

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DUODENAL ÜLSERLİ HASTALARDA
Helicobacter pylori
KLARİTROMİSİN VE FLOROKİNOLON İLAÇ DİRENCİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi
Biyolog
Gökhan ÖZDEMİR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yasemin BULUT

ELAZIĞ - 2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden yüksek lisans tezi olarak

kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yasemin BULUT

Danışman

Yüksek Lisans Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Prof. Dr. Yasemin BULUT

Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla danıştığım ve engin tecrübelerinden faydalandığım çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yasemin BULUT' a ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mustafa YILMAZ' a, Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN' a, Doç. Dr. Cem AYGÜN' e, Doç. Dr. Ulvi DEMİREL' e, Doç. Dr. Selçuk İLHAN' a, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının çok değerli öğretim üyelerine, dönem boyunca aynı ortamı paylaştığım arkadaşlarıma, tüm Anabilim Dalı çalışanlarına ve yalnızca yüksek lisans eğitimimde değil hayatım boyunca ilgi, sevgi ve desteklerini esirgemeyen anne ve babama en derin sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Gökhan ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER.....	VI
TABLolar.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. ÖZET.....	X
2. ABSTRACT.....	XII
3. GİRİŞ.....	1
3.1 Helicobacter pylori.....	1
3.1.1 Tarihçe.....	3
3.1.2 Epidemiyoloji.....	7
3.1.3 Sınıflandırma.....	8
3.1.4 Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	10
3.1.5 Kültür ve Üreme Özellikleri.....	12
3.1.6 Biyokimyasal Özellikler.....	13
3.1.7 Bulaş Yolları ve Patogenezi.....	14
3.1.8 Tanı.....	15
3.1.9 Tedavi.....	21

3.1.10 İlaç Direnci	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
4.1 Örneklerin Alınması ve <i>H. pylori</i> Teşhisi	27
4.2 DNA İzolasyonu	27
4.2.1 Dokulardan DNA İzolasyonu için ön hazırlık aşaması	27
4.2.2 DNA izolasyon aşaması	28
4.3 Biotinlenmiş primerlerle mütipleks amplifikasyon PCR	30
4.4 ELEKTROFOREZ	32
4.5 HİBRİDİZASYON (MANUEL)	32
4.5.1 Ön İşlemler	32
4.5.2 Hibridizasyon aşaması	33
4.6 GenoType® HelicoDR sonuç değerlendirme	34
Konjugat kontrol (CC)	36
Amplifikasyon kontrol (AC)	36
<i>Helicobacter pylori</i> (HP).....	36
Lokus Kontrol (gyrA, 23S RNA)	36
5. BULGULAR.....	38
6. TARTIŞMA	41
7. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER

Şekil 1. <i>H. pylori</i> 'nin elektron mikroskopik görüntüsü.	1
Şekil 2. <i>H. pylori</i> infeksiyonlarının yüzdelerini gösterir.....	8
Şekil 3. Makrolidlerin inhibisyon mekanizması	22
Şekil 4. <i>H. pylori</i> 'ye özgül oligonükleotid problemleri.....	23
Şekil 5. <i>H. pylori</i> 23 S rRNA' sında başlıca gözlenen mutasyonlar	24
Şekil 6. Klaritromisin'in etki mekanizması.	25
Şekil 7. <i>H. pylori</i> 23S rRNA' sı (Monstein ve ark., 2001).....	25
Şekil 8.Kontrol stribi üzerindeki bantlar.....	35
Şekil 9. Direnç problemleri	35
Şekil 10. GenoType HelicoDR testi sonucu DNA stripleri	40

TABLÖLAR

Tablo 1. <i>Helicobacter</i> Türleri	9
Tablo 2. <i>H. pylori</i> infeksiyonunu göstermek için kullanılan testler	21
Tablo 3. PCR karışımı hazırlanması	31
Tablo 4. PCR Döngüleri	31
Tablo 5. <i>H. pylori</i> ' nin yaş ve cinsiyete göre dağılımı	38
Tablo 6. <i>H. pylori</i> ilaç dirençleri	39
Tablo 7. Gen bölgeleri	39

KISALTMALAR

<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
MALT	: Gastrik mukoza ilişkili lenfoid doku lenfoması (Mucosa Associated Lenfoid Tissue)
CagA	: Cytotoxin-associated gene (Sitotoksin ile ilişkili gen) A
VacA	: Vacuolating cytotoxin (Vakuol oluşturuucu sitotoksin)
DÜ	: Duodenal ülser
IACR	: International Agency for Cancer Research
EUROGAST	: Geographic correlation of biological risk factors with Gastritis and Gastric cancer
IgM	: İmmunglobulin M
IgA	: İmmunglobulin A
IgG	: İmmunglobulin G
CLO	: Campylobacter like microorganism
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health)
NHL	: Non-Hodgkin lenfoma
POR	: Piruvate Flavodoxine oksidoreduktase
OOR	: Oxogluterate Acceptor oksidoreduktase
BHI	: Brain Heart Infusion Agar
PPI	: Proton pompa inhibitörü
PCR	: Polimeraze Chain Reaction

ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
UBT	: Urea breath test (üre nefes testi)
GÖRH	: Gastroözefajial reflü hastalığı
MÜ	: Mide ülseri
NSAİİ	: Non steroid anti inflamatuvar ilaçlar
NÜD	: Non ülser dispepsi
MIC	: Minimal inhibitör konsantrasyonu
QRDR	: Kinolon direnç belirleme bölgesi (Quinolone Resistance-Determining Region)
<i>Cag</i> PAI	: <i>Cag</i> Pathogenicity Island
TBE	: Tris Borate EDTA
SPSS	: Statistical package for the social sciences

