzamasını engeller. Spesifik olarak her aminoasidin peptid zincirine katılmasından sorumlu ribozomal bileşen peptidil transferazı hedef alır. Peptidil transferaz etkisi 50S ribozomal alt ünite ile sağlanır ve katalitik aktivitesi potasyum ve amonyum katyonlarını gerektirir. Makrolidlerin bu katyonları optimal aktivite gösterebilmeleri ve peptidil transferaza bağlanabilmeleri için de gerektiği bildirilmiştir. Peptidil transferaz aktivitesinin kaybı aminoasit tRNA molekülünün ribozomal bölgeye bağlanmasını etkilemez, alıcı “acceptor” bölgedeki aminoasit tRNA ribozoma bağlı peptid zinciri (P bölgesi) ile etkileşemez (152).

Peptidil transferaz aktivitesinin inhibisyonuna ek olarak makrolidler ribozomun mRNA boyunca ilerlemesini engeller. Bir peptid oluşturulduğunda ribozom her bir kodonu okumak için mRNA kalıbı boyunca ilerlemek zorundadır. Bu aşama, ribozomal translokasyon, ribozomdan açılmemiş tRNA molekülünün salınımı ile ilişkilidir. Makrolidlerin aynı zamanda ribozomdan tRNA salınımını da engelledikleri bildirilmiştir. Bu durumda alıcı “acceptor” bölge diğer bir aminoasit tRNA’ya bağlanamaz ve ribozom, protein biyosentezine devam edemez (152).

Klaritromisin, 50S alt ünitenin peptidil transferaz bölgesinin V domainine 2142 ve 2143 pozisyonlarındaki klaritromisin bağlanma bölgelerine kladinoz şekeri ile hidrojen bağı oluşturarak bağlanır. Makrolid bağlanma bölgesi tRNA’ların aminoasit ve peptidil uçlarının

peptid bağlarının oluşumunu katalizlemek için ribozomun büyük alt ünitesinde hizalandıkları peptidil transferaz merkezi yanında peptid çıkış tüneli içerisinde 50S ribozomal alt ünitesinde lokalize olarak bulunmaktadır. Klaritromisin bağlandıktan sonra, aminoasidi taşıyan aminoasıl tRNA A bölgesinden P bölgesine kayamaz, peptidil translokasyonu inhibe olur ve protein sentezi durur (153,154).

2.6.1.3. Florokinolon Etki Mekanizması

İlk geliştirilen kinolon nalidiksik asittir. Orijinal florokinolonlar ikinci nesil ajanlardır ve kinolonların C6 pozisyonuna bir florin atomu eklenmesi ile florokinolonlar elde edilmiştir (34,45).

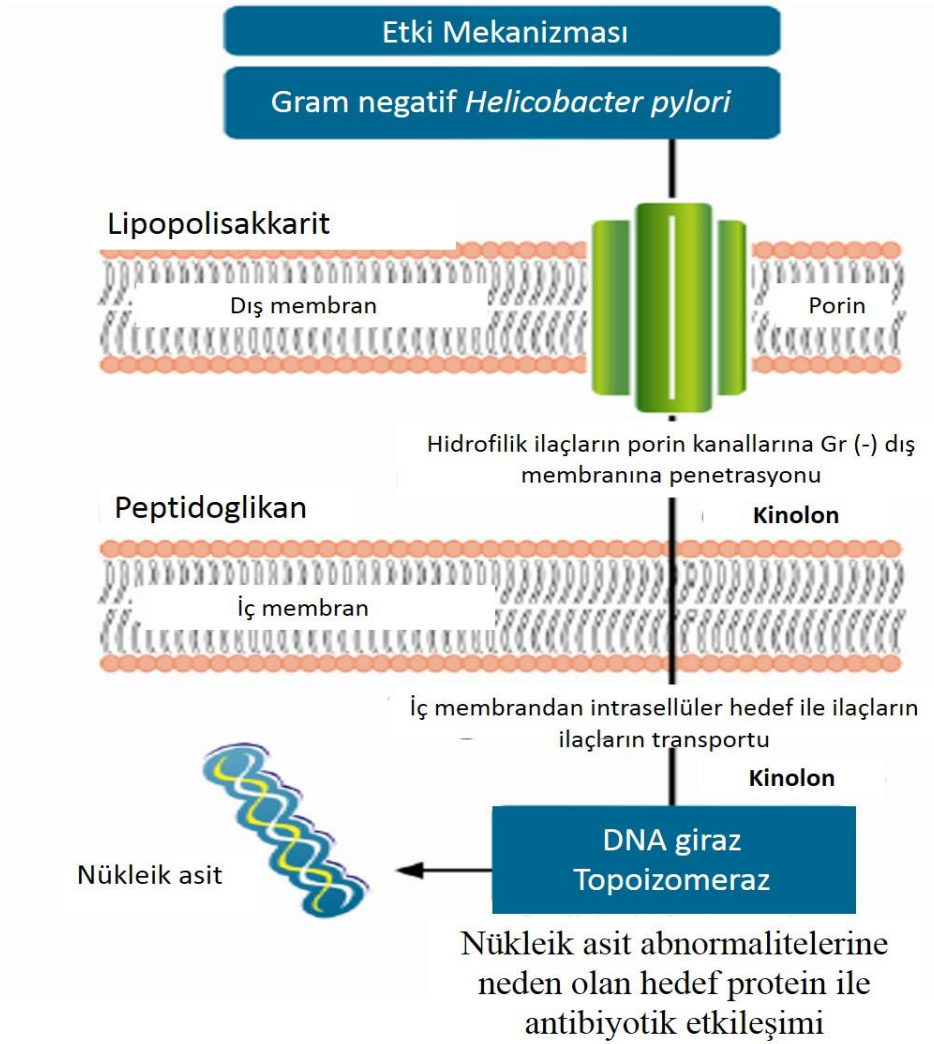
Levofloksasin, nükleik asit sentezini inhibe eden kinolon grubu bir antibiyotiktir. Bakterisidal özelliktedir. Esas yapıları birinci pozisyonunda nitrojen ve dördüncü karbona çift bağla bağlı oksijen içeren kinolon halkasıdır (Şekil 16) (45).



Şekil 16. Levofloksasin'in kimyasal yapısı (155)

Yaygın klinik kullanımı olan antimikrobiyal ajanlar arasında florokinolonlar direkt bakteriyal DNA'nın sentezini inhibe eden tek sınıftır. DNA replikasyonunda önemli rolleri olan florokinolonların inhibe ettiği iki bakteriyal enzim vardır: DNA giraz ve topoizomerez IV. Florokinolonlar, DNA giraz (topoizomerez II) ve topoizomerez IV enzimlerini inhibe ederek hücre replikasyonuna, transkripsiyonuna ve DNA tamirine etki ederler (Şekil 17). Bu enzimlerin DNA ile oluşturdukları komplekslere kinolonlar bağlanır ve topoizomerez-kinolon-DNA üçlü kompleksi oluşur. Bu kompleks DNA'nın çift ipliğinde kırıklar oluşmasını

indükleyerek DNA replikasyonu enzim kompleksinin işleyişini bloke eder. Bu etki, bakteriyal DNA hasarı ve bakteriyal hücre ölümü ile sonuçlanır (34).

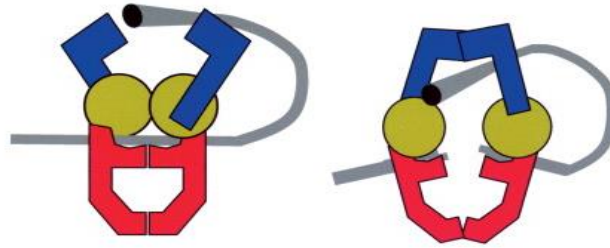


Şekil 17. Florokinolon etki mekanizması (34)

Florokinolonların hedefleri DNA giraz (ya da topoizomeraz II) ve DNA topoizomeraz IV'tür. DNA giraz, *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki adet A ve B alt ünitesinin tetrameridir (31,34). Negatif DNA süpersarmalları meydana getirir, aynı zamanda tüm pozitif ve negatif süpersarmalları ortadan kaldırarak DNA'da kısa süreli kopmalara neden olarak ve tekrar birleşmelerini sağlayarak etki gösterir (34). *gyrA* ve *gyrB* genleri *E. coli* genomunda farklı bölgelerde lokalize olurken, bazı bakterilerde birbirlerine komşudurlar ve bu düzenleniş "Quinolone Resistance Determining Region (QRDR)" olarak bilinir. DNA giraz, negatif süpersarmal DNA oluşumundan sorumlu bir enzimdir ve bu DNA replikasyonunun başlangıcı

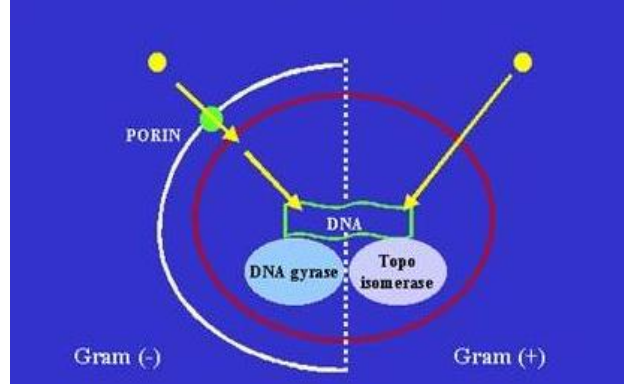
için önemlidir (31). Bakterilerde dört DNA topoizomeraz tanımlanmıştır. Topoizomeraz II ve IV kinolonların majör hedefleridir. Topoizomeraz I ve III kinolonlar tarafından inhibisyona çok duyarlı değildir (156). Topoizomeraz IV, DNA giraz'ın bir homologudur. *parC* ve *parE* tarafından kodlanan iki adet C ve iki adet E olmak üzere dört alt ünite içerir. Topoizomeraz IV'ün reaksiyon mekanizması DNA giraz'a benzerdir fakat topoizomeraz IV DNA'yı paketlemek yerine replikasyon sırasında oluşan yeni DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılarak yavru hücrelere geçmelerine yardım eder. Ayrıca topoizomeraz IV'de negatif ve pozitif süpersarmalları ortadan kaldırabilme yeteneğindedir (31,34).

Kinolon-enzim (DNA giraz / topoizomeraz IV)-DNA kompleksinin oluşması kinolon ve enzim etkileşimi için çok önemlidir. Kinolonlar, DNA giraz enziminin etrafına ek bir DNA molekülünün sarılmasıyla konformasyonel bir değişikliğe neden olurlar (157). DNA-DNA giraz/DNA-topoizomeraz IV kompleksleri kilitlenir (Şekil 18). Kilitlenen DNA-DNA giraz kompleksi replikasyon çatalının ilerlemesini bloke ederek DNA sentezini inhibe eder ve bakteri ölümüne neden olur (158). Kinolon-enzim-DNA kompleksi oluşumu geri dönüşümlüdür (157).



Şekil 18. DNA giraz-DNA kompleksinin yapısı. Kırmızı; GyrA N-terminal domain, Mavi; GyrB N-terminal domain, Yeşil; GyrB C-terminal domain (158)

Genel olarak, DNA giraz Gram-negatif bakteriler için, topoizomeraz IV ise Gram-pozitif bakteriler için primer florokinolon hedefidir (Şekil 19) (30).



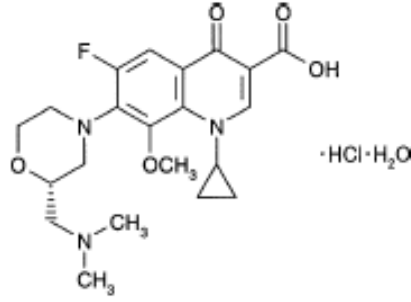
Şekil 19. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde florokinolon temel etki mekanizması (32)

Kinolon moleküllerinin hedefleri tip II topoizomerazlardır: DNA giraz (topoizomeraz II) ve DNA topoizomeraz IV. DNA çift sarmalının tek ipliğini bölen tip I topoizomerazların aksine tip II topoizomerazlar, her iki ipliği de kırar ve ATP hidrolizi ile diğer bir çift iplikli sarmal segmentine geçerler. Topoizomeraz IV etkili bir “decatenation” dekatensasyon aktivitesi sergiler, DNA giraz ise, DNA’da negatif “supercoil”ler üreterek oluşturur. Bu enzimler replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve DNA tamirini kolaylaştırmak için kromozomal DNA’nın topolojik durumunu kontrol eder, bakteriyal üreme için gereklidir. Kinolonlar tip II topoizomerazların aktivitesini DNA’da ilaç-enzim-DNA kompleksleri oluşturarak inhibe ederler. Üçlü kompleks oluşumu DNA sentezinin hızlı bir inhibisyonu ve RNA sentezinin daha yavaş bir inhibisyonu ile bakteriyal üremenin yavaşlamasından (bakteriostatik etki) sorumludur. İlaç-enzim-DNA kompleksleri üremeyi bloke etmelerine rağmen direkt olarak kinolonların letal etkisinden sorumlu değildir. Bakterisidal etki, çift iplikli DNA kırıklarının bu komplekslerden serbest bırakılmasından kaynaklanmaktadır (159).

H. pylori antimikrobiyal direncinin belirlenmesinde standart sınır değerler olmadığından, birçok çalışmada direnç sınır MİK değerleri daha önceki bir çalışmaya göre belirlenmektedir (140). MİK değerleri genellikle 0.25-0.50 mg/L arasında rapor edilmiştir, antibiyotik direncinin ise ≥ 1 mg/L (4-32 mg/L) MİK değerleri ile bilinmekte olduğu bildirilmiştir (27). Ancak farklı çalışmalarda levofloksasin direnci için >0.5 mg/L (4), >1 mg/L (3,8,36,38,141,144-146,160,161), ≥ 1 mg/L (143) farklı MİK değerleri kullanılmıştır. EUCAST’ın 01.01.2015 tarihinden itibaren geçerli olan son versiyonunda (ver 5.0) ise MİK sınır değeri levofloksasin direnci için >1 mg/L belirtilmiştir (148).

i. Yeni bir florokinolon, Y-904

Y-904 ((S)-1-siklopropil-7-[2-(dimetilaminometil) morfolino]-6-floro-1, 4-dihidro-8-metoksi-4-oksokinolin-3-karboksilik asit hidroklorid hidrat (Şekil 20), Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin geniş bir grubuna karşı antibakteriyal aktivite potansiyeli olan yeni bir florokinolon bileşiğidir (162).



Şekil 20. Y904'ün kimyasal yapısı (162)

Y-904'ün *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonu için yararını araştırmak amacıyla *H. pylori*'ye karşı *in vitro* ve *in vivo* antibakteriyal aktivitesi amoksisilin, klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin ile karşılaştırılmıştır. Y-904 levofloksasinden daha fazla anti-*H. pylori* aktivitesine sahiptir ve konvansiyonel florokinolonların eksikliklerini dengelemektedir. Ayrıca Y-904, klaritromisin ve metronidazol dirençli suşlara karşı antibakteriyal aktivite potansiyeli sergilemektedir. Bu nedenle Y-904, *H. pylori* enfeksiyonuna karşı sadece ilk basamak tedavide değil, aynı zamanda üçlü tedavinin de başarısız olduğu durumlarda kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (162).

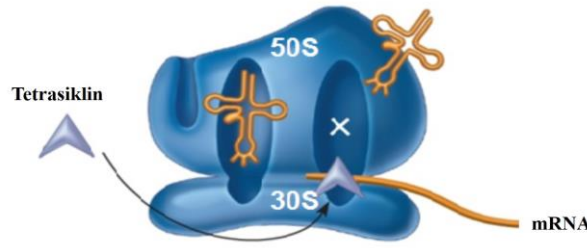
H. pylori enfeksiyonuna karşı antibakteriyal tedavide etkinliğin yüksek düzeylere ulaşması için ilacın asit ortamda stabilitesi önemlidir çünkü ilaç, *H. pylori*'nin yaşayabildiği asit ortamda antibakteriyal aktivite göstermelidir. Kültür ortamında (pH 5.5) Y-904'ün amoksisilin ve levofloksasine eşit *in vitro* aktivite gösterdiği ve klaritromisinden daha stabil aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun Y-904'ün kimyasal stabilitesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu bulguların Y-904'ün midenin düşük pH ortamında bile güçlü antibakteriyal aktivite sergileyebileceğini gösterdiği bildirilmiştir (162).

2.6.1.4. Tetrasiklin Etki Mekanizması

Tetrasiklinler protein sentezini inhibe ederek etki gösteren antibiyotik gruplarındandır. 30S ribozomal alt üniteye geri dönüşümlü bağlanarak bakteride protein sentezini inhibe eden geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiklerdir (45).

Tetrasiklin Gram pozitif ve Gram negatif bakteri türlerine karşı kodon-antikodon bağlantısını 30S ribozomal alt üniteye inhibe ederek ve aminoasit tRNA'nın alıcı "acceptor" bölgeye bağlanmasını bloke ederek bakteriyostatik bir etki gösterirler (27).

Tetrasiklinler aminoasit tRNA'nın 30S ribozom-mRNA kompleksindeki alıcı "acceptor" bölgeye bağlanmasını bloke ederek bakteriyal polipeptid sentezini engellerler (Şekil 21) (139).



Şekil 21. Tetrasiklin etki mekanizması (163)

H. pylori'de antimikrobiyal direncin belirlenmesinde standart sınır değerler olmadığından birçok çalışmada direnç için sınır MİK değerleri daha önceki bir çalışmaya göre belirlenmektedir (140). MİK değerleri genellikle 0.25-2 mg/L arasında rapor edilmiştir (27). Antibiyotik direnci ise ≥ 4 mg/L MİK değeri bildirilmiştir (27,147). Ancak tetrasiklin direnci için çoğu çalışmada >1 mg/L MİK sınır değeri (3,4,144-146), diğer iki çalışmada ise >2 mg/L MİK sınır değeri kullanılmıştır (8,142). EUCAST'ın 01.01.2015 tarihinden itibaren geçerli olan son versiyonunda (ver 5.0) ise MİK sınır değeri tetrasiklin direnci için >1 mg/L belirtilmiştir (148).

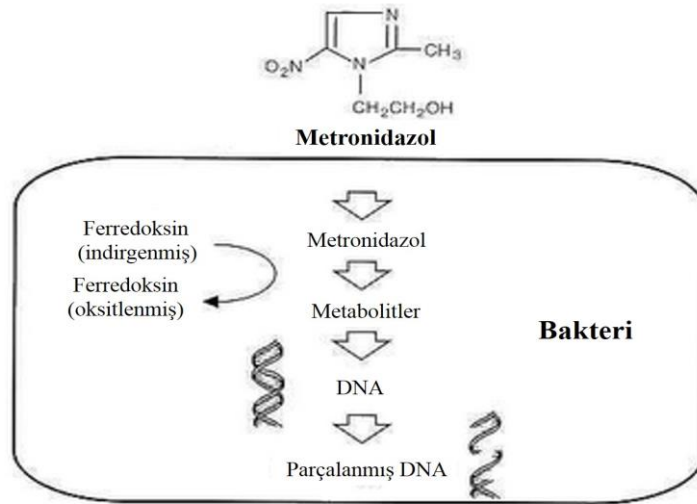
2.6.1.5. Metronidazol Etki Mekanizması

Metronidazol, bir 5-nitroimidazol türevidir. Mikroaerofilik mikroorganizmalara seçici olarak toksik etkili bakterisidal bir antibiyotiktir. Mikroorganizmanın yıkımı ve sitotoksik ürünlerin üretimine neden olan ilaçların kimyasal olarak reaktif indirgenmiş bir formudur (46). Gastrik sıvıda aktif olarak salınır ve antimikrobiyal aktivitesi düşük pH'dan çok az

etkilenir. Metronidazolün antimikrobiyal özellikleri bakteriyal redüktazlar tarafından kimyasal yapısındaki nitro grubunun indirgenmesinden kaynaklanır (45).

H. pylori anaerobik özellikleri olan enzimlere sahiptir. Bu enzimlerden biri piruvattan asetil-CoA oluşumunu katalizleyen flavodoksin oksidoredüktaz (porGDAB)'dır. Bu enzim 5-nitroimidazollerin aktivasyonunda önemlidir. *H. pylori*'nin flavodoksin oksidoredüktaz enziminin metronidazolü aktive edebilme yeteneği bildirilmiştir (164).

Metronidazol hedef hücrede bir veya iki elektron transferi ile aktive olmaya ihtiyaç duyar ve bakteri hücreğine girdiğinde nitro grubu, sitoplazmadaki bir nitroredüktaz enzimi ile indirgenir. Bu redüksiyon DNA ve subsellüler yapıların zararına neden olan nitro-anyon radikalleri ve imidazol ara ürünlerinin oluşumuna neden olur (Şekil 22). Teorik olarak düşük redoks potansiyeline sahip olan her protein metronidazolden elektronları alabilir ve böylelikle ilacı aktive eder (18).



Şekil 22. Metronidazol etki mekanizması (165)

Bu indirgenme reaksiyonları elektron transport zincirindeki komponentlerin intrasellüler redoks potansiyellerine bağlıdır. Elektronlar piruvat oksidoredüktaz kompleksi (POR) tarafından üretilip metronidazolü indirgeyen ferrodoksin ya da flavodoksine aktarılır. Bu süreç özellikle metronidazole oldukça duyarlı anaerobik türlerde aktiftir (27).

Metronidazolün anaerob koşullarda anaerob bakterilere karşı diğer bir etki mekanizması ise serbest oksijen radikallerinin üretimidir. Bu durumda oksijen, indirgenmiş

metronidazolden elektronların son alıcısı olarak görev alır, inaktif antibiyotiğin yenilenmesine ve DNA yapısı için toksik olan serbest oksijen radikallerinin üretilmesine yol açar (27).

Metronidazolün subsellüler yapılara zarar vermesi ve bakteriyal DNA'yı değiştirip, DNA'da letal mutasyonlara neden olabilmesi için aktif olması, aktif olması için ise bakteriyal hücrelerde indirgenmesi gerekmektedir (8,40).

H. pylori'de antimikrobiyal direncin belirlenmesinde standart sınır değerler olmadığından, birçok çalışmada direnç için sınır MİK değerleri daha önceki bir çalışmaya göre belirlenmektedir (140). MİK değerleri 0.5-2 mg/L arasında rapor edilmiştir, antibiyotik direnci ise ≥ 8 mg/L (16-128 mg/L) MİK değeri bildirilmiştir (27). Ancak farklı çalışmalarda metronidazol direnci için çoğunlukla >8 mg/L MİK sınır değeri kabul edilmiştir (2,4,8,140-142,144-146) fakat farklı olarak bir çalışmada MİK sınır değeri ≥ 8 mg/L kullanılmıştır (147). Ayrıca, metronidazol direncinin MİK değerlerinin 8 - ≥ 256 mg/L arasında çok değişkenlik gösterdiği de önemle bildirilmiştir (20). EUCAST'ın 01.01.2015 tarihinden itibaren geçerli olan son versiyonunda (ver 5.0) ise MİK sınır değeri metronidazol direnci için >8 mg/L belirtilmiştir (148).

2.6.1.6. Rifampin Etki Mekanizması

rpoB geni tarafından kodlanan DNA bağımlı RNA polimerazın B alt ünitesini inhibe ederek DNA transkripsiyonunu engellerler (8). Bakterisidal etkilidir. Tüberkülozun hala ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam ettiği ülkemizde *H. pylori* eradikasyon tedavisinde rifabutinin yer almaması gerektiği Türkiye *H. pylori* çalışma grubu tarafından "*H. pylori* tanı ve tedavi uzlaşısı raporu" ile bildirilmiştir (166). *H. pylori*'de antimikrobiyal direncin belirlenmesinde standart sınır değerler olmadığından, birçok çalışmada direnç için sınır MİK değerleri daha önceki bir çalışmaya göre belirlenmektedir (140). Örneğin farklı çalışmalarda rifampin direnci için >1 mg/L (8,4,144) ve >4 mg/L (3,146) farklı MİK sınır değerleri kullanılmıştır. EUCAST'ın 01.01.2015 tarihinden itibaren geçerli olan son versiyonunda (ver 5.0) ise MİK sınır değeri rifampisin direnci için >1 mg/L belirtilmiştir (148).

2.6.2. Antimikrobiyal Direnç

Her antibiyotik ailesi içinde aynı direnç mekanizması olduğu için çapraz direnç vardır; klaritromisine direnç tüm makrolidlere direnci gösterir, levofloksasine direnç tüm florokinolonlara direnci gösterir. Farklı direnç mekanizmaları olan farklı antibiyotik aileleri arasında çapraz direnç yoktur. Kuzey Avrupa hariç Avrupa'da klaritromisin direnç oranları

%20'nin üzerindedir. Bu da yüksek klaritromisin direnci anlamına gelir ve standart üçlü tedavi önerilmez (127).

H. pylori'de antibiyotik direnci yaygındır ve artış göstermektedir. Metronidazol direnci (MİK ≥ 8 mg/L) *H. pylori*'de en yaygın antimikrobiyal dirençtir. Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori*'de metronidazol direnç oranı yüksektir ve bazı bölgelerde ise hemen hemen tüm *H. pylori* suşlarının metronidazol dirençli olmasına karşın, endüstriyelmiş ülkelerde *H. pylori* suşlarının yaklaşık %35'i metronidazol dirençlidir (18).

Metronidazol direnci ile karşılaştırıldığında, *H. pylori*'de klaritromisin direncinin prevalansı (MİK ≥ 2 mg/L) daha düşüktür. Gelişmekte olan ülkelerde, klaritromisine karşı direnç oranı daha yüksektir ve %25-50 arasında değişmektedir. Amoksisilin ve tetrasikline direncin yaygın olduğu çeşitli diğer bakterilerin aksine 20. yüzyılın sonlarına kadar *H. pylori*'de amoksisilin direnci (MİK ≥ 0.5 mg/L) ve tetrasiklin direncinin (MİK ≥ 4 mg/L) çok nadir olduğu ya da olmadığı belirtilmiştir. Fakat özellikle belirli coğrafik bölgelerde (İtalya, Brezilya, Salvador, Hindistan, Litvanya, vb.) *H. pylori* amoksisilin ve tetrasiklin direncinin arttığı bildirilmiştir (18).

H. pylori'de antimikrobiyal direnç, antibiyotik kullanımının bir sonucu olabilir. Genelde dirençli bakteriye sahip olan hastaların, duyarlı bakteriye sahip olanlardan daha çok antibiyotik aldığı bildirilmiştir. Penisilin kullanımı ve *Staphylococcus aureus*, florokinolon kullanımı ve *Campylobacter jejuni* arasında geçici ilişki gösterilmiştir. *H. pylori* makrolid direncinde, bu ilaçların sadece *H. pylori* tedavisinde değil solunum yolu enfeksiyonlarında da artan kullanımı ile paralel olarak artış bildirilmektedir. Metronidazol ile ilgili olarak, gelişmiş ülkelerde vajinal ve dental enfeksiyonlar için kullanılan, gelişmekte olan ülkelerde parazitik enfeksiyonlar için ucuz olan bu ilacın artan kullanımı ile ilişkilendirilen yüksek oranda direnç bildirilmiştir. Antibiyotik kullanımı ile birlikte direnç mekanizmaları, geniş bakteriyal yayılımın ve duyarlı konak tipinin de *H. pylori*'de direnci etkileyebileceği bildirilmiştir (40).

H. pylori glikopeptitler, sefsulodin, polimiksinler, nalidiksik asit, trimetoprim, sülfonamidler, nistatin, amfoterisin B ve sikloheksimide intrinsik direçlidir. Bunlardan bazıları izolasyon ortamında seçici ajan olarak kullanılmaktadır. Wild type suşlar β -laktamlar (sefsulodin hariç), fosfomisin, makrolidler, aminoglikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikoller, rifampinler, florokinolonlar, 5-nitroimidazoller ve nitrofuranolara duyarlıdır (8).

Genetik düzeyde antibiyotiklere direncin farklı mekanizmaları mevcuttur fakat sadece nokta mutasyonları *H. pylori* ile ilişkilidir. Bu nokta mutasyonları bakteriyal kromozomda

gerçekleşir (Tablo 1). Bununla birlikte, özellikle transformasyon ile horizontal transfer teorik olarak mümkündür fakat büyük bir oranda olmadığı bildirilmiştir (18,40).

Tablo 1. *H. pylori*'de antimikrobiyal direnç ile ilişkili genler (8)

Antibiyotikler	İlgili Gen(ler)
Makrolidler	<i>rrl 23S rRNA</i>
Metronidazol	<i>rdxA, frxA</i>
Kinolonlar	<i>gyrA</i>
Amoksisilin	<i>plpI</i>
Tetrasiklin	<i>rrn 16S rRNA</i>
Rifampinler	<i>rpoB</i>

2.6.2.1. Amoksisilin Direnç Mekanizması

Genel olarak amoksisilin direncine azalan membran permeabilitesi, artan efflux/atılım pompa sistemi, ilaç afinitesinin azalmasına neden olan PBP'lerin modifikasyonu ve halka yapısını hidrolize ederek antibiyotiği inaktive eden kromozomda kodlanan ya da daha sıklıkla plazmid aracılı β -laktamaz varlığının neden olduğu bildirilmiştir (18,35,164). PBP'ler sitoplazmik membranda bulunan peptidoglikan biyosentezinin temel basamaklarında görev alan enzimlerdir. PBP'ler hemen hemen tüm bakterilerde bulunur, sayısı ve büyüklüğü (15 - 150 kDa) ve β -laktamlara afinitesi bakteriyal türler arasında çeşitlilik gösterir (165). Gram (-) bakterilerde çoğunlukla β -laktamaz aktivitesi ve Gram (+) bakterilerde genellikle bir veya daha fazla PBP'deki mutasyonal değişiklik amoksisilin direnci ile ilişkilendirilmiştir (18,35,164). β -laktamaz üretimi, çoğu bakteride penisilin direncinin temel mekanizmasıdır, *H. pylori*'de inaktif olduğu bildirilmiştir (27).

Birçok çalışma *H. pylori*'de amoksisilin direncinin temel mekanizmasının amoksisilin ve PBP-transpeptidaz arasındaki afinitenin kaybına neden olan *pbpI* genindeki birden çok, çeşitli mutasyonlar olduğunu göstermiştir (27,167). PBP1'deki SKN motifine bitişik lokalize Ser414Arg değişiminin önemli ölçüde artan MİK (> 0.5-1 mg/L) değeri ile amoksisilin direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada PBP1'in KTG motifi yakınında Asn562Tyr değişimi gösterilmiştir, tüm suşlarda *in vitro* yüksek düzeyde dirence yol açan başlıca mutasyon olarak bildirilmiştir. Asn562Tyr ile daima ilişkilendirilmeyen diğer

mutasyonel değişimlerin (Ala369Thr, Val374Leu, Leu423Phe, Thr593Ala), PBP2, PBP3 ve PBP4'teki nokta mutasyonlarına benzer şekilde dirençli *H. pylori* suşlarının artan MİK değerlerinde ek bir rol oynadığı düşünölmektedir (27).

Bakteriyal dış membran, intrinsik ve spesifik olmayan direnç değerlendirmesi için ilk bariyeri oluşturur. Lipopolisakkarit tabaka birçok lipofilik bileşenin difüzyonunu sınırlandırabilmektedir. *H. pylori*'de *hopB* ve *hopC* genleri tarafından kodlanan porin kanallarının, küçük çözönen maddelerin penetrasyonunu regöle ettiği bildirilmiştir. *hopB* genindeki nokta mutasyonları ve *hopC* genindeki bir delesyon tüm mutant ve transforme *H. pylori* suşlarında azalan amoksisilin birikimi, MİK değerlerinde artış (*hopB* geni için 250 mg/L ve *hopC* geni için 125 mg/L) ile ilişkilendirilmiştir. *hopB* ya da *hopC*'deki nokta mutasyonları *pbp1* genindeki (üçlü mutantlar) mutasyonlar ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular porin kanallarının ve PBP1 mutasyonlarının amoksisilin direncine neden olduğunu göstermiştir (27).

H. pylori'de amoksisilin direnci temel olarak PBP'lerin değişimi ile antibiyotiğin bakteriyal hücre duvarına azalan permeabilitesi ile ilişkilendirilmiştir (167). *H. pylori*'de β -laktamaz aktivitesinden kaynaklanan direnç belirtilmemiştir (8,18,27,168).

β -laktamlar'ın spesifik PBP'lere kovalent bağlanması duyarlı bakterilerde hücre duvar sentezini gerçekteştirmemesi ile hücre lizisi ve ölüm ile sonuçlanır. β -laktamlara direnç ile sonuçlanan PBP'lerdeki değişim yaygın olarak *Streptococcus pneumoniae* gibi Gram pozitif bakterilerde tanımlanmıştır, aynı zamanda *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, ve *Proteus mirabilis* gibi Gram negatif bakterilerde de bildirilmiştir. *H. pylori*'de üç temel PBP (66 kDa PBP 1, 63 kDa PBP 2, 60 kDa PBP 3) saptanmıştır. Dore ve arkadaşları, 32 kDa büyüklüğünde amoksisiline daha düşük affinite de başka bir PBP "PBP-D" bildirmiştir. Diğer birçok çalışmada, *H. pylori*'de PBP-D varlığı gösterilmiştir ve PBP 4 olarak karakterize edilmiştir. *H. pylori*'nin daha sıklıkla 72-kDa büyüklüğünde bir PBP'ye (PBP 1A) bağlandığı ve *H. pylori*'de amoksisilin direncinin *pbp1a* genindeki nokta mutasyonları ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (164).

Amoksisilin dirençli olarak tanımlanan birçok *H. pylori* suşunun sadece toleranslı olduğu, direncin geçici olduğu ve stabil olmadığı bildirilmiştir. *H. pylori*'de kalıcı amoksisilin direnci çok nadirdir ve bu direnç *pbp-1a* genindeki mutasyonel değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir (Ser414Arg, Thr556Ser ve Asn562Tyr) ve PBP1A (HP0597)'nin amoksisiline afinitesi azalarak direnç oluşmaktadır. Amoksisiline tolerans da tanımlanmıştır

ve olası mekanizma olarak dördüncü PBP, PBP-D (PBP4, HP0160) eksikliği bildirilmiştir (8,18,168).

Amoksisilin direnç fenotipinin stabil olmadığı ve -80°C 'de stoklandıktan sonra direnç fenotipinin kaybolduğu fakat bu suşların amoksisilin gradient plaklarına ekildiğinde direncin yeniden saptandığı bildirilmiştir (27,164).

2.6.2.2. Makrolid Direnç Mekanizması

Genel olarak bakterilerde klaritromisine karşı direnç üç farklı mekanizma ile olmaktadır. Bunlardan ilki 23S rRNA metilasyonudur (45,153). Metilasyon (makrolid-linkozamid-streptogramin B, MLS_B direnci) yaygın olarak 23S rRNA'nın V domaininde bir adenin rezidüsünün farklı *erm* (eritromisin ribozomal metilaz) genleri tarafından gerçekleşir ve makrolidin bağlanması engellenir. Metilasyon yüksek düzeyde ($\text{MİK} \geq 64 \text{ mg/L}$) makrolid direnci ile sonuçlanır (169).

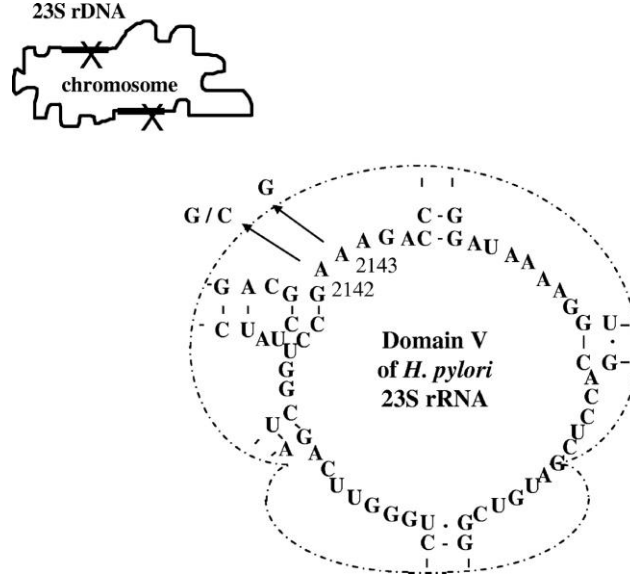
İkinci mekanizma *mef* genleri tarafından kodlanan, 14 ve 15 üyeli makrolidler için spesifik olan efflux pompalarıdır (45,153). İlaç efflux mekanizmalarının beş korunmuş ailesi bakteri türleri ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar; “Small Multidrug Resistance”, “Multidrug and Toxic Compounds Extrusion proteins”, “the Major Facilitator Superfamily”, “the ATP-Binding Cassette Superfamilies” ve “the Resistance-Nodulation Cell Division (RND)” dir. RND ailesi birçok Gram negatif bakteride intrinsik makrolid direncinden sorumludur ve *H. pylori* için de düşünülmüştür (27). Efflux pompa sisteminde çoklu *H. pylori* direncini kontrol etmede rol oynayan dört adet RND gen grubu (HP0605-HP0607, HP0971-HP0969, HP1327-HP1329, HP1489-HP1487) gözlemlenmiştir. Bu sistemler Phe-Arg- β -naftilamid (PA β N) gibi spesifik efflux pompa inhibitörleri (EPI) tarafından inhibe edilebilir. Fakat hangi RND gen grubunun PA β N tarafından inhibe edildiği bilinmemektedir (170). EPI ayrıca antibiyotiğin hücre içi tutulumu ve MİK değerlerinde önemli derecede azalma ile ilişkilendirilmiştir (27,170)

Artan hücre içi antibiyotik konsantrasyonunun mutasyona uğrayan ribozomal bölge için azalan ilaç afinitesini dengeleyebilmesi olası bir mekanizma olarak bildirilmiştir. Bu etki HP0605-HP0607 gen grupları ile ilişkilidir. EPI'lerin MİK değerleri üzerindeki diğer bir etkisinin duyarlı ve rRNA'sında mutasyon olan *H. pylori* suşları arasında olduğu ve olası mekanizmanın duyarlı suşlarda klaritromisinin efflux pompalarına bağlanmak yerine tercihen ribozomal alt üniteye bağlanması olarak bildirilmiştir (27). Bu nedenle EPI varlığında klaritromisin MİK değerinin azaldığı bildirilmiştir (170). Buna karşılık, rRNA'sında

mutasyon olan suşlarda mutant ribozomal bölgeye düşük afinitesi nedeniyle klaritromisin, efflux pompaları tarafından dışarı atılır. Bu düşünce ile PAβN tarafından efflux pompalarının inhibisyonunun MİK değerleri üzerinde daha yakın ilişkili etkisi olduğu belirtilmiştir. Bu bulgulara dayanarak PAβN (ya da PAβN-benzeri moleküller) ile klaritromisinin hücre içi tutulumunu artırarak klaritromisin-temelli tedavilerin eradikasyon etkinliğinin artabileceği hipotezi bildirilmiştir (27). Hirata ve arkadaşlarının çalışmasında tüm klaritromisin dirençli suşların 23S rRNA mutasyonu içerdiği bildirilmiştir (170). Sonuç olarak *H. pylori*'de klaritromisin direnç mekanizması olarak 23S rRNA mutasyonlarının efflux mekanizmasından daha dominant olduğu bildirilmiştir (124).

Üçüncü mekanizma ise enzimler (esterazlar, fosforilazlar, glikosidazlar) tarafından makrolidlerin inaktivasyonu ve 23S rRNA'daki nokta mutasyonlarıdır (45,153).