1.ÖZET

Mikrobiyoloji ve gastroenterolojinin birlikte çalışmalarıyla keşfettikleri *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), 20. yüzyılda tıp alanında en önemli keşiflerden biridir. Bakteri üreaz enzimi ile üreden amonyak sentezleyerek midenin asit ortamını nötralize eder ve böylece kolonizasyonu sağlar. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu insanlarda en yaygın görülen bakteriyel enfeksiyonlardan biridir. Başlıca rezervuarı insanın midesidir. *Helicobacter pylori* mide mukoza tabakasında bulunan, gram negatif, spiral, 4-6 flagellalı, 2.5-5 µm uzunluğunda, 37 °C’de mikroaerofilik koşullarda üreyebilen üreaz, katalaz, oksidaz pozitif bir bakteridir. İlk defa 1997’de *H. pylori*’nin tüm genomu açıklanmıştır. Buna göre *H. pylori*’nin genom uzunluğu 1,6-1,73 Mb arasında değişir. *H. pylori* izolatlarının % 40’ı uzunluğu 1,5-23,3 Kb arasında değişen plazmidler içerirler. Ülkemizin % 85-90’ının dünya nüfusunda yarısından fazlasının enfekte olduğu *H. pylori*’nin eradikasyonu bu nedenle büyük önem taşır. Ancak tedavide kullanılan bazı antimikrobiyal ajanlara karşı bakterinin direnç geliştirmesi, eradikasyonda başarısızlığa yol açmaktadır. *H. pylori* zor ürediği için kültür ve antibiyogramındaki teknik zorluklar nedeni ile ucuz ve kolay uygulanabilen yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda, tedaviden önce direnç varlığının belirlenmesinin önemli olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada 48 adet duodenal ülserli 25 kadın (%53) 23 erkek (%47) hastaların biyopsi numunelerinden elde edilen *H. pylori* bakterisinin Florokinolon ve Klaritromisin antibiyotiklerine olan direnci moleküler yöntemler ile test edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde 48 duodenal ülserli hastanın 40’ında

(%83) Klaritromisin direnci, 33'ünde (%69) Florokinolon direnci toplamda 32 hastada da (%67) hem Klaritromisin hem de Florokinolon direnci GenoType® HelicoDR yöntemi ile kısa sürede tespit edilmiştir. Moleküler testlerin kısa sürede sonuç vermesi dikkate alındığı zaman, yapılan çalışma ile gereksiz ilaç kullanımının ve zaman kaybının önüne geçilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, *H. pylori*, duodenal ülserli hastalar, genotip, PCR.

2.ABSTRACT

Determination of *Helicobacter pylori* Klaritromisin and Floroquinolone drug resistance in patients having duodenal ulcer.

Helicobacter pylori (*H. pylori*), discovered through multidisciplinary studies of the science of gastroenterology and microbiology, and 20. century medicine is one of the most important discoveries that marked. By synthesizing ammonia from urea by the enzyme urease bacterial neutralizes the acid environment of the stomach and thus allows colonization. It is one of the most common bacterial infections *Helicobacter pylori* infection in humans. The main reservoir is the human stomach. The mucous layer of the stomach in *Helicobacter pylori*, gram negative, spiral, 4-6 flagellal, 2.5-5 µm of a length, which can grow under microaerophilic conditions at 37 °C urease, catalase, oxidase positive is a bacterium. The entire genome of *H. pylori* are described for the first time in 1997. Accordingly, the genome of *H. pylori* length 1,6 mb, 1.73 meters varies between. *H. pylori* isolates 40% of length: 1.5 Kb plasmids ranging from 23.3 of contain. More than half of the world's population, 85 to 90 percent of the eradication of *H. pylori* infected our country, therefore, is of great importance. But some of antimicrobial agents used in treatment against the development of resistance of bacteria in the eradication of lead to failure. Culture and sensitivity of *H. pylori* bacteria a breeding applications in difficult due to technical difficulties, easy to implement, and have shown that cheapest of the methods is required. Studies pre-treatment the importance of the detection of the presence of resistance is emphasized.

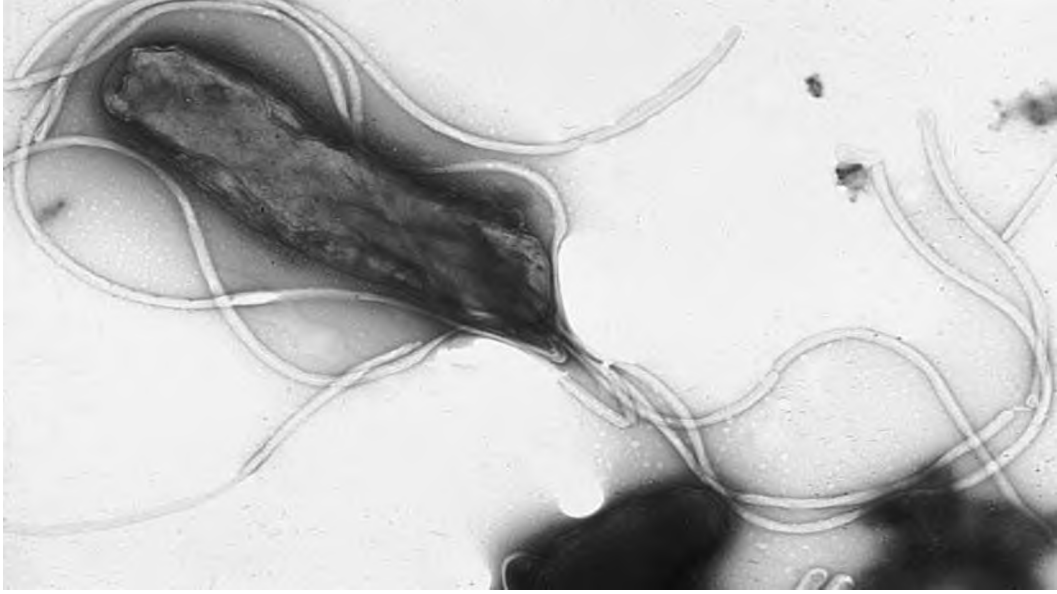
In this study, 48 duodenal ulcers with 25 women (53%) of 23 male (47%) of patients biopsy specimens obtained from *H. pylori* and Clarithromycin to its resistance to Fluoroquinolone antibiotics was tested by molecular methods. The study of 48 patients with duodenal ulcers as a result of 40 (83%) the Clarithromycin resistance, 33 (69%) also Fluoroquinolone resistance in a total of 32 patients (67%) with both Clarithromycin and Fluoroquinolone resistance GenoType® HelicoDR with the method in a short time have been identified. Molecular tests in a short period of when the results are taken into account, the study has been to prevent the loss of time and unnecessary with the use of medications.

Key words: *Helicobacter pylori*, *H. pylori*, patients with duodenal ulcers, genotype, PCR

3.GİRİŞ

3.1 *Helicobacter pylori*

Yüzyılımızın başından bu yana *H. pylori*, insanda mide sıvısı içerisinde görüldüğü halde, peptik ülser, mide kanseri ve kronik antral gastrit ile ilişkisi 1983 yılında anlaşılmıştır (1).