H. pylori'de klaritromisin direnci, konformasyonal değişikliğe ve makrolid bağlanmasında azalmaya neden olan nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. En sık görülen mutasyonları, 2142 ve 2143 pozisyonlarındaki A→G dönüşümü “transition” ve 2142 pozisyonundaki A→C değişimidir “transversion” (Şekil 23) (8,18,29,36,40,171). 2142/2143 pozisyonları *E. coli* 23S rRNA geninde 2058/2059 pozisyonları olarak, *H. pylori*'de ise *H. pylori*'nin ribozomal sekansına dayanarak doğru şekilde yeniden adlandırılmasından önce 2143/2144 pozisyonları olarak gösterilmiştir (29,135). GenoType HelicoDR metodunda ise aynı bölge farklı gen bankası erişim numaralı *H. pylori* genom sekansına göre 2146/2147 olarak isimlendirilmiştir (36). Klaritromisin herhangi bir enfeksiyon için kullanıldığında bu dirençli mutantların seçilimi olur ve bu suşlar populasyonun çoğunluğu haline gelir (8,18,136).



Şekil 23. Klaritromisin direncine neden olan *H. pylori* 23S rRNA'sında meydana gelen nokta mutasyonlar (8)

A2115G, G2141A, T2117C, T2182C, T2289C, G2224A, C2245T, C2611A gibi ender görülen diğer nokta mutasyonları da bildirilmiştir. Az sıklıkla görülmeleriyle birlikte T2182C ve C2611A mutasyonları düşük düzeyde dirence neden olduğu, A2115G, G2141A, T2117C, T2289C, G2224A, C2245T mutasyonlarının ise direnç ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (27,29,172).

H. pylori' de klaritromisin direnci daha önceden herhangi bir makrolidin kullanımı ile de ilişkilendirilmiştir (169).

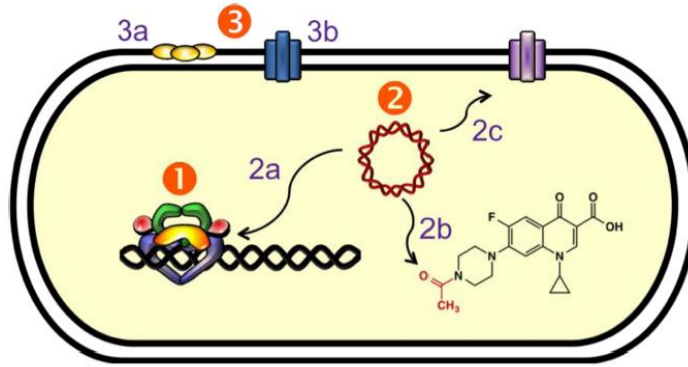
A2143G mutasyonu düşük MİK (<64 mg/L)'li suşlarda sık bulunurken, A2142G ve A2142C özellikle yüksek klaritromisin MİK (>64 mg/L)'li suşlarda daha çok görülmektedir (18).

H. pylori iki 23S rRNA geni (*rrn* operonu) içerir ve mutasyonlar genellikle her iki kopya da da bulunur (18,153,173). 23S rRNA'nın bir kopyasında mutasyon, yüksek klaritromisin direncinin homolog DNA rekombinasyonu ile diğer 23S rRNA genine kolayca transfer olabildiği gösterilmiştir. İki RNA kopyasının birinde mutasyonun gözlenmesi yüksek düzey dirence neden olmak için yeterlidir (18).

MİK değerinin sonuçları uygulanan yöntemin koşullarına göre değişkenlik gösterebilir; artan pH saptanan MİK değerini azaltabilirken, karbondioksitli ortamda inkübasyon MİK değerini arttırabilir (169).

2.6.2.3. Florokinolon Direnç Mekanizması

Genel olarak kinolon direnci üç farklı yol ile olabilir: 1- Hedef aracılı direnç: Giraz ve topoizomerez IV'teki mutasyonlar zayıflamış kinolon-enzim etkileşimlerine neden olur. 2- Plazmid aracılı direnç: Kinolondan enzim-DNA komplekslerini koruyan ve topoizomerez-DNA bağlanmasını azaltan Qnr proteinleri ile ya da siprofloksasin ve norfloksasinin C7 halkasındaki serbest nitrojeni asetilleyen bir aminoglikozid asetiltransferaz olan AAC(6')-Ib-cr aracılığı ile etkileri azalarak olur. Ayrıca plazmidte kodlanan efflux pompaları hücredeki kinolon konsantrasyonunu azaltarak dirence neden olur. 3- Kromozom aracılı direnç: Gram negatif bakterilerdeki porinlerin azalan ekspresyonu ile ilaç alınımının azalması ya da kromozomda kodlanan efflux pompalarının aşırı ekspresyonu sonucunda hücrede ilaç tutulumunun azalması ile olur (Şekil 24) (174).



Şekil 24. Kinolon direnç mekanizması (174)

Kromozomal genlerdeki mutasyonların neden olduğu kinolon direnci iki mekanizma ile gerçekleşir: 1- DNA-giraz ve topoizomerez IV alt ünitelerinin kodlanmasını ve değişen geçirkenlik mekanizmasını kapsayan değişime uğramış hedef mekanizması, 2- Dış membran difüzyonu için kanalları düzenleyen proteinlerin ya da sitoplazmik membran efflux pompalarının ekspresyonunun regülasyonu. Düşük düzeyde kinolon direncine neden olduğu bildirilen bir diğer mekanizma ise indüklenmiş hedef ekspresyonudur (34).

En yaygın levofloksasin direnç mekanizması DNA giraz ve topoizomerez IV kodlayan genlerdeki mutasyonlardır. Porinlerdeki değişiklikler, özellikle OmpF'deki yapısal değişiklikler ve efflux pompalarının aktivitesini etkileyen regülatuar genlerdeki mutasyonal değişiklikler de levofloksasine karşı direnç gelişiminde rol oynayan mekanizmalar olarak bildirilmiştir (31).

Bakteriyal tip II topoizomerazların inhibisyonu yanıtındaki tamir mekanizmalarını aktive eder. Çünkü hasar gören DNA'nın her bir parçası tamir proteinlerinin oluşmasında rol oynayan bir SOS gen ağını aktive eder. SOS sistemini düzenleyen regülatuar RecA ve LexA proteinlerinin kontrolü altında 40'tan fazla gen bulunmaktadır (34).

Bakteriyal DNA topoizomerazlar kinolon inhibisyonundan QnrB peptidi ile korunurlar, aynı zamanda kinolona karşı düşük düzey direnç oluştururlar. SOS yanıt tetikleyicilerin sinyallerinin mutasyon yeteneğini ve qnrB-aracılı kinolon direncini arttırdığı bildirilmiştir (34).

Kinolonlara karşı direnç mutasyon oranını arttıran hedef bölgedeki mutasyonlar ve SOS sistem uyarısı ile genlerin de-represyonu ile kazanılır. Florokinolonlar tarafından genetik varyasyonun artırılabilmesi SOS bağımsız olası ikinci bir mekanizmadır ve direnç determinantlarının kazanımını, değişimini ve yayılmasını destekleyebilmektedir (34).

SOS sistemi antibiyotik direnç genlerinin ya da mutasyonların horizontal geçişini desteklemektedir, antibiyotik direncinin yayılmasına katkıda bulunmaktadır (34).

Kinolon ve florokinolonlara karşı dirence neden olan temel faktörler ilaç hedef genlerindeki kromozomal mutasyonlar ile ilişkilendirilmekle birlikte son zamanlarda keşfedilen ve plazmid-kodlu dirence neden olan çeşitli mekanizmalar bildirilmiştir (159).

i. Kromozom-kodlu Direnç

Enterobacteriaceae'de kinolonlara direnç genellikle ilk olarak DNA giraz'da (GyrA) sonrasında topoizomeraz IV'te (P arC) mutasyonların birikiminden kaynaklanır. *E. coli*'nin GyrA'sındaki değişimler çoğunlukla Ala67 ve Asp87 aminoasitleri arasında lokalize QRDR bölgesindeki proteinin N-terminalinde meydana gelir. Mutasyonlar en sık enzimin aktif bölgelerinin (Tyr122) yakınında Ser83 ve Asp87 kodonlarında meydana gelmektedir. Ayrıca kinolon direnci azalan membran permeabilitesi ve/veya efflux pompa sistemlerinin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabilmektedir (159).

ii. Plazmid-aracılı Direnç

Genellikle efflux direnç mekanizmaları veya hedef bölge için genetik bilgi kromozomlar tarafından kodlanır (34). İmkansız olarak nitelendirilmesine rağmen, plazmid-aracılı kinolon direnci ("plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR") ilk olarak 1998 yılında Amerika'da bir *Klebsiella pneumoniae* suşunda rapor edilmiştir. Bugüne kadar çeşitli

PMQR mekanizmaları tanımlanmıştır: Qnr proteinleri, aminoglikozid açıltransferaz AAC(6')-Ib-cr ve efflux pompaları QepA ve OqxAB (34,159).

İlk tanımlanan PMQR determinantı Qnr proteini, son zamanlarda QnrA1 olarak adlandırılmıştır. QnrA1, prokaryot ve ökaryotlarda 500'den fazla üyesi bilinen, “pentapeptid tekrar ailesine” (“pentapeptid repeat”, PPR) bağlı olan 218-aminoasitlik bir proteindir. Bu proteinler bir konsensus sekans [S,T,A ya da V] [D ya da N] [L ya da F] [S,T ya da R] [G] ile birbiri ardına tekrar eden aminoasit sekanslarından oluşmaktadırlar. Diğer altı QnrA varyantı (QnrA2-QnrA7) tanımlanmıştır ve QnrA1'den birkaç aminoasit değişikliği ile ayrılmaktadır (159).

Kinolon inhibisyonu, topoizomeraz IV ve DNA giraz'ın Qnr proteini ile etkileşimi sonucu önlenir. Qnr proteini, nalidiksik aside karşı dirence ve florokinolon direncine karşı azalan duyarlılığa ya da düşük düzeyde florokinolon direncine neden olur (34).

qnrA ve *qnrB* genleri genellikle aminoglikozid inaktive eden enzimler ya da β -laktamazlar gibi diğer antibiyotiklere dirençten sorumlu olan, integron içeren genleri düzenlerler. Kinolon ve aminoglikozidler, β -laktamlar gibi diğer antibiyotiklere karşı direnci kodlayan genlerin ilişkisi, florokinolonlara dirençli suşların kimyasal açıdan ilişkili olmayan antibiyotik sınıfları tarafından seçim ve yayılım için uygundur (34).

QnrA1, giraz inhibitörlerine dirençte rol oynayan, pentapeptid tekrar ailesinin iki diğer üyesi olan McbG ve MfpA ile %19-20 aminoasit benzerliği göstermektedir. Qnr proteinleri kinolonlara karşı direnci değişen kinolon hedef enzimleri, efflux pompa aktivasyonu, ya da dış membran porinlerinin eksikliği ile destekleyebilir. Ayrıca, Qnr proteinleri kinolon dirençli mutantların seçimini 100 kat daha fazla bir sıklıkla seçilebilir seviyeye yükselterek kolaylaştırır. Qnr determinantlarının bulunması düşük düzeyde kinolon direncinin seçimini kromozom-kodlu mekanizmalar sayesinde kolaylaştırır. Klinik açıdan Qnr determinantları, siprofloksasin mutant önleme konsantrasyonunu (“mutant prevention concentration”, MPC) mutantların daha yüksek düzeyde kinolon direnci ile geri kazanımına aracılık ederek 10 kattan daha fazla arttırılabilir. Buna bağlı olarak Qnr pozitif suşlar, florokinolon tedavi sonrası kinolon direncinin ek olarak kromozom kaynaklı mekanizmalarının *in vivo* seçilimi için uygun zemin olabilir (159).

Qnr determinantlarının tüm tipleri dünya da birçok farklı *Enterobacteriaceae* türlerinde tanımlanmıştır fakat çoğunlukla toplum kökenli ve nozokomiyal *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. coli* ve *Salmonella enterica* suşlarında bildirilmiştir (159).

Tüm *qnr* genleri büyüklüğü 7-320 kb arasında değişkenlik gösteren plazmidler üzerinde identifiye edilmiştir. Bu plazmidlerin, özellikle *qnrA* ve *qnrB* pozitif olanlar sıklıkla β -laktamlar, aminoglikozidler, kloramfenikol, tetrasiklin, sülfonamidler, trimetoprim ve rifampine karşı dirence neden olan diğer antibiyotik direnç genlerini de barındırdıkları gösterilmiştir (159).

iii. Aminoglikozid asetiltransferaz AAC(6')-Ib-cr

AAC(6')-Ib-cr enzimi, Shanghai, Çin'de *qnrA* pozitif *E. coli* suşunda keşfedilen bir PMQR determinantıdır. *aac(6')-Ib-cr* (siprofloksasin direnci için) geni, genellikle kanamisin, tobramisin ve amikasin direncinden sorumlu yaygın aminoglikozid asetiltransferaz AAC(6')-Ib'nin bir varyantını kodlar. Bu varyant, wild type AAC(6')-Ib ile karşılaştırıldığında 102 (Trp → Arg) ve 179 (Asp → Tyr) kodonlarında iki değişim sergiler ve her iki mutasyonun da çeşitli florokinolon moleküllerine duyarlılığın azalmasında rol oynadığı bildirilmiştir (159).

Bu varyant enzim siprofloksasin aktivitesinin dört kat daha azalması için norfloksasin ve siprofloksasin'i asetilleme yeteneğindedir. C-7 pozisyonunda piperazinil bulunmaması nedeniyle levofloksasin ve moksifloksasin asetilasyona uğramaz (167). *aac(6')-Ib-cr* geni *sull*-tip sınıf 1 integronlar içinde bir gen kasedi olarak tanımlanmıştır ve hem ESBL-pozitif hem de ESBL-negatif suşlarda identifiye edilmiştir (159).

iv. Efflux pompası QepA

Efflux pompalarının kromozom-kodlu olmalarının yanısıra yeni bir PMQR determinantı, *qepA* (kinolon efflux pompası için) Japonya ve Belçika klinik *E. coli* suşlarında tanımlanmıştır. Bu gen, 511-aminoasitlik bir protein (53 kDa) kodlar (159). Bu protein wild type duyarlılık profiline kıyasla MİK değerlerinin 8-32 kat artışı ile hidrofilik kinolonlara (örn; norfloksasin, siprofloksasin ve enrofloksasin) duyarlılığın önemli derece azalmasına neden olur. Buna karşın, QepA proteini kısmen hidrofilik (örn; perfloksasin, sparfloksasin, levofloksasin, moksifloksasin) ve hidrofobik (örn; nalidiksik asit) kinolonların MİK değerlerini önemli derecede değiştirmez (34,159).

Kinolon direncinin sadece vertikal aktarımının varsayılmasıyla birlikte, bu PMQR kodlayan genlerin varlığının horizontal geçişin de olabileceğini gösterdiği bildirilmiştir (159).

H. pylori enfeksiyonunda florokinolon direnci çoğunlukla (%99) *gyrA* geninin QRDR bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Enzim ve antibiyotiğin bildirilen nokta mutasyonları ile bağlanmasının inhibisyonunun bir sonucudur. Çeşitli çalışmalarda meydana

gelen mutasyon lokusları olarak 88 pozisyonu (Ala88Val), 91 pozisyonu (Asp91Gly, Asn, Ala ya da Tyr) ve 87 pozisyonu (Asn87Lys) bildirilmiştir. Levofloksasin dirençli *H. pylori* suşlarının tümünde hem 91 hem de 87 pozisyonunda mutasyonlar bildirilmiştir. Ayrıca 87. pozisyonda Tyr→Asn değişimi yeni bir mutasyon tanımlanmıştır. Nadir görülen ve genellikle 87. ve 91. pozisyonlardaki mutasyonlar ile ilişkilendirilen, MİK değerlerindeki rolü az olan Asp86Asn mutasyonu saptanmıştır. Levofloksasin direncinde saptanan *gyrA* ve *gyrB* genlerindeki mutasyonların oranları sırasıyla %83.8 ve %4.4 olarak bildirilmiştir (27,34).

Levofloksasin direncinde rol oynayan *gyrA*'nın 87. kodonunda çeşitli asparjin-treonin rezidülerinden meydana gelen bir aminoasidik polimorfizmin meydana gelmesi gibi diğer faktörler de vardır. Spesifik olarak tanımlanan *H. pylori* J99 standart suşunda treonin bulunması ve *H. pylori* 26695 standart suşunda asparjin rezidülerinin bulunması daha yüksek düzeyde antibiyotik duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu iki standart suşun tüm genomlarının sekanslanması sayesinde bu farklılık tanımlanmıştır. Diğer *Helicobacter* türleri ilginç olarak 87. kodonda treonin rezidülerinin varlığını korumaktadır ve bunun, *Helicobacter* türlerinin evriminin, bir “filogenik” tipinin olması ihtimalini belirtmekte olduğu bildirilmiştir (27,34).

26695 ve J99 standart *H. pylori* suşlarının total genom sekansları daha yüksek antibiyotik duyarlılığı ile ilişkili olarak 87. kodonda J99'da treonin (Thr,T), 26695'de asparajin (Asn,N) varlığını göstermiştir ve bu da *Helicobacter* türlerinin filogenik evriminin olasılığını göstermektedir (27).

H. pylori'de levofloksasin direnci *gyrA* geninin QRDR bölgesindeki mutasyonlar nedeni ile olmaktadır. Başlıca ilişkili aminoasit pozisyonları 87 ve 91 olarak bildirilmiştir. En sık görülen mutasyonlara bağlı değişimler Asn87Lys, Asp91Gly, Asp91Asn ve Asp91Tyr dönüşümleridir. Birçok çalışmada *gyrB* geni de araştırılmıştır fakat *gyrB* geninde dirence neden olan mutasyon görülmemiştir. Efflux pompalarının *H. pylori* 'de florokinolonlara karşı dirençte rol oynamadığı ve *parC* veya *parE* genlerinin *H. pylori* genomunda bulunmadığı bildirilmiştir (8,35). 86, 87, 88 ve 91 kodonlarında tespit edilen 11 adet mutasyon ve bu 11 mutasyona ek olarak yeni tanımlanan A88P ve D91H mutasyonlarının da levofloksasin direncinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (175). 87 ve 91 pozisyonlarındaki mutasyonların levofloksasin dirençli suşların tümünde görüldüğü bildirilmiştir (27).

2.6.2.4. Tetrasiklin Direnç Mekanizması

Genel tetrasiklin direnç mekanizmaları; antibiyotiğin bakteri hücrelerine girişinin azalması, aktif efflux pompaları, ribozomal hedef bölgesinin değişmesi veya antibiyotiğin

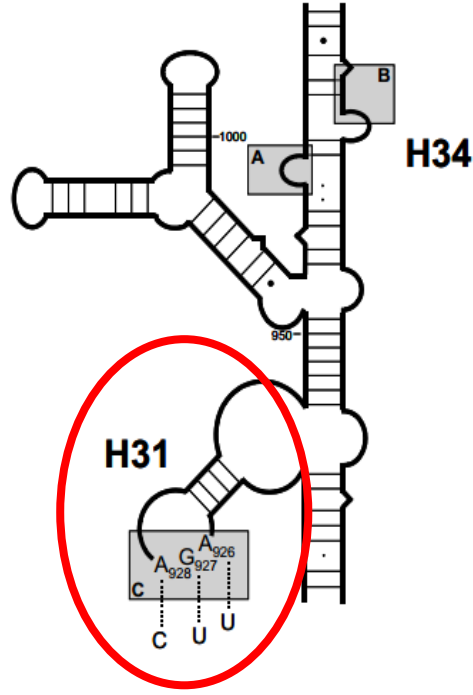
enzimatik modifikasyonudur. Dış membran porin proteini OmpF'yi kodlayan kromozomal gende meydana gelen mutasyonlar diğer antibiyotiklerde (β -laktamlar, kinolonlar, kloramfenikol) olduğu gibi tetrasiklinlere karşı düşük düzeyde direnç neden olabilir. Birçok bakteride tetrasiklin direnci çoğunlukla efflux proteinlerinin veya ribozomal koruma proteinlerinin aşırı ekspresyonu aracılığı ile olur (18,45).

Çoğu bakteride tetrasikline karşı direnç hücre zarında membran-ilişkili efflux proteinleri tarafından tetrasiklin-kasyon komplekslerinin bir enerji-bağımlı efflux'u nedeniyle olmaktadır. Tetrasiklin komplekslerinin hücreden dışarı atılması hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltır ve ribozomu tetrasiklinin etkisinden korur. Tetrasiklin duyarlılığı efflux genlerindeki delesyonlar ile artmaktadır, efflux genlerinin aşırı eksprese edilmesi ise tetrasiklin direncine neden olmaktadır (20).

Diğer yaygın direnç mekanizması ise ribozomal koruma proteinleri aracılığı ile olmaktadır. Bu sitoplazmik proteinler tetrasiklin için ribozomun afinitesini azaltarak ya da bağlı antibiyotiğin ribozomdan serbest bırakılmasını sağlayarak tetrasiklin direncine neden olmaktadır (20,27). Ribozom koruma proteinleri elongasyon faktörleri EF-Tu ve EF-G'ye homoloji gösterirler. Ribozoma bağlanarak konformasyonunu değiştirip tetrasiklinin bağlanmasını inhibe ederler. Tet(M) ve Tet(O) bu proteinlerden en karakterize olanlarıdır. Ribozom koruyucu proteinlerde antibiyotik ribozoma bağlanabilir fakat protein sentezi bozulmaz (18,45).

Oksijen ve NADPH varlığında *tetX* geni tarafından kodlanan bir enzim tarafından tetrasiklinin enzimatik inaktivasyonu ve tetrasiklinin bağlanma bölgesini değiştiren 16S rRNA genindeki mutasyonlar diğer tetrasiklin direnç mekanizmalarıdır (20).

H. pylori'deki tetrasiklin direncinin efflux pompaları ya da ribozom koruyucu proteinler aracılığı bildirilmiştir. Temel mekanizma 16S rRNA'da primer tetrasiklin bağlanma bölgesindeki tek, ikili ve üçlü baz çifti değişimlerine dayanır (Şekil 25). Nükleotidik triplette değişiklik (AGA926-928TTC) tetrasiklinlerin bağlanma bölgesine bağlanamamalarından dolayı bu bileşiklere karşı direnç ile ilişkilendirilmiştir (8,35,176).



Şekil 25. 16S rRNA’da primer tetrasiklin bağlanma bölgesindeki baz değişimleri (177)

16S rRNA’daki tek veya ikili mutasyonların orta düzeyde (“intermediate”) MİK değerine, üçlü mutasyonların (AGA926-928 >TTC) ise yüksek seviyelerde tetrasiklin direncine neden olduğu bildirilmiştir. (8,27,172,178) *H. pylori*’de tetrasiklin direncinin birçok ülkede görülmediği ya da direnç oranının düşük olduğu bildirilmiştir (<%5) (8,27).

Yüksek düzeyde direnç (MİK >256 µg/ml) ilk defa *H. pylori* eradikasyonu klasik üçlü tedavi başarısızlığı ile sonuçlanan bir hastada 1996 yılında Avustralya’da bildirilmiştir. *H. pylori*’nin tetrasiklinlere karşı genel direnç oranı düşüktür ve %2’den daha az olduğu bildirilmektedir. Tüm tetrasiklin dirençli suşların metronidazole karşı çapraz direnç gösterdiği ve çapraz direncin tetrasiklin direnci de dahil olmak üzere tetrasiklin duyarlı *H. pylori* suşlarına aktarılabileceği bildirilmiştir (164).

2.6.2.5. Metronidazol Direnç Mekanizması

Genel metronidazol direnç mekanizmaları; sitotoksik bileşenlerin konak DNA’sı ile etkileşiminden önce eliminasyonu ve serbest radikal ara ürünleri uzaklaştırabilen intrasellüler enzimlerin varlığıdır. Anaerobik bakterilerde metronidazol direnci, elektron alıcısının (özellikle piruvat: ferrodoksik oksidoredüktaz ve ferrodoksin) indirgenmiş aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek intrasellüler redoks potansiyellerinin metronidazol indirgenme

aktivasyonunu engellemesinin ise aerob türlerin intrensek direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (18,35).

H. pylori'deki metronidazol direnci ise proteini etkisiz hale getirebilen oksijen-duyarsız bir nitroredüktaz *rdxA* genindeki mutasyonlar, *frxA* (flavin oksidoredüktaz) ve *frxB* (ferrodoksin benzeri enzimler) genleri tarafından kodlanan diğer redüktazların inaktivasyonu ve son zamanlarda raporlanan kompleks efflux sistemleri ile ilişkilendirilmiştir (18,35). Ayrıca TolC efflux pompasının da metronidazol direnç mekanizmasında rol oynadığı bildirilmiştir (8,176). *H. pylori*'de metranidazol direnci ilacın aktif olması için gereken elektron alıcılarını kodlayan genlerde görülen mutasyonlar ile oluşmaktadır. *H. pylori*'de FdxA, Fld A, Fdx B, Frx A, Oor D, Por D, Rdx A, Mda B, Rib F gibi elektron alıcıları bulunmaktadır, bu nedenle *H. pylori*'de görülebilecek mutasyona bağlı direnç gelişme olasılığını arttırmaktadır (18,172).

2.6.2.6. Rifampin Direnç Mekanizması

H. pylori 'de rifampinlere karşı direnç gelişimi *Mycobacterium tuberculosis* ve *E. coli* 'de olduğu gibi *rpoB* geninde 149, 524, 525, 585 pozisyonlarındaki mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir ve oldukça nadirdir (8).

2.7. Antimikrobiyal Duyarlılığın Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

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 (18,42). 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 (18).

H. pylori duyarlılık testleri için kullanılan yöntemler difüzyon ya da dilüsyon temelli standart fenotipik yöntemler ve genotipik yöntemler olarak iki grupta incelenir (8).

2.7.1. Fenotipik Yöntemler

2.7.1.1. Agar Dilüsyon

Agar dilüsyon, antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan referans bir yöntemdir. *H. pylori* için CLSI'nın önerdiği antimikrobiyal duyarlılık testi agar dilüsyondur (8,18,178). 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 (179). CLSI'ya göre klaritromisin için sınır değerler <0.25 µg/mL duyarlı, 0.5 µg/mL intermediate ve >1 µg/mL dirençli olarak agar dilüsyon yöntemi için belirlenmiştir (8,178). EUCAST'a göre ise klaritromisin için; ≤ 0.25 µg/mL duyarlı, >0.5 µg/mL dirençli olarak E-test yöntemi için belirlenmiştir (148). Rutin olarak uygulanması zor bir yöntemdir (38,180).

2.7.1.2. Broth Dilüsyon

Broth dilüsyon metodu otomasyona adapte olabilme avantajına sahiptir. Ayrıca, *H. pylori*'nin sıvı besiyerinde üremesinin zorluğu nedeniyle *H. pylori* için çok sık kullanılmamaktadır. Brucella broth ya da Mueller-Hinton broth sıvı besiyerlerinin eklenmesi ile iyi sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir. Metronidazol hariç E-test ile diğer antibiyotiklerin iyi bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır (8,40).

2.7.1.3. Disk Difüzyon

Rutin duyarlılık testleri için çok ekonomik, en basit ve en sık kullanılan metottur (8,18). *H. pylori* gibi yavaş üreyen bakteriler için önerilmeyen bir yöntemdir. Fakat birçok çalışmada E-test ile uyumlu bulunmuştur (38,180). 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 (8).

2.7.1.4. Gradyent Difüzyon (E-test)

E-test, disk difüzyon yönteminin kantitatif bir varyantıdır. Metronidazol hariç diğer tüm antibiyotikler için agar dilüsyon metodu ile uyumunun çok iyi olduğu bildirilmiştir. Kesin bir MİK değeri belirlenmesi gerektiğinde E-test uygulanmalıdır (8). *H. pylori*'de disk difüzyon yerine E-test metodunun önerilmesinin temel nedeninin E-test stribinin antibiyotik

salımı için daha sağlam bir yapıya sahip olması ve uzun inkübasyonları tolere edebilmesi olduğu belirtilmiştir (38,180).

2.7.1.5. “Breakpoint” Duyarlılık Testi

Dilüsyon metodlarının basitleştirildiği bir metottur. Agar plağında direnci ifade eden sınır değere karşılık gelen sadece bir ilaç konsantrasyonu kullanılır. Suşları duyarlı, orta düzeyde dirençli ya da dirençli olarak sınıflandırmak için örneğin klaritromisin’de 1 µg/mL ya da iki farklı konsantrasyon (0.25 ve 1 µg/mL) kullanılır (8). Agar dilüsyon metodu ile metronidazol hariç korelasyonunun iyi olduğu bildirilmiştir (40). Agar difüzyon (E-test ve disk) ile karşılaştırıldığında ise metronidazol duyarlılık testi %94 korelasyon göstermiştir fakat tekrarlanabilirliğinin çalışılmadığı bildirilmiştir (8).

2.7.2. Genotipik Yöntemler

H. pylori tanısında kültürün altın standart yöntem olmasına ve özgülüğünün %100 olmasına rağmen narin ve yavaş üreyen bir bakteri olmasından dolayı, birçok laboratuvar moleküler tanı testlerine yönelmektedir (43). *H. pylori* nazlı ve yavaş üreyen mikroaerofilik bir mikroorganizmadır ve standart kültür temelli *in vitro* antibiyotik duyarlılık testleri (disk difüzyon, agar dilüsyon ve E-test) bir uzman kişi tarafından yapılırsa bile duyarlılık sonuçları gastrik biyopsi örneğinin hastadan alındığı günden en az 10-14 gün sonra raporlanabilir (39). Moleküler metotlar bakterilerin canlılığına bağımlı değildir (8). Genotipik metodların hemen hemen hepsi sadece makrolid direncini saptamak için uygulanabilmektedir (40).

2.7.2.1. PCR- Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Biyopsi ya da dışkı örneğinden izole edilen DNA’da klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarını içeren 23S rRNA geni PCR ile çoğaltılır ve sonrasında spesifik olarak mutasyon bölgelerinden kesim yapan restriksiyon endonükleazlar ile parçalanır. Sonuçta oluşan fragmentlerin boyutu kullanılan enzime özgü nokta mutasyonun varlığını/yokluğunu belirler. Örneğin; A2142G mutantının varlığı yaklaşık 700 bp büyüklüğünde iki fragment veren bir *MboII* bölgesi yaratır. A2143G mutasyonunun varlığı 700 bp ve 300 bp büyüklüğünde iki majör fragment veren ek bir *BsaI* bölgesi yaratır. Direnç fenotipi ve bu yöntem ile saptanan spesifik mutasyonların varlığı sekans analizi ile valide edilmiştir ve farklı ülkelerde *H. pylori* suşlarının klaritromisin duyarlılığını belirlemede kullanılmaktadır (39). Ayrıca *BceAI* enzimi A2142C mutasyonunu saptamak için önerilmiştir. Genel olarak

restriksiyon bölgeleri o bölgeleri kesen enzimler ile bilinmektedir; *BsaI* A2142G mutasyonu, *Bsbl* A2143G mutasyonu için kullanılan enzimlerdir (8).

2.7.2.2. Floresan Rezonans Enerji Transfer (FRET)-Real-Time PCR

Bu yöntem direkt gastrik biyopsi örneklerinden ve dışkı örneklerinden izole edilen DNA'da klaritromisin direncine neden olan majör nokta mutasyonlarının PCR, eş zamanlı olarak ampliconların prob hibridizasyonu ile saptanması ve LightCycler thermocycler ile FRET teknolojisi kullanılan termal analizine dayanır (42). Floresanla işaretlenmiş mutasyonlu probun varlığında bir 23S rDNA fragmenti amplifiye edilir. Bu problemler PCR ürünleriyle hibridize olduğu zaman, bir floresan sinyal oluşur. PCR tamamlandıktan sonra, ısı mutasyon probunun erime noktasını saptamak için artırılır. Floresan sinyalin oluşturduğu ısı, mutasyon probunun ayrıldığı noktada (erime noktası) sinyal verir. Hedef sekansta uyumsuzluk olduğunda, daha düşük erime sıcaklığı hibrid birleşimi karşılaştırılarak elde edilir. Kültüre gereksinim duymadan, direkt gastrik dokuya uygulandığında üç saat içerisinde sonuç veren basit ve hızlı bir tekniktir (18).

Bu yöntem wild type ve makrolid dirençli suşların saptanabilmesine olanak sağlar fakat A2142G ve A2143G mutasyonlarını ayırd edebilme gücüne sahip değildir. Bu mutasyonlar *H. pylori* suşlarında saptanan en yaygın (dirençli suşların %95'inden fazlası) iki mutasyon olduğu için bu, majör bir problem değildir (43).

2.7.2.3. Diğer PCR Temelli Yöntemler

PCR-Oligonükleotid ligasyon testi (OLA), PCR'dan sonra ek bir basamak içerir. İkinci basamağı gerçekleştirebilmek için wild type ve farklı mutasyonları içeren DNA fragmentine komplementer oligonükleotid problemler olmalıdır (40). **PCR-DNA enzim immun testi (DEIA)**, PCR'dan sonra çoğaltılan ürünler prob kaplı mikrotitre kuyucuklara eklenir, sıvı fazda bir ters hibridizasyon gerçekleştirilir ve kolorimetrik olarak saptanır. Direkt biyopsi örneklerinden *H. pylori* ve klaritromisin direncine neden olan majör üç mutasyon saptanabilmektedir (39,40). **PCR-Line Prob Testi (PCR-LIPA)**, nokta mutasyonlarına uygun oligonükleotid problemler nitroselüloz bir stripe uygulanır ve testin genel prensibi amplifiye edilmiş ürünlerle ters hibridizasyona dayanır (39,40). PCR-LIPA, geniş sayıda örneklerin test edilmesi için oldukça uygun olan ve yedi farklı mutasyonun saptanabildiği sistem, streptavidin-alkalin fosfataz konjugat/substrat aracılığıyla hibritleri kolorimetrik olarak saptanır (39). **Biprob Real-time PCR**, *H. pylori*'nin *ureA* ve 23S rRNA'sı "LightCycler thermocycler" ile FRET ve erime

eğrisi analizi kullanılarak saptamaktadır (13,43). Biprob lar Cy5 floro foru ile işaret lenmiş sekans spesifik prob lar dır. Prob hedef sekansa hibridize oldu ğ unda, Cy5 SybrGreenI'den enerji transferine neden olmak ta ve salınan ış ık artmaktadır. Prob ve hedef arasında uyumsuz baz çift leri varlığ ında, erime eğrisi analizinde düşük erime derecesi aç ığ a çıkarmaktadır (13). Bu protokol hem gastrik biyopsi ve dış ık ı örnek leri ne uygulanabilmektedir (43). **DPO (Dual Priming Oligonucleotide) Multiplex PCR**, spesifik olmayan bağ lanma bölgelerini bloke eder, dolayısıyla yanlış primer bağ lanmalarını elimine ederek konvensiyonel PCR'a göre saptama duyarlılı ğ ı ve özgül lüğ ünü artırır. Bu yöntem DPO teknolojisi kullanılan bir multipleks PCR'a dayanır. DPO primerlerinin yapısı konvensiyonel primerlerden farklıdır, 55-60 °C arasında daha spesifik bir hibridizasyon sağ lar ve hedefe bağ lanıp non-spesifik bağ lanmaları önler. Bu PCR herhangi bir konvensiyonel thermocyclerde uygulanabilir. "Seeplex® ClaR-*H. pylori* ACE detection kit" kullanılarak *H. pylori* varlığ ı ve A2142G ve A2143G nokta mutasyonlarının neden oldu ğ u makrolid direncinin saptanmasında DPO-PCR yöntemi uygulanmaktadır. Makrolid direncine neden olan 23S rDNA mutasyonlarını saptama performansı kùltür temelli fenotipik duyarlılık testleri ile uyumlu oldu ğ u bildirilmiştir (41). **Tek Kanal Multipleks PCR**, *H. pylori* enfeksiyonunu ve allel spesifik "scorpion" primerleri kullanarak klaritromisin direncine neden olan üç 23S rDNA mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Tek bir molekülde bir primer ve bir prob birleşmesi ile oluş an "scorpion" primerler tek nükleotid polimorfizmlerini SmartCycler II cihazı ile floresan sinyalleri dört kanalda okuyarak ayırt edebilmektedir. Duyarlılı ğ ı ve spesifikli ğ i yüksek bir test olan "scorpion" PCR A2142G ve A2143G mutasyonlarının ayırımını yapabilmektedir (43).

2.7.2.4. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

Floresan işaretli oligonükleotid prob lar kullanılan bir rRNA temelli tam hücre "whole cell" in situ hibridizasyon metodudur (8). *H. pylori*, floresanla işaret lenmiş oligonükleotid prob lar *H. pylori* spesifik 16S ve 23S rRNA ile hibridize olmaktadır. İşaret lenmiş prob larla in situ olarak hibridize edilmiş bakteriler floresan mikroskobu ile incelenebilmektedir. Bu yöntem ile eş zamanlı olarak *H. pylori* varlığ ı ve klaritromisin direnci saptanabilmektedir ve direkt olarak gastrik biyopsi örnek leri ne uygulanabilmektedir (8,18,39,40,43). *H. pylori* için türe spesifik saptama florese in ile işaretli 16S rRNA spesifik oligonükleotid Hpy-1 probu ile yapılmaktadır. Eş zamanlı olarak tür için genotipik antibiyotik direncin saptanması mümkündür. *H. pylori* enfeksiyonuna karşı üç lü tedavide kullanılan temel antibiyotik

klaritromisine karşı dirence neden olan 23S rRNA'da tanımlanan majör nokta mutasyonları rodamin ile işaretli ClaR1, ClaR2 ve ClaR3 probları ile spesifik olarak saptanmaktadır. Mutasyon içermeyen wild type suşun belirlenmesi için rodamin işaretli probu kullanılmaktadır (181).

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan FISH yöntemi fiksasyon, preparatların hazırlanması ve dehidratasyon, hibridizasyon, yıkama basamaklarından oluşmakta ve sonuçların analizi epifloresan mikroskobu ya da flow sitometri ile yapılmaktadır (181).

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 donanıma gerek duymaksızın laboratuvarlarda uygulanabilmektedir (182). Maastricht IV Konsensus 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 (127). Klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarının moleküler yöntem ile saptanmasında DNA amplifikasyonu ve sekansa alternatif bir yaklaşım da FISH yöntemidir. Bu yöntem ile gastrik biyopsi örneklerinde mutasyonların hızlıca saptanabilmesi için mutasyonlara spesifik fluorezan problar kullanılır. Klaritromisin dirençli *H. pylori* suşlarının saptanmasında FISH yönteminin kültür ve duyarlılık testleri ile iyi bir korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir. FISH yönteminin diğer bir avantajı ise histolojik inceleme için gönderilen doku örneklerinin teorik olarak patoloji servisinden FISH yöntemini uygulamak için istenebilecek olmasıdır (136).

2.7.2.5. GenoType HelicoDR

Metronidazol ve amoksisilin için hala belirsiz olmasına rağmen makrolid ve florokinolon için dirence neden olan mutasyonlar artık çok iyi bilinmektedir. GenoType HelicoDR testi, *H. pylori*'nin ve florokinolon ve/veya klaritromisin direncinin kültür veya biyopsi örneklerinden saptanması için bir moleküler genetik test sistemidir (36).

Klaritromisin direncinin saptanması 23S rRNA genindeki en bilinen mutasyonların (2146 ve 2147 pozisyonları) saptanması ile mümkün kılınmıştır. Florokinolon direncini test etmek için ise *gyrA* geni (87. ve 91. kodon) incelenmektedir. Klaritromisin direncine neden olan en yaygın mutasyonların görüldüğü 2142 ve 2143 pozisyonları bu test yönteminde gen

bankası NC000921 ve NC000915 erişim numaralı *H. pylori* genom sekanslarına göre 2146 ve 2147 olarak belirtilmiştir (36,130).

PCR temelli bir hibridizasyon metodu olan GenoType HelicoDR'de stripler, *H. pylori*'nin ve klaritromisin direnci ile ilişkili olarak 23S rRNA geninde 2146-2147 kodonlarındaki (A2146G, A2146C ve A2147G) mutasyonların, florokinolon direnci ile ilişkili olan 87. ve 91. kodonlardaki (N87K, D91N, D91G ve D91Y) mutasyonların saptanması için dizayn edilmiştir. Bu test, *H. pylori* varlığının, antimikrobiyal profilinin ve klaritromisin ve florokinolon ile ilişkili mutasyonların eş zamanlı saptanmasını sağlar (29,36).

Stripler, wild type alleller (*WT* problemleri) ya da mutasyona uğramış allellerin (*MUT* problemleri) sekans dizileri ile hibridize olmak üzere dizayn edilen oligonükleotidler (DNA problemleri) ile kaplanmıştır (Tablo 2) (36).

GenoType HelicoDR testi ile florokinolon ile ilişkili olarak 91. kodonda wild type genotipinin ve 87. kodonda 4 farklı wild type genotipinin saptanması mümkündür (Tablo 2) (36,130).

Tablo 2. *rrl* geni ve *gyrA* genindeki mutasyonları saptamak için GenoType HelicoDR testinde kullanılan DNA sribine hibridize olan problemler (36)

Prob	Kodon	Nukleotit	İlişkili Fenotip
gyr87-WT1	N87	AAC	Levofloksasin S
gyr87-WT2	N87	AAT	Levofloksasin S
gyr87-WT3	T87	ACC	Levofloksasin S
gyr87-WT4	T87	ACT	Levofloksasin S
gyr87-MUT	N87K	AAA	Levofloksasin R
gyr91-WT	D91	GAT	Levofloksasin S
gyr91-MUT1	D91N	AAT	Levofloksasin R
gyr91-MUT2	D91G	GGT	Levofloksasin R
gyr91-MUT3	D91Y	TAT	Levofloksasin R
23S-WT	2146 ve 2147	AA	Klaritromisin S
23S-MUT1	2146	A2146G	Klaritromisin R
23S-MUT2	2146	A2146C	Klaritromisin R
23S-MUT3	2147	A2147G	Klaritromisin R

(*H. pylori* J99 ve 26695 suşlarındaki numaralama sistemi kullanılmıştır; Gen Bankası erişim numarası: NC000921 ve NC000915. S, duyarlı; R, dirençli)

GenoType HelicoDR, kültür ya da biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu, ilgili gen bölgelerinin oaltıldığı biyotinlenmiş primerler ile multipleks amplifikasyon (PCR) ve bir ters hibridizasyon basamağı olmak üzere  basamakta uygulanmaktadır (36,129,130). Hibridizasyon aşaması; amplifikasyon ürünlerinin kimyasal denaturasyonu, tek iplikli biyotin işaretli amplikonların membrana bağlı problara hibridizasyonu, unspezifik bağlanan amplifiye olmuş ürünlerin uzaklaştırılması, streptavin/alkalinfosfataz (AP) konjugatının eklenmesi ve AP aracılı boyama reaksiyon basamaklarını içermektedir. Hibridizasyon sonucunda strip üzerinde saptanan bant paternleri, grsel olarak bir değerlendirme şablon sribi ile değerlendirilmektedir (130).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez çalışması Şubat 2012 - Mart 2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğine dispeptik yakınmalar ile başvuran endoskopi endikasyonu konulan diğer 2006.KB.SAG.042 BAP proje no'lu, 13.07.2006/179 Etik kurul onaylı doktora tez projesi kapsamında alınmış olan hasta grubundan randomize seçilen 58 hasta (40 kadın, 18 erkek; yaş ortalaması 41.1 ± 13.5) retrospektif olarak çalışmaya alınmıştır. Hastalar Roma III kriterlerine göre değerlendirilerek dispepsi tanısı konulmuştur (183). Koagülopati, gebelik, laktasyon, malignansiler, yakın zamanda kan transfüzyonu 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 alınmamıştır.

3.4. Çalışma Materyali

i. Biyopsi Örneklerinin Alınması

En az sekiz saatlik açlıktan sonra Fujinon SN2 GN20 A003 veya SN1 GN20 A923 marka video endoskop kullanılarak üst gastrointestinal sistem (GIS) endoskopisi, Uzman Gastroenterolog/Endoskopist tarafından uygulanmıştır.

Endoskopi öncesinde %10'luk Xylocain sprej ile farinkse lokal anestezi uygulanmıştır. 2006.KB.SAG.042 BAP proje no'lu, 13.07.2006/179 Etik kurul onayı olan doktora tez çalışması için endoskopi sırasında mide antrum ve korpusundan beşer adet olmak üzere yukarıdaki diğer doktora tez projesi kapsamında, endoskopi endikasyonu konulmuş hastalardan toplam on adet biyopsi örneği alınmıştır. Bir korpus ve bir antrum biyopsi örneğine endoskopi sırasında HÜT uygulanıp, diğer üç korpus ve üç antrum örneği ise kültür ve diğer moleküler testler için Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na 30 dakika içerisinde ulaştırılmıştır.

Bu hasta grubundan 58 hasta randomize seçilerek retrospektif olarak bu çalışmaya alınmıştır.

ii. Dışkı Örneklerinin Alınması

2006.KB.SAG.042 BAP proje no'lu, 13.07.2006/179 Etik kurul onayı olan doktora tez çalışması kapsamında çalışmaya alınan hastalardan ayrıca endoskopi oldukları gün içerisinde ya da maksimum 2-3 gün içerisinde temin edilebilmiş olan dışkı örnekleri -80 °C'de saklanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında randomize seçilen 58 hastanın 55'inin dışkı örnekleri de çalışmaya alınmıştır. Ancak randomize seçilen bu hasta grubundan üç hastanın dışkı örnekleri ise diğer doktora tez projesi kapsamında dışkı örneklerinin hastalardan elde edilemediği grup içerisinde yer almış olması nedeniyle bu tez çalışmasına dahil edilememiştir.

Dışkı örnekleri dışkı DNA izolasyonu yapılabildiği kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı Değişkenler: 2006-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne dispeptik yakınmalar ile başvuran ve endoskopi endikasyonu konulmuş, endoskopi uygulanan diğer proje kapsamındaki (2006.KB.SAG.042 BAP proje no'lu, 13.07.2006/179 Etik kurul onaylı doktora tezi) hasta grubunun içinden randomize seçilen 58 hastadan izole edilen *H. pylori* suşlarında bulunan *rrl* ve *gyrA* genlerindeki mutasyonların varlığı

Bağımsız Değişkenler: 2006-2010 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne dispeptik yakınmalar ile başvuran ve endoskopi endikasyonu konmuş, endoskopi uygulanan diğer proje (2006.KB.SAG.042 BAP proje no'lu, 13.07.2006/179 Etik kurul onaylı doktora tezi) kapsamındaki hasta grubunun içinden randomize seçilen 58 hastada korpus ve antrumdan alınan biyopsi örnekleri, biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşları ve aynı hastaların dışkılarından izole edilen total DNA

Kontrol Değişkenleri: *rrl* ve *gyrA* genlerinde mutasyon olmadığı bilinen *H. pylori* NCTC 11637 ve J99 standart suşları

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	Antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi
3	Brain Hearth Infusion Broth	OXOID	CM0225	İzole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının stoklanması için %20 gliserollü stok besiyeri hazırlanması
4	Brucella buyyon	BD	211088	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin transportu
5	Defibrine at kanı	OXOID	SR0050C	<i>H. pylori</i> kültür protokolünde kullanılan besiyerinin hazırlanması
6	Defibrine koyun kanı	OXOID	SR0051B	Antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılan besiyerinin hazırlanması
7	<i>Helicobacter pylori</i> Selective Supplement (DENT)	OXOID	SR0147E	<i>H. pylori</i> kültür protokolünde kullanılan besiyerinin hazırlanması
8	Christensen's 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	AB Biodisk	BI3964	Klaritromisin duyarlılığının

				belirlenmesi
11	Levofloksasin E-test	Biomerieux	1000843320	Levofloksasin duyarlılığının belirlenmesi
12	GasPak EZ Campy Container System	BD	260680	<i>H. pylori</i> 'nin üretilmesi için mikroaerofilik ortam oluşturulması
13	Gliserol	Baked Analyzed	M77809	İzole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının stoklanması için besiyeri hazırlığı
14	Ependorf tüp (1,5 ml)	Greiner bio-one	616201	Tüm analizler
15	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, biyokimyasal testler
16	Steril eküvyon	Cultiplast	Q0020	Antibiyotik duyarlılık testleri için bakteri süspansiyonunun besiyerine yayılması
17	Bistüri	Raymond	08220	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin parçalanması
18	Steril ajirojen su	Galen İlaç San. Tic. Aş	10501001	<i>Helicobacter</i> selective supplement (DENT)'in sulandırılması
19	Nitril eldiven	Galena	GT352R09P001	Agaroz jel hazırlanması
20	Pudrasız eldiven	Beybi	011119031130A	Tüm analizler
21	Filtreli pipet ucu (0,5-10, 10-100, 100-1000µl)	Greiner bio-One		Tüm analizler
22	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
23	Steril plastik (Pasteur) pipet	LP ITALIANA	161010	Tüm analizler
24	Santrifüj tüpü (50 ml)	Greiner bio-One	227261	Tüm analizler

25	QIAamp DNA mini kit	QIAGEN	51306	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu
26	High Pure PCR Template kit	Roche		İzole edilen <i>H. pylori</i> suşlarından DNA ekstraksiyonu
27	QIAamp DNA Stool mini kit	QIAGEN	145028041	Dışkı örneklerinden total DNA ekstraksiyonu
28	Primerler	Tibmolbiol ve Genmar		Real-time PCR ve konvensiyonel PCR
29	Problar	Tibmolbiol		Real-time PCR
30	LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (96 reaksiyon)	Roche	03003248001	Real-time PCR
31	Burgulu kapaklı tüp (16x100 mm)	ISOLAB	07703001	McFarland standart bulanıklık eşelinin hazırlanması
32	Agaroz (500g)	Lonza	50004	PCR ürünlerinin görüntülenmesi
33	TBE tamponu (x10 konst.) (1000ml)	AppliChem	A39451000	PCR ürünlerinin görüntülenmesi
34	Taq DNA polimeraz (500U)	Fermentas QIAGEN	# EP0402 201203	PCR
35	dNTP set (Herbir setten 10mM 'lık)	Fermentas	# R0193	PCR
36	PCR tüpü 0.2 ml (düz kapaklı) (10x100 adet/poşet)	BIOLOGIX		PCR
37	50 bp DNA Ladder	Fermentas	# SM0371	PCR ürünlerinin görüntülenmesi
38	DNA Loading dye (X6 konsantre) 5x1 ml	Fermentas	# R0631	PCR ürünlerinin görüntülenmesi
39	Etidyum bromür	Sigma	E7637-1G	PCR
40	Thermal Cyler	Techne	Techne TC-412	PCR
41	Jel elektroforez sistemi	Thermo	252436	PCR
42	Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat		PCR

43	Mikrodalga fırın	Roda	RD-7017P-A	PCR
44	-80°C Ultra derin dondurucu	Thermo	705 REL#2 805797-117	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin, dışkı örneklerinin ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının saklanması
45	-20°C Derin dondurucu	Beko		Malzemelerin (FBS gibi), E-test striplerinin, DNA izolasyonu için bekletilen parçalanmış biyopsi örneklerinin ve DNA örneklerinin saklanması
46	Buzdolabı	Beko No-Frost		Malzemelerin saklanması
47	Etüv	Memmert INE 500	E509.04 76	<i>H. pylori</i> ’nin üremesi için gereken 37°C ısının oluşturulması
48	Tartı	Adam Equipment Co. Ltd.	AE 326611770	Besiyeri hazırlanması
49	Otoklav	HICLAVE Hirayama	HV-85 000685748	Tüm analizler
50	Densimat	Biomerieux SA, France	IDN012764	McFarland standart bulanıklık eşelinin ayarlanması
51	Isı bloğu	Major Science	MC-01N 6214001	DNA ekstraksiyonu
52	Santrifüj	Hettich Zentrifugen	1204-001003- 01-00	DNA ekstraksiyonu
53	Pipet seti (10, 100, 1000µl)	Eppendorf	022474359	Tüm analizler
54	Işık mikroskobu	Olympus	CX31RTSF	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin Modifiye Gram boyama ve metilen mavisi boyalı preparatları ve izole edilen <i>H. pylori</i> suşlarının Gram boyalı preparatlarının incelenmesi
55	GenoType HelicoDR kiti	HAİN LIFESCIE NCE	JF00049	GenoType HelicoDR moleküler metodu
56	Lightcyler 1.5	Roche		Real-time PCR analizi
57	Lightcycler	Roche	04929292001	Real-time PCR analizi

	Kapiller (20µl)			
58	Anaerobik Jar 2.5 lt	OXOID	AG0025A	<i>H. pylori</i> ' nin üremesi için gereken mikroaerofilik ortamın oluşturulması
59	Burgulu kapaklı tüp (16x100 mm)	ISOLAB	07703001	McFarland eşelinin hazırlanmasında
60	Petri kutusu	FıratMed		Besiyerlerinin dökülmesi
61	DNaz RNaz içermeyen steril moleküler biyolojik su (ULTRA PURE WATER)	BİOCHROM AG	L0015	Moleküler biyolojik tüm uygulamalarda
62	Su banyosu	Poly Science/Memmert	108600979/230-130000112	Besiyerlerinin 50 °C'de tutulması için ve %20 gliserollü stok besiyerine eklenen insan serumunun inaktivasyonunda
63	Etanol (absolute)	AppliChem	A3678,25001A000417	DNA ekstraksiyonunda (QIAmp DNA mini kit prosedürüne göre)
64	Steril filtre (0.20 µm)	Sartorius stedim Ministart®	1655580390103	%20 gliserollü stok besiyerine eklenen insan serumunun sterilizasyonunda

3.6.2. Hızlı Üreaz Testi (HÜT)

Bir gram üre (Merk, Germany) 10 ml steril distile suda eritilerek pH kontrolü yapıp hazırlanan karışımdan her test tüpüne birer ml dağıtıldı (pH <8.1). Korpus ve antrum biyopsi örnekleri %10'luk üre solüsyonu içeren birer test tüpüne konuldu ve üzerlerine ikişer damla % 0.1'lik fenol kırmızısı solüsyonu eklenerek 0-10-15 dakika, 3-5 saat ve 24 saat içerisinde HÜT sonucu diğer proje kapsamında bu prosedüre göre uygulanarak değerlendirildi. Üreli solüsyon içerisindeki gastrik biyopsi örneği *H. pylori* ile enfekte ise bakterinin üreaz enzimi varlığında üre hidrolizi sonucunda açığa çıkan 2 NH₃ ve 2 CO₂ ile pH'nın değişmesi sonucu pH indikatörü fenol kırmızısı ile üreli solüsyonda pembe renk değişiminin görülmesi (pH >8.1) pozitif, rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirilerek HÜT sonuçları elde edilmiştir.

3.6.3. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi

2006.KB.SAG.042 BAP proje no'lu, 13.07.2006/179 Etik kurul onaylı doktora tezi kapsamında daha önceden uzman endoskopist tarafından bir korpus ve bir antrum örneği

histopatolojik inceleme için hemen %10'luk formalin solüsyonu içeren şişelere alındı. Ayrı ayrı şişelerde alınan bölgeler belirtilerek “*Helicobacter-like organisms*” (HLO) ve rutin histopatolojik inceleme istemi ile Patoloji Anabilim Dalı'na ulaştırılmıştır.

Elli sekiz hastanın antrum ve korpus toplam 116 biyopsi örneği gastrointestinal patoloji ile ilgili patoloji uzmanı tarafından Hematoksilen-Eozin (H&E), Alcian blue ve Giemsa boyaları ile boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon E600) morfolojik olarak HLO yönünden incelendi. Lamina propria'da, pitlerde enflamasyon, atrofi, intestinal metaplazi (IM) ve HLO her biri 0-3 [yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3)] arası olarak güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilmiştir (125).

3.6.4. Hastaların *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Yönünden Değerlendirilmesi

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

3.6.5. Biyopsi Örneklerinin Mikrobiyolojik İncelenmesi

3.6.5.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

i. Helicobacter pylori %7 At Kanlı Seçici Besiyeri:

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

500 ml'lik balon joje içerisinde distile suya Columbia Blood Agar (Oxoid) eklenerek iyice homojenize edildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyerinin 50°C'ye gelmesi için sterilizasyon sonrası besiyeri su banyosunda bekletildi. Önceden oda ısısına getirilen steril defibrine at kanı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) ve 2 ml apirojen steril distile su ile çözündürülen *H. pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid), 50 °C'de su banyosunda bekletilen besiyerine ilave edildi. Daha sonra 90 mm'lik petrilere aseptik koşullarda her petriye yaklaşık 20-25 ml besiyeri döküldü. Besiyerleri donduktan sonra

kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37°C etüvde bekletildi. Kontaminasyon kontrolü 24 saat sonra yapıpı buzdolabında +4°C’de saklandı.

ii. Transport Besiyeri:

100 ml besiyeri:	
Distile su	80 ml
Brucella Broth (Beckton Dickinson and Company)	2.8 gr
Gliserol (Baked Analyzed)	20 ml

Brucella Broth besiyeri (Becton Dickinson and Company), distile su içerisinde eklenerek iyice homojenize edildi. Hazırlanan besiyeri ve ayrı bir erlen içerisinde gliserol, 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra gliserol solüsyonu aseptik koşullarda besiyerine eklenerek steril ependorflara 1’er ml olacak şekilde aktarıldı ve kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37°C etüvde bekletilip kontrolü yapılarak buzdolabında +4°C’de saklandı.

iii. %20 Gliserollü Stok Besiyeri:

%40’lık Gliserol Çözeltisi	
Distile su	60 ml
Gliserol (Baked Analyzed)	40 ml
BHI Buyyon (Oxoid)	
Distile su	80 ml
BHI Broth	7.4 gr
İnsan Serumu	20 ml

Gliserol çözeltisi ve Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid) Buyyon 121°C’de 15 dakika ayrı ayrı otoklavlandı. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarları Seroloji Laboratuvarı’ndan temin edilen ve serolojik testler ile taranmış taze insan serumu filtre (Sartorius, 0.20 µm) edilip 56°C’de 30 dakika su banyosunda inaktive edildi. BHI buyyon içerisinde %40’lık hazırlanmış gliserol çözeltisi ve 20 ml inaktive steril taze insan serumu aseptik koşullarda ilave edilerek steril ependorflara bir’er ml olacak şekilde aktarıldı. Kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37 °C etüvde bekletilip kontrolü yapılarak buzdolabında +4°C’de saklandı.

Ayrıca, kontaminasyon kontrolü yapılan stok besiyerlerine farklı hastalardan izole edilen *H. pylori* kolonileri ve NCTC 11637 *H. pylori* standart suşu inokule edilerek -80 °C’de birkaç gün bekletilip tekrar *H. pylori* % 7 Defibrine At Kanlı (Oxoid), *H. pylori* selektif supplement (DENT, Oxoid) içeren Columbia Blood Agar (Oxoid) besiyerinde canlandırılarak stok besiyerlerinin internal kontrolü yapıldı.

iv. Brucella Buyyon :

- a) 2.8 gr Brucella Broth (Becton Dickinson and Company) tartılıp 100 ml distile su içerisine eklenerek 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav sonrasında genel amaçlı kullanım için birer ml steril ependorflara (Greiner Bio-one) aktarıldı.
- b) 2.8 gr Brucella Broth (Becton Dickinson and Company) tartılıp 100 ml distile su içerisine eklendi. İyiçe homojenize edilerek antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılacak bakteri süspansiyonunun uygun Mc Farland standart bulanıklık eşelinin hazırlanması amacı ile 10 ml’lik cam tüplere ikişer ml dağıtıldı ve ağzıları tam kapatılmadan 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklav sonrası tüplerin kapakları kapatıldı.

Her ikisi de kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37 °C etüvde bekletilip kontrolü yapılarak buzdolabında +4°C’de saklandı.

v. %5 Koyun Kanlı Mueller-Hinton Besiyeri:

50 ml besiyeri:	
Distile su	47.5 ml
Mueller-Hinton Agar (Oxoid)	1.9 gr
Defibrine Koyun Kanı (Oxoid)	2.5 ml

50 ml’lik erlen içerisinde distile suya Mueller-Hinton Agar (Oxoid) eklenerek iyice homojenize edildi ve 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyerinin 50°C’ye gelmesi için sterilizasyon sonrası besiyeri su banyosunda bekletildi. Önceden oda ısısına getirilen steril defibrine koyun kanı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) 50°C’de besiyerine ilave edildi. Daha sonra 90 mm petrilere 25 ml besiyeri aseptik koşullarda döküldü. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37 °C etüvde bekletildi. Kontaminasyon kontrolü 24 saat sonra yapıp buzdolabında +4°C’de saklandı.

vi. Christensen's Üreli Agar Besiyeri :

100 ml besiyeri:	
Distile su	95 ml
Üre Agar (Oxoid)	1.9 gr
Üre Solüsyonu (Oxoid)	2.5 ml

Distile suyun içerisine üre agar (Oxoid) eklendi ve homojenize edilip 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyerinin 50°C'ye gelmesi için sterilizasyon sonrası besiyeri su banyosunda bekletildi. Aseptik koşullarda 50°C'de besiyerine vial içerisindeki üre solüsyonu (Oxoid) eklendi ve steril ependorflara (Greiner Bio-one) birer ml aktarıldı. Kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37 °C etüvde bekletildi. Kontaminasyon kontrolü yapıp buzdolabında +4°C'de saklandı.

3.6.5.2. *Helicobacter pylori* Kültür Protokolü

Endoskopi sırasında alınan bir antrum ve bir korpus gastrik biyopsi örneği %20 Gliserollü Brucella broth içeren *H. pylori* transport besiyeri ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvara getirildi. Transport besiyeri içerisindeki gastrik biyopsi örnekleri aseptik koşullarda steril petrilerin içerisinde steril bistüri ile kesilerek parçalandı. Parçalanmış biyopsi örneklerinin ekimi % 7 At kanlı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) *H. pylori* Selektif Supplement (DENT, Oxoid) içeren Columbia Blood agar (Oxoid) besiyerine yapıldı. Ekim yapılan plaklar anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik koşullarda 37°C'de üç-10 gün inkübe edildi. Kültürü yapılmak üzere parçalanmış antrum ve korpus biyopsi örneklerinin her birinden bir parça kültürle eş zamanlı olarak Christensen's üreli agar besiyerine üreaz testi için konuldu. Aynı zamanda direkt dokudan imprint preparatlar hazırlanarak Gram ve metilen mavisi ile boyandı. Doku hücrelerinin arasında *H. pylori* tipik spiral morfolojisi ışık mikroskopunda (Olympus, CX31 RTSF) 100X immersiyon objektifi ile incelendi.

İnkübasyon sonrası kültürde üreyen kolonilerin *H. pylori* olup olmadığı; tipik koloni morfolojisi, hareket özelliğini değerlendirmek üzere direkt bakısı, katalaz, oksidaz, üreaz testleri ve Gram boyaması yapılarak değerlendirildi. Tipik spiral morfolojide Gram (-) *H. pylori* varlığı ışık mikroskopunda (Olympus, CX31 RTSF) 100X immersiyon objektifi ile incelendi.

Üreyen kolonilerden *H. pylori* tanımlaması yapıldıktan sonra %7 at kanlı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) *H. pylori* Selektif Supplement (DENT, Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyerine pasajlanarak subkültürleri yapıldı.

Subkültürde üreyen *H. pylori* kolonilerinin, direkt bakı ile hareket özelliği değerlendirildi, katalaz, oksidaz, üreaz testleri yapıldı. Subkültürde üreyen ve *H. pylori* identifikasyonu yapılan suşlara antimikrobiyal duyarlılık testleri uygulandı. Ayrıca, ayrı ayrı her bir hastanın antrum ve/veya korpusundan izole edilen, subkültürde üreyen ve identifikasyonu yapılan *H. pylori* kolonileri, stok kültür amacıyla %20 gliserollü BHI buyyon içeren stok besiyeri içerisinde homojenize edilip stokları yapılarak -80 °C’de saklandı. Daha sonra gerektiğinde %7 At kanlı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) *H. pylori* Selektif Supplement (DENT, Oxoid) içeren Columbia Blood agar (Oxoid) besiyerine pasajlanarak canlandırılıp yeniden kültürleri yapıldı.

3.6.5.3. Biyokimyasal Testler

i. Katalaz Testi:

Temiz bir lam üzerine bakteri kolonisinden steril plastik öze ile bir miktar alınıp sürüldü. Üzerine bir damla %3’lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatıldı. Katalaz enzimi varlığında 10-12 saniye içinde oksijen gazının çıkışı hava kabarcığı oluşumu ile gözlemlendiğinde test pozitif olarak değerlendirildi (18).

ii. Oksidaz Testi (Kovac’s Metodu):

%1’lik tetrametil-*p*-fenilendiamin dihidroklorid temiz bir kurutma kağıdına (Watman no 1) bir damla damlatıldı. Üzerine steril platin uçlu öze ya da steril eküvyonun tahta çubuğu kullanılarak bir miktar bakteri kolonisinden alınarak sürüldü. On – 15 saniye içerisindeki mavi-mor renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (18).

iii. Üreaz Testi:

Üreaz testi hem direkt biyopsiden hem de üreyen kolonilerden yapıldı. Biyopsi kültür için parçalandığında küçük bir parçası ayrıca daha sonra kültürde üreyen birkaç koloni Christensen’s Üreli Agar besiyerine aktarıldı. Besiyeri 37°C etüve kaldırıldı. Üreaz enzimi varlığında ürenin parçalanması sonucunda amonyak (NH_3) açığa çıkarak alkali ortamın oluşmasıyla pH indikatörü fenol kırmızısı ile besiyerinin rengi sarıdan pembe renge dönüşüm 15, 30, 60 dakika ve maksimum dört saat içinde pozitif olarak değerlendirildi (52).

3.6.6. Kültür Temelli Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

3.6.6.1. Gradiyent Difüzyon Testi (E-Test) :

Antrum ve/veya korpustan izole edilen saf *H. pylori* kolonilerini elde etmek ve kolonileri logaritmik faza getirmek amacıyla %7 At kanlı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) *H. pylori* Selektif Supplement (DENT, Oxoid) içeren Columbia Blood agar (Oxoid) besiyerinde yapılan 48 saatlik subkltrde üreyen, tipik hareket özelliği ile ve biyokimyasal testler ile tekrar identifikasyonu yapılan *H. pylori* kolonileri, içerisinde iki ml Brucella buyyon (Becton Dickinson and Company) bulunan cam tüplerde (Isolab) spektrofotometrik ölçüm yapan Densimat (Biomerieux SA, France) cihazı kullanılarak bakteri yoğunluğu McFarland 3.0 ($\sim 9 \times 10^8$ CFU/ml) standart bulanıklık eğeli olacak şekilde süspanse edildi. Bakteri sspanسیونundan 200 µl alınarak %5 koyun kanlı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) Mueller-Hinton besiyerine (Oxoid) aktarıldı ve steril eküvyon ile tüm besiyeri yüzeyine yayıldı. Klaritromisin ve levofloksasin E-test stripleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) besiyeri yüzeyine prosedürüne uygun olarak aseptik koşullarda yerleştirilerek üç veya dört gün 37°C’de GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak mikroaerobik ortamda inkübe edildi.

İnkübasyonun sonunda antrum ve korpus biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarının E-test yöntemine göre antimikrobiyal duyarlılıkları, klaritromisin ve levofloksasin için sırasıyla ≥ 1 µg/mL (22,24,28,42,184) ve >1 µg/mL (38,146,165,166,184) MİK sınır değerleri kullanılarak değerlendirildi.

Kalite kontrol amacı ile klaritromisin ve levofloksasin duyarlı *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu %5 koyun kanlı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) Mueller-Hinton besiyerinde (Oxoid) klaritromisin ve levofloksasin E test stripleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) kullanılarak E-test yöntemi ile internal kontrol olarak çalışılmıştır.

Antrum ve/veya korpustan izole edilen tek bir *H. pylori* kolonisi dahi dirençli ise hasta, dirençli olarak değerlendirildi.

3.6.6.2. Disk Difüzyon Testi :

Disk difüzyon yöntemi, randomize seçilen antrum ve/veya korpustan izole edilen ve 48 saatlik subkltrde üreyen saf *H. pylori* kolonileri E-test yöntemi ve disk difüzyon yöntemini antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının karşılaştırılması amacıyla çalışılmıştır. İçerisinde iki ml Brucella buyyon bulunan cam tüpler içerisinde spektrofotometrik olarak Densimat

cihazı (Biomérieux SA, France) ile McFarland 3 ($\sim 9 \times 10^8$ CFU/ml) standart bulanıklık eşeline göre *H. pylori* kolonileri süspanse edildi. Bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak %5 koyun kanlı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) Mueller-Hinton besiyerine (Oxoid) aktarıldı ve steril eküvyon ile tüm besiyeri yüzeyine yayıldı. Klaritromisin (15µg/disk, BD BBL) ve levofloksasin (5µg/disk, BD BBL) antibiyotik diskleri aseptik koşullarda ekim yapılmış besiyerine yerleştirildi. Besiyerleri mikroaerofilik ortamda GasPak Campy Container System kullanılarak (Becton Dickinson and Company) 37°C’de üç veya dört gün inkübe edildi ve inkübasyon sonunda zon çapları ölçülerek klaritromisin ve levofloksasin antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları değerlendirildi. Suşlar, E-test yöntemi ile MİK ≥ 1 µg/mL değerine göre, disk difüzyon yöntemi ile klaritromisin sınır inhibisyon zonu ≤ 21 mm saptandığında klaritromisin dirençli olarak değerlendirildi (185). Suşlar, E-test yöntemi ile MİK > 1 µg/mL değerine göre, disk difüzyon yöntemi ile levofloksasin sınır inhibisyon zonu < 12 mm saptandığında levofloksasin dirençli olarak değerlendirildi (38).

3.6.7. Uygulanan Moleküler Testler

3.6.7.1. DNA Ekstraksiyonları

i. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinden Total DNA Ekstraksiyonu

“QIAamp® DNA Mini Kit” (QIAGEN) prosedürü uygulandı:

Tüm testler için bistüri ile ayrı ayrı parçalanmış antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu için ayrılan dokular Brucella buyyon’da -20°C’de bekletilmiştir.

- -20 °C’de Brucella buyyon içinde DNA ekstraksiyonu için ayrı ayrı bekletilen bistüri ile parçalara ayrılmış antrum ve korpus biyopsi örnekleri oda ısısına geldikten sonra 30 dk 14,000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, her birinin pelleti üzerine 180 µl ATL tamponu (“Buffer ATL”) ve 20 µl proteinaz K eklendi. 10 sn vortekslendi ve 56°C’de ısı bloğunda (Major Science) dokunun tamamen lize olması için bir gece inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü kısaca santrifüjlendi.
- 200 µl AL tamponu eklenip 15 sn vortekslendi.
- 10 dk 70°C ısı bloğunda (Major Science) bekletildi.

- Kısa bir süre santrifüjlendi.
- 200 µl etanol (absolute) (AppliChem, Molecular biology grade, A3678) eklenip 15 sn vortekslendi.
- Yukarıdaki karışımın tamamı QIAamp Mini spin kolonuna konulup kolonun altına iki ml'lik toplama kabı yerleştirildi.
- 8000 rpm'de bir dk santrifüjlendi.
- QIAamp Mini spin kolonunun altındaki toplama kabı değiştirilip 500 µl AW1 tamponu eklendi ve 8000 rpm'de bir dk santrifüj edildi.
- QIAamp Mini spin kolonunun altına yeni toplama kabı konuldu ve 500 µl AW2 tamponu eklendi. 14,000 rpm'de üç dk santrifüjlendi.
- Toplama kabı değiştirilip 14,000 rpm'de bir dk santrifüjlendi.
- QIAamp Mini spin kolonu, 1.5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (Greiner Bio-one) konuldu ve üzerine önceden ısıtılmış 70°C'de 100 µl distile su eklendi. 10 dk oda ısısında bekletildi ve 14,000 rpm'de iki dk santrifüj edildi. DNA ekstraksiyonu tamamlandı.

*Her bir antrum ve korpus biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen DNA örneği randomize seçilerek DNA konsantrasyonları NanoDrop™ cihazı (Thermo Scientific) ile ölçüldü (3.6.7.2'de belirtilmiştir).

Antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden ayrı ayrı ekstrakte edilen DNA örneklerini uzun süreli saklamak amacıyla çalışılncaya dek -20°C' de saklandı.

ii. Antrum ve Korpus Biyopsi Örneklerinden İzole Edilen Helicobacter pylori Kolonilerinden DNA Ekstraksiyonu

“QIAamp DNA Mini Kit” (QIAGEN) prosedürü uygulandı:

Subkültürde üreyen *H. pylori* kolonilerinden birkaç öze alınıp 750 µl DNaz ve RNaz içermeyen moleküler biyolojik grade su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG L0015) eklenmiş olan ependorf tüp içerisine konuldu ve ekstraksiyon yapılana kadar -20°C'de bekletildi.

Ekstraksiyon yapılacağı zaman kolonilerin oda ısısına gelmesi beklendi ve maksimum hızda 14,000 rpm 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.

180 µl ATL tamponu ("Buffer ATL") ve 20 µl proteinaz K eklendi. 10 sn vortekslenip bütün gece 56 °C'de ısı bloğunda (Major Science) bekletildi.

Doku DNA ekstraksiyonunda kullanılan kitin (QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit) aynısı kullanıldı ve inkübasyon sonrası doku DNA ekstraksiyonundaki prosedürün aynısı uygulandı:

- İnkübasyon sonrası 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü kısaca santrifüjlendi.
- 200 µl AL tamponu eklenip 15 sn vortekslendi.
- 10 dk 70 °C ısı bloğunda (Major Science) bekletildi.
- Kısa bir süre santrifüjlendi.
- 200 µl etanol (absolute) (AppliChem, Molecular biology grade, A3678) eklenip 15 sn vortekslendi.
- Yukarıdaki karışımın tamamı QIAamp Mini spin kolonuna konulup kolonun altına iki ml'lik toplama kabı yerleştirildi.
- 8000 rpm'de bir dk santrifüjlendi.
- QIAamp Mini spin kolonunun altındaki toplama kabı değiştirilip 500 µl AW1 tamponu eklendi ve 8000 rpm'de bir dk santrifüj edildi.
- QIAamp Mini spin kolonunun altına yeni toplama kabı konuldu ve 500 µl AW2 tamponu eklendi. 14,000 rpm'de üç dk santrifüjlendi.
- Toplama kabı değiştirilip 14,000 rpm'de bir dk santrifüjlendi.
- QIAamp Mini spin kolonu, 1.5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (Greiner Bio-one) konuldu ve üzerine önceden ısıtılmış 70 °C'de 100 µl distile su eklendi. 10 dk oda ısısında bekletildi ve 14,000 rpm'de iki dk santrifüj edildi. DNA ekstraksiyonu tamamlandı.

Antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* kolonilerinden ekstrakte edilen DNA örnekleri uzun süreli saklamak amacıyla çalışılncaya dek -20°C’ de saklandı.

Ayrıca, -80 °C’de stok besiyerinde saklanan ve kültürü yapılarak canlandırılan *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun DNA’sı moleküler yöntemlerde pozitif kontrol amacı ile kullanılmak üzere yukarıdaki protokole göre ekstrakte edildi.

*iii. Helicobacter pylori Koloni Örnekleri için Hızlı DNA Ekstraksiyonu**

- Bir öze (Greiner Bio-one) dolusu bakteri, 150 µl DNaz RNaz free moleküler biyolojik grade su (BIOCHROM AG) içeren 1.5 ml ependorf tüpü içerisinde süspansiyon edildi.
- 95 °C’de 15 dk su banyosunda (PolyScience) inkübe edildi.
- Beş dk son hızda (13-14,000 rpm) santrifüj edildi.
- Koloniden ekstrakte edilen *H. pylori* bakteri DNA örneği (süpernatant) elde edildi.

*Moleküler yöntemler ile *H. pylori* varlığı ve antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının aynı gün içerisinde belirlenebilmesi amacı ile QIAamp DNA mini kiti (QIAGEN) kullanılarak yapılan DNA ekstraksiyonunun yanı sıra, bu hızlı koloni ekstraksiyon protokolü de bazı hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarına uygulandı. Kit ile ekstraksiyon için gereken bir gecelik inkübasyon sonunda, ertesi gün aynı kolonilerin QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) ile DNA ekstraksiyonu da gerçekleştirildi.

**Bu protokol “Victor Segalen Bordeaux 2 University, Laboratoire de Bacterologie, Reference Center for Campylobacter and Helicobacter, Bordeaux France” da *Campylobacter* spp. suşları için uygulanmakta olup bu tez kapsamında, izole edilen *H. pylori* suşları için de kullanılarak uygulanabilirliği araştırılmıştır.

iv. Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Elde edildiği gün ya da gerektiğinde çalışılmak üzere -80 °C’de saklanan dışkı örneklerinden DNA ekstraksiyonu “QIAamp DNA Stool Mini Kit” (QIAGEN) prosedüründe, dışkıda *H. pylori* çok daha az bulunduğu için ve dışkıda fazla miktarda bulunan inhibitörler nedeni ile total dışkı DNA’sında var olabilecek veya varlığı araştırılan *H. pylori* DNA’sının

moleküler yöntemlerde kalıp olarak kullanılabilmesi amacı ile bazı modifikasyonlar (29) yapılarak uygulandı:

- Bir gr dışkı örneği ağzı burgulu kapaklı temiz bir cam tüpe (ISOLAB) konuldu ve üzerine 10 ml ASL tamponu (“Buffer ASL”) eklendi.
- Dışkı örneği homojenize olana kadar vortekslendi.
- İki ml lizat, dışkı örneği süspansiyonundan alınıp iki ml’lik ependorf (Greiner Bio-One) tüpüne konuldu.
- Süspansiyon ısı bloğunda (Major Science) 95 °C’de 10 dk inkübe edildi.
- Örnek 15 sn vortekslendi ve bir dk son hızda (14,000 rpm) santrifüj edildi.
- Üstteki sıvı kısımdan 1.2 ml alınarak iki ml’lik yeni ependorf santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Her bir örneğe bir adet InhibitEX tablet eklendi ve homojenize olana kadar vortekslendi.
- İnhibitörlerin, InhibitEX matriksine adsorbe olmasını sağlamak amacı ile süspansiyon bir dk oda ısısında inkübe edildi.
- Üç dk son hızda santrifüjlendi.
- Üstte kalan sıvının tamamı 1.5 ml’lik yeni ependorf santrifüj tüpüne aktarıldı ve örnek son hızda üç k santrifüj edildi.
- 15 µl proteinaz K yeni bir ependorf santrifüj tüpüne eklendi ve santrifüjden sonra süpernatantın 200 µl’si proteinaz K içeren ependorf tüpüne eklendi.
- Üzerine 200 µl AL tamponu eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- 70 °C’de 10 dk su banyosunda bekletildi.
- Spin out yapıldı. (Santrifüj son hıza gelene kadar kısa bir süre santrifüj edildi)
- 200 µl etanol (absolute) (AppliChem) eklendi vortekslenip kısa bir santrifüj yapıldı.