Şekil 1. *H. pylori*'nin elektron mikroskopik görüntüsü.

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~tsutsumi/image/002/2-6.jpg>

H. pylori; spiral şekilli, kamçılı, hareketli, katalaz, oksidaz ve üreaz pozitif, gram negatif, 2 - 4 µm ebatlarındadır (Şekil 1). Bu bakteri, mukus içinde koloniler yapar ve mide antrumunda yerleşerek yaşar. Sahip olduğu üreaz enzimi sayesinde üreden amonyak sentezleyerek, çevresinde bazik bir ortam oluşturur ve kendini midenin asit ortamından korur. *H. pylori*, en iyi mikroaerofil ortamlarda yaşayabilir ve üreyebilmesi için % 5 - 15 oranında CO₂ bulunan ortama ihtiyacı vardır (2, 3). Bu bakteri, fekal-oral ve oral-oral olarak bulaşır. Bakteriyal enfeksiyonlar arasında dünyada en sık rastlananlardan biridir (4, 5). Kalabalık

yaşam şartlarının, hijyen koşullarının kötü ve sosyo ekonomik düzeyin düşük olması enfeksiyonun yayılma düzeyini artırır. Prevalans yaş ve coğrafik lokalizasyona bağlıdır. Yaşın ilerlemesi ile birlikte enfeksiyon riski artmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda prevalans % 46 - 78 oranındayken ABD' de 60 yaşın üzerindeki insanlarda prevalans % 50 - 60'lara kadar ulaşmıştır (4, 6, 7). *H. pylori* enfeksiyonunun devamında B lenfositlerine bir dizi immünolojik reaksiyondan sonra antijenler sunulur ve IgM, IgA, IgG antikorları sırayla üretilir. Uzun bir zaman IgG - IgA antikorları yüksek düzeyde gözlenirken, IgM antikorları birkaç ay içinde kaybolur. Bu antikor düzeylerinde düşme, antimikrobiyal tedavi sonucu eradikasyon sağlanırsa gözlenir (8). *H. pylori*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda karın ağrısı, bulantı ve kusma akut dönemde gözlenir. 3 - 14 gün semptomlar sürer ve zamanla kronik süperfisial gastrit gelişir. Fonksiyonel dispepsi (non - ülser dispepsi), peptik ülser, gastrit maligniteye (lenfoma, adenokarsinom) ilerleyebildiği gibi asemptomatik olarak da kalabilir. EUROGAST (Geographic correlation of biological risk factors with Gastritis and Gastric cancer) araştırma grubunun bir çalışmasında *H. pylori* varlığının mide kanseri riskini 6 kat arttırdığı saptanmıştır (9, 10, 11). Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonunun tanısında invaziv ve noninvaziv yöntemler kullanılabilir. İnvaziv yöntemler histopatolojik inceleme, hızlı üreaz ve endoskopik biyopsi testleridir. Bu yöntemler maliyeti yüksek ve tedaviye yanıtı değerlendirmede pratik değildir daha çok aktif enfeksiyonun tanısında güvenilirdir (12). Üre nefes testi, seroloji, ve gaita antijen testleri non-invaziv yöntemler içinde yer alır. Sadece venöz girişim gerektirdiğinden seroloji kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Serolojik

olarak IgG - IgA antikorlarının ölçümü, aktif enfeksiyon tanısı için güvenilir değildir ancak özellikle tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde faydalı olabilir (13). Non - invaziv, hem aktif enfeksiyon için iyi bir belirteç, hem de üre nefes testi ve endoskopik biyopsi ile karşılaştırıldığında maliyetinin daha düşük olması ile gaita antijen testi avantajları olan bir tanı yöntemidir (14, 15). *H. pylori* açısından antibiyotik tedavisinden 28 gün sonra testlerin negatif olması *H. pylori*'nin eradike edildiğini gösterir. Proton pompa inhibitörleri, bizmut tuzları, antibiyotikler, H₂ reseptör blokörlerinin yer aldığı çeşitli kombinasyonlar bu eradikasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Bir tek ilaç ile etkin tedavi sağlanamamaktadır. Tedavide son yıllarda çoğunlukla, Ranitidin bizmut sitratın, Klaritromisin ya da Klaritromisin + Amoksisilin ile kombinasyonu ve proton pompa inhibitörleri + Klaritromisin + Amoksisilin / Metranidazol kombinasyonu kullanılmaktadır ve 1 - 2 haftada tedavi edilmektedir. Eradikasyon oranlarının % 95'e vardığı yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (16).

3.1.1 Tarihçe

Gastroduodenal hastalıklar ve etiyolojisine tıbbın ilgisi yazılı tıbbın ilk günlerine kadar uzanmaktadır. Hipokrat'ın "epigastrik yanma ve şişlik" olarak tanımladığı gastroduodenal hastalıkların etiyolojisini, İbni Sina (980 - 1037) "yemek ile gastrit ağrı" arasındaki ilişkide aramış, Donati M. (1586) ülserli hastalarda mide asidine dikkat çekmiştir. Bir bakteri ile gastrit yakınmalarının muhtemel ilişkisi ilk defa Alman bakteriyolog Bottcher G. ve arkadaşı Fransız Letulla M. (1875) tarafından ileri sürülmüş, ülser tabanında ve kenarında bakteri kolonilerini göstererek, kültür ortamında üretemedikleri bu bakterilerin ülser

neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (17, 18). Patolog Klebs C. 1881’de basil benzeri organizmaların midede varlığını bildirmesine rağmen, o dönemde konu fazla ilgi çekmemiştir. Bottcher hayvanların gastrointestinal sisteminde spiral bakterinin varlığını bilimsel olarak bildirmiştir (19). Dr. Jarowski W. (1889) insandan aldığı mide yıkama suyu sedimentlerini incelemiş, sıvı içerisinde çomak şeklindeki bakterilerin yanı sıra, spiral şekilli basillerin varlığını göstererek, bunlara “*Vibrio regula*” adını vermiştir. Bu araştırmacı tarihe “spiral bakteriler gastrit etkenidir” iddiasını ilk ileri süren araştırmacı olarak geçmiştir. İtalyan araştırmacı Bizzozero G. (1892) köpeklerin ülseratif lezyonlu mide biyopsi örneklerindeki, muhtemelen bu gün *H. heilmannii* veya *Gastrospirillum hominis* olarak tanımladığımız spiral şeklindeki bakterileri ve artmış üreaz aktivitesini göstererek, gastrit ve ülserin hem etiyolojisi, hem de patofizyolojisi hakkında son derece faydalı bilgiler sunmuştur (17, 18). Krienitz (1906) mide kanserinde benzer mikroorganizmaların varlığını gösterdikten sonra, Muhlens, Luger, Neuberger de ülseratif özellikteki mide kanserlerinde bu yapıları göstermişlerdir. Neuberger aynı zamanda sağlıklı kişilerin mide suyu ve mide mukozasında da spiral bakterinin varlığını göstermiştir (20).