- Lizatin tamamı QIAamp kolonuna eklendi.
- Bir dk 14,000 rpm’de santrifüj edildi ve yeni kitin içeriğinde bulunan ucu açık iki ml toplama kabı QIAamp kolonunun altına yerleştirildi.
- QIAamp kolonuna 500 µl AW1 tamponu eklendi ve bir dk 14,000 rpm’de santrifüj edilip yeni iki ml toplama kabı kolonun altına yerleştirildi.
- QIAamp kolonuna 500 µl tampon AW2 eklendi ve üç dk son hızda santrifüj edilip kolonun altına yeni iki ml toplama kabı yerleştirildi.
- Bir dk 13,200 rpm’de santrifüjlendi.
- QIAamp kolonu temiz steril 1.5 ml ependorf santrifüj tüplerine yerleştirildi.
- Üzerlerine 200 µl tampon AE eklendi ve beş dk oda ısısında bekletildi.
- Bir dk son hızda santrifüjlendi ve dışkıdan total DNA ekstrakte edildi.

Örnekler uzun süreli saklamak amacıyla çalışılncaya dek -20°C’ de saklandı.

3.6.7.2. DNA Örneklerinin Ölçümü

NanoDrop™ (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans oranı DNA ve ayrıca RNA’nın saflığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Genel olarak ~1.8 dalga boylarındaki absorbans oranı DNA için, ~ 2.0 dalga boylarındaki absorbans oranı ise RNA için saf kabul edilir. Oranın bu değerlerden düşük olması 280 nm veya bu dalga boyuna yakın bir dalga boyunda absorbe eden protein, fenol veya diğer kontaminantların varlığını işaret edebilir. 260/230 oranı nükleik asit saflığı için ikinci bir ölçüm olarak kullanılır. Beklenen 260/230 oranı genellikle 2.0-2.2 aralığındadır. Bu oran beklenilenden daha düşük olduğunda 230 nm dalga boyunda absorbe eden kontaminantların varlığını işaret edebilir.

Gastrik biyopsi (antrum ve korpus), kültürde izole edilen *H. pylori* suşları ve dışkı örneklerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinin; 1- DNA konsantrasyonları (ng/µl), 2- 260/280 oranı ve 3- 260/230 oranları NanoDrop™ (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak ölçüldü.

3.6.7.3. GenoType® HelicoDR Testi

GenoType® HelicoDR (HAIN LIFESCIENCE) kiti ticari olarak temin edilmiştir. DNA-STRIP® teknolojisine dayanan GenoType® HelicoDR testi antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri, dışkı örnekleri* ve kültürden izole edilen *H. pylori* suşlarından ekstrakte edilen DNA örneklerinde *H. pylori* varlığını (*ureA*), klaritromisin (23S rRNA, 2146 ve 2147 pozisyonu, “GenBank accession number” NC_000915) ve florokinolon (*gyrA*, 87 ve 91. kodon) duyarlılığını saptamak amacı ile moleküler genetik identifikasyonda kullanılmıştır (36,130).

H. pylori’de klaritromisin direncinde en sık görülen nokta mutasyonlarının olduğu 2142 ve 2143 pozisyonları daha önceden *E. coli* 23S rRNA geninde 2058/2059 pozisyonları olarak, *H. pylori*’de ise *H. pylori*’nin ribozomal sekansına dayanarak doğru şekilde yeniden adlandırılmasından önce 2143/2144 pozisyonları olarak gösterilmiştir (29,40). GenoType® HelicoDR metodunda ise aynı bölge farklı gen bankası erişim numaralı *H. pylori* genom sekansına göre 2146/2147 olarak isimlendirilmiştir (36).

Bu test, DNA ekstraksiyonu, ilgili gen bölgelerinin çoğaltıldığı biyotinlenmiş primerler ile multipleks amplifikasyon (PCR) ve bir ters hibridizasyon basamağı olmak üzere prosedürüne uygun olarak üç basamakta uygulanmıştır. Hibridizasyon sürecinde; amplifikasyon ürünlerinin kimyasal denaturasyonu, tek iplikli biyotin işaretlenmiş ampikonların membrana bağlı problemlara hibridizasyonu, “stringent” yıkama, streptavin/alkalin fosfat (AP) konjugatının eklenmesi ve AP aracılı boyama reaksiyon basamakları uygulanmıştır. Çalışılan stripler üzerinde hibridizasyon sonucunda saptanan bant paternleri, kit içerisinde temin edilen değerlendirme şablon stribi “template” kullanılarak strip üzerinde oluşan bantlar hizalandı ve sonuçlar değerlendirildi (130).

*Ayrıca GenoType® HelicoDR (HAIN LIFESCIENCE) kiti prosedürü içeriğinde belirtilen klinik örneklerin (biyopsi ve koloni örnekleri) dışında, prosedürde yer almayan dispeptik hastaların dışkı örneklerinden ekstrakte edilen total DNA örneklerinde de, *H. pylori* varlığını (*ureA*), klaritromisin (23S rRNA, 2146 ve 2147 pozisyonu, “GenBank accession number” NC_000915) ve florokinolon (*gyrA*, 87 ve 91. kodon) duyarlılığını saptamak amacı ile bu yöntem bu örneklerle uyarlanarak kitin dışkı örneklerinde de uygulanabilir olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla biyopsi ve koloni örnekleri ile eşgüdümlü olarak her bir hastanın dışkı örneklerinde de bu yöntemin uygulanabilmesi için optimizasyon ve validasyon çalışmaları yapılarak hasta örneklerine uygulandı.

3.6.7.3.1. GenoType® HelicoDR Amplifikasyon Basamağı

3.6.7.3.1.1. GenoType® HelicoDR Multipleks PCR Karışımı Hazırlanması

Amplifikasyon karışımı DNA'sız temiz odada hazırlandı. Amplifiye edilecek örnek sayısı belirlendi (analiz edilecek örnek sayısı ve kontrol örnekleri). Negatif kontrol olarak, DNA yerine beş µl DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (BIOCHROM AG) kullanıldı. DNA örneği ayrı bir alanda eklendi. GenoType® HelicoDR testinde her bir strip üzerinde testin amplifikasyon ve hibridizasyon basamaklarını ayrı ayrı kontrol eden AC ("Amplification Control") ve CC ("Conjugate Control") bantları bulunduğu için pozitif kontrol olarak sadece testin optimizasyon aşamasında koloni, biyopsi ve dışkı örnekleri için optimum substrat aralığını/süresini belirlemek amacıyla *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kullanıldı. Negatif kontrol ise her bir test çalışmasında kullanıldı.

i. Antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri ve izole edilen H. pylori kolonileri için GenoType® HelicoDR multipleks PCR karışımının hazırlanması

PNM*	35 µl
10X PCR Tamponu HotStar Taq için**	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Hot Start Taq DNA Polimeraz (1 U)***	0.2 µl
Steril saf su****	3 µl
Kalıp DNA	5 µl

*Kitin içerisinde PNM (Primer Nükleotid Miks) karışımı hazır halde bulunduğu için primerler ve dNTP'ler PCR karışımına ayrıca eklenmedi.

**HotStar Taq 10X PCR tamponu, 15 mM MgCl₂ içerir.

***Genotype® HelicoDR yönteminin ilk basamağı olan multipleks PCR aşamasını gerçekleştirmek amacı ile GenoType® HelicoDR (HAIN LIFESCIENCE) kit içeriğinde mevcut olan Hot Start Taq DNA polimeraz (QIAGEN) kullanılmıştır.

****DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG)

DNA dışındaki tüm solüsyonları içeren amplifikasyon miksi yukarıda belirtildiği gibi hazırlandı, vortekslenmeden pipetaj ile iyice karıştırıldı ve karışım, hazırlanan her bir PCR tüpüne 45 µl aktarıldı. Multipleks PCR, son hacim 50 µl olacak şekilde 0.2 ml'lik ependorflar

(Greiner Bio-one) içinde termal cycler’da (Techne TC-412) gerçekleştirildi. Amplifikasyon karışımında son $MgCl_2$ konsantrasyonu 2.5 mM’dır. “Hot Start Taq DNA Polimeraz” (QIAGEN) kullanıldı (36,130).

ii. *Antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri ve izole edilen H. pylori kolonileri için GenoType® HelicoDR PCR döngüleri** (36,130)

	Kültür Örnekleri	Biyopsi Örnekleri
95 °C 15 dakika	1 döngü	1 döngü
95 °C 30 saniye } 58 °C 2 dakika }	10 döngü	10 döngü
95 °C 25 saniye } 53 °C 40 saniye } 70 °C 40 saniye }	20 döngü	25 döngü
70 °C 8 dakika	1 döngü	1 döngü

*Çalışmamızda validasyon amacı ile Taq polimeraz (QIAGEN) enzimi kullanıldığından bu döngüler uygulandı. Ancak diğer “hot start” DNA polimerazlar kullanıldığı zaman enzimin manuele göre ilk basamağın zaman aralığı azaltılmalıdır. Amplifikasyon ürünleri +4 ila -20 °C’de saklandı. Amplifikasyon reaksiyonunun kontrolü için her bir örneğin beş µl’si “loading buffer” eklenmeden %2’lik agoroz jele direkt olarak uygulandı. Amplikonlar yaklaşık olarak 145bp (*gyrA*), 100bp (23S RNA) ve 63bp (amplifikasyon kontrolü) uzunluğundadır.

*iii. Dışkı örnekleri için GenoType® HelicoDR multipleks PCR karışımının hazırlanması**

Kit içerisinde dışkı örnekleri için mevcut bir prosedür bulunmamaktadır. Dışkı örneklerinden elde edilen total DNA örneklerine öncelikle kit içerisinde var olan doku DNA örneklerine uygulanan multipleks PCR prosedürü uygulandı ve hibridizasyon basamağına geçmeden önce PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi (Thermo, 252456) ile görüntülendi; sonuç alınamadı.

Daha sonra dışkı total DNA örnekleri, PCR karışımı sabit tutularak antrum ve korpus gastrik biyopsi DNA örnekleri ile ayrı bir termocycler cihazında PCR döngüsü beş döngü artırılarak 30 döngü olacak şekilde amplifiye edildi. Bunun sonucunda dışkı total DNA örnekleri ile istenilen bölgelerde PCR ürünleri (silik bantlar şeklinde) elde edildi.

Total dışkı DNA örnekleri ile daha belirgin PCR ürünleri (daha kuvvetli bantların) elde edilebilmesi için PCR döngüsü 30 döngü olacak şekilde sabit tutuldu fakat PCR karışımı içerisindeki üç µl su yerine total dışkı DNA örneği (kalıp DNA) konularak toplamda sekiz µl total dışkı DNA örneği PCR karışımına eklendi. Aynı hastanın antrum gastrik biyopsi, korpus gastrik biyopsi ve dışkı DNA örnekleri eş güdümlü olarak aynı anda çalışıldı. Bunun sonucunda jelde en az gastrik biyopsi örnekleri kadar belirgin PCR ürünleri elde edildi.

iv. Dışkı örnekleri için GenoType® HelicoDR PCR döngüleri:

95 °C 15 dakika 1 döngü

95 °C 30 saniye } 10 döngü
58 °C 2 dakika }

95 °C 25 saniye }
53 °C 40 saniye } 30* döngü
70 °C 40 saniye }

70 °C 8 dakika 1 döngü

*Döngü sayısını daha fazla arttıırırsak, istenilen bölgenin dışında non-spesifik bantların oluşması söz konusu olduğu için döngü sayısı beş döngü arttırılmış olup, ayrıca PCR karışımına eklenen DNA miktarı artırıldı.

3.6.7.3.2. GenoType® HelicoDR Hibridizasyon Basamağı

Hibridizasyon için gerekli inkübasyonlar ve tüm işlemler HAIN LIFESCIENCE tarafından sağlanan TwinCubator® cihazında 45°C'ye ısıtılarak gerçekleştirildi. Antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri, antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşları ve dışkı örnekleri için aynı prosedür, hibridizasyon basamakları uygulandı.

Uygun bir tüp kullanılarak konsantre konjugat (CON-C, turuncu) ve konsantre substrat (SUB-C, sarı) ilgili tampon ile (CON-C CON-D ile, SUB-C SUB-D ile) gereken miktarda 1:100 dilue edildi. İyice karıştırılarak oda ısısında bekletildi. Her bir strip için bir ml ilgili tampona 10 µl konsantre solüsyon eklendi. Her bir kullanımdan önce CON-C dilue edildi. Dilue SUB-C ise ışıktan korunarak oda ısısında saklandığında dört hafta stabil olarak kullanım için bekletilebilir. Ancak tüm çalışmalarımızda solüsyonlar her deney öncesinde taze olarak hazırlandı (130).

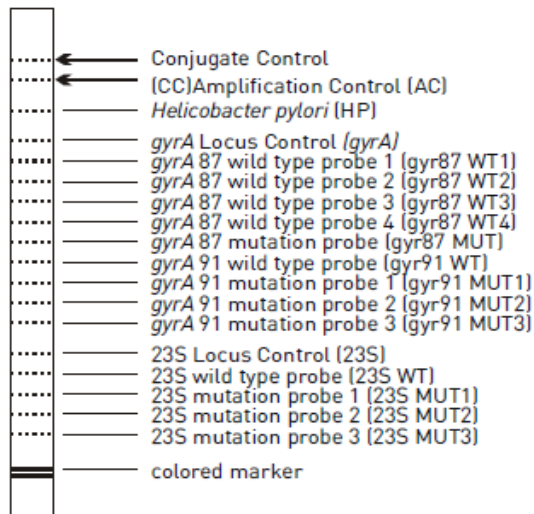
- 20 µl denatürasyon solüsyonu (DEN, mavi) her bir kuyunun ucuna eklendi.
- 20 µl amplifiye örnek (PCR ürünü) eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı ve oda ısısında beş dk inkübe edildi.
- Alkol ve alevden geçirilmiş penset kullanılarak stripler bulunduğu tüpten çıkarılır ve kurşun kalemle numaralandırıldı. Stripler çıkarılırken mutlaka eldiven kullanıldı.
- Daha önceden 37-45 °C'ye ısıtılmış olan hibridizasyon tamponundan (HYB, yeşil) bir ml kuyuların diğer uçlarına pipetlenerek homojen bir karışım elde edilinceye kadar yavaşça plak hareket ettirilerek karıştırıldı. Solüsyonların yan kuyulara sıçramamasına dikkat edildi.
- Her bir kuyucuğa prob emdirilmiş stripler dikkatlice yerleştirildi. Striplerin tamamen solüsyon ile kaplanmasına dikkat edildi.
- Plak TwinCubator® cihazına yerleştirildi ve 45°C'de 30 dk inkübe edildi.

- Hibridizasyon tamponu (HYB, yeşil) kuyucuklardan her bir örnek için ayrı ayrı steril pipet ucu kullanılarak tamamen uzaklaştırıldı.
- Daha önceden 37-45°C'ye ısıtılmış olan bir ml “stringent” yıkama solüsyonu (STR, kırmızı) her bir stribeye eklendi ve 45°C'de 10 dk TwinCubator® cihazında inkübe edildi.
- Bu basamaktan sonrası oda ısısında 25°C'de çalışıldı.
- “Stringent” yıkama solüsyonu (STR, kırmızı) tamamen uzaklaştırıldı. Bu basamaktan sonra solüsyonları plaktan uzaklaştırmak için plak ters çevrilerek solüsyon dökülüp en son kurutma kağıdı üzerine hafifçe vuruldu.
- Bir ml “Rinse” solüsyonu (RIN) ile bir dk TwinCubator® cihazında yıkama işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra plak ters çevrilerek solüsyon uzaklaştırıldı.
- Daha önceden kit içeriğinde yer alan tampon (CON-D) ile 1:100 oranında seyreltilmiş ve oda ısısına gelmiş olan konjugat (CON-C) kuyularda yer alan her bir stribeye bir ml eklendi ve 30 dk oda ısısında TwinCubator® cihazında inkübe edildi.
- Konjugat plak ters çevrilerek ve temiz bir kağıt havluya nazikçe vurularak tamamen uzaklaştırıldıktan sonra tekrar bir ml “Rinse” solüsyonu (RIN) ile stripler bir dk'da iki kere TwinCubator® cihazında yıkandı.
- Her bir kuyuya birer ml distile su (DNaz-RNaz içermeyen moleküler biyolojik grade su, BIOCHROM AG) ile TwinCubator® cihazında yıkandı. Hiçbir su zerreciği kalmamasına dikkat edildi.
- Daha önceden kit içeriğinde yer alan tampon (SUB-D) ile 1:100 oranında seyreltilen substrat (SUB-C) her bir kuyuya bir ml eklendi. Üç - 20 dk arasında oda ısısında ışıktan korunarak inkübe edildi. İnkübasyon zamanı AC ve CC kontrollerinin oluşması, lokus ve diğer bölgelerdeki bant paternlerinin oluşması dikkate alınarak 20 dk'yı geçmeyecek şekilde (genellikle yaklaşık 7-8 dk) test koşullarına göre değerlendirildi. Dışkı örneklerinde ise biyopsi ve koloni örneklerine göre daha uzun bir substrat inkübasyonu (yaklaşık 15 dk) gerçekleştirildi.

- Reaksiyon, iki kez distile su (DNaz-RNaz içermeyen moleküler biyolojik grade su, BIOCHROM AG) ile yıkama yapılarak durduruldu.
- Penset kullanılarak stripler kuyulardan çıkarıldı ve iki kurutma kağıdı arasında kurutuldu. Kuruyan stripler üzerleri selobant ile örtülecek şekilde kaplanarak kitin içeriğinde mevcut olan çalışma sayfasına yapıştırıldı.
- Wild-type allellerinin (WT probalar) yada mutant allellerin (MUT probalar) sekansı ile hibridize olabilmesi için dizayn edilmiş farklı spesifik oligonükleotidler (DNA problemleri) ile kaplı stripler üzerinde alkalinfosfataz (AP)-streptavidin kompleksi ve substrat sayesinde kolorimetrik bir reaksiyon sonucu oluşan bantlar değerlendirilerek sonuçlar test prosedüründe belirtildiği gibi yorumlanarak değerlendirildi.

3.6.7.3.3. GenoType® HelicoDR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Stripler yapıştırılır ve ışıktan korunarak saklanır. Değerlendirme sayfası kit içeriğinde sağlanmıştır. Bu değerlendirme sayfası kullanıldığı zaman değerlendirme sayfasındaki ilgili çizgilerle AC ve CC bantları hizalanarak stripler belirlenen alanlara yapıştırılır. Direnç durumu belirlenir ve değerlendirmeye yardımcı olması için ilgili kolona not edilir. Temin edilen değerlendirme şablonu “template strip” (Şekil 26) değerlendirmede kullanıldı ve stribin AC ve CC bantları ile her biri hizalandı. Her bir strip 18 reaksiyon zonu içerir. Her stripteki bantlar aynı belirginlikte olmayabilir (130).



Şekil 26. GenoType® HelicoDR testi sonuç değerlendirme şablonu “template strip” (130)

(Strip, test kiti içerisinde temin edilen orijinal boyutunda değildir)

i. Konjugat Kontrol (CC)

Bu bölgede konjugat bağlanmasının ve substrat reaksiyonunun etkinliğini gösteren bir bant oluşmak zorundadır (130).

ii. Amplifikasyon Kontrol (AC)

Test doğru olarak uygulandığında “Amplifikasyon Kontrol (AC)” bölgesine bir kontrol amplikonu bağlanmaktadır. Bu bölgede bant oluştuğunda, ekstraksiyon ve amplifikasyon uygulamasındaki hatalar ve amplifikasyon inhibitörlerinin varlığı, bir sonraki aşamaya taşınması dışlanabilir. Pozitif test sonucunda AC bölgesi sinyali (bandı) çok zayıf olabilir ya da tamamen kaybolmuş olabilir. Bu, amplifikasyon sürecindeki yarışmalı reaksiyonlardan kaynaklanıyor olabilir. Bu durumda, amplifikasyon reaksiyonu doğru uygulanmıştır ve test tekrarlanmak zorunda değildir (130).

Negatif test sonucunda AC bandının olmaması amplifikasyon uygulamasında yapılan hatayı ya da amplifikasyon inhibitörlerinin varlığını, bir sonraki aşamaya taşındığını gösterir. Böyle bir durumda ise test valid değildir ve bu örnek tekrarlanmalıdır (130).

iii. Helicobacter pylori (HP)

Bu reaksiyon bölgesi, *H. pylori* suşunun varlığını gösterir. Bu bandın yoğunluğu DNA başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir (130).

iv. Lokus Kontrolleri (gyrA, 23S RNA)

Lokus Kontrol bölgeleri ilgili lokus için spesifik bir gen bölgesini saptar ve HP bölgesinde bir *H. pylori* suşunun varlığı görüldüğünde mutlaka pozitif boyanmalıdır (130).

v. Wild type problemleri

Wild type problemleri ilgili genlerin (Tablo 4 ve Tablo 5) en önemli direnç bölgelerini içermektedir. Ayrıca, 87. kodonda dört *gyrA* wild type probu ilgili *H. pylori* wild type 1-4’ü gösterir. Bu dört probtan biri, *gyrA* WT ile birlikte ve aynı zamanda wild type prob 23S WT pozitif boyandığında incelenen bölgelerde saptanabilir mutasyon yoktur. Bu durumda test edilen suş, her iki antibiyotiğe karşı duyarlıdır (36,130).

Bir mutasyon olması durumunda, ilgili amplikon buna karşılık olan wild type proba bağlanamaz. Florokinolonlara karşı olası bir direnç ile ilgili sonuç çıkarabilmek için *gyrA* geninin her iki pozisyonunun sonucunun birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Eğer dört

gyr87 wild type probu ya da gyr91 WT bandından hiçbirisi pozitif boyanmazsa, bu florokinolonlara direnci gösterir. Eğer 23S WT bandı negatif ise, test edilen *H. pylori* suşunun klaritromisine karşı direncini gösterir. Wild type paterninden farklı her patern test edilen suşun direncini gösterir. Sadece Amplifikasyon Kontrol bölgesi kadar ya da daha kuvvetli yoğunluktaki bantlar dikkate alınmalıdır (36,130).

vi. Mutasyon problemleri

Mutasyon problemleri, direnç ile ilişkili en yaygın mutasyonların (Tablo 3 ve Tablo 4) bazılarını saptar. Sadece Amplifikasyon Kontrol bölgesi kadar ya da daha kuvvetli yoğunlukta bantlar dikkate alınmalıdır. Wild type paterninden her patern ayrılığı test edilen suşun direncini gösterir. *gyrA* problemleri ile elde edilen bant paterni test edilen suşun florokinolonlara karşı direnci hakkında sonuç verir, 23S problemleri ile elde edilen bant paterni klaritromisin direnci ile ilgili sonuç verir (130).

Test edilen örnek heterojen bir suş içerebilir. Eğer bir suş iki kromozomundan sadece birinde direnç ile ilişkili mutasyon taşıyorsa, mutasyon problemlerinden biri ve aynı zamanda ilgili wild type bandı oluşabilir. Test edilen örnek birden fazla *H. pylori* suşu (örn; miks kültüre bağlı olarak) içerebilir. Bu suşlardan en az biri bir mutasyona sahipse mutasyon bantlarından biri ve aynı zamanda ilgili wild type bandı oluşabilir (36,130).

Tablo 3. *gyrA* genindeki mutasyonlar ve ilgili wild type ve mutasyon problemleri*(130)

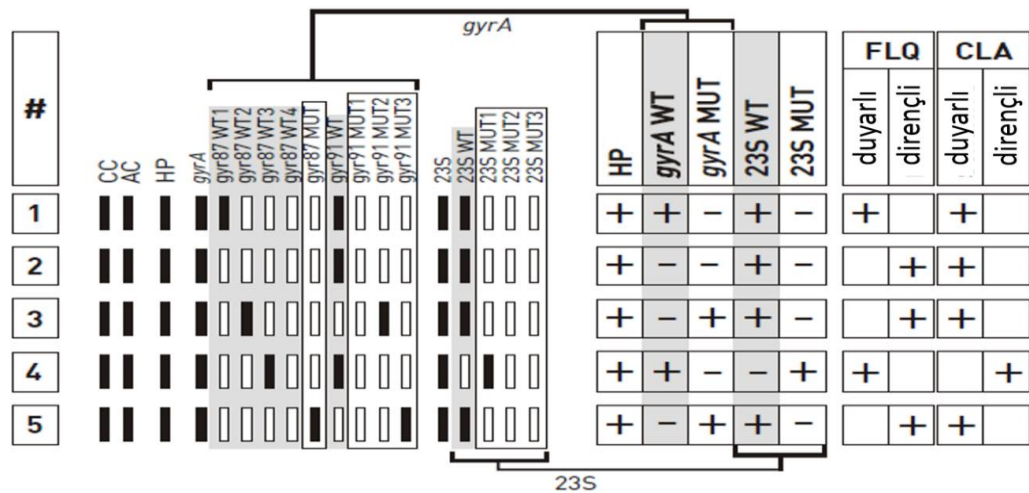
Oluşmayan wild type prob	Analiz edilen kodon	Görülen mutasyon probu	Mutasyon
gyr87 WT1-4	87	gyr87 MUT	N87K
gyr91 WT	91	gyr91 MUT1	D91N
		gyr91 MUT2	D91G
		gyr91 MUT3	D91Y

Tablo 4. 23S rRNA genindeki mutasyonlar ve ilgili wild type ve mutasyon problemleri*(130)

Oluşmayan wild type prob	Analiz edilen kodon	Görülen mutasyon probu	Mutasyon
23S WT	2146-2147	23S MUT1	A2146G
		23S MUT2	A2146C
		23S MUT3	A2147G

*Miks enfeksiyon durumunda hem wild type hem de mutasyon probu oluşmaktadır. Ayrıca, wild type ve mutasyon problemlerinin hiç birinde bant oluşmaması da farklı bir mutasyon varlığını düşündürmelidir.

vii. Değerlendirme Örnekleri



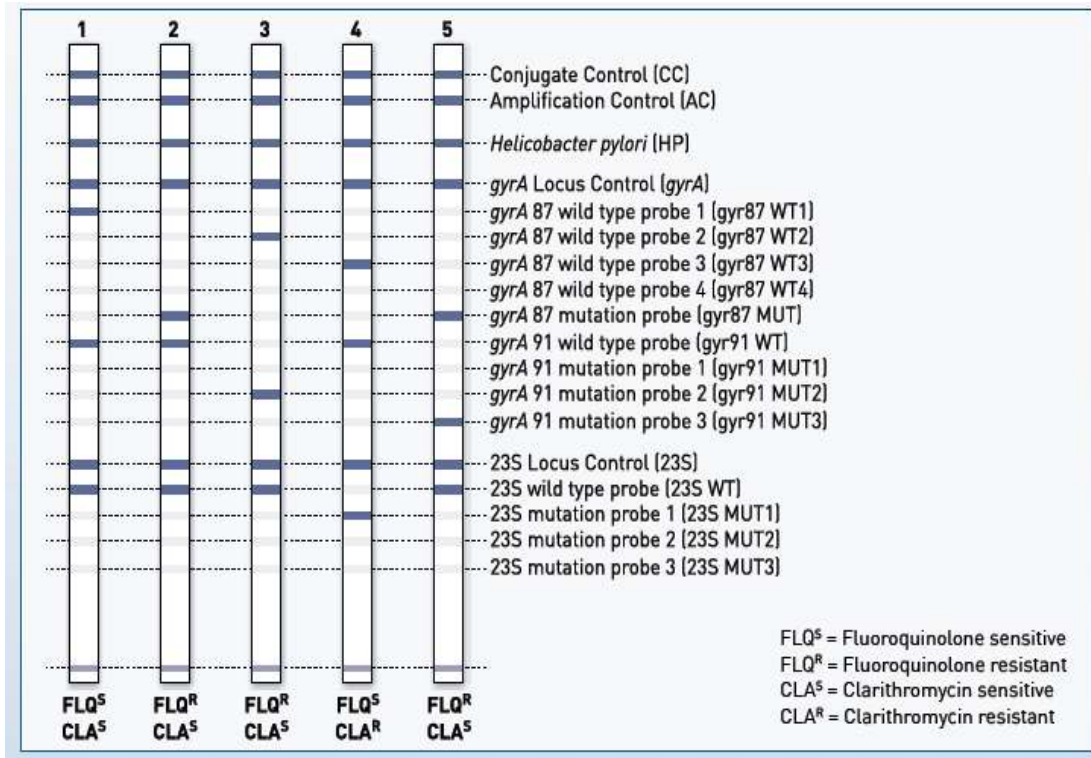
Şekil 27. Örnek bant paternleri ve bu paternlerin florokinolon ve/veya klaritromisin direnci ile ilgili değerlendirilmeleri (130)

Eğer gyr87 WT bantlarından biri ve gyr91 bandı oluşursa, pozitif olarak sınıflandırılır ve *gyrA* geninin WT sütununa “+” işareti konulur. Eğer 23S WT probu boyanırsa, aynı şekilde 23S WT sütununa “+” işareti konulur. Dört gyr87 WT probunun hiçbirinde sinyal oluşmazsa ya da gyr91 WT bandı yoksa bu, negatif olarak sınıflandırılır ve *gyrA* geninin WT sütununa “-” işareti konulur. 23S WT bandı negatif ise aynı şekilde 23S WT sütununa “-” işareti konulur. Mutasyon sütunlarına, hiçbir genin mutasyon bandında renk olmadığı durumlarda negatif yazılır. Mutasyon bantlarından en az birinde renk gözlenirse pozitif olarak sınıflandırılır ve ilgili genin MUT sütununa “+” işareti konulur (Şekil 27) (130).

İki örnek aşağıda açıklanmaktadır;

Bir numaralı örnek, WT bant paternini göstermektedir. *gyr87* WT problelerinden birisi ve diğer iki WT probunda bant oluşmuştur, ancak hiçbir mutasyon probunda bant oluşmamıştır. Bu nedenle değerlendirme çizelgesinde iki WT sütununda “+”, iki mutasyon sütununda “-” işaretlenmiştir. Bu durumda florokinolon (FLQ) duyarlı ve klaritromisin (CLA) duyarlı kutucuklarına “+” işareti konulur. Suş, *H. pylori* “wild type 1” taşımaktadır (130).

İki numaralı örnekte, *gyr91* WT probu boyanmıştır ancak *gyr87* WT bantlarından hiçbirisi oluşmamıştır. Bu nedenle değerlendirme çizelgesindeki *gyrA* WT sütununa negatif yazılmıştır. Test edilen iki *gyrA* lokusunun MUT bantlarından hiçbirisi pozitif değildir ve bu nedenle de *gyrA* MUT sütununa da negatif yazılmıştır. 23S problemleri wild type patern göstermektedir, 23S WT kutucuğuna “+” ve 23S MUT kutucuğuna “-” yazılmıştır. WT bantlarından birinin olmaması test edilen suşun dirençli olduğunu göstermektedir. İkinci örnek, florokinolon dirençli, klaritromisin duyarlı olarak değerlendirilmektedir (130).



Şekil 28. GenoType® HelicoDR testi bant paternleri için örnekler ve değerlendirilmeleri (129)

viii. GenoType® HelicoDR testinin kısıtlılıkları

Tüm DNA temelli testlerde olduğu gibi, bu test aminoasit sekansını değil, sadece nükleik asit sekansını taramaktadır. Bu nedenle, bir aminoasit değişimine neden olmayan mutasyonlar (“silence” mutasyon), wild type problemlerinden birinin olmamasına neden olabilir (130).

Florokinolon ve klaritromisin direncine neden olan test edilen *gyrA* ve 23S gen bölgelerindeki diğer mutasyonlar da bildirilmiştir. Bu mutasyonlar oldukça nadir görülmektedir, validasyon için uygun değildir sadece *in silico* test edilmiştir. Bir *in silico* saptama, bu mutasyonlardan bazılarının *in vitro* saptanamayabileceği ihtimalini dışlamaz (130).

GenoType® HelicoDR testi sadece, direnci *gyrA* ve 23S gen bölgelerinde orjinlenen *H. pylori* suşlarının direncini saptayabilir. Diğer genler ya da gen bölgelerindeki mutasyonlardan ve diğer florokinolon ve klaritromisin direnç mekanizmalarından kaynaklanan direnç bu test ile saptanamamaktadır. Analiz edilecek örnekte birden fazla bakteriyal türün olması testin değerlendirilmesini engelleyebilir (130).

Teorik olarak, bir wild type paternine rağmen direnç var olabilir. Eğer örnek sadece mutasyon problemleri ile kaplanmayan, sadece kısmi bir direnç geliştiren bir suş içeriyorsa, wild type paterni oluşacaktır. Eğer örnekte birden fazla *H. pylori* suşu varsa (miks kültür) ve suşlardan biri mutasyon problemleri ile kaplanmayan bir mutasyon sergilerse, wild type paterni oluşur (36,130).

Diğer hibridizasyon temelli saptama sistemleri gibi bu test, muhtemelen primer ve problemlerin seçildiği genomik bölgelerdeki sekans varyasyonuna dayanır fakat dizayn edilmeyen test yanlış sonuçlara neden olabilir. Bakteriyal genomların yüksek varyasyonu nedeniyle bazı sub-tiplerin saptanamayabilir. Bu test sadece primer ve problemlerin seçildiği genomik bölgenin sınırlarında çalışmaktadır. İleri araştırmalar için sekans analizi gerekmektedir (130).

3.6.7.4. Fluorescence Energy Transfer (FRET) Real-Time PCR

LightCycler thermocycler (Roche) kullanılarak gerçekleştirilen floresans enerji transfer teknolojisine dayanan bir PCR metodudur. *H. pylori* ve klaritromisin direncinden en sık sorumlu olan 2142 ve 2143 pozisyonlarındaki G ve C mutasyonlarının saptanması için

kullanıldı. Direkt antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri ve dışkı örneklerinin DNA'larından FRET-real-time protokolüne uygun olarak çalışıldı.

i. Primerlerin Hazırlanması

H. pylori 23S rRNA geninin 267 bp'lik bir bölümü HpyS ve HpyA primerleri kullanılarak çoğaltıldı (42).

Hpy-S 5'- AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC -3'

Hpy-A 5'- CGCATGATATTCCCATTAGCAGT -3'

Kuru (liyofilize) halde gelen primerler (Tıbmolbiol), her ikisinin de konsantrasyonu 20 pmol/μl olacak şekilde DNaz RNaz içermeyen moleküler biyolojik su (Biochrom AG) eklenerek hazırlandı.

ii. Probların hazırlanması

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

Anchor FL 5'- TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC- FL- 3'

Liyofilize olarak temin edilen problar (Tıbmolbiol), her ikisinin de konsantrasyonu 20 pmol/μl 20 pmol/μl olacak şekilde nükleaz içermeyen moleküler biyolojik su eklenerek hazırlandı. Çoğaltılan ürün HpyRED ve Anchor FL probları ile saptandı (42).

iii. Kullanılan Pozitif Kontroller

FRET-real-time PCR yönteminde *H. pylori* ve klaritromisin direncine neden olan mutasyonları saptamaya yönelik üç farklı pozitif kontrol kullanıldı. **Wild type** kontrolü için klaritromisin duyarlı genotipe sahip *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu, A→G ve A→C mutasyonları için ise "Federation of European Microbiology Societies" (FEMS) bursu ile gidilen "Victor Segalen Bordeaux 2 University, Laboratoire de Bacterologie, Reference Center for Campylobacter and Helicobacter, Bordeaux France" da tarafımda sekans analizi yapılmış olan, antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* koloni DNA örneklerinin 23S rRNA geninde G ve C mutasyonları saptanan hasta suşlarının DNA'ları kullanıldı.

iv. Amplifikasyon için FRET-Real-time PCR Karışımının Hazırlanması

Antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri ve dışkı örnekleri için aynı PCR karışımı "Victor Segalen Bordeaux 2 University, Laboratoire de Bacterologie, Reference Center for

Campylobacter and Helicobacter, Bordeaux France” da uygulanan prosedüre göre hazırlandı. Ayrıca dışkı DNA örneklerinde inhibitörlerin varlığı nedeniyle yalancı negatif sonuçların önlenmesi amacıyla Fransa’daki referans merkezde uygulanan protokole göre her dışkı DNA örneği aynı zamanda DNaz RNaz içermeyen moleküler biyolojik su (Biochrom AG) ile 1/10 oranında seyreltilerek duplike çalışıldı.

PCR karışımı cam kapiller tüplerde, toplam hacim 8 µl olacak şekilde hazırlandı;

Steril saf su*	5.28 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0.64 µl
Hpy A (20 pmol/µl)	0.16 µl
Hpy S (20 pmol/µl)	0.16 µl
Hpy RED (20 pmol/µl)	0.08 µl
Anchor FL (20 pmol/µl)	0.08 µl
FastStart DNA Master**	0.80 µl
DNA kalıbı	0.80 µl

* DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG)

** Light Cycler Fast Start Enzim-Reaksiyon Karışımı (FastStart DNA Master) (Roche): FastStart Taq DNA Polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı ve 10 mM MgCl₂ içermektedir.

v. FRET-Real-time PCR Programı

Her bir örnek ve pozitif kontroller için hazırlanmış olan kapiller tüpleri LightCycler 1.5 (Roche) cihazına yerleştirildi. Tüm amplifikasyon ve melting curve analiz işlemleri aynı cihazda yapıldı (Tablo 5).

Tablo 5. FRET-real-time PCR yönteminde uygulanan LightCycler 1.5 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	17 sn	20		
Melting Curve	95°C	0 sn	20		
	38°C	50 sn	20		
	85°C	0 sn	0.10	Devamlı	
Soğutma	45°C	30 sn	20		

vi. FRET-Real-time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

LightCycler 4.1 Front Screen Software (Roche) programı kullanılarak real-time PCR sonuçları değerlendirildi. 530 floresans kanalı ve “melting curve” analiz programı seçilerek pozitif kontrollerin “melting” sıcaklıkları (T_m) kontrol edildi. Wild-type, A→G dönüşüm (2143/2142 pozisyonları) ve A→C dönüşümü (2142 pozisyonu) T_m ’leri sırasıyla yaklaşık 61.5, 53.0, 58.0 °C civarında olduğunda hasta suşlarının analizi pozitif kontroller göz önünde bulundurularak yapıldı. Negatif kontrol, her çalışmada pozitif kontroller ile birlikte kullanıldı. Pozitif kontroller ve hasta sonuçları değerlendirilmeden önce negatif kontrolde olası bir kontaminasyon nedeniyle pik oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Aynı zamanda “Absolute Quantification” analiz programı kullanılarak Ct (threshold cycle) değerleri de kontrol edildi. PCR ürünlerinde meydana gelen ilk önemli artış (Ct) hedef gen bölgesinin (template)

başlangıç miktarı ile doğru orantılıdır. Ct değerinin 35'den fazla olduğu örnekler kontaminasyon olarak değerlendirilerek tekrar çalışıldı.

3.6.7.5. Konvansiyonel PCR Protokolleri

Konvansiyonel PCR yöntemi, randomize seçilen antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde ve izole edilen *H. pylori* koloni DNA örneklerinde *H. pylori* varlığının saptanması için konfirmasyon amacıyla (HPU PCR), 23S rRNA (*rrl* geni) geninde klaritromisin direncine ve *gyrA* geninde levofloksasin direncine neden olan mutasyonların saptandığı moleküler yöntemlerin doğrulanması amacıyla (23S rRNA PCR ve *gyrA* PCR) uygulanmıştır. Moleküler yöntemler ile ya da E-test fenotipik yöntemi ile klaritromisin duyarlılığı sonucu farklı çıkan ve randomize seçilmiş bazı uyumlu hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örnekleri ve hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* kolonilerinden ekstrakte edilen DNA'lara sekans analizi için gönderilmek üzere 23S rRNA PCR yöntemi uygulandı. Aynı şekilde moleküler yöntem ve geleneksel fenotipik E-test yöntemi ile levofloksasin duyarlılık sonucu farklı çıkan ve aynı zamanda randomize seçilmiş bazı uyumlu hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örnekleri ve hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* kolonilerinden ekstrakte edilen DNA'lara *gyrA* PCR uygulandı.