Sir Berkeley Moynihan, aşırı mide asidinin duodenum mukozasını dijesyona uğratarak ülser oluşturduğunu ileri sürmüştür. Schwartz K. (1910) “Asit yoksa ülser yok” aforizmasını ortaya atmış, gastroduodenal hastalıkların patofizyolojisinde, tedavi protokollerini de uzun yıllar etkileyecek olan yeni bir tartışmayı başlatmıştır. Bu hipoteze bağlı olarak gastrit tedavisinde 1915 yılından itibaren anti-asitler kullanılmaya başlanmıştır. Penisilinin keşfi ile gastroduodenal

patolojide mikroorganizmaların muhtemel rolü varsayımından hareketle Lieber C. ve Lefevre A. (1957) antibiyotiklerin gastrit ürenin amonyağa dönüşümünü engellediğini ve bu sebeple tedavide kullanılabileceklerini göstermişlerdir. Bu bildiriden kısa bir süre sonra Yunanlı gastroenterolog Lykoudis J. (1957) önce kendisindeki peptik ülseri tedavi için antibiyotik kullanmış, hastalığını tedavi edince 22.453 peptik ülserli hastanın tedavisinde antibiyotik kullanarak başarılı olduğunu bildirmiştir. Steer H.W. ve Colin Jones 1975 yılında gastrit biyopsi örneklerinde epitele yakın konumda bakterilerin varlığını gösterirken, Rollasan ve arkadaşları da 1981 yılında gastrit spiral bakteriyi göstermişler, ancak midenin yüksek asiditesi nedeniyle burada bir mikroorganizmanın yaşayabilmesine ve hastalık yapabilmesine ihtimal vermemişlerdir. Yapılan araştırmaların çoğunlukla postmortem çalışmalar olması, hastalık etkeni olabileceği bildirilen mikroorganizmaların genellikle bulaş kaynaklı olabileceği şüphesine yol açmıştır (17, 18, 19, 21).

Nihayet, patolog Robin Warren (1979) *H. pylori* ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki ilişkiyi keşfetmiş ve Barry J. Marshall (1982) mikroorganizmayı kültür ortamında üretebilmiştir. İki araştırmacı yaklaşık 4 yıl süren çalışmalarını 1983 yılında Lancet dergisinde yayınlanan makaleleri ile Tıp Dünyasına duyurmuşlardır. Patolog Warren R. yıllardır gastritli olgularda gözlemlendiği bakteriyel yapıları gastroenteroloji asistanı Marshall B.J. ile birlikte değerlendirmeye başlayarak “gastrit - bakteri ilişkisi” konusundaki çalışmaların ilk adımını atmışlardır. *H. pylori*’nin virulans çalışmalarında hayvan modeli başarılı olmadığından Koch postulatlarını gerçekleştirmek için Dr. Marshall bu

bakteri ile gönüllü olarak kendisini infekte etmiş ve bir süre sonra kendisinde gastrit tablosunun geliştiğini görmüştür. Bu gözlemlere dayanan Dr. Marshall, bu bakterinin sadece mideyi infekte etmekle kalmayıp, mide dokusunda inflamasyonu arttırdığını da deneysel olarak ispatlamıştır. Buna göre, bu bakterinin özellikle antral gastrit ve ülser ile etiyolojik ilişkisi olduğu kesinlik kazanmıştır (18, 20, 22).

Bakteri yapısal olarak *Campylobacter*lere benzediği için önceleri “Campylobacter - like microorganism (CLO)” şeklinde isimlendirilmiş fakat daha sonra yapılan çalışmalar neticesinde DNA zincir yapısı, 16S rRNA (Ribozomal RNA) yapısı, yağ asitleri kompozisyonu ve enzimlerinde birçok farklılıklar olduğu anlaşılmıştır. 1989’ da Goodwin, bu bakterilerin benzer fenotipik özelliklere sahip *Campylobacter*, *Flexispira* ve *Wolinella* cinslerine ait olmadığını bildirmiştir. İn vivo şartlarda gözlenen helikal görüntü ve çoğunlukla midenin pilor bölgesinden izole edildiği için bu bakteri “*Helicobacter*” şeklinde tanımlanmış yeni bir cins içinde “*Helicobacter pylori*” türü olarak adlandırılmıştır (17, 23, 24).

H. pylori infeksiyonlarının öneminin anlaşılması üzerine, ilk olarak “Avrupa *Helicobacter pylori* Çalışma Grubu” oluşturulmuştur (1987). Bakterinin gastrit kanser ile ilişkisinin dört çalışma ile ispatlanmasından (1991) sonra da, Dünya Sağlık Örgütü’ nün (WHO - World Health Organisation) bir kolu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC - International Agency for Research on Cancer Working Group) 1994 yılında yeniden mevcut verileri gözden geçirerek *H. pylori*’ yi insanlarda birinci sınıf karsinojen olarak ilan etmiştir. Yine aynı yılda NIH (National Institute of Health) konsensusunda *H. pylori*’nin en

önemli nedeni olduğu peptik ülser hastalığının ve ülserli hastaların bu mikroorganizmanın eradikasyonu için tedavi olmaları gerektiği kabul edilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunun gastrit, MALT lenfoma, Non - Hodgkin Lenfoma (NHL), diğer lenfoproliferatif hastalıkların gelişmesiyle de ilişkisi bulunmuştur (17, 25 - 29).