3.6.7.5.1. PCR Karışımının Hazırlanışı

HPU PCR, 23S rRNA PCR ve *gyrA* PCR yöntemlerinde PCR karışımında kullanılan dNTP ve Taq DNA polimeraz aynı olup sadece farklı primerler ve farklı PCR döngüleri ile çalışıldı.

i. 10 mM dNTP karışımı

10 µl dNTP (Sigma) karışımı (dNTP tüpü içerisinde her birinden 10 mM olarak: dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) 1:5 oranında DNaz RNaz içermeyen moleküler biyolojik su (Biochrom AG) ile homojenize edildi.

ii. Taq DNA Polimeraz (250 ünite) (Fermentas)

Kullanıma hazır olarak temin edildi.

iii. Primerler

HPU PCR için (TıbMolBiol)

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

HPU-2; 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3' (forward primer) (186)

23S rRNA PCR için (TıbMolBiol)

HPY-S; 5-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3 (reverse primer)

HPY-A; 5-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3 (forward primer) (25)

**Antisense; 5-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3 (reverse primer)

Sense; 5-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3 (forward primer) (28)

**Antisense; 5-CTGCATGAATGGCGTAACGAG-3 (reverse primer)

Sense primer; 5-TCCTCTCGTACTAGGGA-3 (forward primer) (24)

**Başka bir proje kapsamında klaritromisin duyarlılık sonuçları moleküler yöntem ve E-test yöntemi ile farklı saptandığı için sekans analizine gönderilmek üzere iki farklı primer seti ile değerlendirilen ve bu tez projemizde randomize seçilen hasta grubumuzda da yer alan hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarının 23S rRNA genlerinin sekans analizi FEMS bursu ile gittiğim “Victor Segalen Bordeaux 2 University, Laboratoire de Bacterologie, Reference Center for Campylobacter and Helicobacter, Bordeaux France” da tarafımca yapılmıştır.

gyrA PCR için (Genmar)

gyr-APF; 5-AGCTTATTCCATGAGCGTGA-3 (reverse primer)

gyr-APR; 5-TCAGGCCCTTTGACAAATTC-3 (forward primer) (187)

Liyofilize primerler 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG) ile sulandırılarak stok solüsyon hazırlandı ve -20 °C’de saklandı.

Hazırlanan bu primer stok solüsyonu, PCR karışımında kullanılmak üzere primer konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG) ile seyreltilti. Primer ara stoğu bittiğinde aynı işlem ana stoktan tekrarlandı.

3.6.7.5.2. Konvansiyonel PCR Karışımları ve PCR döngüleri

Her PCR reaksiyonunda bir negatif (steril saf su) ve bir pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637 standart suşu) kullanıldı. PCR son hacim 50 µl olacak şekilde 0.2 ml'lik ependorflar (Greiner Bio-one) içinde termal cycler'da (Techne TC-412) gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak NCTC 11637 *H. pylori* standart suşu'ndan elde edilen DNA kullanıldı. Hem koloni hem de gastrik biyopsi DNA örneklerinden çalışıldı. PCR karışımı ve döngüsü her iki örnek için aynıydı.

HPU PCR

PCR Karışımı :

Steril saf su*	32 µl
dNTP	5 µl
10X PCR Tamponu**	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
HPU-1	1 µl
HPU-2	1 µl
Taq DNA Polimeraz**	1 µl
Kalıp DNA	1 µl

* DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG)

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

PCR Döngüleri

Başlangıç aktivasyon basamağı	95 °C 3 dakika	
Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C 1 dakika	} 35 döngü
Primer bağlanması (Annealing)	45 °C 1 dakika	
DNA zincirinin uzaması	72 °C 1 dakika	
Son uzama	72 °C 10 dakika	

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

23S rRNA PCR

PCR Karışımı :

Steril saf su*	31 µl
dNTP	5 µl
10X PCR Tamponu**	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
HPY-S	1 µl
HPY-A	1 µl
Taq DNA Polimeraz**	1 µl
Kalıp DNA	3 µl

* DNAz ve RNAz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG)

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

PCR Döngüleri :

Başlangıç aktivasyon basamağı	95 °C	5 dakika	
Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C	1 dakika	} 40 döngü
Primer bağlanması (Annealing)	55 °C	1 dakika	
DNA zincirinin uzaması	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	7 dakika	

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

***gyrA* PCR**

PCR Karışımı :

Steril saf su*	31 µl
dNTP	5 µl
10X PCR Tamponu**	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
<i>gyrA</i> -1	1 µl
<i>gyrA</i> -2	1 µl
Taq DNA Polimeraz*	1 µl
Kalıp DNA	3 µl

* DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG)

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

PCR Döngüleri :

Başlangıç aktivasyon basamağı	95 °C 5 dakika	
Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C 30 saniye	} 35 döngü
Primer bağlanması (Annealing)	47 °C 30 saniye	
DNA zincirinin uzaması	72 °C 30 saniye	
Son uzama	72 °C 5 dakika	

PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Bazı antrum ve korpus gastrik biyopsi DNA örnekleri ile *gyrA* PCR jel görüntüsünde non-spesifik bantlar gözlemlendi. Bu bantları gidermek ve sadece istenilen gen bölgesinin çoğaltılması için PCR döngüleri değiştirildi. Temel olarak primer bağlanma sıcaklığını (annealing) arttırarak istenilen büyüklükte ve spesifik bantlar elde edildi.

Bazı gastrik biyopsi örnekleri için optimize edilen *gyrA* PCR Döngüleri :

Başlangıç aktivasyon basamağı	95 °C 2 dakika	
Ayrılma (Denatürasyon)	95 °C 30 saniye	} 40 döngü
Primer bağlanması (Annealing)	55 °C 30 saniye	
DNA zincirinin uzaması	72 °C 30 saniye	
Son uzama	72 °C 5 dakika	

3.6.7.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi

i. Agaroz Jel Hazırlanması (Seakem ® LE Agaroz) (Lonza, USA)

PCR ürünlerinin saptanması için 1X TBE içerisinde 23S rRNA PCR için % 1’lik ve *gyrA* PCR için %2’lik agaroz jel hazırlandı: 100 ml 1X TBE (Tris-borate- EDTA) tamponu içine agaroz (Seakem ® LE Agaroz) eklendi. 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 kalıbının tarağı yerleştirildi. Hazırlanan jel karışımı kalıba döküldü. Donması beklendi. Donduktan sonra jel kalıbından tarak çıkartıldı.

ii. TBE (Tris-borate- EDTA) 10X tamponu (Applichem)

100 ml TBE 10X solüsyonu ve 900 ml distile su karıştırılarak 1X TBE tamponu elde edildi.

ii. Etidium bromid (10 mg/ml) (Sigma)

0.1 gr etidium bromid 10 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı

iii. 6X Orange DNA Loading dye (Fermentas)

Jele yüklenen PCR ürünlerinin görünür hale gelmesini ve kuyucuklara çökmesini sağlayan “DNA loading dye” kullanıma hazır olarak temin edildi.

iv. *GeneRulerTM 50 bp DNA ladder* (50µg) (Fermentas)

Jelde görüntülenen PCR ürünlerinin büyüklüğünü referans büyüklükteki DNA ile karşılaştırıp saptayabilmek için 50 bp’lik DNA ladder; 5 µl DNA Ladder, 5 µl 6x loading dye ve 20 µl DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su (ULTRA PURE WATER, BIOCHROM AG) karıştırılarak hazırlandı.

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 EasycastTM B2) 20-40 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilluminatörde (VILBER LOURMAT) Infinity Capt programı kullanılarak incelendi. PCR ürünü büyüklükleri DNA ladder ile karşılaştırıldı.

3.6.7.6. Pürifikasyon Protokolü

Antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden ve izole edilen *H. pylori* kolonilerinden ekstrakte edilen DNA’lardan 23S rRNA ve *gyrA* genleri amplifiye edilerek elde edilen PCR ürünleri “QIAquick PCR Pürifikasyon Kiti” (QIAGEN) ile pürifiye edildi:

- Boş bir ependorfa beş volüm PB Buffer, bir volüm PCR ürünü olacak şekilde 200 µl PB tamponu ve 40 µl PCR ürünü eklendi: Toplam PCR ürünü 50 µl final volüm olup, 10 µl agaroz jele yüklendiğinden pürifiye edilecek PCR ürünü 40 µl’dir.
- Hazırlanan bu karışımlar ayrı ayrı QIAquick spin kolonlarına aktarıldı.
- DNA’ nın bağlanması için PCR ürünlerini içeren QIAquick spin kolonları bir dk 13,000 rpm hızda santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası QIAquick spin kolonlarının altında kalan sıvı atıldı ve tekrardan toplama kabı QIAquick spin kolonunun altına yerleştirildi.
- Yıkama aşaması için 750 µl PE tamponu QIAquick spin kolonuna eklendi ve bir dk 13,000 rpm hızda santrifüj edildi.
- Tekrardan altta kalan sıvı atıldı ve toplama kabı QIAquick spin kolonunun altına yerleştirildi ve bir dk 13,000 rpm hızda santrifüj edildi.
- QIAquick spin kolonu temiz 1,5 ml’lik ependorf tüpüne yerleştirildi.

- DNA'yı ayırtmak için 50 µl EB tamponu kolonun içindeki membranın ortasına gelecek şekilde eklendi ve bir dk 13,000 rpm hızda santrifüj edildi.

Pürifikasyonu yapılmış PCR ürünleri sekansa gönderilene kadar -20 °C'de saklandı.

3.6.7.7. Sekans Analizi

Pürifiye DNA ürünleri ile birlikte 23S rRNA ve *gyrA* genlerinin çoğaltıldığı konvansiyonel PCR'larda kullanılan reverse ve forward primerler sekans analizi yapılmak üzere "MacroGen (Güney Kore) (www.macrogen.com)" firmasına gönderildi. İstenilen gen bölgelerinin çoğaltıldığı forward ve reverse primerler ile gerçekleştirilen sekans reaksiyonunun sonuçları çalışılan farklı iki gen için (*rrl* ve *gyrA*) farklı programlar ile değerlendirildi:

i. *rrl* geni

MacroGen'den gelen forward ve reverse primerler ile gerçekleştirilen sekans analiz sonuçları <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> sitesi kullanılarak değerlendirildi. Referans sekans dizi olarak gi|15644634 numaralı *Helicobacter pylori* 26695 standart suşunun 23S rRNA gen bölgesi dizisi kullanıldı. Forward primer sekans analiz sonucunun öncelikle http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html sitesi kullanılarak tamamlayıcı dizisi (reverse complement) elde edildi. Daha sonra i-referans dizi, ii-reverse primer sekans analiz dizisi ve iii-forward primerin elde edilen tamamlayıcı dizisi <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> sitesinde alt alta yazıldı. Sekans dizilerinin giriş biçimi "Multalin-Fasta" seçildi. Alt alta görülen forward ve reverse primerlerin sonuçları referans diziye göre analiz edilerek baz değişiklikleri değerlendirildi.

ii. *gyrA* geni

Referans dizi olarak gi|409893860 numaralı "DNA gyrase subunitA *H. pylori* 26695" kullanıldı. Öncelikle reverse primerin http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html sitesi kullanılarak tamamlayıcı dizisi (reverse complement) elde edildi. Referans dizinin ve her iki primer ile sekans dizilerinin aminoasit dizileri <http://web.expasy.org/translate/> sitesi kullanılarak stop kodunu içermeyen protein kodlayabilen (Open Reading Frame) bölgesi en uzun olan seçilerek elde edildi. Son olarak "Expasy Bioinformatic Resource Portal"dan

CLUSTALW programı kullanılarak referans diziye göre aminoasit dizisinde görülen değişimler değerlendirildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Şubat 2012	Etik Kurul Kabulü
Temmuz 2012-Mart 2013	Proje Kabulü Malzeme Satın Alımı
Eylül -Aralık 2012	FEMS Bursu Eğitimi (Bordeaux,Fransa)
Ocak-Nisan 2013	Yöntemlerin Standardizasyonu
Mayıs 2013-Şubat 2014	Yöntemlerin Uygulanması
Mart- Mayıs 2014	Sonuçların Değerlendirilmesi
Haziran 2014-Şubat 2015	Tez Yazımı

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Uygulanan testlerin sonuçlarının değerlendirilmesi için dört gözlü tablo oluşturuldu. Histopatolojik inceleme, HUT ve kültürün en az ikisinin pozitif olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu pozitif; tümünün negatif olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu negatif değerlendirildi.

a: Doğru pozitif Duyarlılık: $a/(a+c).100$

b: Yalancı pozitif Seçicilik: $d/(b+d).100$

c: Yalancı negatif PPV: $a/(a+b).100$

d: Doğru negatif NPV: $d/(c+d).100$

Yaş ve cinsiyet dağılımının tüm test yöntemleri ile değerlendirildiğinde *H. pylori* pozitifliği/negatifliği ile arasındaki ilişki varlığı t test ve McNemar ile değerlendirildi.

FRET-real-time PCR metodu ve GenoType® HelicoDR testi ile altın standart yöntemin karşılaştırılmasında duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif öngörü değeri (PPV ve NPV) ve tanısal doğruluk kullanıldı. McNemar Ki-kare testi uygulandı (SPSS Version 15.0). Farklı testlerin klaritromisin ve levofloksasin direnç sonuçları kappa tutarlılık testi ile değerlendirildi (SPSS Version 15.0). $p < 0.05$ 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 Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 16.02.2012 tarih ve 510-GOA protokol numaralı toplantısında, 2012/05-22 karar numaralı **“Gastrik Biyopsi ve Dışkı Örneklerinden İzole Edilen Helicobacter Pylori Genomik DNA’sında Klaritromisin ve Levofloksasin Duyarlılığının Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi”** isimli yüksek lisans tezi araştırma projesinin uygulanması onayı, 20.02.2012 tarih ve 123 sayılı yazı ile Prof. Dr. Özlem Yılmaz’a bildirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğine dispeptik yakınmalar ile başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 40 kadın (%69) ve 18 erkek (%31) toplam 58 erişkin hastanın yaş ortalaması 41.1 ± 13.5 , yaş aralığı 18-73 saptandı.

H. pylori enfeksiyonu pozitifliği ile kadın ve erkek cinsiyeti arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 testi, $p=1,000$).

H. pylori enfeksiyonu pozitifliği ile yaş arasında anlamlı bir fark saptandı (t testi, $p=0,002$).

H. pylori enfeksiyonu pozitif hastalarda yaş ortalaması 43.1 ± 13.0 , *H. pylori* enfeksiyonu negatif hastalarda yaş ortalaması 26.3 ± 6.5 saptandı. Kadın ve erkek oranı ise *H. pylori* enfeksiyonu pozitif hastalarda 2.18, *H. pylori* enfeksiyonu negatif hastalarda 2.50 saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. *H. pylori* enfeksiyonu pozitif ve negatif hastaların demografik verileri

	<i>H. pylori</i> enfeksiyonu (n=58)	
	Negatif	Pozitif
Hasta sayısı (n)	7	51
Yaş ortalaması	26.3 ± 6.5	43.1 ± 13.0
Yaş medyanı	24	44
Yaş aralığı	20-38	18-73
Kadın/erkek oranı	2.50	2.18

4.2. Hızlı Üreaz Testi (HÜT) Bulguları

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Endoskopi ünitesinde uygulanan hasta başı testi HUT, 58 hastanın 50 (%86.2)'sinde pozitif saptandı. Pozitif 50 hastanın 41 (%82)'inde hem antrum hem de korpus biyopsi örneği, sekiz (%16) hastada sadece antrum, bir (%2) hastada

ise sadece korpus HÜT testi pozitif saptandı. Antrum ve korpus biyopsi örnekleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise; 58 hastada 49 (%84.5) antrum, 42 (%72.4) korpus biyopsi örneği HÜT pozitif olarak saptandı.

4.3. Histopatoloji Bulguları

Antrum ve korpus biyopsi örnekleri birlikte değerlendirildiğinde toplam 58 hastanın 50 (%86.2)'si HLO pozitif saptandı. Elli hastanın 45 (%90.0)'i antrum ve korpus, dördü (%8.0) sadece antrum, biri (%2.0) sadece korpus pozitif saptandı. Elli sekiz hastada HLO yönünden pozitif saptanan 49 (%84.5) antrum biyopsi örneğinin 21 (%42.9)'i üç pozitif, 16 (%32.6)'sı iki pozitif, 12 (%24.5)'si bir pozitif saptandı. Elli sekiz hastada HLO yönünden pozitif saptanan 46 (%79.3) korpus biyopsi örneğinin 16 (%34.8)'sı üç pozitif, 19 (%41.3)'u iki pozitif, 11 (%23.9)'i bir pozitif olarak saptandı.

Toplam 116 antrum ve korpus biyopsi örnekleri lamina propria'da, pitlerde enflamasyon, atrofi, intestinal metaplazi (IM) ve HLO her biri 0-3 [yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3)] arasında güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre uzman patolog tarafından değerlendirilmiştir (125). Histopatolojik inceleme ile 50 HLO pozitif hastanın 50 (%100)'sinde gastrit, iki (%4.0)'sinde atrofi, sekiz (%16.0)'inde intestinal metaplazi saptandı. Histopatolojik inceleme ile HLO negatif bulunan sekiz hastanın sekiz (%100)'inde gastrit, bir (%12.5)'inde intestinal metaplazi saptandı.

4.4. *Helicobacter pylori* Kültür Bulguları

Elli sekiz hastanın 49 (%84.5)'unda kültürde üreme saptandı, dokuzunda (%15.5) üreme gözlenmedi. Bu 49 kültür pozitif hastanın sekiz (%16.3)'inde sadece antrum, beş (%10.2)'inde sadece korpus, 36 (%73.5)'sında hem antrum hem de korpus biyopsi örneği pozitif saptandı. Elli sekiz hastanın antrum biyopsi örneklerinde 44 (%75.9)'ü kültür pozitif, 14 (%24.1)'ü kültür negatif saptandı. Elli sekiz hastanın korpus biyopsi örneklerinde ise 41 (%70.7)'i kültür pozitif, 17 (%29.3)'si kültür negatif saptandı.

İki hastanın kültür plaklarında *H. pylori* kolonileri ile birlikte farklı morfolojide koloniler gözlemlendi. İki plaktaki farklı morfolojideki kolonilerden direkt bakı ve Gram boyalı preparatlar hazırlandı. Direkt bakıda; birinde maya hücreleri, diğerinde ise basil morfolojisinde bakteriler gözlemlendi. Gram boyalı preparatların da aynı şekilde birinde Gram pozitif boyalı Candida benzeri maya hücreleri, diğerinde Gram pozitif basiller gözlemlendi. Maya hücrelerinin Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerine pasajı yapılarak ileri identifikasyonu

için Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi merkez laboratuvarı, mikoloji laboratuvarına* gönderildi. *Candida parapsilosis* üremesi saptandı. Gram pozitif basil morfolojisindeki bakteri kolonilerinden %10 defibrine at kanlı CBA'ya pasaj yapıldı ve katalaz negatif, hareketsiz Gram pozitif tipik basil morfolojide *Lactobacillus spp.* olarak identifiye edildi.

*Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi merkez laboratuvarı, mikoloji laboratuvarında Sayın Prof. Dr. Mine Doluca Dereli'nin izni ile maya identifikasyonu yapılmıştır. Kendilerine teşekkür ederiz.

4.5. Hastalarda *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi

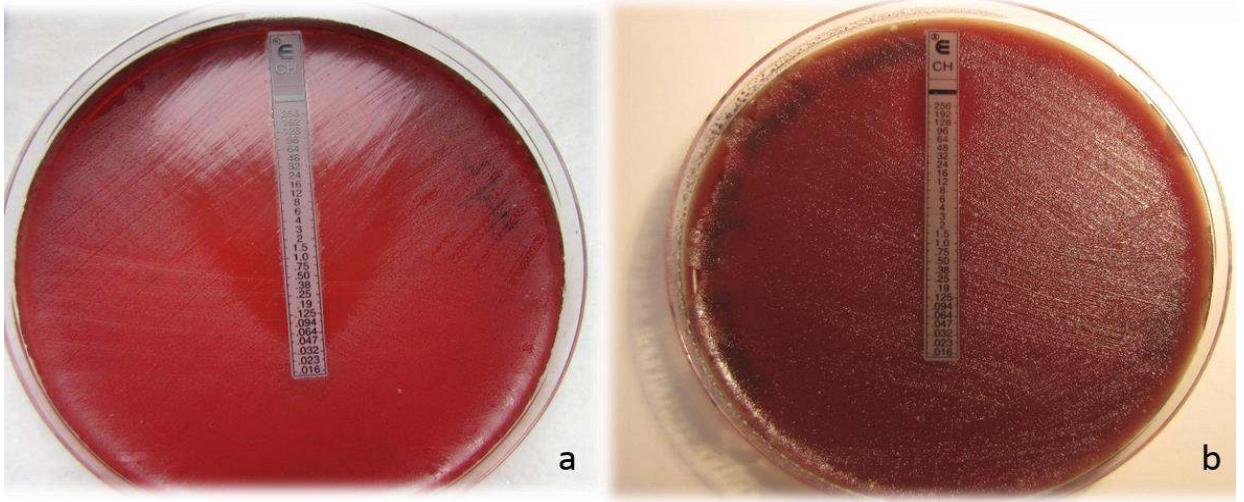
Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniğine dispeptik yakınmalar ile başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan, diğer 2006.KB.SAG.042 BAP proje no'lu, 13.07.2006/179 Etik kurul onaylı doktora tez projesi kapsamında alınmış olan hasta grubundan randomize seçilen 58 hastadan alınan her bir korpus ve antrum biyopsi örneklerine uygulanan histopatolojik inceleme, HÜT ve kültürün, en az ikisinin pozitif olduğu 51 (%87.9) hasta *H. pylori* enfeksiyonu pozitif; her üç testin negatif olduğu yedi (%12.1) hasta, *H. pylori* enfeksiyonu negatif saptandı.

4.6. Gradient Difüzyon (E-test) Bulguları

Kırk dokuz *H. pylori* kültür pozitif hastanın 85 antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarının klaritromisin ve levofloksasin duyarlılığı fenotipik bir yöntem olan E-test yöntemi ile belirlendi.

4.6.1. Klaritromisin E-test Bulguları

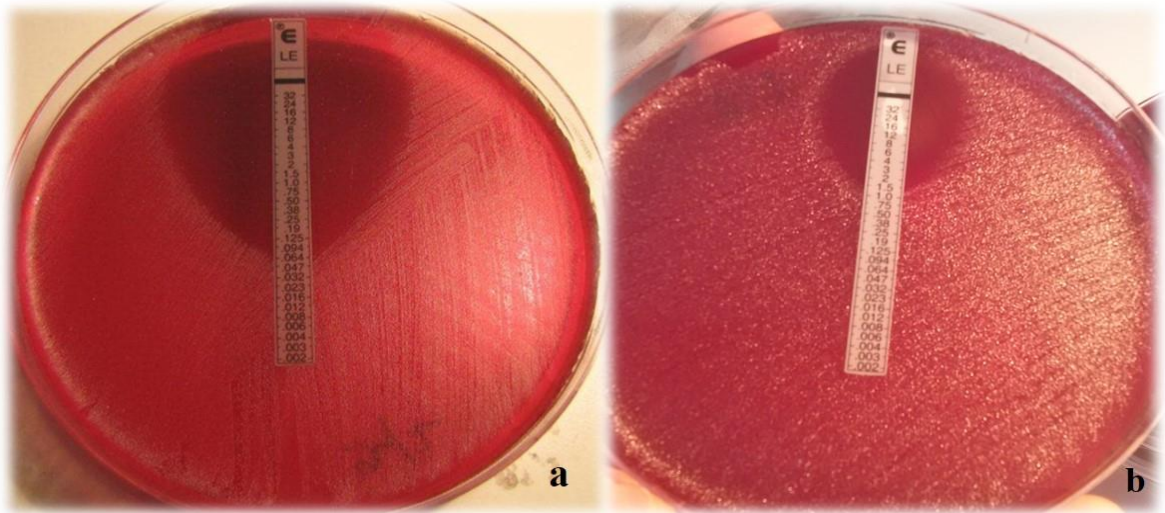
Kültür pozitif olan 49 hastanın E-test yöntemi ile 35 (%71.4)'i klaritromisin duyarlı, 10 (%20.4)'u klaritromisin dirençli, dört (%8.2)'ü ise antrum ve korpus biyopsi örneklerinde farklı bir profil sergileyerek duyarlı ve dirençli “miks enfeksiyon” saptandı. Toplam 85 biyopsi örneğinin 64 (%75.3)'ü klaritromisin duyarlı (Şekil 29-a), 21 (%24.7)'i klaritromisin dirençli (Şekil 29-b) saptandı.



Şekil 29. %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agarda E-test yöntemi ile klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi (a-Klaritromisin duyarlı *H. pylori* hasta suşu, MİK=0.047 µg/mL, b-klaritromisin dirençli *H. pylori* hasta suşu, MİK=64 µg/mL)

4.6.2. Levofloksasin E-test Bulguları

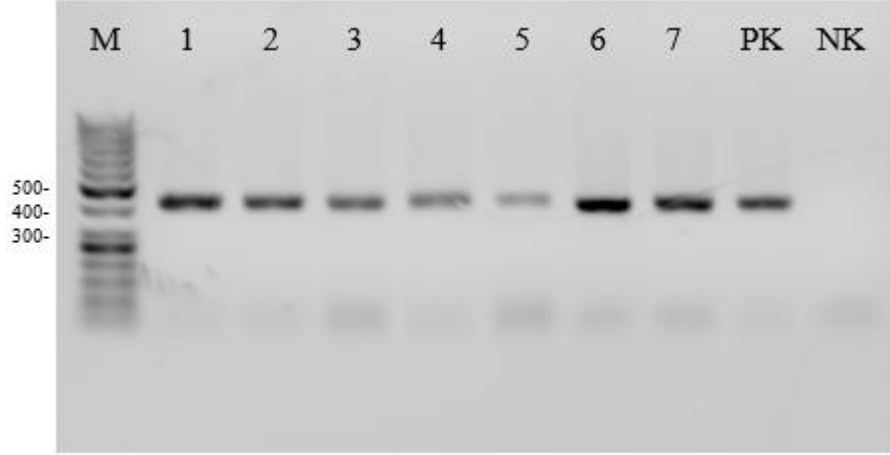
Kültür pozitif olan 49 hastanın E-test yöntemi ile 35 (%71.4)'i levofloksasin duyarlı, dokuz (%18.4)'ü levofloksasin dirençli, beş (%10.2)'i ise antrum ve korpus biyopsi örneklerinde duyarlı ve dirençli saptandı. Bu iki hasta da levofloksasin dirençli ve miks enfeksiyon olarak değerlendirildi. Toplam 85 biyopsi örneğinin 67 (%78.8)'si levofloksasin duyarlı (Şekil 30-a), 18 (%21.2)'i levofloksasin dirençli (Şekil 30-b) saptandı.



Şekil 30. %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agarda E-test yöntemi ile levofloksasin duyarlılığının belirlenmesi (a-Levofloksasin duyarlı *H. pylori* hasta suşu, MİK=0.64 µg/mL, b-Levofloksasin dirençli *H. pylori* hasta suşu, MİK=1.5 µg/mL)

4.7. HPU PCR Bulguları

Elli sekiz hasta içinden randomize seçilen hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi DNA'larına uygulanan HPU PCR sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu ve gastrik biyopsi DNA örneklerinde beklenen ürün büyüklüğünde (411 bp) PCR ürünü elde edildi (Şekil 31).



Şekil 31. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinin HPU PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, 1-7: Hasta örnekleri, PK: Pozitif kontrol NCTC 11637 *H. pylori* standart suşu, NK:Negatif kontrol)

4.8. GenoType® HelicoDR Bulguları

Multipleks PCR ve hibridizasyon aşamalarından oluşan GenoType® HelicoDR testi uygulanırken stripler üzerinde amplifikasyon ve hibridizasyon kontrol bantları olduğu için doku ve koloni DNA örnekleri için multipleks PCR aşamasından sonra agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin incelenmesine gerek olmadığı halde, striplerin değerlendirilmesi aşamasında negatif kontrol sribinde sadece AC ve CC kontrol bantlarının görülmesi gerekirken, diğer bant bölgelerinde de renklenme gözlenip, kontaminasyon saptandığı durumlarda, kontaminasyonun amplifikasyon aşamasında mı hibridizasyon aşamasında mı olduğunu anlayabilmek için PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Fakat dışkı örnekleri için kit içerisinde bir protokol bulunmadığı için testin optimizasyonu ve validasyonu amacıyla en az gastrik biyopsi örnekleri ile elde edilen PCR ürünleri kadar güçlü PCR ürünleri saptanana kadar çalışılan süreçte tüm denemelerde dışkı örneklerinin PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. İstenilen

bölgelerde (*gyrA* için 145 bp, 23S rRNA için 100 bp) en az doku (antrum ve korpus biyopsi örnekleri) DNA örnekleri ile elde edilen PCR ürünleri kadar net ürünler elde edildikten sonra hibridizasyon aşamasına geçilmiştir.

4.8.1. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örnekleri

4.8.1.1. *Helicobacter pylori* pozitifliği

GenoType® HelicoDR testi ile HP (*H. pylori*) bant bölgesinde renklenme gözlenen 58 (%100) hastanın antrum ve korpus toplam 116 gastrik biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen gastrik doku DNA örneklerinde *H. pylori* pozitif saptandı.

4.8.1.2. *Helicobacter pylori* Klaritromisin Duyarlılığı

GenoType® HelicoDR testi ile 23S lokus kontrolünde renklenme gözlendikten sonra, antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri birlikte değerlendirildiğinde, 58 hastanın 37 (%63.8)'si klaritromisin duyarlı, 5 (%8.6)'i klaritromisin dirençli saptanırken, 16 (%27.6) hastada ise hem wild type hem de mutant genotiplerini içeren ikili popülasyon (miks enfeksiyon) saptandı.

Elli sekiz hastanın antrum gastrik biyopsi örneklerinin 42 (%72.4)'si klaritromisin duyarlı, 6 (%10.4)'sı dirençli saptanırken, 10 (%17.2)'unda ise hem wild type hem de mutant genotiplerini içeren ikili popülasyon saptandı. Elli sekiz hastanın korpus gastrik biyopsi örneklerinin 39 (%67.2)'u klaritromisin duyarlı, 5 (%8.6)'i dirençli saptanırken, 14 (%24.2)'ünde ise hem wild type hem de mutant genotiplerini içeren ikili popülasyon saptandı.

Toplam 116 antrum ve korpus gastrik biyopsi DNA örneğinin 81 (%69.8)'inde yalnızca WT, 11 (%9.5)'inde klaritromisin direncine neden olan mutant allel/allelere (MUT1-A2146G/A2142G, MUT2-A2146C/A2142C, MUT3-A2147G/A2143G) ve 24 (%20.7)'ünde WT genotipi ile birlikte mutant allel/allelere saptandı.

Otuz beş klaritromisin dirençli antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneğinin 31 (%88.6)'inde A2147G mutasyonu, iki (%5.7)'sinde A2146G mutasyonu (aynı hastanın antrum ve korpus biyopsi örneğinde), iki (%5.7) örnekte ise A2147G ile A2146G (aynı hastanın antrum ve korpus biyopsi örneğinde) mutasyonları birlikte saptandı.

4.8.1.3. *Helicobacter pylori* Levofloksasin Duyarlılığı

GenoType® HelicoDR testinde gyr lokusunda renklenme varlığı gözlemlendikten sonra florokinolon direncinin belirlenmesinde 87. ve 91. kodonların her ikisi birlikte değerlendirilmiştir.

GenoType® HelicoDR testi ile 58 hastanın 33 (%56.9)'ü levofloksasin duyarlı, 11 (%19)'i levofloksasin dirençli, 14 (%24.1)'ü ise hem wild type hem de mutant genotipine sahip ikili popülasyon olarak saptandı. Yüz on altı antrum ve korpus doku DNA örneğinin 75 (%64.7)'inde sadece wild type alleli, 41 (%35.3)'inde ise mutant allel/alleliler tek başına (22 örnek, %53.7) ya da wild type ile birlikte (19 örnek, %46.3) saptandı.

Yüz onaltı antrum ve korpus gastrik biyopsi örneğinde, 87. kodonda wild type ve gyr87 MUT-N87K mutasyonunun ya da 91. kodonda wild type ve mutant allellerin (gyr91MUT1-D91N, gyr91MUT2-D91G, gyr91MUT3-D91Y) birlikte belirlendiği 19 (%16.4) antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneğinde ikili popülasyon (miks enfeksiyon) varlığı saptandı.

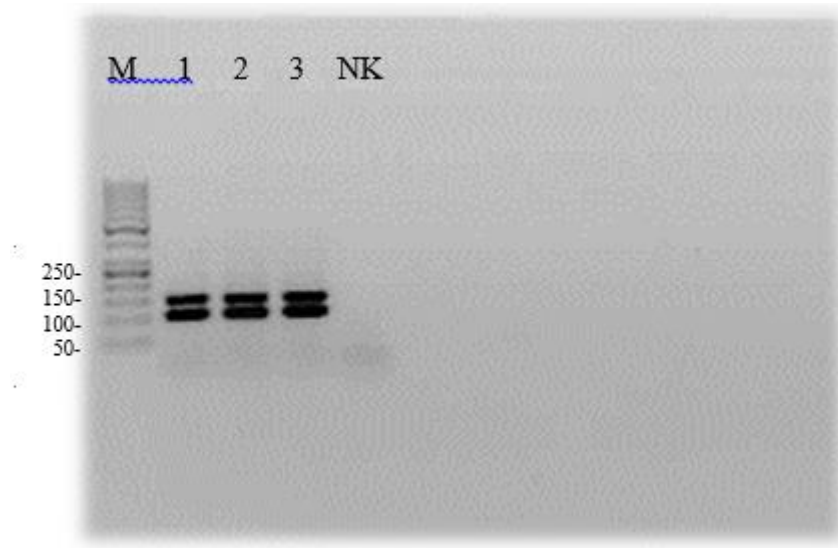
Toplam 58 hastanın 116 antrum ve korpus biyopsi DNA örneklerinde saptanan 41 mutant allelin dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Mutant allel içeren 41 antrum ve/veya korpus doku DNA örneklerinde mutasyon dağılımı

n	Kodon 87	Kodon 91
6	WT	D91G
3	WT	D91N
2	WT	WT + D91G
3	WT	WT + D91N
3	WT	WT + D91Y
2	WT	WT+ D91N + D91G
1	WT	WT + D91G + D91Y
7	N87K	WT
5	WT + N87K	WT
2	WT + N87K	WT + D91N
6	“No band”	WT
1	“No band”	WT+ D91N

4.8.2. Antrum ve Korpustan İzole Edilen *Helicobacter pylori* suşları

Kırk dokuz kültür pozitif hastadan randomize seçilen 15 hastanın; 11'inin antrum ve korpus (ancak bir hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinde üreyen *H. pylori* kolonileri birleştirilmiştir), ikisinin sadece antrum, ikisinin sadece korpus biyopsi örneklerinden, izole edilen *H. pylori* suşlarından ekstrakte edilen toplam 25 koloni DNA örneğine gastrik doku örnekleri ile uyumunu saptamak amacıyla GenoType® HelicoDR testi uygulandı. *H. pylori* NCTC 11637, J99 ve 26695 standart suşları (Şekil 32) ve 25 antrum ve/veya korpustan izole edilen *H. pylori* suşları çalışıldı.



Şekil 32. *H. pylori* standart suşlarının GenoType® HelicoDR testi ile amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. (M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, *H. pylori* standart suşları 1: NCTC 11637, 2: J99, 3: 26695. NK: Negatif kontrol)

4.8.2.1. *Helicobacter pylori* Pozitifliği

H. pylori kültür pozitif olan ve *H. pylori* enfeksiyonu değerlendirme kriterimize göre de pozitif olan, aynı zamanda doku GenoType® HelicoDR testi ile de pozitif saptanan antrum ve korpus biyopsi örneklerinden izole edilen 25 *H. pylori* koloni DNA'sının tümü bu test yöntemi ile *H. pylori* pozitif olarak saptandı.

4.8.2.2. *Helicobacter pylori* Klaritromisin Duyarlılığı

Çalışılan 25 koloni DNA örneğinin 18 (%72)'inde yalnızca WT alleli, beş (%20)'inde yalnızca mutant allel iki (%8)'sinde ise WT alleli ile birlikte mutant allel saptandı. Mutant

allel saptanan toplam yedi suşun; dördünde A2147G mutasyonu, birinde A2146G mutasyonu, ikisinde ise A2146G ve A2147G mutasyonu saptanmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. GenoType® HelicoDR ile koloni DNA örneklerinde saptanan mutant 23S rRNA profilleri

GenoType® HelicoDR ile koloni DNA örneklerinde saptanan mutant 23S-rRNA Profilleri	Koloni DNA örneği (n)
A 2146G (MUT1)	1
A2147G (MUT3)	2
A2146G + A2147G	2
WT + A2147G	2

GenoType® HelicoDR testi ile klaritromisin duyarlılığının saptanmasında 25 koloni DNA örneğinin 18 (%72)'i izole edildiği doku örneği ile tamamen uyumlu (aynı direnç profiline sahip ya da ikisi de wild type) saptandı. Yedi (%28)'sinde ise birinde wild type diğerlerinde wild type ile birlikte aynı direnç profili saptandı (Tablo 9).

Tablo 9. GenoType® HelicoDR testi ile koloni ve biyopsi örneklerinin klaritromisin duyarlılıklarının karşılaştırılması

Örnek sayısı (n)	Biyopsi GenoType® HelicoDR	Koloni GenoType® HelicoDR
15	WT	WT
2	A2146G+A2147G	A2146G+A2147G
1	A2146G	A2146G
3	WT+A2147G	WT
2	WT	WT+A2147G
2	WT	A2147G

4.8.2.3. *Helicobacter pylori* Levofloksasin Duyarlılığı

Çalışılan 25 suşun 17 (%68)'si levofloksasin duyarlı, beş (%20)'i dirençli, üç (%12)'ü miks popülasyon olarak saptandı. Sekiz suшта saptanan mutant allellerin dağılımı tablo 10' da gösterilmektedir.

Tablo 10. Sekiz suшта saptanan mutant allellerin dağılımı

Suş Sayısı	Kodon 87	Kodon 91
1	WT	D91N
1	WT	D91G
2	WT	WT + D91G
1	WT	WT + D91N
3	“No band”	WT

GenoType® HelicoDR testi ile levofloksasin duyarlılığının saptanmasında 25 koloni DNA örneğinin 18 (%72)'i izole edildiği doku örneği ile tamamen uyumlu saptandı (Tablo 11).

Tablo 11. GenoType® HelicoDR testi ile koloni ve biyopsi örneklerinin levofloksasin duyarlılıklarının karşılaştırılması

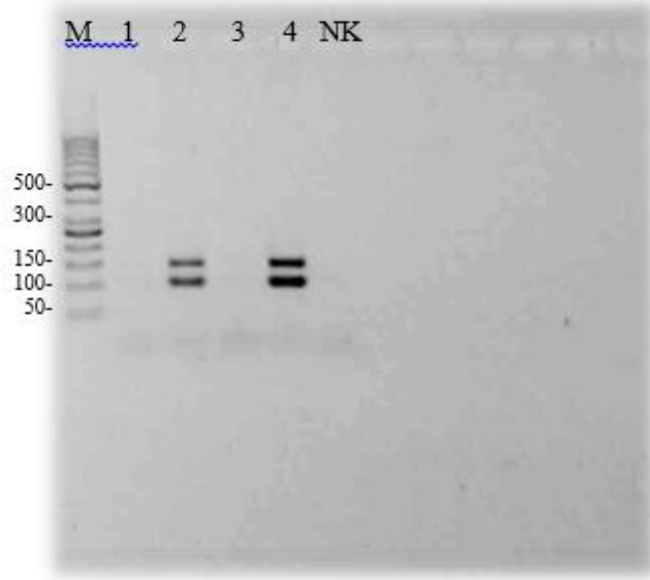
Örnek sayısı (n)	Biyopsi GenoType® HelicoDR		Koloni GenoType® HelicoDR	
	Kodon 87	Kodon 91	Kodon 87	Kodon 91
13	WT	WT	WT	WT
1	WT	D91G	WT	D91G
1	WT	D91N	WT	D91N
1	“no band”	WT	“no band”	WT
1	WT	WT+D91G	WT	WT+D91G
1	WT	WT+D91N	WT	WT+D91N
1	WT	D91G	WT	WT
1	“no band”	WT	WT	WT
1	WT	WT+D91N	WT	WT
1	WT	WT+D91Y	“no band”	WT
1	“no band”	WT+D91N	“no band”	WT
1	WT	WT+D91N+D91N	WT	WT
1	WT	WT+D91N+D91N	WT	WT+D91G

4.8.3. Dışkı Örnekleri

GenoType® HelicoDR testinin bir non-invaziv yöntem olarak dışkı örneklerinde *H. pylori*’nin saptanması, klaritromisin ve levofloksasin duyarlılığının belirlenmesinde uygulanabilirliğinin araştırılması amacı ile ilk olarak test protokolünde yer alan doku DNA multipleks PCR protokolü uygulanmıştır.

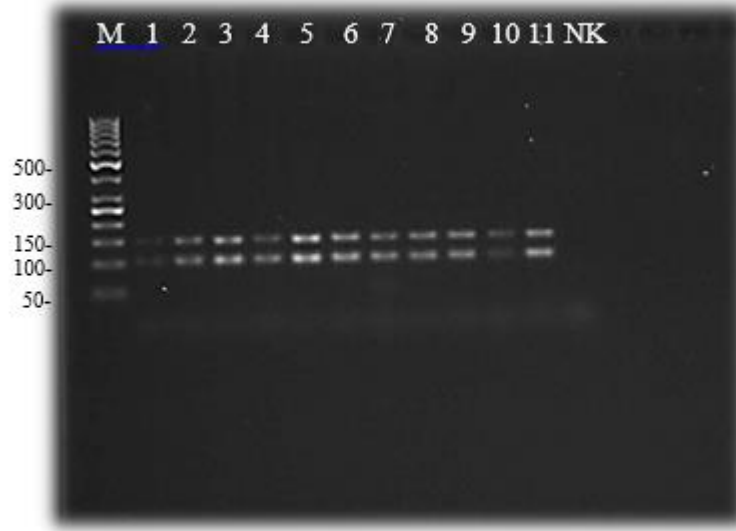
İlk çalışmada dışkı örneklerinden ekstrakte edilen ve dışkı real-time PCR ile *H. pylori* pozitif saptanan dışkı DNA örnekleri aynı hastaya ait antrum ve korpus doku DNA örnekleri ile birlikte eş zamanlı olarak kit prosedüründe yer alan doku DNA multipleks PCR

protokolüne göre çalışılmıştır. İki hastaya ait antrum ve dışkı örneklerinden her iki hastanın antrum DNA örneklerinde beklenen (*gyrA* için 145 bp, 23S rRNA için 100 bp) PCR ürünleri saptanırken her iki hastanın dışkı DNA örneklerinde herhangi bir PCR ürünü saptanmamıştır (Şekil 33).



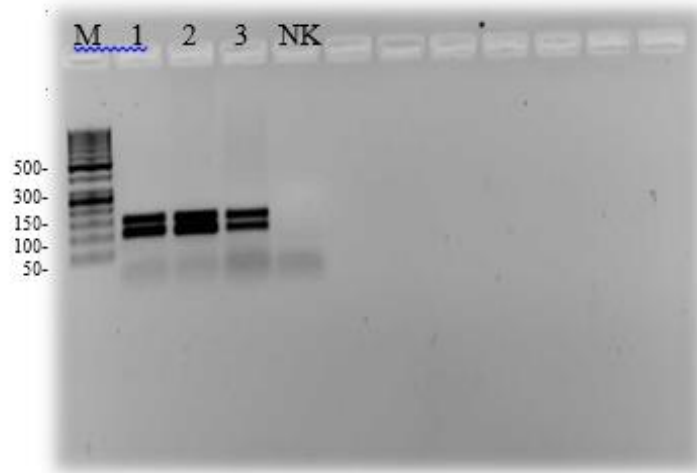
Şekil 33. Dışkı DNA örneklerinin GenoType® HelicoDR testi ile ilk denemesinin her iki hastaya ait antrum biyopsi örnekleri ile amplifikasyon sonrası PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü (M: Gene Ruler 50 bp DNA Ladder, 1 ve 3: Dışkı DNA örnekleri, 2 ve 4: antrum DNA örnekleri, NK: Negatif kontrol)

Daha sonra dışkı DNA örnekleri, PCR karışımı sabit tutularak doku DNA'lar ile ayrı bir termocycler cihazında PCR döngüsü beş döngü artırılıp 35 döngü olacak şekilde amplifiye edildi. Bunun sonucunda dışkı DNA örnekleri ile istenilen bölgelerde silik bantlar elde edildi (Şekil 34).



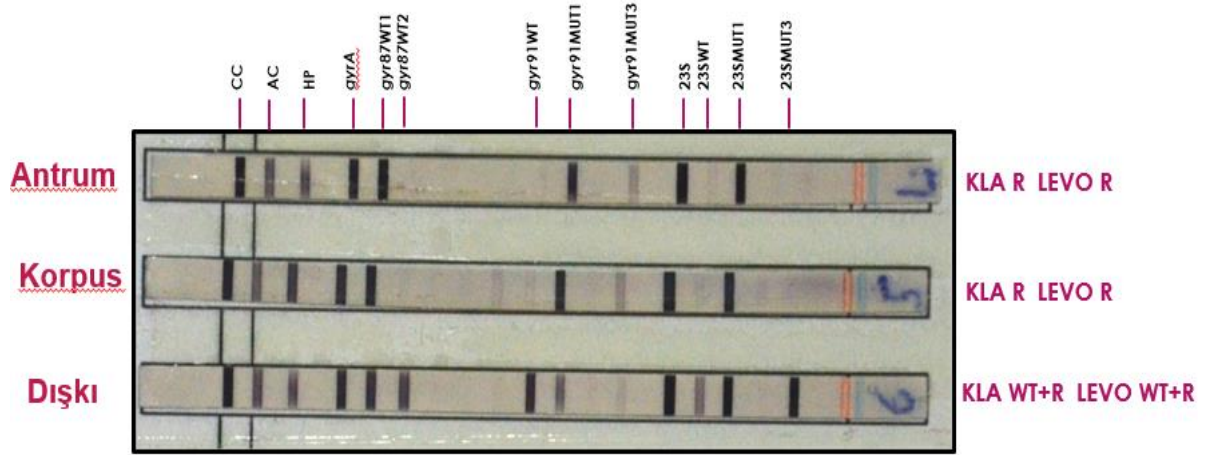
Şekil 34. Dışkı DNA örneklerinin GenoType® HelicoDR testi ile optimizasyon denemesinde elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü (M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, 1 ve 10: Dışkı DNA örnekleri, 2-9,11: Doku DNA örnekleri, NK:Negatif kontrol)

Dışkı DNA örnekleri ile daha kuvvetli bantların elde edilebilmesi için PCR döngüsü 30 döngü olacak şekilde sabit tutuldu fakat PCR karışımı içerisindeki 3 µl su yerine dışkı DNA örneği konularak toplamda 8 µl dışkı DNA örneği PCR karışımına eklendi. Aynı hastanın antrum, korpus ve dışkı DNA örnekleri birlikte çalışıldı. Bunun sonucunda jelde en az doku örnekleri kadar belirgin bantlar elde edildi (Şekil 35).

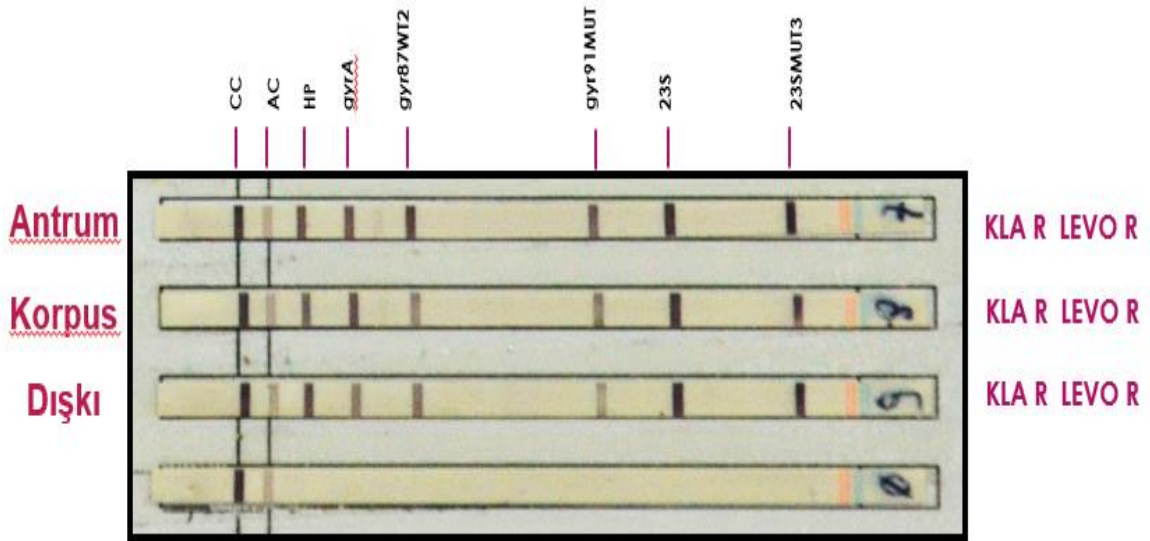


Şekil 35. *gyrA* ve 23S rRNA genlerinin GenoType® HelicoDR testi ile optimize amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü (M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, 1: Antrum DNA örneği 2: Korpus DNA örneği, 3: Dışkı DNA örneği, NK:Negatif kontrol)

PCR aşamasının optimizasyonu sonrasında hibridizasyon basamağına geçildi ve dışkı örneklerinde en az doku örnekleri kadar güçlü hibridizasyon bantları elde edildi (Şekil 36-37).



Şekil 36. Aynı hastanın hibridizasyon sonrası antrum, korpus biyopsi ve dışkı DNA örneklerine ait GenoType® HelicoDR testi strip görüntüleri. (Antrum ve korpus: klaritromisin ve levofloksasin dirençli, dışkı örneği: klaritromisin ve levofloksasin hem wild type hem de direnç paterni, aynı zamanda 87. kodonda iki farklı wild type paterni saptandığı için miks enfeksiyon) (4: Antrum biyopsi örneği, 5: Korpus biyopsi örneği 6: Dışkı örneği. AC: Amplifikasyon kontrolü, CC: Konjugat kontrolü)



Şekil 37. Aynı hastaya ait antrum, korpus biyopsi ve dışkı örneklerine ait strip görüntüleri. (Antrum-korpus biyopsi ve dışkı örneği: klaritromisin ve levofloksasin dirençli (7: Antrum biyopsi örneği, 8: Korpus biyopsi örneği 9: Dışkı örneği. AC: Amplifikasyon kontrolü, CC: Konjugat kontrolü)

Üç hastanın dışkı örneği elde edilemediğinden dolayı optimizasyon sonrası 55 hastanın dışkı DNA örneğine GenoType® HelicoDR testi uygulandı.

4.8.3.1. *Helicobacter pylori* Pozitifliği

Elli beş hastanın yalnızca biri dışkı GenoType® HelicoDR testi ile *H. pylori* negatif saptandı, diğer 54 hasta *H. pylori* pozitif saptandı.

4.8.3.2. *Helicobacter pylori* Klaritromisin Duyarlılığı

Dışkı GenoType® HelicoDR testi ile *H. pylori* pozitif saptanan 54 hastanın 24 (%44.4)'ü klaritromisin duyarlı, 30 (%55.6)'u klaritromisin dirençli saptandı. Dışkı GenoType® HelicoDR testi ile klaritromisin dirençli saptanan 30 hastanın 23S rRNA genotip dağılımı Tablo 12'de gösterilmektedir.

Tablo 12. Dışkı GenoType® HelicoDR ile saptanan mutant suşların 23S rRNA profilleri

Dışkı GenoType® HelicoDR ile saptanan mutant 23S rRNA profilleri	Dışkı Örneği (n)
A2146G	1
A2147G	2
WT + A2146G	1*
WT + A2147G	19*
WT + A2146G + A2147G	6*
A2146G + A2146C + A2147G	1**

* Hem wild type hem de mutant allelleri saptanan miks enfeksiyonlu hastalar

** Üç farklı mutant alleli saptanması nedeniyle miks enfeksiyonlu hasta

4.8.3.3. *Helicobacter pylori* Levofloksasin Duyarlılığı

Dışkı GenoType® HelicoDR ile 54 hastanın 39 (%72.2)'u levofloksasin duyarlı, 15 (%27.8)'i levofloksasin dirençli saptandı. Levofloksasin dirençli saptanan 15 hastanın *gyrA* genotip dağılımı Tablo 13'de gösterilmektedir.

Tablo 13. Dışkı GenoType® HelicoDR ile saptanan mutant suşların *gyrA* profilleri

Dışkı GenoType® HelicoDR ile saptanan mutant <i>gyrA</i> profilleri		Dışkı örneği (n)
Kodon 87	Kodon 91	
WT	D91G	4
WT	D91N	3
“No band”	WT	3
WT	WT + D91N	1*
WT	WT + D91G	2*
“No band”	WT + D91N	1*
WT	D91G + D91N	1**

* Hem wild type hem de mutant allelleri saptanan miks enfeksiyonlu hastalar

** İki farklı mutant allel saptanması nedeniyle miks enfeksiyonlu hasta

4.9. FRET-Real-time PCR Bulguları

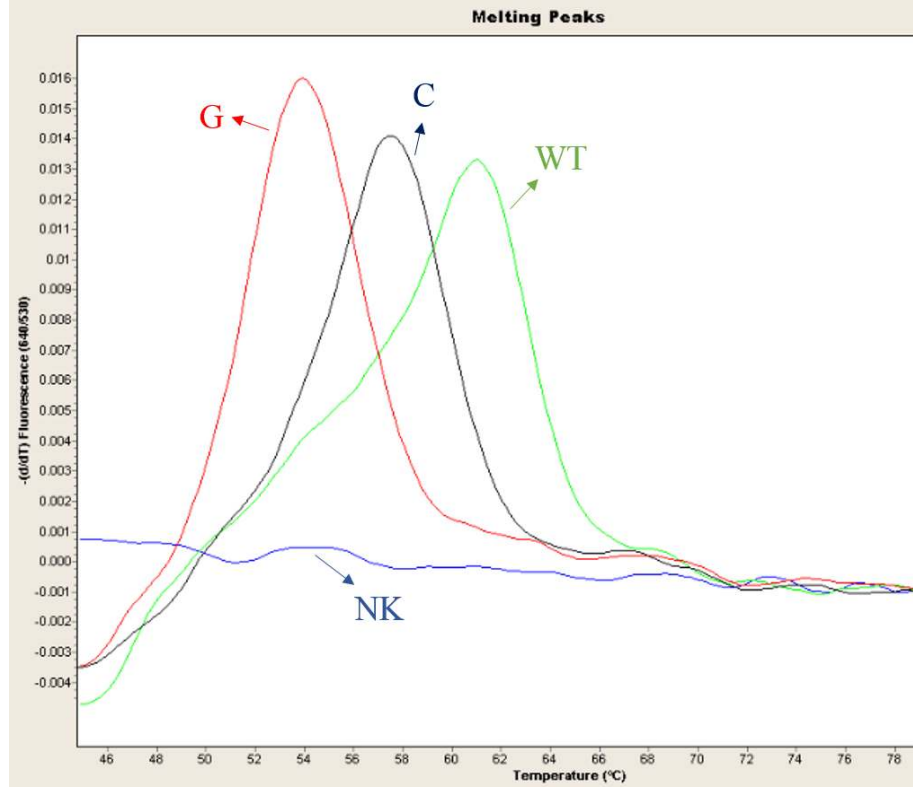
4.9.1. Biyopsi Örnekleri

4.9.1.1. *Helicobacter pylori* Pozitifliği

Elli sekiz hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin tümü FRET-real-time PCR ile *H. pylori* pozitif olarak saptandı.

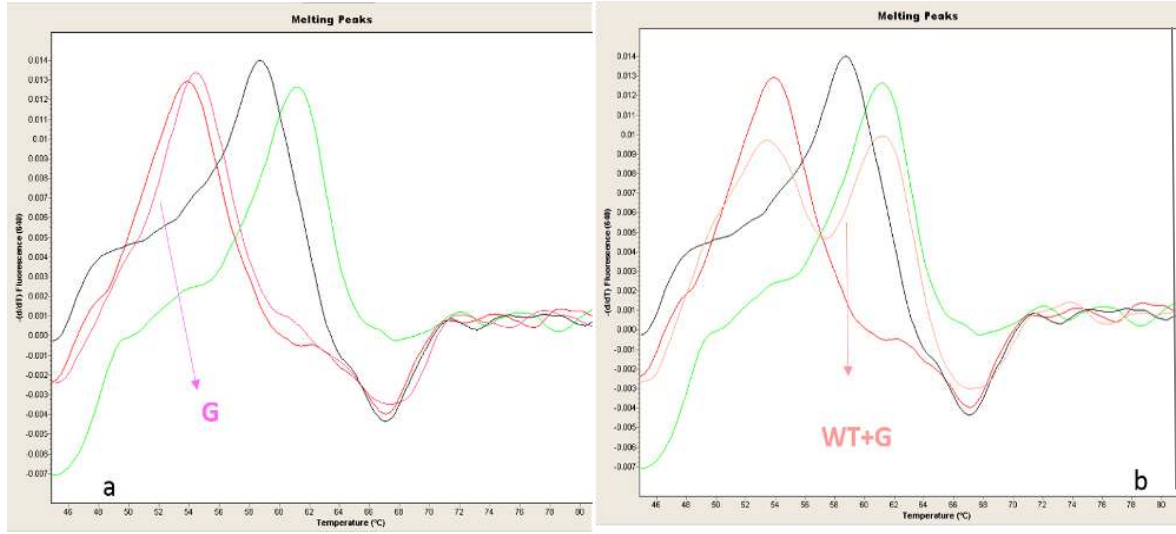
4.9.1.2. Klaritromisin Duyarlılığı

Gastrik biyopsi örneklerinden klaritromisin duyarlılığının analizi, “melting curve” analiz programı ile pozitif kontrollerin “melting” sıcaklıkları (T_m) kontrol edilerek wild-type, A→G dönüşüm (2143/2142 pozisyonları) ve A→C dönüşümü (2142 pozisyonu) T_m ’leri (sırasıyla yaklaşık 61.5, 53.0, 58.0 °C) göz önünde bulundurularak yapıldı (Şekil 38).



Şekil 38. FRET-real-time PCR yönteminde kullanılan kontroller (**G:** A→G dönüşüm (2143/2142 pozisyonları), T_m : 53.95 °C **C:** A→C dönüşümü (2142 pozisyonu) T_m : 57.63 °C **WT:** wild-type, T_m : 61.42 °C **NK:** Negatif kontrol)

Elli sekiz hastanın 46 (%79.3)'sı klaritromisin duyarlı, beş (%8.6)'i klaritromisin dirençli, yedi (%12.1)'si ise klaritromisin duyarlı ve dirençli genotip içeren miks enfeksiyon olarak saptandı. Elli sekiz hastanın antrum biyopsi örneğinin 46 (%79.3)'sında wild type, altı (%10.4)'sında A→G (2142/2143) mutasyonu, beş (%8.6)'inde hem wild type hem de mutant A→G genotipine sahip ikili polpulasyon (Şekil 39), bir (%1.7)'inde hem wild type hem de mutant A→C genotipine sahip ikili polpulasyon saptandı. Elli sekiz hastanın korpus biyopsi örneğinin 49 (%84.5)'unda wild type, beş (%8.6)'inde A→G (2142/2143) mutasyonu, dört (%6.9)'ünde hem wild type hem de mutant A→G genotipine sahip ikili polpulasyon saptandı.



Şekil 39. FRET-real-time PCR yöntemi ile gastrik biyopsi örneklerinin klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi (a- Antrum gastrik biyopsi örneğinde saptanan A→G (2142/2143) mutasyonu. b- Antrum gastrik biyopsi örneğinde saptanan hem wild type hem de mutant A→G genotipine sahip ikili polipulasyon)

Toplam 116 antrum ve korpus biyopsi örneğinin 21 (%18.1)'inde klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonu saptandı. Bu 21 nokta mutasyonunun 20 (%95.2)'si A→G (2142/2143) mutasyonu, bir (%4.8)'i A→C (A2142C) mutasyonu olarak saptandı (Tablo 14).

Tablo 14. Antrum ve korpus biyopsi DNA örneklerinde FRET-real-time PCR ile saptanan 23S rRNA profilleri

Örnek sayısı (n)	FRET-real-time PCR ile saptanan 23S rRNA profilleri
95	WT
11	A→G (2142/2143)
9	WT+G*
1	WT+C**

*Hem wild type hem de mutant A→G (2142/2143) genotipine sahip ikili populasyon

**Hem wild type hem de mutant A→C (2142) genotipine sahip ikili populasyon

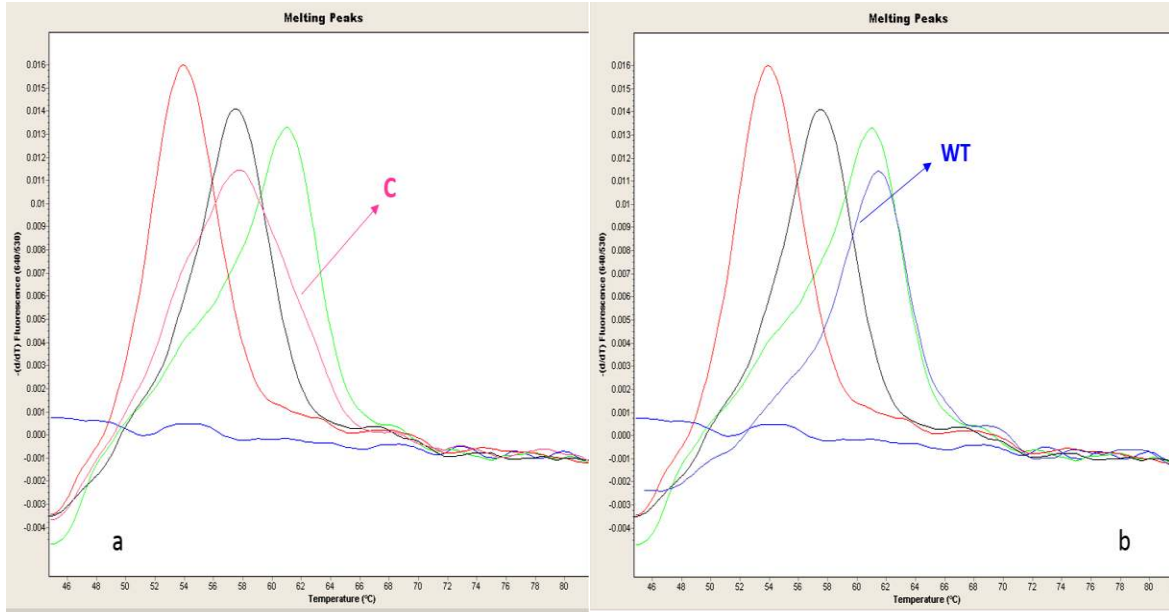
4.9.2. Dışkı Örnekleri

4.9.2.1. *Helicobacter pylori* Pozitifliği

Toplam 58 hastadan üç hastanın dışkı örneği elde edilemediği için 55 hastanın dışkı DNA'sı ekstrakte edildi. Dışkı FRET-real-time PCR ile 55 hastanın 49 (%89.1)'u *H. pylori* pozitif, altı (%10.9)'sı *H. pylori* negatif saptandı.

4.9.2.2. Klaritromisin Duyarlılığı

H. pylori pozitif saptanan 49 hastanın 39 (%79.6)'u klaritromisin duyarlı, iki (%4.1)'si dirençli, sekiz (%16.3)'i ise klaritromisin duyarlı ve dirençli genotip içeren miks enfeksiyon saptandı. Mutasyon saptanan 10 dışkı DNA örneğinin yedi (%70)'sinde A→G (2142/2143) mutasyonu, üç (%30)'ünde A→C (2142) mutasyonu saptandı (Tablo 15) (Şekil 40).



Şekil 40. FRET-real-time PCR yöntemi ile dışkı örneklerinin klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi (a- Dışkı örneğinde saptanan A→C (2142) mutasyonu. b- Dışkı örneğinde saptanan wild type genotipi)

Tablo 15. Dışkı DNA örneklerinde FRET-real-time PCR ile saptanan 23S rRNA profilleri

Örnek sayısı (n)	FRET-real-time PCR ile saptanan 23S rRNA profilleri
39	WT
2	A→C (2142)
7	WT+G*
1	WT+C**

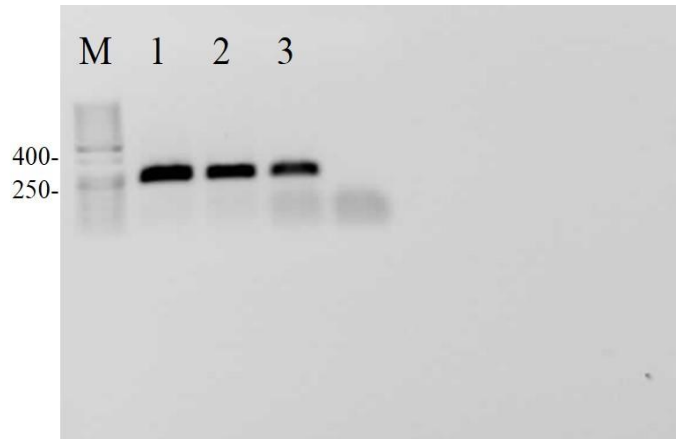
*Hem wild type hem de mutant A→G (2142/2143) genotipine sahip ikili populasyon

**Hem wild type hem de mutant A→C (2142) genotipine sahip ikili populasyon

4.10. 23S rRNA (*rrl*) ve *gyrA* PCR Bulguları

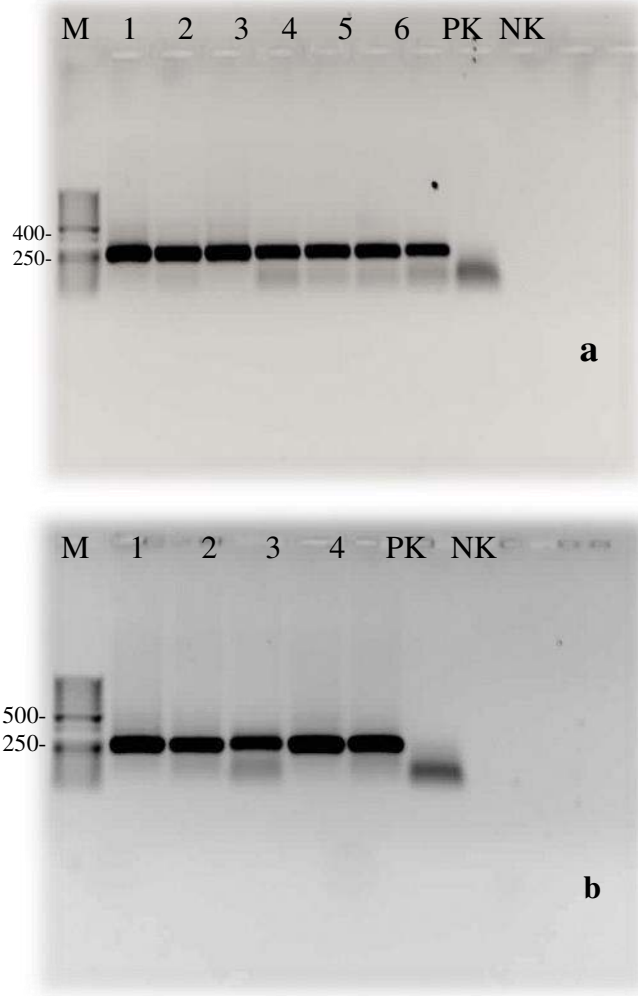
4.10.1. 23S rRNA (*rrl*) PCR

İlk olarak J99, NCTC 11637 ve 26695 *H. pylori* standart suşları ile 23S rRNA (*rrl*) PCR optimizasyon çalışması yapıldı (Şekil 41).



Şekil 41. *H. pylori* standart suşlarının *rrl* PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, *H. pylori* standart suşları NCTC 11637, J99, 26695)

Optimizasyon çalışmasından sonra hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarının DNA örnekleri ile antrum ve korpus gastrik biyopsi DNA örnekleri (Şekil 42) de çalışılarak %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Beklenen büyüklükte (267 bp) PCR ürünleri elde edildi ve pürifikasyonları yapılarak sekans analizine gönderildi.

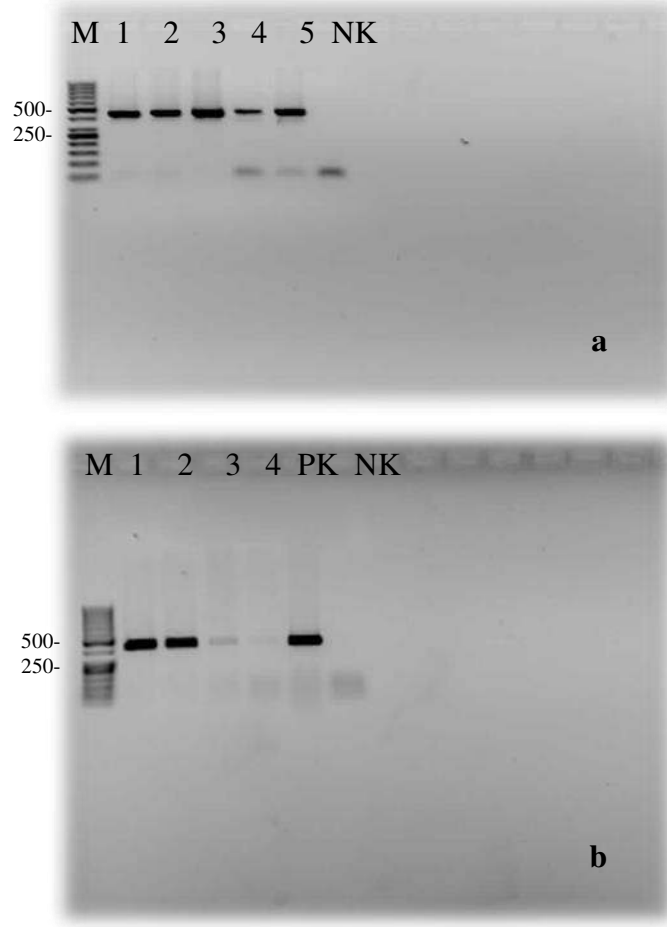


Şekil 42. *rrl* PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri (M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, **a**) 1-6: Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden izole edilen *H.pylori* suşları **b**) 1-4: Antrum ve korpus biyopsi örnekleri, PK: Pozitif kontrol NCTC 11637, NK:Negatif kontrol)

4.10.2. *gyrA* PCR

H. pylori NCTC 11637, J99 ve 26695 standart suşları ile *gyrA* PCR optimizasyon çalışması yapıldı (Şekil 43-a).

Hasta suşlarının DNA örnekleri ve gastrik biyopsi DNA örnekleri (Şekil 43) de çalışılarak %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Beklenen büyüklükte (428bp) PCR ürünleri elde edildi ve pürifikasyonları yapılarak sekans analizine gönderildi.



Şekil 43. *gyrA* PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri (M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder, **a**) 1-2: Hasta suşları 3,4,5: *H. pylori* standart suşları NCTC 11637, J99, 26695. **b**) 1-4: Biyopsi örnekleri; *H. pylori* “patchy” dağılım gösterdiği için biyopsi örneklerindeki silik bantlar, o örnekte daha az sayıda *H. pylori*’nin olduğu anlamındadır. PK: Pozitif kontrol (NCTC 11637) NK:Negatif kontrol)

4.11. Yöntem Karşılaştırmaları

4.11.1. Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması

4.11.1.1. Gastrik biyopsi örnekleri

GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin her ikisi ile de 58 hastanın tümü *H. pylori* pozitif saptandı. Levofloksasin duyarlılığı moleküler olarak sadece GenoType® HelicoDR ile belirlendiği için klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi açısından iki moleküler testin karşılaştırması Tablo 16’da özetlenmiştir.

Tablo 16. Biyopsi DNA örnekleri ile klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin karşılaştırılması

Hasta sayısı (n)	GenoType® HelicoDR	FRET-real-time PCR
36	S	S
5	R	R
6	WT+R	WT+R
10	WT+R	S
1	S	WT+R

S: Duyarlı, R: Dirençli, WT+R: Wild type ve dirence neden olan mutasyonun birlikte saptandığı ve dirençli değerlendirilen örnekler

4.11.1.2. Dışkı örnekleri

GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin her ikisi ile de 55 hastanın dışkı örneğinin 48 (%87.3)'i *H. pylori* pozitif saptandı. Altı (%10.9) hasta GenoType® HelicoDR ile *H. pylori* pozitif saptanırken FRET-real-time PCR ile negatif olarak saptandı. Bir (%1.8) hastada ise GenoType® HelicoDR ile *H. pylori* negatif, FRET-real-time PCR ile pozitif olarak saptandı.

Levofloksasin duyarlılığı moleküler olarak sadece GenoType® HelicoDR ile belirlendiği için klaritromisin duyarlılığının belirlenmesi açısından 48 hastada iki moleküler testin karşılaştırılması Tablo 17'de özetlenmiştir.

Tablo 17. Dışkı DNA örnekleri ile *H. pylori*'de klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin karşılaştırılması

Hasta sayısı (n)	GenoType® HelicoDR	FRET-real time PCR
23	S	S
1	R	R
7	WT+R	WT+R
13	WT+R	S
1	WT+R	R
1	S	WT+R
2	R	S

(S: Duyarlı, R: Dirençli, WT+R: Wild type ve dirence neden olan mutasyonun birlikte saptandığı ve dirençli değerlendirilen örnekler)

4.11.2. İnvaziv ve Non-invaziv Moleküler Yöntemlerin Bulguları

GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin her ikisi de biyopsi ve dışkı örnekleri ile çalışıldığı için çalışıldığı örneğe göre hem invaziv hem de non-invaziv yöntemlerdir.

FRET-real-time PCR yöntemi ile 55 hastanın dışkı örneğinin altı (%10.9) sı *H. pylori* negatif saptanırken bu 55 hastanın tümünün doku örneklerinde *H. pylori* pozitif saptandı. Klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde 49 hastanın gastrik biyopsi ve dışkı örneklerinin FRET-real-time PCR yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. FRET-real-time PCR metodu ile 49 hastanın hem biyopsi hem de dışkı DNA örneklerinde saptanan klaritromisin duyarlılığının karşılaştırılması

Biyopsi Dışkı	S	R	WT+R
S	33	3	3
R	1	1	-
WT+R	7	-	1

(S: Duyarlı, R: Dirençli, WT+R: Wild type ve dirence neden olan mutasyonun birlikte saptandığı ve dirençli değerlendirilen örnekler)

GenoType® HelicoDR yöntemi ile 55 dışkı örneği olan hastalardan biri (%1.8) *H. pylori* negatif saptanırken bu 55 hastanın tümünün doku örneklerinde *H. pylori* pozitif saptandı. Klaritromisin ve levofloksasin duyarlılıklarının GenoType® HelicoDR yöntemi ile belirlenmesinde 54 hastanın karşılaştırılması Tablo 19 ve 20’de gösterilmektedir.

Tablo 19. GenoType® HelicoDR yöntemi ile hem biyopsi hem de dışkı DNA örneklerinde *H. pylori* pozitif saptanan 54 hastanın klaritromisin duyarlılığı sonuçlarının karşılaştırılması

Biyopsi Dışkı	S	R	WT+R
S	19	2	3
R	-	3	1
WT+R	16	-	10

(S: Duyarlı, R: Dirençli, WT+R: Wild type ve dirence neden olan mutasyonun birlikte saptandığı ve dirençli değerlendirilen örnekler)

Tablo 20. GenoType® HelicoDR yöntemi ile hem biyopsi hem de dışkı DNA örneklerinde *H. pylori* pozitif saptanan 54 hastanın levofloksasin duyarlılığı sonuçlarının karşılaştırılması

Biyopsi Dışkı	S	R	WT+R
S	27	4	8
R	2	7	2
WT+R	3	-	1

(S: Duyarlı, R: Dirençli, WT+R: Wild type ve dirence neden olan mutasyonun birlikte saptandığı ve dirençli değerlendirilen örnekler)

4.11.3. Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Fenotipik bir yöntem olan kültür ve moleküler yöntemler GenoType® HelicoDR ve FRET-Real-time PCR'ın üçü birlikte değerlendirildiğinde 58 hastanın 49 (%84.5)'u *H. pylori* pozitif saptandı. Dokuz (%15.5) hasta ise kültür negatif iken moleküler yöntemlerin her ikisi ile de pozitif saptandı. Klaritromisin duyarlılığı açısından 49 hastada fenotipik yöntemlerden E-test ve her iki moleküler yöntem GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR'ın karşılaştırması Tablo 21'de gösterilmiştir. E-test yöntemi ile miks enfeksiyonlar saptanamadığı için sadece duyarlılık ya da direnç karşılaştırılmıştır.

Tablo 21. *H. pylori* pozitif 49 hastanın E-test, GenoType® HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin klaritromisin duyarlılığının karşılaştırılması

E-test	GenoType® HelicoDR	FRET-real-time PCR	Hasta sayısı (n)
S	S	S	25
R	R	R	5
R	S	S	9
S	R	S	6
S	R	R	3
S	S	R	1

(S: Duyarlı, R: Dirençli, WT+R: Wild type ve dirence neden olan mutasyonun birlikte saptandığı ve dirençli değerlendirilen örnekler)

Levofloksasin duyarlılığı için GenoType® HelicoDR ve E-test yöntemleri karşılaştırıldı. Kültür pozitif 49 hastanın 25 (%51.0) 'i her iki yöntem ile de levofloksasin duyarlı, dokuz (%18.4) 'u dirençli saptandı (Tablo 22). On beş (%30.6) hastanın levofloksasin duyarlılığı ise uyumsuz saptandı.