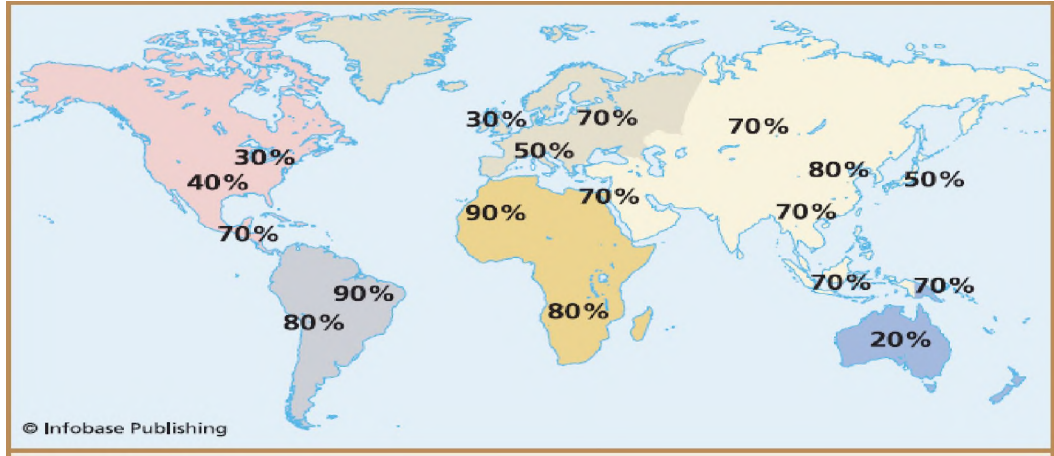
Virulansın tespitine yönelik çalışmalarla VacA ve CagA toksinlerinin keşfedilmesi, türler arasında virulans farklılıklarının anlaşılmasını sağlamıştır (30, 31).

Marshall B.J. ve Warren R.' ye *H. pylori* ile ilgili çalışmaları sebebi ile 2005 yılında "Fizyoloji ve Tıp bilimleri" alanında Nobel ödülü verilmiştir (32, 33).

3.1.2 Epidemiyoloji

H. pylori enfeksiyonu, dünyadaki en yaygın kronik bakteriyel hastalıktır (34). Bu nedenle sadece gastroduodenal ülser oluşumunda değil, daha değişik organ ve sistemlerde de farklı klinik tabloların nedeni olarak kabul edilmeye başlanmıştır. *H. pylori* prevalansı ABD ve gelişmiş ülkelerde % 30' larda iken, bu oran gelişmekte olan ülkelerde %80'leri bulmaktadır. *H. pylori* sıklıkla çocuklukta alınmakta olup, yaşla ilişkisi doğum - kohort etkisine bağlıdır. Kolonizasyon için yaştan başka diğer risk faktörleri arasında düşük sosyoekonomik sınıftan olma, çocuklukta kalabalık ve düşük gelirli ailede yaşamış olmak yer almaktadır. Çocuk yaştan tutulumun önemine örnek; Cezayir, Fildişi sahili, Tayland, S. Arabistan, Şili, Peru, G. Hindistan, G. Afrika ve Brezilya'da insidans 0 - 20 yaş arasında % 13 - 70 iken, 70 yaşın üzerinde bu oran % 70 - 90' lara ulaşmaktadır. Yine

İngiltere, Fransa, İskandinav ülkeleri, İtalya, San Marino, Belçika ve ABD' de çocukluk çağında seropozitiflik % 5 - 15 iken, 30 - 75 yaşlar arasında bu oran % 20 - 65' tir (35). *H. pylori* için en önemli rezervuar insandır (Şekil 2). Aynı aile bireyleri benzer suşları taşıyabilirler. İnsandan insana bulaş esas iken, bunun fekal - oral veya oral - oral yolla olup olmadığı net değildir. Su kaynaklarında *H. pylori* DNA' sının görülmesi, kontamine suların gelişmekte olan ülkelerde insan kolonizasyonuna yol açabileceği gerçeğini ortaya koymuştur. Birçok çalışma, bu olası yollardan hangisinin bulaşta en önemli olduğunu araştırmaya odaklanmıştır (36). Gastroenterologlarda ve sağlık çalışanlarında, diğer gruplara oranla daha sık görülür (37). Cinsel yolla bulaş bildirilmemiştir.



Şekil 2. *H. pylori* infeksiyonlarının yüzdelerini gösterir

3.1.3 Sınıflandırma

H. pylori, ilk kez 1982 yılında Warren ve Marshall tarafından insanın mide mukozasından alınan endoskopik biyopsi örneğinden izole edilmiştir (38, 39, 40, 41, 42). İlk izole edildiğinde *Campylobacter pyloridis* (38, 39) daha sonra *Campylobacter pylori* olarak adlandırılmıştır (40, 43). Goodwin ve çalışma arkadaşları bu bakterinin *Campylobacter* soyuna ait olmadığını belirlemişler ve

1989 yılında *Helicobacter pylori* olarak yeniden sınıflandırmışlardır (40). *Campylobacter*’lerden başlıca farkları; üreyi çok hızlı olarak hidrolize edebilmesi, kını olan çoklu flagellaya sahip olması ve yağ asitleri profilleridir (43). Güçlü üreaz aktivitesi ile beraber *H. pylori*, karbonhidrat profilleri ve antibiyotiklere karşı farklı duyarlılığa sahip olması ile de *Campylobacter* soyundan ayrılır (44). *H. pylori*, diğer karbonhidratları katabolize edemediği halde glikozu katabolize eder. Besiyerlerine amino asitlerin ilave edilmesi ile gelişebilirler. Bazı suşların gelişmelerinde bu amino asitlerle beraber serin ve alanin amino asitleride gereklidir (41). Başlıca *Helicobacter* türleri (Tablo 1):