Tablo 22. *H. pylori* pozitif 49 hastanın E-test ve GenoType® HelicoDR yöntemleri ile levofloksasin duyarlılığının karşılaştırılması

E-test	GenoType® HelicoDR	Hasta sayısı (n)
S	S	25
R	R	9
S	WT+R	5
S	R	5
R	S	5

(S: Duyarlı, R: Dirençli, WT+R: Wild type ve dirence neden olan mutasyonun birlikte saptandığı ve dirençli değerlendirilen örnekler)

4.12. Sekans Analizi Sonuçları

4.12.1. 23S rRNA (*rrl*)

Moleküler testler arasında uyumsuz sonucu olan ya da E-test yöntemi ile uyumsuz sonuç saptanan 17 korpus DNA örneği, 16 antrum DNA örneği toplam 33 doku DNA örneğinin 23S rRNA PCR'ı yapılarak, PCR ürünleri pürifiye edilip sekans analizi için

Macrogen firmasına gönderildi. Üç korpus doku DNA örneğinin sekans analizi forward ve/veya reverse primer ile gerçekleştirilen sekans reaksiyonlarında düşük sinyal dizileri ya da multiple pikler olduğu için yapılamadı.

Otuz doku DNA örneğinin sekans analizi ile 23 (%76.7) 'ü WT saptanırken, üç (%10)'ünde A2142G, üç (%10)'ünde A2143G ve bir (%3.3)'inde A2142C mutasyonu saptandı.

Otuz doku örneğinin sekans analizi sonuçları, FRET-real-time PCR ve GenoType® HelicoDR sonuçları ile karşılaştırıldı. Yirmi beş (%83.3) doku (antrum ve/veya korpus) biyopsi örneğinin sekans analizi ve FRET-real-time PCR sonucu tamamen uyumlu saptandı. Dört (%13.3) örnekte FRET-real-time PCR ile wild type ve mutasyon (WT+R) saptanırken, bu dört örneğin sekans analizi ile ikisinde G (birinde A2142G, diğerinde A2143G) mutasyonu, diğer ikisinde ise WT sonucu saptandı. 23S rRNA sekans analizi ve FRET-real-time PCR ile klaritromisin duyarlılık sonuçları uyumsuz saptanan bir örnek ise FRET-real-time PCR ile wild type olarak saptanırken, sekans analizi ile A2142C mutasyonu saptandı (Tablo 23).

Tablo 23. Antrum ve/veya korpus biyopsi DNA örneklerinin 23S rRNA sekans analizi ve FRET-real-time PCR ile klaritromisin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Sekans analizi	FRET-real-time PCR	Örnek sayısı (n)
WT	WT	21
A2142G	G	2
A2143G	G	2
A2142G	WT+G	1
A2143G	WT+G	1
WT	WT+G	1
WT	WT+C	1
A2142C	WT	1

GenoType® HelicoDR testi sonucu ile 30 antrum ve/veya korpus biyopsi örneğinin 15 (%50)'i örneğin sekans analizi sonucu tamamen uyumlu saptandı. On dört (%46.7) örnekte ise GenoType® HelicoDR metodu ile saptanan wild type ve mutasyon (WT+R) sonucundan birisi sekans analizi ile uyumlu saptandı. Bir (%3.3) örnek ise GenoType® HelicoDR metodu

ile wild type ve A2147G olarak saptanırken, sekans analizi ile A2142C mutasyonu saptandı (Tablo 24).

Tablo 24. Antrum ve/veya korpus biyopsi DNA örneklerinin 23S rRNA sekans analizi ve GenoType® HelicoDR metodu ile klaritromisin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Sekans analizi	GenoType® HelicoDR	Örnek sayısı (n)
WT	WT	11
A2143G	A2147G	2
A2142G	A2146G	1
WT	WT+A2147G	12
A2143G	WT+A2147G	1
A2142G	WT+A2146GG	1
A2142G	A2146G+A2147G	1
A2142C	WT+A2147G	1

Moleküler testler ile E-test yöntemi sonucunun farklı olduğu ya da moleküler testlerin sonuçlarının uyumsuz olduğu 32 hasta suşundan izole edilen koloni DNA örneğinin (15 antrum, 15 korpus ve iki hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinden izole edilen kolonilerin miks (daha önceden antrum ve korpusta üreyen koloniler birleştirilip DNA izolasyonu yapılmış olan) *H. pylori* koloni DNA örneği 23S rRNA PCR ürünlerinin sekans analizi sonucunda 18 (%56.4) örnek WT, altı (%18.8)örnekte A2143G mutasyonu, iki (%6.2) örnekte A2142G mutasyonu saptandı. Bir hastanın antrum ve korpus biyopsilerinden izole edilen *H. pylori* suşlarından ekstrakte edilen iki (%6.2) DNA örneğinde C2310A, diğer bir hastanın antrum ve korpus biyopsi örneğinden izole edilen *H. pylori* suşlarından ekstrakte edilen iki (%6.2) DNA örneğinde C2136T, başka bir hastanın antrum ve korpus biyopsi örneğinden izole edilen *H. pylori* suşlarından ekstrakte edilen iki (%6.2) DNA örneğinde ise C2428T olmak üzere üç yeni mutasyon saptandı (Şekil 44). Bu altı örnekte klaritromisin direncine neden olduğu bilinen bölgelerde (2142/2143) mutasyon saptanmadı. Bu altı örneğin tümü hem FRET-Real-time PCR hem de GenoType® HelicoDR ile klaritromisin duyarlı olarak saptanırken, E-test yöntemi ile dirençli saptandı.

23S rRNA geni sekans analizi yapılan 32 hasta suşundan izole edilen koloni DNA örneğinden 17 (%53.1) örneğin E-test sonucu sekans sonucu ile uyumlu saptandı; klaritromisin direncine neden olduğu bilinen üç nokta mutasyonundan birisi saptandığında E-test dirençli, saptanmadığında E-test duyarlı saptandı. Sekans analizi ile yeni mutasyon saptanan altı (%18.8) örnek ise E-test ile klaritromisin dirençli saptandı. Dokuz (%28.1) örneğin sekans analizi sonuçları ile E-test sonuçları uyumsuz saptandı; altı örnek sekans analizi ile WT, E-test ile klaritromisin dirençli saptanırken, üç örnekte sekans analizi ile A2143G mutasyonu, E-test ile klaritromisin duyarlı saptandı. Bu dokuz örneğin sekans sonucu diğer tüm moleküler testler ve izole edildikleri doku DNA'ların sekans analizleri ile uyumlu saptandı.

2101 C2136T 2200
gi | 1564463 GAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGC
23S-Y124-1 GAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGTGGCAAGACGGAAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGC
23S-Y124-2 GAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGTGGCAAGACGGAAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGC
Consensus GAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGC

2301 C2310A 2400
gi | 1564463 ATCCACAGGCAGGACAATGCTTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAAAGTAACGGAGGCTTGCAAAGGTTGGCTCATTGCGGTTGGAAA
23S-Y73-1 ATCCACAGGAAGGACAATGCTTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAAAGTAACGGAGGCTTGCAAAGGTTGGCTCATTGCGGTTGGAAA
23S-Y73-2 ATCCACAGGAAGGACAATGCTTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAAAGTAACGGAGGCTTGCAAAGGTTGGCTCATTGCGGTTGGAAA
Consensus ATCCACAGGCAGGACAATGCTTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAAAGTAACGGAGGCTTGCAAAGGTTGGCTCATTGCGGTTGGAAA

2401 C2428T 2500
gi | 1564463 TCGCAAGTTGAGTGTAATGGCACAAGCCAGCCTGACTGTAAGACATACAAGTCAAGCAGAGACGAAAGTCGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGGA
23S-Y109-2 TCGCAAGTTGAGTGTAATGGCACAAGCTAGCCTGACTGTAAGACATACAAGTCAAGCAGAGACGAAAGTCGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGGA
23S-Y109-1 TCGCAAGTTGAGTGTAATGGCACAAGCTAGCCTGACTGTAAGACATACAAGTCAAGCAGAGACGAAAGTCGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGGA
Consensus TCGCAAGTTGAGTGTAATGGCACAAGCCAGCCTGACTGTAAGACATACAAGTCAAGCAGAGACGAAAGTCGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGG

Şekil 44. Aynı hastaya ait antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* koloni DNA örneklerinde 23S rRNA PCR ürünlerinin sekans analizi sonucunda saptanan üç farklı hastadaki üç yeni mutasyon (C2136T, C2310A, C2428T)

4.12.2. *gyrA*

GenoType® HelicoDR ve E-test yöntemi ile uyumsuz sonuç saptanan 10 antrum, 12 korpus toplam 22 doku DNA örneğinin *gyrA* PCR'ı yapılarak, PCR ürünleri pürifiye edilip sekans analizi için gönderildi. İki antrum doku DNA örneğinin forward primer ile gerçekleştirilen sekans reaksiyonlarında multiple pikler olduğu için sekans analizi yapılamadı.

Yirmi doku DNA örneğinin altısında (%30) N87K mutasyonu, üç (%15)'ünde N87I mutasyonu saptandı. On bir (%55) örneğin ise 87. kodonu WT saptandı. 91. kodonda iki örnekte (%10) D91G mutasyonu, bir (%5) örnekte D91Y mutasyonu, bir (%5) örnekte D91N mutasyonu saptandı. On altı (%80) örneğin 91. kodonu WT saptandı. Florokinolon direncini belirlemek için iki kodon birlikte değerlendirildiğinde 20 örneğin profili Tablo 25'de gösterilmiştir. Ayrıca, *gyrA* geninde levofloksasin direncine neden olan mutasyonların sekans analizi sonuçlarına ait örnekler Şekil 45'de gösterilmektedir.

Tablo 25. Gastrik biyopsi DNA örneklerinin *gyrA* sekans analiz sonuçları

Kodon 87	Kodon 91	Biyopsi örneği sayısı (n)
WT	WT	8
N87K	WT	5
N87I	WT	3
WT	D91G	2
N87K	D91Y	1
WT	D91N	1

Yirmi gastrik biyopsi DNA örneğinin sekans analizi sonuçları, GenoType® HelicoDR sonuçları ile karşılaştırıldı. On iki (%60) örneğin sekans analizi ve GenoType® HelicoDR sonucu tamamen uyumlu saptandı. Üç (%15) örnekte GenoType® HelicoDR testinde “noband” olarak isimlendirilen mutasyon, sekans analizi ile N87I mutasyonu saptandı. Diğer üç (%15) örnekte ise hem 87. hem de 91. pozisyonda GenoType® HelicoDR testi ile saptanan wild type ve mutasyon (WT+R) sonucundan birisi sekans analizi ile uyumlu saptandı.

Uyumsuz iki (%10) örnekten birinde GenoType® HelicoDR testi ile 87. pozisyon wild type, 91. pozisyon WT+D91Y saptanırken sekans analizi ile 87. pozisyonda N87K, 91. pozisyonda D91Y mutasyonu saptandı.

Moleküler testler ile E-test yöntemi sonucunun uyumsuz olduğu 21 hastadan izole edilen *H. pylori* suşlarının (dokuz antrum, 11 korpus ve bir hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinden izole edilen kolonilerin miks *H. pylori* DNA örneği) DNA örneklerinin altısında (%28.6) N87K, üçünde (%14.3) N87I mutasyonu saptandı. Oniki (%57.1) *H. pylori* suşunun 87. kodonu WT saptandı. 91. kodonda ise, iki (%9.5) *H. pylori* suşunda D91G mutasyonu saptandı. On dokuz (%90.5) *H. pylori* suşunun 91. kodonu WT saptandı. Florokinolon direncini belirlemek için iki kodon birlikte değerlendirildiğinde 21 *H. pylori* suşunun profili Tablo 26’da gösterilmektedir.

Tablo 26. *H. pylori* suşlarının *gyrA* sekans analiz sonuçları

Kodon 87	Kodon 91	<i>H. pylori</i> suş sayısı (n)
WT	WT	10
N87K	WT	6
N87I	WT	3
WT	D91G	2

	70	80	90	100	110	120
gi 409893860	LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDN					
GYRA-1	LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGD	I	AVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDN			
GYRA-2	LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVY	G	ALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDN			
GYRA-3	LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGD	K	AVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDN			
GYRA-4	LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGD	K	AVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDN			
GYRA-5	LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVY	N	ALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDN			
Prim.cons.	LTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDN					

Şekil 45. *gyrA* geninde levofloksasin direncine neden olan mutasyonların sekans analizi sonuçlarına örnekler. gi|409893860 numaralı “DNA gyrase subunitA *H. pylori* 26695” referans dizisi, (1): N87I mutasyonu, (2): D91G mutasyonu, (3): N87K mutasyonu, (4): N87K ve D91Y mutasyonları, (5): D91N mutasyonu

5. TARTIŞMA

Klaritromisin ve levofloksasinin *H. pylori* enfeksiyonu tedavisi için efektif ilaçlar olması ve bu ilaçlara direncin eradikasyon başarısızlığı ile ilişkilendirilmesinden bu yana klaritromisin ve levofloksasin direncinin saptanmasının hedeflendiği bildirilmiştir (36). Antibiyotik direnci, *H. pylori* enfeksiyonu tekrarının ve eradikasyon tedavisindeki başarısızlığın temel nedeni olduğu bildirilmiştir (15,17,188). Son yıllarda direnç oranının artması *H. pylori*'de antimikrobiyal ajanlara direncin önemini arttırdığı bildirilmiştir (189). Artan klaritromisin ve levofloksasin direnç oranlarının klaritromisin ve levofloksasinin sadece *H. pylori* eradikasyonu için değil, solunum yolu enfeksiyonları için de artan kullanım oranı ile paralel olduğu düşünülmektedir (3,190).

Antibiyotik direnç oranları tüm dünyada artmakta olup gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir (15). Bakteriyal direncin prevalansı farklı coğrafik bölgelerde değişiklik gösterir ve o bölgedeki genel nüfusun antibiyotik tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (17). De Francesco ve arkadaşlarının dünya genelindeki *H. pylori* primer antibiyotik direnç oranları ile ilgili sistematik derlemesinde klaritromisin direncini, Amerika'da %29.9, Asya'da %18.9, Avrupa'da %11.1'dir. Levofloksasin direncini ise; Asya'da %11.6, Avrupa'da %24.1 bildirmişlerdir (17).

Birçok bakteride antibiyotik direnç mekanizmaları plazmidler, transpozonlar ya da integronlar üzerinde bulunmaktadır fakat *H. pylori*'de çoğunlukla bakteriyal kromozomdaki nokta mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir. *H. pylori*'de antibiyotik direnci “de novo” gelişmektedir, bununla birlikte duyarlı ve dirençli suşlar arasında doğal transformasyon aracılığıyla horizontal gen transferi de olmaktadır (18).

Aynı direnç mekanizması görüldüğü için her antibiyotik ailesinde çapraz direnç olduğu bildirilmiştir: klaritromisine direnç tüm makrolidlere direnci belirtmektedir, levofloksasine direnç tüm florokinolonlara direnci belirtmektedir. Farklı direnç mekanizmaları olan farklı antibiyotik aileleri arasında çapraz direnç bulunmamaktadır (127).

H. pylori'ye karşı etkili olduğu gösterilen farklı antibiyotikler (klaritromisin, amoksisilin, metronidazol, tetrasiklin ve florokinolonlar) bulunmaktadır, bir antisekretuar ajan/bizmut eklenmesi ile geliştirilen tedavi protokolleri etkinlik ve tolere edilebilirliği açısından dozaj, tedavi süresi gibi çeşitli faktörler ile en iyi sonuç elde edilebilmesi için uygun hale getirilmiştir. Optimal empirik tedavinin belirlenmesi için hala daha çalışmalar devam etmektedir (191). *H. pylori*, *in vitro* koşullarda çoğu antibiyotiğe duyarlıdır fakat *in vivo*

koşullarda çoğu antibiyotiğin *H. pylori* ile enfekte hastaları tedavi edemeyeceği bildirilmiştir (20,192). Çeşitli faktörler *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunu zorlu kılmaktadır: i- antibiyotiklere karşı *H. pylori* tarafından edinilmiş direnç gelişimi (20,24,191), ii- çok sayıda bakterinin oluşturduğu inokulum etkisi (198), iii- kalın gastrik mukus tabakasının koruyucu etkisi ve antibiyotiklerin gastrik mukus tabakasına penetre olamaması (20,24,191), iv- birçok bakterinin intrasellüler lokasyonu, v- multiple suş enfeksiyonunun olması (198), vi- antibiyotiklerin düşük mide pH'ında inaktive olması ve *H. pylori*'nin yavaş üreme oranı ile ilişkilendirilmektedir (20,24). Ayrıca, tedaviye uyum, 60 yaşın altında olmak, PPI metabolizmasını etkileyen CYP 2C19 polimorfizmleri, sigara kullanımı ve artan vücut kütle indeksi gibi hastalara özgün faktörlerin de *H. pylori* eradikasyonunu olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (191).

Klaritromisin direncinin %15-20'den düşük olduğu bölgelerde ilk seçenek tedavi olarak klaritromisin, amoksisilin, metronidazol ve PPI'dan oluşan standart üçlü tedavi, klaritromisin direncinin %15-20'den yüksek olduğu bölgelerde bizmut içeren dördümlü tedavi ilk seçenek tedavi olarak önerilmektedir (15,17,127,197). İlk seçenek tedavi başarısızlığında artan levofloksasin direnç oranları göz önünde bulundurularak klaritromisin direncinin düşük ve yüksek olduğu her iki bölgede de levofloksasin içeren üçlü tedavi önerilmektedir. İkinci seçenek tedavinin başarısızlığında ise tedavi protokolü antimikrobiyal duyarlılık testlerine göre belirlenmesi gerektiği bildirilmiştir (5,127). Son yayınlanan Maastricht IV konsensus raporunda klaritromisin direncinin yüksek olduğu bölgelerde eğer standart klaritromisin içeren üçlü tedavi düşünülüyorsa ilk seçenek tedavi uygulanmadan önce kültür ve antimikrobiyal ajanlar için standart duyarlılık testinin uygulanmasının önemli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca tüm bölgelerde eğer başka bir nedenden dolayı endoskopi yapılacaksa ikinci seçenek tedaviden önce ve ikinci seçenek tedavide eradikasyon başarısızlığında her bölge ve her durumda kültür ve duyarlılık testlerinin uygulanması gerektiği vurgulanmıştır. Eğer standart antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılamıyorsa *H. pylori*'yi ve klaritromisin ve/veya florokinolon direncini direkt gastrik biyopsi örneklerinde saptamak için son dönemlerde geliştirilen moleküler testlerin ve ticari olarak elde edilebilen kitlerin uygulanabileceği bildirilmiştir. Önerilen ticari kit ve moleküler testlerden ikisi bizim çalışmamızda yer alan GenoType HelicoDR ve FRET-real-time PCR'dır. Florokinolon moleküler testlerinin doğruluğunun klaritromisin için olduğu kadar güvenilir olmadığının dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (127).

H. pylori tanısında kültürün altın standart yöntem kabul edilmesine ve özgüllüğünün %100 olmasına rağmen narin ve yavaş üreyen bir bakteri olmasından dolayı, birçok klinik laboratuvarın moleküler tanı testlerine yöneldiği bildirilmiştir (43). *H. pylori* enfeksiyonunun saptanması için mevcut birçok tanısal testin her birinin avantaj ve dezavantajları olduğu, düşük duyarlılık ya da özgüllükleri nedeniyle hiç birinin tek başına altın standart olarak kabul edilemeyeceği bildirilmiştir. *H. pylori* tanısında genellikle birden fazla testin kombinasyonunun oldukça güvenilir olduğu bildirilmiştir (186,193). Bu duruma çözüm olarak iki veya daha fazla test sonucunun birleştirilmesi ve değerlendirilen her bir sonucun karşılaştırılması önerilmiştir. Bununla birlikte moleküler yöntemler çapraz kontaminasyondan ya da ölü bakterilerin DNA'sının saptanmasından kaynaklanan yalancı pozitif sonuç ihtimalini arttırabileceği bildirilmiştir. Kültürün daha düşük pozitiflik oranının, az sayıda bakterinin olması ve kültüre edilemeyen kokoid formların ("non culturable coccoid forms") varlığı, transport sırasında bakterinin canlılığını kaybedebilmesi, yavaş üreyen bakterilerin üreme gereksinimleri, *H. pylori*'nin üremesini baskılayan diğer bakteriler ile kontaminasyon ya da antibiyotik kullanımından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (193). Günümüzde *H. pylori*'nin biyopsi örneklerinde saptanmasının histoloji, HÜT, kültür ve PCR testlerine dayandığı bildirilmiştir (193,194).

Çeşitli çalışmalar antibiyotiklere karşı *H. pylori* duyarlılığına dayanan tedavilerin ("tailored"), standart empirik tedaviye göre daha iyi bir eradikasyon oranı gösterdiği ve daha ucuz maliyetli olabileceği bildirilmiştir (2,195). Tedavi öncesi *H. pylori* antimikrobiyal direncinin ve eradikasyon başarısızlığından sorumlu mutasyonların saptanması için hızlı ve uygun bir metodun artan tedavi başarısızlıklarının üstesinden gelmek için iyi bir destek olabileceği bildirilmiştir (143). *H. pylori* eradikasyon tedavi başarısı antibiyotik direncinin tedavi öncesinde tanımlanması ile yakından ilişkili olduğundan ve duyarlılık testlerinin bakterinin yavaş üremesi nedeniyle ender uygulanmasından dolayı *H. pylori*'de antibiyotik direncini hızlı saptayan yeni bir moleküler yöntem geliştirilmiştir (36). Ticari olarak elde edilebilen GenoType HelicoDR, (Hain LifeScience, Nehren, Germany) multipleks PCR temelli olup DNA strip hibridizasyonu ile birleştirilmiş ilk moleküler testtir ve aynı zamanda florokinolon direnci ile ilişkili *gyrA* genindeki mutasyonları ve eş zamanlı olarak 23S rRNA mutasyonlarını saptamada kullanılan ilk testtir. Aynı gastrik biyopsi örneğindeki farklı genotipler saptanabilir (36,43) Kolay ve hızlı bir yöntem olması rutin uygulamalarda kullanılabilirliğini düşündürmektedir.

Tüm DNA temelli testlerde olduğu gibi GenoType HelicoDR aminoasit sekansını değil, sadece nükleik asit sekansını taramaktadır. Bu nedenle, bir aminoasit değişimine neden olmayan mutasyonlar (“silence” mutasyon), wild type problemlerinden birinin olmamasına neden olabileceği bildirilmiştir. GenoTypeHelicoDR testi sadece, direnci *gyrA* ve 23S gen bölgelerinde orjinlenen *H. pylori* suşlarının direncini saptayabilir. Diğer genler ya da gen bölgelerindeki mutasyonlardan ve diğer florokinolon ve klaritromisin direnç mekanizmalarından kaynaklanan direncin bu test ile saptanamadığı bildirilmiştir. Ayrıca, bu test primer ve problemlerin seçildiği genomik bölgelerdeki sekans varyasyonuna dayanır. Bakteriyal genomların yüksek varyasyonu nedeniyle bazı sub-tipleri saptanamayabileceği bildirilmiştir (130).

GenoType HelicoDR testinde, testin doğru uygulanıp uygulanmadığı ya da hangi basamakta hata yapıldığının anlaşılması amplifikasyon ve konjugat kontrollerinin ayrı ayrı her bir stripte olması sayesinde ve böylece her reaksiyonda pozitif kontrol kullanma zorunluluğunu ortadan kaldırarak büyük bir avantaj sağladığı düşünülmüştür.

H. pylori antimikrobiyal duyarlılık testleri için agar dilüsyon metodu CLSI tarafından önerilen altın standart yöntemdir (178). Fakat teknik olarak zahmetli ve zaman alıcı bir yöntemdir. Duyarlılık testleri için diğer iki seçenek E-test ve disk difüzyon yöntemleridir. Avrupa’da yapılan çok merkezli çalışmada E-test ve agar dilüsyon yöntemleri arasındaki uyumun çok iyi olduğu bildirilmiştir (196). McNulty ve PHLS *Helicobacter* çalışma grubunun yapmış olduğu bir çalışmada çoğunlukla kabul edilmiş bir duyarlılık ortamının kullanılmasının gerektiği vurgulanmıştır. %5-10 koyun ya da at kanlı Mueller-Hinton agar (8); Avrupa *Helicobacter* çalışma grubu ve BSAC tarafından E-test yöntemi için, CLSI tarafından ise agar dilüsyon yöntemi için önerilen referans bir duyarlılık ortamıdır (196).

H. pylori’de klaritromisin direncinin belirlenmesinde kullanılacak MİK sınır değeri CLSI tarafından sadece agar dilüsyon metodu için belirlenmiştir (178). E-test metodu ile klaritromisin direncinin belirlenmesinde standart bir MİK sınır değeri bulunmamaktadır (140). Birçok makalede klaritromisin direncini belirleyen farklı MİK sınır değerleri kullanılmaktadır (41,160,184). *H. pylori* levofloksasin direncinin belirlenmesinde kullanılacak MİK sınır değeri hiçbir metod için CLSI’da belirlenmediği bilinmektedir. E-test metodundaki MİK sınır değerlerindeki farklılıklar açısından *H. pylori*’de antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesinde moleküler testler kolaylık sağlayabilir ve ışıktutabilir. Ayrıca kullanılan ve bildirilen farklı MİK sınır değerleri *H. pylori* antimikrobiyal duyarlılığının

belirlenmesinde uygulanan fenotipik ve moleküler testler arasındaki uyumsuz sonuçları da etkileyebilecek olduğu tarafımızca düşünülmüştür.

Fenotipik metodlar duyarlı ve dirençli suşları ayırt etmede yeterlidir fakat sonuçlar ancak birkaç gün (3-7) sonra alınabilir ve epidemiyolojik ve klinik önemi olabilecek, var olan mutasyonun tipine ilişkin bilgi vermez (29). Geliştirilen ve ilerleyen duyarlılığından dolayı moleküler testler, dirençli mikroorganizmalar total bakteri yükünün küçük bir kısmını oluşturduğunda direnci saptayabilir. Yapılan ve ileride yapılacak olan çalışmaların, moleküler testlerin tedavi başarısızlığını fenotipik testlerden daha doğru öngörüp öngöremeyeceğini belirleyeceği bildirilmiştir (22). Moleküler metodlar spesifik transport koşulları gerektirmezler (193,197,198), kolay uygulanabilir ve hızlı testlerdir (201,210). PCR'ın diğer bir avantajı ise üreaz testi için kullanılan biyopsi örneklerine uygulanabilmesidir (193,198).

Moleküler temelli yöntemler küçük doku örneklerinde çok az sayıda bulunan dirençli *H. pylori* suşlarını saptamada oldukça hassastır. Ayrıca moleküler yöntemler, hetero-direnç olarak bilinen aynı hasta örneğinde bir arada bulunan, aynı antibiyotiğe duyarlı ve dirençli *H. pylori* suşlarını saptamada da hassastır (2,36,188). Moleküler testlerin büyük çoğunluğunun *rrl* ve *gyrA* genlerinde klaritromisin ve florokinolon direncine neden olan tanımlanmış nadir mutasyonları ve nadir görülen genetik mekanizmalara dayanan direnci saptayamadıkları bilinmektedir ve bunların göz önünde bulundurulması gerekmektedir (2).

Çalışmamızda *H. pylori* tanısı; invaziv olarak, gastrik biyopsi örneklerine uygulanan kültür, HÜT, histopatoloji, moleküler yöntemler ve aynı zamanda non-invaziv olarak, dışkı örneklerine uygulanan moleküler yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. Klaritromisin ve levofloksasin duyarlılıkları; hem biyopsi örneklerine uygulanan kültür temelli E-test metodu ile hem de moleküler olarak gastrik doku ve dışkı örneklerine uygulanan moleküler yöntemler ile belirlenmiştir. Yöntemler fenotipik ve genotipik olarak, invaziv ve non-invaziv olarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca yöntemler arasında farklı sonuç veren örnekler ise sekans analizine gönderilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Kültür ya da real-time PCR yöntemleri ile *H. pylori* pozitif saptanan tüm örnekler GenoType HelicoDR yöntemi ile de Cambau ve arkadaşlarının çalışmasında (36) pozitif saptanmış olup, bununla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da *H. pylori* pozitif saptanan tüm örnekler GenoType HelicoDR yöntemi ile pozitif saptanmıştır.

H. pylori'de klaritromisin direncine *rrl* genindeki nokta mutasyonlar neden olmaktadır, bir çok çalışmada en sık rastlanan mutasyon A2143G bildirilmiştir (14,22,39,94,150,188).

Çalışmamızda klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde FRET-real-time PCR ve E-test yöntemlerinin uyumu %73.5 saptanmıştır. Monno ve arkadaşlarının çalışmasında da %71.2 uyum saptanmıştır, uyumsuz saptanan sonuçların %50'sinde hetero-direncin rol oynadığı bildirilmiştir (150). De Francesco ve arkadaşları da çalışmalarındaki uyumsuz sonuçların %78.5'ini real-time PCR ile hetero-direnç, E-test ile klaritromisin duyarlılığı saptanması ile karakterize etmişlerdir (22). Monno ve arkadaşları ve Oleastro ve arkadaşları çalışmalarında real-time PCR ile mutasyon saptanamayan fakat E-test ile dirençli saptanan örnekleri real-time PCR ile saptanabilen pozisyonlardan farklı bir pozisyonadaki nokta mutasyonu ile ya da henüz tam olarak bilinmeyen diğer genetik mekanizmalar ile ilişkilendirmişlerdir (42,150). Çalışmamızda klaritromisin duyarlılığının belirlenmesinde E-test yöntemi altın standart kabul edilerek real-time PCR'ın duyarlılık ve özgüllüğü %35.71 ve %88.57 saptanırken, Oleastro ve arkadaşlarının agar dilüsyon metodu altın standart kabul ederek real-time PCR yönteminin duyarlılık ve spesifikliğı %98.4 ve %94.1 saptanmıştır (42). Çalışmamızda real-time PCR'ın duyarlılığın düşmesine neden olan E-test ile dirençli real-time PCR ile duyarlı saptanan dokuz örneğin altısında sekans analizi ile yeni mutasyonlar C2136T, C2310A ve C2428T saptanmış olup real-time PCR ile saptanabilen 2142 ve 2143 pozisyonlarında mutasyon saptanmamıştır.

Çalışmamızda, 23S rRNA ve *gyrA* mutasyonlarını saptamada GenoType HelicoDR testinin duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri GenoType HelicoDR testine ilişkin önceki diğer çalışmalarla (29,36,143,199) karşılaştırıldığında daha düşük saptanmıştır. Bunun nedeninin, temel olarak GenoType HelicoDR testi stribinde yer almayan, saptadığımız yeni üç mutasyonun üç hastanın antrum ve korpus olmak üzere toplam altı örneğinde fenotipik dirence yansımından kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Lee ve arkadaşlarının çalışmasında GenoType HelicoDR testinin 23S rRNA ve *gyrA* mutasyonlarını saptamada duyarlılık ve negatif prediktif değeri, GenoType HelicoDR testi ile ilgili daha önceki çalışmalarla kıyaslanarak genel olarak iyi sonuç alınmıştır. Fakat özgüllük ve pozitif prediktif değer temel olarak bazı yalancı pozitif sonuçlar nedeniyle önceki çalışmalara göre %10 daha düşük saptanmıştır (143). Lee ve arkadaşlarının çalışmasının aksine, çalışmamızda 23S rRNA ve *gyrA* mutasyonlarını saptamada GenoType HelicoDR testinin özgüllük ve negatif prediktif

değerleri daha yüksek saptanmış olup, duyarlılık ve pozitif prediktif değerleri daha düşük saptanmıştır.

Cambau ve arkadaşları GenoType HelicoDR ve fenotipik E-test yöntemlerinin klaritromisin uyum yüzdesini 0.96, levofloksasin uyum yüzdesini ise 0.94 saptamışlardır (36), ancak çalışmamızda aksine GenoType HelicoDR ve fenotipik E-test yöntemlerinin levofloksasin duyarlılığının belirlenmesinde uyum yüzdesi (%69.4), klaritromisine (%63.3) göre daha yüksek saptanmıştır. Çalışmamızda fenotipik ve genotipik test sonuçlarında uyumsuzluğa neden olan; E-test yöntemi ile duyarlı, GenoType HelicoDR testi ile dirençli saptanan hastaların çoğunda hem mutant hem de wild type genotiplerinin bulunduğu miks enfeksiyon saptanmıştır. Trespalacios ve arkadaşları da fenotipik ve genotipik yöntemler arasındaki uyumsuzluğu daha çok iki farklı genotip saptanan gastrik biyopsi örneklerindeki miks enfeksiyon ile ilişkilendirmişlerdir (200). Oleastro ve arkadaşları da çalışmalarında fenotipik yöntemler (agar dilüsyon ve E-test) ile klaritromisin duyarlı saptanan örneklerde real-time PCR ile hem wild type hem de A→G mutantı saptandığını ve bu farklı sonucun dirençli popülasyonun fenotipik yöntemle saptanamayacak kadar düşük konsantrasyonda olması ile açıklanabileceğini ve genotipik metodun aynı örnekteki miks popülasyonu saptamada fenotipik yöntemden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (42). Çalışmamızda E-test yöntemi ile dirençli, GenoType HelicoDR testi ile duyarlı saptanan diğer uyumsuz sonuçlu hastaların sekans analizi genellikle GenoType HelicoDR test sonuçları ile uyumlu saptanmıştır. Primerlerin çoğalttığı bölgenin dışında başka bir mutasyonun fenotipik dirence neden olmuş olabileceği kanısına varılmıştır.

H. pylori'de florokinolon direnci 1995'ten bu yana 87 ve 91 (*H. pylori* numaralandırma sistemi) pozisyonlarında *gyrA* gen mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Florokinolon (levofloksasin, gatifloksasin ve siprofloksasin) direnci florokinolon dirençli suşların %80-100'ünde *gyrA* mutasyonları ile ilişkilidir. Mutasyonlar genellikle kodon 87 ve 91 ve nadir olarak 86'da bulunmuştur (36). Cambau ve arkadaşlarının GenoType HelicoDR testi ile ilgili çalışmasında 67 florokinolon dirençli *H. pylori* suşunun %87'sinde mutasyon görülmüş olup ya kodon 87 (mutasyonların %57'si) ya da kodon 91 (mutasyonların %48'i) 'de bir mutasyon saptanmıştır (36). Bizim çalışmamızda ise 41 florokinolon dirençli *H. pylori* suşunun %35.4'ünde görülen mutasyonlar kodon 87 (mutasyonların %51.2) ya da kodon 91 (mutasyonların %56.1'i) de saptanmış olup 87. ve 91. pozisyonda saptanan mutasyonların oranı çalışmamızda Cambau ve arkadaşlarının çalışmasına benzer oranda saptanmıştır.

Bu kiti geliştiren ve değerlendiren Cambau ve arkadaşlarının çalışmasında GenoType HelicoDR testi ile levofloksasin duyarlılığının belirlenmesi açısından 87. kodonda wild type ya da mutant allel saptanamayan ve “no band” mutasyonu olarak belirtilen *H. pylori* koloni ve doku DNA rneklerinin sekans analizinde saptanan izolösin (I) aminoasidine dönüşüm (36) alışmamızda da “no band” mutasyonu olarak belirttiğimiz hasta örneklerinde bu izolösin (I) aminoasidine dönüşüm (N87I) saptanmıştır. Tanih ve arkadaşlarının ve Deyi ve arkadaşlarının çalışmalarında ise N87I mutasyonu saptanmamıştır (29,199).

Tanih ve arkadaşları (29), Lee ve arkadaşları (143), Deyi ve arkadaşlarının (199) alışmalarıyla uyumlu olarak alışmamızda GenoType HelicoDR testi ile klaritromisin direncine neden olan üç mutasyondan en sık A2143G mutasyonu, levofloksasin direncine neden olan mutasyonlardan en sık N87K mutasyonu saptanmıştır.

E-test yöntemi ile klaritromisin ve levofloksasin direnci; çalışmamızda %28.6 ve %28.6, Schiota ve arkadaşlarının Amerika’da yaptıkları çalışmada (201) %16.4 ve % 31.3, ağdaş ve arkadaşlarının Mersin’de yaptıkları çalışmada (202) %18.2 ve %18.2, şimşek ve arkadaşlarının İzmir’de yaptıkları çalışmada (203) %25.5 ve %26.9 saptanmıştır. E-test yöntemi ile *H. pylori*’de çoklu direnci Biernat ve arkadaşları çalışmalarında %26 (4), Shokrzadeh ve arkadaşları agar dilüsyon yöntemi ile %22.6 saptamışlardır (204). Çalışmamızda yedi (%14.3) hastada E-test yöntemi ile hem klaritromisin hem de levofloksasin direnci (oklu direnç) saptanmıştır.

Çalışmamızda FRET-real-time PCR ile klaritromisin direnci; biyopsi örneklerinde %20.7, dışkı örneklerinde %20.4 saptanmıştır. Kargar ve arkadaşları ve Monno ve arkadaşları çalışmalarında klaritromisin direncini real-time PCR ile biyopsi örneklerinde %36 (188) ve %56.8 (150) saptamışlardır. Çalışmalardaki farklı popülasyonlar (rneğin peptik ülserli ya da daha önce hiç tedavi edilmemiş hastalar) ya da hetero-dirençli *H. pylori* suşu olan hastaların oranındaki farklılıklar, aynı ülkede iki farklı bölgedeki direncin farklı epidemiyolojisinin sonuçları olduğu bildirilmiştir (150).

H. pylori’nin gastrik mukozada yama tarzı “patchy” dağılımı nedeniyle, midenin farklı bölümlerinden alınan biyopsilerin, *H. pylori*’nin saptanmasında tanısıl verimi büyük ölçüde arttıracadı düşünülmektedir. Ayrıca, aynı hastadan izole edilen *H. pylori* suşları genellikle antibiyotik duyarlılığı açısından ya duyarlı ya da dirençli fenotipe sahiptir fakat hem duyarlı hem de dirençli *H. pylori* suşları aynı hastada bulunabilmektedir. Midenin farklı bölümlerinde farklı antimikrobiyal duyarlılığa sahip *H. pylori* suşlarının enfeksiyonunun, eradikasyon

tedavi başarısının negatif etkilenmesinin muhtemel olduğu düşünülmektedir (3). Tek bir biyopsi örneğinde birden fazla genotipin varlığı ya gastrik mukozada farklı suşların birlikte bulunması ya da aynı suшта mutant ve wild type allellerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir (36,42). Midede klaritromisine duyarlı ve dirençli *H. pylori* suşlarından oluşan miks enfeksiyonun prevalansı yaklaşık %20 olarak bildirilmiştir (26). Bizim çalışmamızda ise bu oran GenoType HelicoDR testi ile % 27.6, FRET-real-time PCR yöntemi ile %12.1 saptandı. Kargar ve arkadaşlarının çalışmasında (188) miks enfeksiyon real-time PCR yöntemi ile %9.8, Monno ve arkadaşlarının çalışmasında ise %36.6 saptandığı bildirilmiştir (150).