Tablo 1. *Helicobacter* Türleri

TÜR	KONAK	DOKU	İLK BİLDİRİM
<i>H. pylori</i>	insan	MİDE	1985
<i>H. mustelae</i>	insan	GİS	1988
<i>H. cinaedi</i>	insan	GİS	1988
<i>H. felis</i>	Kedi	GİS	1991
<i>H. fenneliae</i>	Kedi	GİS	1991
<i>H. nemestrinae</i>	M.nemestrina	GİS	1991
<i>H. maridarum</i>	Rodent	GİS	1992
<i>H. acinonychis</i>	Domuz	GİS	1993
<i>H. bilis</i>	İmbret fare	GİS	1993
<i>H. hepaticus</i>	Fare	KARACİĞER	1994
<i>H. pametensis</i>	Kuş, domuz	GİS	1994
<i>H. pullorum</i>	İnsan	GİS	1995
<i>H. bizzazeronii</i>	Köpek	GİS	1996
<i>H. heilmannii</i>	Kedi, köpek, rat	MİDE	1996
<i>H. trogonum</i>	Rat	GİS	1996
<i>H. cholecystus</i>	Syrian hamster	GİS	1997
<i>H. rodentium</i>	Laboratuvar faresi	GİS	1997
<i>H. rappini</i>	Fare	GİS	1997
<i>H. salomonis</i>	Köpek	GİS	1997
<i>H. bovis</i>	Sığır	GİS	1999
<i>H. suis</i>	Domuz	GİS	1999

GİS: Gastro intestinal sistem

Bu türler morfoloji, boyut, kültürlerde üreyip üremediği ve etkilediği konakçıya göre ayrılmışlardır (45). *Helicobacter* türlerinin hepsi aynı tipte ve derece patolojik bozukluk oluşturmadıkları gibi bütün türleri patojenik değildir. *H. pylori*, insanlarda başlıca patojen olduğu halde, ülserli hastaların çok az bir bölümünde de *Helicobacter heilmannii* izole edilmiştir (45,46). *H. heilmannii*, *H. pylori*' ye nazaran daha ılımlı aktif akut gastritli hastalarda tespit edilmiştir (46). Şimdiye kadar *Helicobacter*' in üç türü insanların bağırsaklarının alt kısımlarında tespit edilmiştir (45).

3.1.4 Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

3.1.4.1 Morfolojik Özellikler

H. pylori S harfi şeklinde kıvrık veya ince spiral biçimde, yuvarlak uçlu, birden fazla kamçılı ve hareketli gram negatif bir bakteridir (47, 48). Bakterinin uzunluğu 3 - 5 µm (mikrometre) olup, genişliği 0.5 - 0.9 µm arasında değişmektedir (49). Kültür ortamında üretilen bakterinin kıvrımları azalmakta hatta kaybolup çomak biçimini alabilmektedir (50). Sayıları altıyı bulan polar flagellaları sayesinde hızlı hareket yeteneğine sahiptirler (47, 51, 52). Bazı kültürlerde asılı damla yöntemi ile bakterinin hareketsiz olduğu gözlenebilir. Bakterinin hızlı hareket edebilme yeteneği, mukus tabakasının en kalın olduğu antral bölgeye hızla ulaşmasını ve epitel ile mukustaki pH nötr ortama yerleşip mide asidinin zararlı etkisinden korunmasını sağlar (47, 53, 54). Özellikle invivo olarak sferik, V şeklinde, U şeklinde ve düz formları da gözlenebilir.

3.1.4.2 Fizyolojik Özellikleri

Bakteri en iyi mikroaerofilik ve çok nemli ortamlarda (% 98), 37 °C' de, % 5 - 10 karbondioksit ve % 5 oksijen içeren atmosferde 5 - 7 günde ürer (47, 55, 56). Kan içeren kalp - beyin agara (Brain Heart Infusion Agar) % 1 Iso Vitalex (B12 vitamini, L-glutamin, L-sistein) ilave edilirse *H. pylori* için ideal besiyeri hazırlanmış olur. Kan olarak % 5 at kanı kullanılır. Oda sıcaklığında ise canlılığını hızla kaybeder. Distile su ve serum fizyolojikte +7 °C derecede canlılığını günlerce sürdürür, % 20 glikoz kullanıldığında +4 °C derecede 5 saat canlılığını yitirmez, +4 °C derecede 2 gün veya -70 °C derecede uzun süre saklanabilir (57, 58, 59).

Besi yerlerine çeşitli antibiyotikler ekleyerek seçicilik özelliği kazandırılır. Diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek amacıyla besiyerlerine Kolistin, Vankomisin, Trimetoprim, Polimiksin B, Nalidiksik asit eklenir. Amfoterisin B, Sikloheksimid, Nistatin ise mantar üremesini engellemek için eklenebilir (58, 59). *H. pylori* ' nin duyarlı olduğu antibiyotikler ise Penisilin, Ampisilin, Sefalotin, Kanamisin, Gentamisin, Rifampin ve Tetrasiklidir. Direncin değişken olduğu ise antibiyotikler ise Metranidazol ve Klaritromisindir (47).

Kültür için ideal olanı biyopsi materyalinin hemen kanlı zengin besiyerine ekilmesidir. Zengin besiyeri olarak Mueller - Hinton, Brusella agar, Tripticase soy beyin - kalp infüzyon bazal besiyerine % 7 - 20 taze kan eklenerek hazırlanmış olan besiyeri bu amaçla kullanılmaktadır (58, 59, 60).

Besi yerinde 0.5 mm çapında, düzgün ve pigmentsiz koloniler oluşturarak üreyen, gram negatif, üreaz, katalaz ve oksidaz aktivitesi olan bakteriler *H. pylori* olarak tanımlanmaktadır (61).

Tüm suşlarda 33 – 40  C ısıda üreme görülebilir. 30  C ve 42  C’ de üreme azalır. Üreme 25  C’ de görülmez. *H. pylori* için uygun pH aralığı oldukça geniş olduğu halde (5.5 - 8.5), üremesini en iyi 6.9 - 8.0 pH aralığında gerçekleştirir. Mikroorganizma dış ortamda düşük pH derecelerine ve oksijen ile temasa son derece duyarlıdır. Safra içeren ortamlarda kısa sürede ölür. Tekrarlayan pasajlarda üretilmesi zordur. Klasik besiyerlerinde 4 pasajdan sonra canlılığını kaybeder (51, 55).

3.1.5 Kültür ve üreme zellikleri

Mikroaerofilik şartlarda rerler; % 5 O₂, % 75 N₂, % 10 CO₂, % 10 H₂ gazlarından oluşan nemli bir atmosferde inkübe edilmelidir. Aerobik şartlarda bakteri metabolizmasında yaşamsal öneme sahip olan POR (Piruvate Flavodoxine oxidoreductase) ve OOR (Oxogluterate Acceptor oxidoreductase) enzimleri inhibe olmaktadır (62). Laboratuvar pasajları sonrası biraz aerotoleran hale gelirler. Anaerobik şartlarda zayıf rerler. 30 - 37  C’ de rer, fakat 25  C’ de reyemezler (63).