Çalışmamızda üç ayrı hastada 23S rRNA geni sekans analizi ile her biri farklı hastada (ve bu her bir farklı hastanın hem antrum hem de korpus biyopsi örneklerinde aynı mutasyon) C2136T, C2310A ve C2428T üç farklı mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların her biri, aynı hastaya ait antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* koloni DNA'larında saptanmıştır. Bu hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin tümü E-test yöntemi ile klaritromisin dirençli, GenoType HelicoDR ve FRET-real-time PCR moleküler yöntemleri ile bu mutasyonlar saptanamadığı için duyarlı (wild type) saptanmıştır. Sekans analizi ile de 2142 ve 2143 pozisyonlarında hiçbir mutasyon saptanmadı. Bu bulgular, bu üç mutasyonun yeni mutasyonlar olabileceklerini düşündürmüştür. Klonlama ile doğrulama yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Düşük sinyal dizileri nedeniyle sekans analizi yapılamayan örneklerin yetersiz ya da düşük kalitede kalıp DNA ve/veya primer kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Sekans analiz sonucu miks sekans (birden fazla pik) olması nedeniyle analizi yapılamayan örneklerin ise multipl PCR ürünleri ya da “frame-shift” mutasyonları veya DNA kalıbında tekrarlayan bölgelerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

H. pylori'yi izole etmek için endoskopik biyopsi örneğinin kullanılması daha güvenilir olmasına rağmen biyopsi örneklerinin alınması, sağlıklı bireylere gereksiz girişim gibi birçok dezavantaja sahiptir. Dışkı örnekleri non-invazivdir ve elde edilmesi kolaydır ancak inhibitörlerin varlığı ve dışkı örneklerindeki bakterilerin karmaşıklığı PCR amplifikasyonu gibi moleküler tekniklerin kullanılarak *H. pylori* genlerinin detaylı analizini engelleyebileceği bildirilmiştir (205).

Dışkı örnekleri, DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu için en zor örneklerdir. Bunun nedeni *H. pylori*'nin bir intestinal bakteriyal patojen olmaması ve bu nedenle dışkı örneklerinde düşük konsantrasyonda bulunabileceğinin düşünülmesidir. Diğer bir zorluk ise

dışkıda bulunan kompleks polisakkaritler olarak tanımlanan DNA polimeraz inhibitörleri ile ilişkilendirilmiştir (172). Dışkı örnekleri PCR teknolojisi ile *H. pylori*'nin saptanması için non-invaziv elde edilebilecek en iyi örneklerdir. Fakat bazı çalışmalarda duyarlılık düşük saptanmıştır. Düşük duyarlılığın muhtemel nedeni kalıp DNA'nın düşük kopya sayısı ve dışkı örneklerindeki PCR inhibitörlerinin varlığı olduğu bildirilmiştir (193). Fakat DNA izolasyonu için özel teknikler ile PCR inhibisyonunun önlenildiği gösterilmiştir (186,193). Çalışmamızda dışkı örneklerine uyguladığımız GenoType HelicoDR ve FRET-real-time PCR yöntemlerinin duyarlılıkları %100 ve %91.84 saptanmıştır. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu için Şen ve arkadaşlarının bildirdiği protokol (186) ve GenoType HelicoDR testinde yaptığımız modifikasyonlar ile non-invaziv bir test yöntemi geliştirilip uygulanmış olup üç saat içinde hem *H. pylori* varlığı hem de klaritromisin ve levofloksasin duyarlılıkları dışkı örneklerinde de saptanmıştır.

GenoType HelicoDR testi ile biyopsi ve dışkı örneklerinin klaritromisin ve levofloksasin duyarlılığının saptanmasında uyumu %60 ve %68.5 saptanmıştır. Dışkı ve biyopsi örneklerinde klaritromisin duyarlılığı sonucu uyumsuz olan hastaların %72.7'sinin dışkı örneklerinde hem wild type hem mutant profili, biyopsi örneklerinde sadece wild type (duyarlı) genotip saptanmıştır. Biyopsi ve dışkı örneklerinden farklı sonuçlar elde edilmesi biyopsi ve dışkı örneklerindeki genotip çeşitliliği ile ilişkilendirilmiştir. Bu genotip çeşitliliği aynı hastada birden fazla *H. pylori* genotipi olabileceğini göstermiştir.

FRET-real-time PCR yönteminin dışkı örneklerinde *H. pylori*'yi saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü çalışmamızda kültür, histopatoloji ve HÜT'nin en az ikisinin pozitifliği ile karşılaştırılarak %91.8 ve %33.3 saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan yüksek duyarlılığın aksine Lottspeich ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada dışkı real-time PCR duyarlılığı %63 saptanmış olup, düşük duyarlılığın donmuş dışkı örneklerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (141). Schabereiter-Gurtner ve arkadaşlarının çalışmalarında ise real-time PCR yönteminin dışkı örneklerinde *H. pylori* saptanmasındaki duyarlılık ve özgüllüğü %98 saptanmıştır (13). Altın standardımızın negatif dediği dışkı real-time PCR ile pozitif saptanan dört hastanın dördü de biyopsi real-time PCR ile de *H. pylori* pozitif saptanmıştır. Bununla ilişkili olarak özgüllüğün düşmesindeki neden olarak; düşük bakteriyal dansitenin ve *H. pylori*'nin midedeki "patchy" dağılımın negatif kültür ve histopatoloji sonucuna neden olmuş olabileceği düşünülmüştür. FRET-real-time PCR ile biyopsi ve dışkı örneklerinin klaritromisin duyarlılığının saptanmasındaki uyumu ise %71.4 saptanmıştır.

Sonuç olarak, saptadığımız yüksek *H. pylori* klaritromisin ve levofloksasin yüksek direnç oranları ve son yayınlanan Maastricht IV konsensus raporu dahil birçok çalışmada *H. pylori* eradikasyon tedavisinin yüksek antibiyotik direnci görülen bölgelerde duyarlılık testlerine göre belirlenmesi gerektiğinin vurgulanması nedeniyle biyopsi GenoType HelicoDR testinin, biyopsi elde edilemediği durumlarda ise geliştirdiğimiz dışkı GenoType HelicoDR testinin yüksek duyarlılığı, birkaç saat içinde sonuç alınabilmesi ve epidemiyolojik öneme sahip nokta mutasyonlarını da saptayabilme özelliği ile rutin uygulamalarda kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Maastricht IV konsensus raporunda yayınlanan birinci ve ya ikinci basamak *H. pylori* eradikasyon tedavi protokollerinde kullanılan klaritromisin ve levofloksasin antibiyotiklerine artan direnç oranları tedavi başarısızlıklarının temel nedenidir. Kültürün altın standart yöntem olmasının yanı sıra zorlu transport koşulları, *H. pylori* kokoid formlarının varlığı, narin üremesi gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bu nedenle son on yılda, kültür temelli standart duyarlılık testlerinin sınırlılıklarını gidermek amacıyla *H. pylori* klaritromisin ve levofloksasin direncini saptamak için birçok PCR temelli yöntem geliştirilmiştir. Ayrıca klaritromisin ve levofloksasin duyarlılıklarının eş zamanlı saptanabildiği multipleks PCR ve hibridizasyona dayanan GenoType HelicoDR testi geliştirilmiştir. Fakat düşük duyarlılık ve/veya özgüllükleri nedeniyle ve her birinin ayrı avantaj/dezavantaja sahip olmaları nedeniyle *H. pylori* tanısı tek bir yöntem ile değil, birkaç test sonucunun karşılaştırılması ile değerlendirilmelidir. *H. pylori*'nin midede yama tarzı "patchy" dağılımı nedeniyle *H. pylori* varlığı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için hastalardan ayrı ayrı antrum ve korpus biyopsi örneklerinin alınması gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır. Kültür ve E-test yöntemlerinin sonuçlanmasının en az bir hafta - on gün sürmesi açısından rutin uygulamalarda hastaya aynı gün sonuç verilebilecek, hem *H. pylori* varlığını hem de eradikasyon tedavisinde kullanılan iki önemli antibiyotik klaritromisin ve levofloksasine karşı duyarlılık profilini direkt biyopsi örneklerinden belirleyebildiğimiz GenoType HelicoDR yönteminin, ayrıca biyopsi alınamadığı durumlarda yüksek duyarlılıkta non-invaziv bir yöntem olarak dışkı GenoType HelicoDR yönteminin rutin uygulamalarda kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır. Aynı hastada birden fazla *H. pylori* genotipi bulunabileceği nedeniyle, biyopsi ve dışkı örneklerindeki olası genotip çeşitliliği sonucunda farklı sonuçlar elde edilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda saptadığımız üç yeni mutasyonun fenotipik dirence yansıması ve uygulanan moleküler yöntemler ile ve sekans analizi ile dirence neden olduğu bilinen bölgelerde wild type saptanıp sekans analizi ile bilinenden (2142/2143) farklı pozisyonlarda mutasyonların saptanması çok önemli bir veridir ve klonlama yapılarak saptadığımız yeni üç mutasyonun (C2136T, C2310A ve C2428T) fenotipik dirence neden olduğu gösterilmelidir.

7. KAYNAKLAR

- 1) Correa P, Piazuelo MB. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. US Gastroenterol Hepatol Rev 2011; 7(1): 59-64.
- 2) Smith SM, O'Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. World J Gastroenterol 2014; 20(29): 9912-9921.
- 3) Selgrad M, Tammer I, Langner C, Bornschein et al. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. World J Gastroenterol 2014; 20(43): 16245-16251.
- 4) Biernat MM, Poniewierka E, Btaszczyk J, Czapla L et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates from Lower Silesia, Poland. Arch Med Sci 2014; 10(3): 505-509.
- 5) Papastergiou V, Georgopoulos SD, Karatapanis S. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Meeting the challenge of antimicrobial resistance. World J Gastroenterol 2014; 20(29): 9898-9911.
- 6) Ford AC, Axon ATR. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. Helicobacter 2010; 15: 1-6.
- 7) Lehours P, Yilmaz O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2007; 12(Suppl 1): 1-3.
- 8) Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007; 20(2): 280-322.
- 9) Vaira D, Holton J, Menegatti M, Ricci C et al. Review article: invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2000; 14(3): 13-22.
- 10) 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.

- 11) 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.
- 12) Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES et al. Detection of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8): 3636-3640.
- 13) 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.
- 14) Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374–1384.
- 15) Hunt RH, Xiao SD, Mégraud F, Leon-Barua R et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. WGO Global Guidelines. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; 20(3): 299-304.
- 16) Occhialini A, Urdaci M, Doucet Populaire F, Bebear CM et al. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(12): 2724-2728.
- 17) De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G et al. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointest Liver Dis* 2010; 19(4): 409-414.
- 18) 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.
- 19) Rodvold KA, Piscitelli SC. New oral macrolide and fluoroquinolone antibiotics: An overview of pharmacokinetics, interactions, and safety. *Clin Infect Dis* 1993; 17(Suppl 1): 192-199.
- 20) Gerrits MM. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Erasmus MC, Netherlands. PhD thesis 2004; 21-28.

- 21) 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.
- 22) 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: 327-32.
- 23) Toracchio S, Aceto GM, Mariani-Costantini R, Battista P et al. Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2004; 9: 396-399.
- 24) Agudo S, Perez-Perez G, Alarcon T, Lopez-Brea M. High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10): 3703-3707.
- 25) Menard A, Oleastro M, Santos A, Mégraud F. PCR-RFLP can also detect the point mutation A2142C of the 23S rRNA gene associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46:1156–1157.
- 26) Liou JM, Chang CY, Sheng WH, Wang YJ et al. Genotypic resistance in *Helicobacter pylori* strains correlates with susceptibility test and treatment outcomes after levofloxacin and clarithromycin-based therapies. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(3): 1123–1129.
- 27) De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Giorgio F et al. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World J Gastroenterol* 2011; 2(3): 35-41.
- 28) Agudo S, Pérez-Pérez G, Alarcón T, López-Brea M. Rapid detection of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* strains in Spanish patients by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Rev Esp Quimioter* 2011; 24(1): 32-36.
- 29) Tanih NF, Ndip RN. Molecular Detection of Antibiotic Resistance in South African Isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Res Pract* 2013; 2013: 259457.

- 30) Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin Infect Dis 2000; 31(2): 22-28.
- 31) Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. J Antimicrob Chemother 2003; 51(1): 29-35.
- 32) <http://www.pharmainfo.net/reviews/fluoroquinolones-overview>
- 33) Oyedeji KS, Smith SI, Coker AO. Antibiotic susceptibility patterns in *Helicobacter pylori* strains from patients with upper gastrointestinal pathology in western Nigeria. Br J Biomed Sci 2009; 66(1): 10-13.
- 34) Negrei C, Boda D. The Mechanisms of action and resistance to fluoroquinolone in *Helicobacter pylori* infection. In: Roesler BM. Ed. Trend in *Helicobacter pylori* infection. InTech press 2014; Chapter 13.
- 35) Jones KR, Cha JH, Merrell DH. Who's winning the war? Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Curr Drug Ther 2011; 3(3): 190-203.
- 36) 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.
- 37) Liu G, Xu X, He L, Ding Z et al. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Beijing children. Helicobacter 2011; 16: 356-362.
- 38) Yu C, Li L, Chen W, Jiao Y et al. Levofloxacin Susceptibility Testing for *Helicobacter pylori* in China: Comparison of E-test and Disk Diffusion Method. Helicobacter 2011; 16: 119-123.
- 39) Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Gut 2002; 50: 285-289.
- 40) Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. Drug Resist Update 2001; 4: 178-186.

- 41) Lehours P, Siffre E, Mégraud 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.
- 42) 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.
- 43) Lehours P, Mégraud F. *Helicobacter pylori* molecular diagnosis. Expert Rev Mol Diagn 2011; 11(4): 351-355.
- 44) Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM et al. The peopling of the pacific from a bacterial perspective. Science 2009; 323: 527-530.
- 45) Fox JG, Mégraud F. Helicobacter. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. p. 947-962.
- 46) 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.
- 47) Özden A. *Helicobacter pylori*'nin yüzyıllık hikayesi. Özden A editor. İşte *Helicobacter pylori*. Ankara, Nurol Matbaacılık: Türk Gastroenteroloji Derneği yayını. 1995; 1-3.
- 48) Ovalı Ö, Baylan O. Klinik ve mikrobiyolojik açıdan *Helicobacter pylori*. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 135-146.
- 49) Heatley RV. *Helicobacter pylori* el kitabı. Second edition, İstanbul, Blackwell Science, CSA, 1998; 1-35.
- 50) 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.
- 51) Radosz-Komoniewska H, Bek T, Jozwiak J, Martirosian G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 602-610.

- 52) Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey&Scott's Diagnostic microbiology. 12th edition. China, Mosby Elsevier, 2007; 421-423.
- 53) 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.
- 54) Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: What is new? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14(8): 1865–1868.
- 55) Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720-741.
- 56) Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. Infect Genet Evol 2012; 12(2): 203-213.
- 57) 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.
- 58) Marshall B, Adams PC. *Helicobacter pylori*: A Nobel pursuit? Can J Gastroenterol 2008; 22(11): 895-896.
- 59) Tsuji S. The “Costa Rican enigma” of *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer. J Gastroenterol 2006; 41: 716-717.
- 60) http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html
- 61) Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006; 12(19): 2979-2990.
- 62) Catrenich CE, Makin KM. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. Scand J Gastroenterol Suppl 1991; 181: 58-64.
- 63) Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science 1999; 284: 1328-1333.

- 64) 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.
- 65) Siavoshi F, Saniee P, Atabakhsh M, Pedramnia S et al. Mucoid *Helicobacter pylori* isolates with fast growth under microaerobic and aerobic conditions. *Helicobacter* 2011; 17: 62-67.
- 66) 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.
- 67) Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65: 389-410.
- 68) Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. Second edition. Washington, D.C, ASM press; 2002; 339-351.
- 69) Otteman KM, Lowenthal CA. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* 2002; 70(4): 1984-1990.
- 70) Skene C, Young A, Every A, Sutton P. *Helicobacter pylori* flagella: antigenic profile and protective immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 249-256.
- 71) O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* 2000; 2: 1207-1214.
- 72) 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.
- 73) 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.
- 74) Demiray Gürbüz E. Dispeptik yakınmalı hastalarda *Helicobacter pylori* varlığı, direnç ve virulans faktörlerinin moleküler yöntemler ile değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi 2013; 8-101.

- 75) Gilbreath JJ, Cody WL, Merrell DS, Hendrixson DR. Change is good: Variations in common biological mechanisms in the Epsilonproteobacterial genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiol Molec Biol Rev* 2011; 75(1): 84-132.
- 76) Wang J, Wang WH, Li J, Liu FX. Celecoxib inhibits *Helicobacter pylori* colonization-related factors. *World J Gastroenterol* 2010;16(7): 846-853.
- 77) Spohn G, Scarlato V. Motility, chemotaxis, and flagella. In Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press 2001; Chapter 21.
- 78) Moran AP. Molecular structure, biosynthesis and pathogenic roles of lipopolysaccharides. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press 2001; Chapter 8.
- 79) Backert S, Clyne M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2011; 16(Suppl 1): 19-25.
- 80) Costa AC, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2009; 14(Suppl. 1): 15-20.
- 81) de Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ. 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.
- 82) 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.
- 83) 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.
- 84) Mitchell HM. Epidemiology of infection. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press 2001; Chapter 2.

- 85) Azevedo NF, Huntington J, Goodman KJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. *Helicobacter* 2009; 14(Suppl.1): 1-7.
- 86) Hasni S, Ippolito A, Illei GG. *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. *Oral Dis* 2011; 17: 621-627.
- 87) 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.
- 88) 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.
- 89) Das JC, Paul N. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian J Pediatr* 2007; 74: 287-290.
- 90) Bergman MP, D'Elios MM. Cytotoxic T cells in *H. pylori*-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 104918.
- 91) 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.
- 92) 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.
- 93) Sachs G, Scott DR. *Helicobacter pylori*: Eradication and preservation. *F1000 Med Rep* 2012; 4: 7.
- 94) 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.
- 95) Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37(2): 112-117.
- 96) Covacci A, Rappuoli R. *Helicobacter pylori*: After the genomes, back to biology. *J Exp Med* 2006; 197(7): 807-811.

- 97) 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.
- 98) 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.
- 99) 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.
- 100) 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.
- 101) Torres J, Backert S. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2008; 13 (Suppl. 1): 13-17.
- 102) Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2007; 12 (Suppl. 1): 10-14.
- 103) Cover TL. Role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in gastroduodenal disease. J Infect Dis 2006; 194: 1343-1345.
- 104) Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. World J Gastroenterol 2008; 14(27): 4265-4272.
- 105) 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.
- 106) 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.
- 107) Henning EE, Allen JM, Cover TL. Multiple chromosomal loci for the *babA* gene in *Helicobacter pylori*. Infect Immun 2006; 74(5): 3046-3051.

- 108) 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.
- 109) Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 449-490.
- 110) 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.
- 111) Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006; 55: 775-781.
- 112) 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.
- 113) Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2005; 10 (Suppl. 1): 14-20.
- 114) 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.
- 115) 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.
- 116) Azuma T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol* 2004; 39: 97-103.
- 117) Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S et al. EPIYA motif is a membrane-trageting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2005; 280(24): 23130-23137.
- 118) Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96: 835-843.

- 119) Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2(92): 1-9.
- 120) Chambers MG, Pyburn TM, Gonzalez-Rivera C, Collier SE et al. Structural analysis of the oligomeric states of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Mol Biol* 2013; 425(3): 524–535.
- 121) Purvi C, Panchal MD, Forman JS, Blumberg DR et al. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 4-10.
- 122) Janulaityte-Günther D, Kupcinskis 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.
- 123) Chitcholtan K, Hampton MB, Keenan JI. Outer membrane vesicles enhance the carcinogenesis potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis* 2008; 29(12): 2400-2405.
- 124) 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): 1-18.
- 125) 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.
- 126) Ricci C. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21(2): 299-313.
- 127) Malfertheiner P, Mégraud F, O’Morain CA, Atherton J et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-The Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.
- 128) Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2012; 17 (suppl. 1): 1-8.
- 129) www.hain-lifescience.de/.../HelicoDR_eng.pdf

- 130) GenoType® HelicoDR VER 1.0. Molecular genetic assay for identification of resistance to fluoroquinolones and/or clarithromycin of *Helicobacter pylori* from culture and biopsy samples. 2009; 8-13.
- 131) http://www.hain-lifescience.de/uploadfiles/file/technologie/technik_eng.pdf
- 132) Kindermann A, Lopes AI. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter* 2009; 14(Suppl.1): 52-57.
- 133) Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J Med Microbiol* 2001; 50: 1021-1029.
- 134) Hirschl AM, Makristathis A. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicobacter* 2007; 12(Suppl 2): 6-11.
- 135) Monteiro L, Oleastro M, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2009; 14(Suppl. 1): 8-14.
- 136) Rimbara E, Fischbach LA, Graham DY. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 79-88.
- 137) Wong WM, Xiao SD, Hu PJ, Wang WH et al. Standard treatment for *Helicobacter pylori* infection is suboptimal in non-ulcer dyspepsia compared with duodenal ulcer in Chinese. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21(1): 73-81.
- 138) <http://pubs.sciepub.com/ajmr/2/1/2/>
- 139) Versalovic J, Fox JG. *Helicobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. p. 915-928.
- 140) Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(11): 2747-2757.
- 141) Seck A, Burucoa C, Dia D, Mbengue M et al. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12: 3.

- 142) Glupczynski Y, Broutet N, Cantagrel A, Andersen L et al. Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21(7): 549-552.
- 143) Lee JW, Kim N, Nam RH, Park JH et al. GenoType HelicoDR test in the determination of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea. Scand J Gastroenterol 2014; 49: 1058-1067.
- 144) Boyanova L, Davidkov L, Gergova G, Kandilarov N et al. *Helicobacter pylori* susceptibility to fosfomycin, rifampin, and 5 usual antibiotics for *H. pylori* eradication. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 79(3): 358-361.
- 145) Vilaichone RK, Gumnarai P, Ratanachu-Ek T, Mahachai V. Nationwide survey of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 77(4): 346-349.
- 146) Selgrad M, Meissle J, Bornschein J, Kandulski A et al. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013; 25(11): 1257-1260.
- 147) Ogata SK, Ortiz-Godoy AP, da Silva Patricio FR, Kawakami E. High *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazilian children and adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2013; 56(6): 645-648.
- 148) http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf
- 149) Sadeghi-Khomami A, Lumsden MD, Jakeman DL. Glycosidase inhibition by macrolide antibiotics elucidated by STD-NMR spectroscopy. Chem Biol 2008; 15: 739-749.
- 150) Monno R, Giorgio F, Carmine P, Soleo L et al. *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance detected by E-test and TaqMan real-time polymerase chain reaction: a comparative study. APMIS 2012; 120: 712-717.
- 151) <http://www.antibiotics-info.org/clarithromycin.html>

- 152) Dax SL. Antibacterial chemotherapeutic agents. London United Kingdom: Blackie Academic and Professional 1997: 251-255.
- 153) Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1): 1-12.
- 154) Gaynor M, Mankin AS. Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. Cur Top Med Chem 2003; 3(9): 949-961.
- 155) <http://www.ilactr.com/ilac/tavanic.html>
- 156) Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. Clin Infect Dis 2005; 41: 113-9.
- 157) Cheng G, Hao H, Dai M, Liu Z et al. Antibacterial action of quinolones: from target to network. Eur J Med Chem 2013; 66: 555-562.
- 158) Heddle JG, Lu T, Zhao X, Drlica K et al. *gyrB*-225, a mutation of DNA gyrase that compensates for topoisomerase I deficiency: investigation of its low activity and quinolone hypersensitivity. J Mol Biol 2001; 309(5): 1219-31.
- 159) Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. Front Microbiol 2012; 3: 24.
- 160) Fujimura S, Kato S, Linuma K, Watanabe A. *In vitro* activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. JMM 2004; 53: 1019-1022.
- 161) Chung JW, Lee GH, Jeong JY, Lee SM et al. Resistance of *Helicobacter pylori* strains to antibiotics in Korea with a focus on fluoroquinolone resistance. J Gastroenterol Hepatol 2012; 27: 493-497.
- 162) Iwao E, Yokoyama Y, Yamamoto K, Hirayama F et al. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of Y-904, a new fluoroquinolone. J Infect Chemother 2003; 9: 165-171.
- 163) <http://classconnection.s3.amazonaws.com/287/flashcards/1231287/png/chloramphenicol1340588451439.png>

- 164) Mégraud F, Hazell S, Glupczynski Y. Antibiotic susceptibility and resistance. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press 2001; Chapter 42.
- 165) <http://rx-metronidazole.net/work.html>
- 166) Şimşek I, Soytürk M, Kadayıfçı A, Şimşek H ve Türkiye *H. pylori* Çalışma Grubu (THPÇG). *Helicobacter pylori* tanı ve tedavi uzlaşısı raporu, Haziran 2010, İzmir.
- 167) Co EMA, Schiller NL. Resistance mechanisms in an *in vitro* selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(12): 4174-4176.
- 168) Wu W, Yang Y, Sun G. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. Gastroenterol Res Pract 2012; 1-8.
- 169) Zuckerman JM. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. Infect Dis Clin N Am 2004; 18: 621-649.
- 170) Hirata K, Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H et al. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol Hepatol 2010; 25: 75-79.
- 171) Wu JY, Wang SSW, Lee YC, Yamaoka Y et al. Detection of genotypic clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by string tests. World J Gastroenterol 2014; 20(12): 3343-3349.
- 172) Özçakır O, Yılmaz YA. *Helicobacter pylori*'de antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2007; 38: 75-79.
- 173) Taylor DE. Pathophysiology of antibiotic resistance: Clarithromycin. Can J Gastroenterol; 14(10): 891-894.
- 174) Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanisim of quinolone action and resistance. Biochemistry 2014; 53: 1565–1574.

- 175) Garcia M, Raymond J, Garnier M, Cremniter J et al. Distribution of spontaneous gyrA mutations in 97 fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* isolates collected in France. AAC 2012; 56(1): 550-551.
- 176) Boyanova L, Mitov I. Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. Expert Rev Anti Infect Ther 2010; 8(1): 59-70.
- 177) Trieber CA, Taylor DE. Mutations in the 16 rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. J Bacteriol 2002; 184(8): 2131-2140.
- 178) Clinical Laboratory Standard Institute 2007 M7-MİK Tablo 2J, M100-S17; 27(1):134.
- 179) Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. Aliment Pharmacol Ther 1997; 11: 43-53.
- 180) 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.
- 181) Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori*'de antibiyotik direnci ve direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler. Mikrobiyol Bül 2005; 39: 399-409.
- 182) Yılmaz Ö, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence *in situ* hybridization method in diagnosis of *H. pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *H. pylori* eradication therapy. World J Gastroenterol 2007; 13(5): 671-675.
- 183) Drossman DA. Rome III: The new criteria. Chin J Dig Dis 2006; 7: 181-185.
- 184) Karczewska E, Wojtas-Bonior I, Sito E, Zwolinska-Wcislo M et al. Primary and secondary clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to *Helicobacter pylori* in southern Poland. Pharmacol Rep 2011; 63: 799-807.
- 185) Woo HY, Park DI, Park H, Kim MK et al. Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with gastric biopsy specimens. Helicobacter 2009; 14: 22-28.

- 186) Sen N, Yılmaz Ö, Simsek İ, Küpelioğlu AA et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. *Helicobacter* 2005; 10(4): 353-359.
- 187) Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit JC et al. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(12):3942.
- 188) 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. *Res Microbiol* 2012; 163: 109-113.
- 189) Bağlan PH, Bozdayı G, Özkan M, Özden A. Klaritromisin dirençli *Helicobacter pylori*'nin saptanmasında, E-test ve agar dilüsyon metodlarının karşılaştırılması. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2005; 4(2) 83-87.
- 190) Magalhães PP, Queiroz DM, Barbosa DVC, Rocha GA et al. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 2021–2023.
- 191) Georgopoulos SD, Papastergiou V, Karatapanis S. Current options for the treatment of *Helicobacter pylori*. *Expert Opin Pharmacother* 2013; 14(2): 211-223.
- 192) Torres-Debat ME, Perez-Perez G, Olivaares A, Fernandez L et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* and mechanisms of clarithromycin resistance in strains isolated from patients in Uruguay. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101(11): 757-762.
- 193) Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standart? *World J Gastroenterol* 2014; 20(36): 12847-12859.
- 194) Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of stool-PCR test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *World J Gastroenterol* 2009; 15(4): 484-488.

- 195) Wenzhen Y, Yumin L, Quanlin G, Kehu Y et al. Is antimicrobial susceptibility testing necessary before first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection? Meta-analysis of randomized controlled trials. Intern Med 2010; 49: 1103-9.
- 196) McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P et al. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 601-609.
- 197) Mégraud F. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. Ther Adv Gastroenterol 2012; 5(2): 103-109.
- 198) Di Bonaventura G, Neri M, Angelucci D, Rosini S et al. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR on gastric biopsy specimens taken for CP test: comparison with histopathological analysis. Int J Immunopathol Pharmacol 2004; 17: 77-82.
- 199) Deyi VYM, Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y et al. Practical use of GenoType® HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70: 557-560.
- 200) Trespalacios AA, Rimbara E, Otero W, Reddy R et al. Improved allele-specific PCR assays for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies: identification of N87I mutation in GyrA. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; S0732-8893(14): 00494-5.
- 201) Schiota S, Raddy R, Alsarraj A, El-Serag HB et al. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* among male US veterans. Clin Gastroenterol Hepatol 2015; S1542-3565(15): 00122-6.
- 202) Çağdaş U, Otağ F, Tezcan S, Sezgin O ve ark. Mide biyopsi örneklerinden *Helicobacter pylori*'nin tanımlanması ve antimikrobiyal direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 398-409.
- 203) Şimşek I, Gokcekuyu B, Yilmaz O, Elligokuz H ve ark. Increased resistance needs to change the first line treatment strategy for eradication of *Helicobacter pylori* in Turkey. Helicobacter: 120, 11-13 September 2011, Dublin, Ireland.

- 204) Shokrzadeh L, Alebouyeh M, Mirzaei T, Farzi N et al. Prevalence of multiple drug-resistant *Helicobacter pylori* strains among patients with different gastric disorders in Iran. *Microb Drug Resist* 2015; 21(1): 105-110.
- 205) Hirai I, Sasaki T, Saori F, Moriyama T et al. A method for assessment of *Helicobacter pylori* genotype using stool specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 56: 63-66.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 122 20.02.2012

Prof.Dr.Özlem YILMAZ

Kurulumuz tarafından 16.02.2012 tarih ve 510-GOA protokol numaralı 2012/05-22 karar numarası ile görüşülen “Gastrik Biyopsi ve Dışkı Örneklerinden İzole Edilen *Helicobacter Pylori* Genomik DNA’sında Klaritromisin ve Levofloksasin Duyarlılığının Moleküler Yöntemler İle Belirlenmesi” 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

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	510 -GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gastrik Biyopsi ve Dışkı Örneklerinden İzole Edilen Helicobacter Pylori Genomik DNA'sında Klaritromisin ve Levofloksasin Duyarlılığının Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Özlem YILMAZ Mikrobiyoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/05-22	Tarih: 16.02.2012
	Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın sorumlusu olduğu "Gastrik Biyopsi ve Dışkı Örneklerinden İzole Edilen Helicobacter Pylori Genomik DNA'sında Klaritromisin ve Levofloksasin Duyarlılığının Moleküler Yöntemler İle Belirlenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin 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 ☒	
Prof.Dr. Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Zuhul BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

8.2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Tuba BECERİKLİ

TC Kimlik No / Pasaport No:	31525261072
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dekanlık Binası Kat: 4 Inciraltı 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	0554 310 50 88
e-posta :	tubabecerikli@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ağırlıklı-Biyoloji	Lisans	2010

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Gastrik biyopsi ve dışkı örneklerinden izole edilen <i>Helicobacter pylori</i> genomik DNA'sında klaritromisin ve levofloksasin duyarlılığının moleküler yöntemler ile belirlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	47500	05.07.2012-05.07.2013	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	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	16.02.2012-16.06.2012	Araştırmacı /Uzman	Ulusal

ilişkilendirilmesi					
Çocuklarda <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunda amoksisilin, klaritromisin ve metronidazole karşı primer antibiyotik direncinin belirlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	104983	22.01.2014-22.07.2015	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunda primer tetrasiklin ve levofloksasin direncinin belirlenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi		2013	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunda tetrasiklin, amoksisilin, levofloksasin primer direncinin fenotipik yöntemler ile klaritromisin dirancinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması	Şifa Üniversitesi	50000	01.02.2014-01.02.2015	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi öğrencilerinin <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu konusunda bilgi düzeyleri ve farkındalıkları	Dokuz Eylül Üniversitesi	0	2014	Araştırmacı/Uzman	Ulusal

DiĞER 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			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci		Tamamlanan	Devam Eden

Sayısı	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Üyeliği (2012-) - Fedaration of European Microbiological Societies (FEMS) Araştırma Bursu “Determination of Clarithromycin and Levofloxacin Susceptibility in Helicobacter pylori Genomic DNA Isolated from Gastric Biopsy and Stool Specimens by Molecular Methods” konusunda Victor Segalen Bordeaux 2 University, Laboratoire de Bacterologie, National Reference Laboratory of Campylobacter and Helicobacter, Bordeaux, France, 1 Ekim-30 Aralık 2012 *ESCMID: European Bridging Meeting in Gastroenterology. EAGEN Postgraduate Course, November 09-10, 2012, Berlin, Germany (sözlü sunum) -İnönü Üniversitesi ve Adnan Menderes Üniversitesi tarafından TÜBİTAK desteği ile düzenlenen IV. Klonlama Kursu, İnönü Üniversitesi, Malatya, 27-31 Mayıs 2013 *European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 12-14,2013, Madrid, Spain -Rapid methods and Automation in Food Microbiology-XII Workshop MRAMA, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, İspanya, 26-29 Kasım 2013 (sözlü sunum)		

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
“European Bridging Meeting in Gastroenterology” Katılım bursu “Young ScientistAward”	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID)*	2012
Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Araştırma Bursu	Federation of European Microbiological Societies (FEMS)	2012
Yurt Dışı Bilimsel Etkinliklere Katılım Bursu-2224	TÜBİTAK*	2013

YAYINLARI

Uluslararası hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

ÖZKAN H, TIRAŞ HI, KARA E, METERİS A, BAŞERDEM O, BECERİKLİ T , 2 DEMİRAY GÜRBÜZ E, DOĞAN Y, ELLİDOKUZ H, ÖZTÜRK Y, YILMAZ Ö. Is there any relationship between <i>Helicobacter pylori</i> infection and celiac disease which causes iron deficiency anemia in childhood? European Helicobacter Study Group (EHSg) XXV th 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.
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 Helicobacter Study Group (EHSg) XXV th International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15, 2012, Ljubljana, Slovenia, P4.38. Helicobacter 2012;17 (Suppl. 1):107-108.
BECERİKLİ T , DEMİRAY-GÜRBÜZ E, SARIOĞLU S, SOYTÜRK M, ELLİDOKUZ H, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Importance of antimicrobial susceptibility testing for eradication of <i>Helicobacter pylori</i> based on the detection of clarithromycin and levofloxacin resistance by phenotypic and genotypic methods. ESCMID: European Bridging Meeting in Gastroenterology. EAGEN Postgraduate Course, November 09-10, 2012, Berlin, Germany (Sözlü sunum)
BECERİKLİ T , YILMAZ Ö, DEMİRAY-GÜRBÜZ E, SARIOĞLU S, SOYTÜRK M, ELLİDOKUZ H, ŞİMŞEK İ. A new approach as a non-invasive molecular method to detect <i>Helicobacter pylori</i> and determine clarithromycin and levofloxacin susceptibility: Stool genotype HelicoDR. European Helicobacter Study Group (EHSg) XXVI th International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 12-14,2013, Madrid, Spain, W2.6. Helicobacter 2013;18 (Suppl. 1):82. (Sözlü sunum)

BECERİKLİ T, YILMAZ Ö, DEMİRAY-GÜRBÜZ E, SOYTÜRK M, SARIOĞLU S, ELLİDOKUZ H, ŞİMŞEK İ. Is genotype HelicoDR method efficient enough to detect *Helicobacter pylori* in comparison with traditional phenotypic methods. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 12-14,2013, Madrid, Spain, P10.06. Helicobacter 2013;18 (Suppl. 1):120.

ERZURUMLU Y, **BECERİKLİ T**, YILMAZ Ö, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ. Imprint FISH (IFISH): A novel approach in FISH technique for *Helicobacter pylori* independent from paraffin-embedded tissue section. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 12-14, 2013, Madrid, Spain, P10.10. Helicobacter 2013;18 (Suppl. 1):121.

CAN D, ÇELİK Y, DEMİRAY-GÜRBÜZ E, GÜLDAŞ N, **BECERİKLİ T**, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, YILMAZ Ö. A questionnaire survey to determine the levels of knowledge and awareness about *Helicobacter pylori* infection for students at Dokuz Eylul University health campus. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 11-13, 2014, Rome, Italy, P04.01. Helicobacter 2014; 19 (Suppl. 1):101.

BECERİKLİ T, YILMAZ O, DEMİRAY-GÜRBÜZ E, SOYTÜRK M, SARIOĞLU S, ELLİDOKUZ H, ŞİMŞEK İ. Evaluation of stool real-time PCR to detect *Helicobacter pylori* and to determine clarithromycin susceptibility in comparison with biopsy real-time PCR in patients with dyspepsia. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 11-13, 2014, Rome, Italy, P10.03. Helicobacter 2014; 19 (Suppl. 1):121.

DEMİRAY-GÜRBÜZ E, **BECERİKLİ T**, YILMAZ O, SARIOĞLU S, SOYTÜRK M, ELLİDOKUZ H, ŞİMŞEK İ. Real-time PCR for diagnosing *Helicobacter pylori* and determining clarithromycin susceptibility in patient with dyspepsia. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 11-13, 2014, Rome, Italy, P10.02. Helicobacter 2014; 19 (Suppl. 1):121.

GUNES S, **BECERİKLİ T**, TIHMINLIOĞLU F, YILMAZ Ö. Investigation of antimicrobial activity to determine MIC value of cinnamon bark oil against *Helicobacter pylori*. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 11-13, 2014, Rome, Italy, P13.28. Helicobacter 2014; 19 (Suppl. 1):153.

BECERİKLİ T, YILMAZ O, DEMİRAY-GÜRBÜZ E, SOYTÜRK M, SARIOĞLU S, ELLİDOKUZ H, ŞİMŞEK İ. Which test to use for determination of clarithromycin and levofloxacin susceptibility in *Helicobacter pylori* infection? European Helicobacter Study Group (EHSG) XXVIIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 11-13, 2014, Rome, Italy, P13.09. Helicobacter 2014; 19 (Suppl. 1):148.

Ulusal hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

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 *Helicobacter pylori* enfeksiyonu arasında ilişki var mı? VI. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu. 37/P-AR9, 28 Eylül 2012, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

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 *Helicobacter pylori* enfeksiyonu arasında ilişki var mı? 9. Ulusal Çocuk Gastroenteroloji Hepatoloji ve Beslenme Kongresi.184/PS-205, 18-21 Ekim 2012, The Marmara Otel, Antalya.

BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, TÜKEL S, YILMAZ Ö. Gastrik biyopsi örneklerinde *Helicobacter pylori*'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.

BECERİKLİ T, DEMİRAY GÜRBÜZ E, GÖKÇEKUYU BM, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *Helicobacter pylori* suşlarının klaritromisin ve levofloksasine karşı antimikrobiyal duyarlılığının değerlendirilmesi. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 260/P087, 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.

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 *Helicobacter pylori* enfeksiyonu arasında ilişki var mı? XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 410/P406, 3-7 Kasım 2012, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın.

SARIOĞLU S, YILMAZ Ö, ADALI Y, DEMİRAY GÜRBÜZ E, **BECERİKLİ T**. Gastrik biyopsilerde APCA pozitifliği ve mide biyopsi bulguları. 22. Ulusal Patoloji Kongresi. S17, 7-11 Kasım 2012, Manavgat, Antalya

CAN D, ÇELİK Y, DEMİRAY-GÜRBÜZ E, GÜLDAŞ N, **BECERİKLİ T**, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, YILMAZ Ö. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi öğrencilerinin *Helicobacter pylori* enfeksiyonu konusunda bilgi düzeyleri ve farkındalıkları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi VIII. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu. S.47, 19 Eylül 2014, İzmir.