Karmaşık besin gereksinimleri olan bakteriyi üretmek için besiyerine tam kan, hemin, mısır unu, yumurta sarısı gibi zenginleştirici maddeler katılmalıdır (64). BHI (Brain Heart Infusion) agar, Brucella agar, Columbia agar ve Skirrow besiyerleri bu amaçla kullanılmaktadır. Bunlarda % 5 - 7 oranında at veya koyun kanı kullanılsa da insan kanının da kullanılabileceği bildirilmiştir (65). Ayrıca

besiyerlerine çeşitli antibiyotiklerin ilavesiyle seçiciliğin artırılabilceği rapor edilmiştir. Bu amaçla besiyerlerine gram pozitif mikroorganizmalar için Vankomisin veya Teikoplanin, Gram negatif basiller için Polimiksin, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Kolistin veya Sefsulodin, funguslar için Amfoterisin B veya Nistatin ilave edilmelidir (65).

Mide biyopsi örneklerinden ilk izolasyonda 3 - 4. günde üreme görölse de kültürde üreme olmadı diyebilmek için 7 - 10 gün beklemek gerektiği vurgulanmıştır. Pasajlanan kültürlerde ise 48 - 72 saatlik inkübasyon sonucunda üreme görüldüğü bildirilmiş ve küçük S tipi gri - saydam görünümlü koloniler oluşturduğu bildirilmiştir (65).

Kültürde üreyen kolonilerden yapılan Gram boyama, katalaz ve oksidaz pozitifliği, üreaz enzimi içermesinden yararlanılmaktadır (66). Katalaz negatif mutant suşlar olabileceği de bildirilmiştir (65).

3.1.6 Biyokimyasal Özellikler

H. pylori çomak ya da virgül şeklindeki bu bakteri, üreaz, katalaz, oksidaz pozitif ve zorunlu mikroaerofildir. Nitratların nitrite indirgenmesini, karbonhidratların oksidasyon ve fermentasyonunu yapamaz. *H. pylori*, enerjiyi muhtemelen aminoasit ve yağların metabolizmasından sağlamaktadır (67, 68).

H. pylori, üreaz, katalaz, alkalen fosfataz, DNAase, lösinaminopeptidaz ve gama - glutamil aminopeptidaz enzimleri salgılayabilir. Bu enzimlerden, özellikle üreaz testinin pozitifliğine yol açan üreaz enzimi, doğrudan mide örneklerinden *H. pylori*' nin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu bakteri, antibiyotik duyarlılığı açısından *Campylobacter fetus*' e benzer. Sefalosporinler,

Metronidazol, bizmut bileşikleri, Penisilinler, Tetrasiklinler, Eritromisin, Rifampisin ve aminoglikozoidlere duyarlıdır. Sefsulodin, Polimiksin ve Kotrimoksazol' e dirençlidir. Ayrıca, safra tuzlarına duyarlı olduğu için bağırsaklarda üreyemez (69,70).

3.1.7 Bulaş Yolları ve Patogenezi

H. pylori eşler arasında ve aile içi bireylerin birbirine yakın teması ile bulaşabilir. *H. pylori* enfeksiyonunda genetik yatkınlık söz konusudur. Ancak seksüel aktivite bir risk faktörü değildir. *H. pylori* bazı çalışmalarda tükürükten ve dental plaktan da izole edilmiştir. Kullanma ve içme sularında kontamine gıdalarla da bulaşabilir. Evcil kümes hayvanları ve kedi ile de bulaşabilir. Bu bakteriye sudan kaynaklanan enfeksiyonlarda rastlanması ve feçesten izole edilmesi fekal-oral yolla bulaşın olduğunu gösterir (71, 72).

Mide mukozası, insan organizmasında *H. pylori*' nin tek yaşayabildiği yerdir. Genellikle bu bakteriye mukoza biyopsi örneklerinde rastlanır; mide salgıları, safra ve tükürükte de bulunabilir. Genç yaşlarda etkenin prevalansı yaklaşık % 20 iken, ilerleyen yaşlarda artarak % 50' lere çıkar. *H.pylori* mukus salgısı yapan yerlerde daha kolay üreyebildiği için en sevdiği yer midenin antrum mukozasıdır. Bu bölgede yüzeye tutunarak çoğalır ve doku invazyonu yapmaz. Mide mukozasını örten mukus tabakasındaki nötrale yakın pH, mikroorganizmanın yaşamasına imkan sağlar. Mide salgı bezlerinin içerisinde de üreyebilir. Bulunduğu yerde mukozalarda üreyerek peptik ülser, mukozal değişikliklere ve kronik aktif gastrit gibi hastalıklara neden olur. Etkenin epidemik karakterlerde akut gastrit ve hipoklorhidri yaptığını bildiren çalışmalarda

mevcuttur (73, 74). Kronik aktif gastritte *H. pylori*' nin mukoza yüzeyinde oluşturduğu bakteri kolonizasyonunun neden olduğu polimorf çekirdekli lökosit infiltrasyonu mevcuttur. Nötrofiller içerisinde fagosit edilmiş şekilde de *H.pylori*' ye rastlanabilir (75, 76).

3.1.8 Tanı

İnvaziv (hızlı üreaz testi, kültür, histoloji,) ve non - invaziv (serolojik testler, üre nefes testi, polimeraz zincir reaksiyonu, *H. pylori* gaita antijen testi) testleri *H. pylori* tanısında kullanılır. Her testin kendine göre üstünlüğü vardır fakat henüz her yönüyle mükemmel bir test bulunamamıştır. Bunların hangisinin nerede ve hangi hasta için kullanılacağına hekim karar vermelidir. Serolojik testler *H. pylori* ile temasın araştırılmasında ve kitle taramalarında kullanılır. Histolojik yöntemler *H. pylori* enfeksiyonunun yaygınlığını ve mukozal hasarı gösteren tek yöntemdir. Tedavi öncesi hızlı üreaz ve histoloji, tedavi takibinde ise üre solunum testi daha yararlıdır. İnvaziv testlerde doğru tanı için endoskopların, biyopsi forsepslerinin dezenfekte edilmesi ve hastaların testten en az bir hafta öncesinden antibiyotik ve PPI (Proton pompa inhibitör)' leri kesmiş olması gerekir (77, 78).

3.1.8.1 İnvazif Yöntemler

Bu testler içinde endoskopik olarak alınan materyalin kültürü, histopatolojik incelemesi, üreaz testi yer almaktadır (79).

3.1.8.1.1 Kültür

“Altın standart” olarak kabul edilmektedir. Biyopsi örneğinin hem çikolata agar gibi selektif olmayan bir besiyerine hem de Skirrow besiyeri gibi antibiyotik içeren selektif bir besiyerine çift ekimi yapılır. 35-37 °C’ de, nemli mikraerofilik

(% 5 oksijenli) bir ortamda, 2 - 5 gün inkübe edilir. S veya Virgül şeklindeki, üreaz, katalaz ve oksidaz aktivitesi olan bakteriler *H. pylori* olarak tanımlanır. Aynı zamanda bakterinin patogenetik ve büyüme faktörlerinin, metabolik ürünlerinin araştırılmasına ve antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılmasına olanak sağlar (79, 80). En önemli dezavantajları: pahalı, izolasyon için birkaç gün gerektirmesi, çok zahmetli olması ve laboratuvarlar arasında optimal duyarlılığın sağlanmasında zorluklar olmasıdır.

3.1.8.1.2 Histopatolojik inceleme

Histopatolojik olarak midenin farklı bölgelerinden alınan doku örneklerinin incelenmesi hem bakteri hem de oluşan doku hasarı konusunda önemli bilgiler verir. İnflamasyon, MALT, gastrit kanser varlığı ve metaplazinin derecesi araştırılır. Genellikle hematoksilen - eozin boyama kullanılmaktadır. Kesin sonuç alınamazsa Giemsa gibi özel bir boyama önerilmektedir. Giemsa, akridin oranj, Wright, gümüş, immünfloresan ve immünperoksidaz boyama yöntemlerinin duyarlılığı hematoksilen - eozine göre daha yüksek bulunmuştur (79, 80). Duyarlılığı kültüre göre daha fazladır. Ancak gastritin yama tarzında olması ve biyopsinin yanlış bölgeden alınması veya çok az bakteri varlığında yalancı negatiflik olabilmesi ve zaman alıcı bir yöntem olması gibi dezavantajları vardır.

3.1.8.1.3 Üreaz testi

Her yerde yapılabilecek kolay, hızlı ve ucuz bir testtir. Üre içeren besiyerine biyopsi örneği alınır ve 37 °C’ de inkübe edilir. Üreaz aktivitesi ile bakteri ortamdaki üreyi amonyak ve karbondioksit'e dönüştürür. Besiyerinin pH’

sı artar, pH indikatörü ile renk değişikliği (sarıdan kırmızıya doğru) araştırılır. Sonuç genellikle iki saat içinde alınır. İnkübasyon süresini uzatmak duyarlılığı artırır. Bir saat içinde bu testin duyarlılığı % 60 iken, 24 saatte duyarlılık % 90' dan fazladır. Yalancı pozitif sonuçlarla karşılaşılabilmesi en önemli dezavantajdır. Yalancı pozitiflik aşırı bakteri üremesinin olduğu uzun inkübasyon ve yaşlılık durumunda olabilir. Ayrıca yakın zamanda proton pompa inhibitörleri, bizmut tuzları, antibiyotik ve sükralfat kullanımı veya safra reflüsü durumunda üreaz aktivitesi değişikliğe uğrayacağından yanlış sonuçlarla karşılaşılabilir (79, 80).

3.1.8.1.4 Moleküler tanı yöntemleri

H. pylori' nin özgün olarak taranmasında gastrik biyopsi örneklerinde bakterinin 23S rRNA, vacA ve glmM gibi farklı hedef genlerine yönelik PCR yöntemi kullanılmaktadır. Ancak tanı yöntemi olarak bu testler rutin uygulamalarda pek fazla tercih edilmemektedir. İnhibitörlerin varlığı nedeni ile yanlış negatif sonuçların alınabilmesi, maddi açıdan ekonomik olmaması ve uygulamadaki teknik zorluklar PCR uygulamalarında karşılaşılabilecek dezavantajlardır. Tükürük, gastrit sıvı, safra, dışkı gibi içinde az sayıda bakteri bulunan örneklerde mikroorganizma DNA' sının saptanarak noninvaziv olarak *H. pylori* tanısı yapılabilmesine olanak sağlayabilmesi PCR' ın üstünlüğüdür (81, 82, 83). Moleküler yöntemler, *H. pylori* suşları arasındaki genetik farklılıkların saptanması ve patojenitesinin araştırılması, epidemiyolojik açıdan hastalığın yayılma yolları ve araştırma çalışmalarında, antibiyotik direncine neden olabilecek mutasyonların tanınması amacıyla kullanılması uygun olan

yöntemlerdir. Antibiyotik kullanan hastalarda tedavi sonrası gastrit mukozadaki bakteri sayısı kültür ve diğer tanı yöntemleri ile tespit edilemeyecek kadar az olabileceğinden tedavi başarısının takibinde PCR' nin tercih edilebilecek yöntem olduğu bildirilmektedir. *H. pylori*' nin PCR ile taranmasında ve tanımlanmasında 23S rRNA geni, *cagA*, *ureA*, *ureB*, *ureC* ve *adhesin* gibi farklı gen dizileri kullanılabilmektedir (84, 85). Testin doğruluğunu etkileyen faktörler arasında bakteri yoğunluğu, örneğin hazırlanması, primer ve hedef DNA seçimi, PCR uygulaması ile ilgili teknik konular yer almaktadır (86). Değişik protokollerin uygulandığı, farklı hedef bölge ve primerlerin tercih edildiği PCR yöntemlerinde duyarlılığı ve özgüllüğü değişmektedir (87).

3.1.8.2 Noninvaziv Yöntemler

3.1.8.2.1 Üre nefes testi

Bu testte oral yoldan C13 veya C14 (radyoaktif karbon) işaretli üre alımında 20 - 30 dakika sonra solunan hava örnekleri toplanmakta ve bunlar daha sonra sintilasyon cihazlarında veya spektrometrik olarak sayılmaktadır. *H. pylori* pozitif kişilerde bakterinin üreaz enzimi ile işaretli üre parçalanır. Oluşan CO₂ solunum ile dış ortama verilen hava içerisinde saptanmaktadır. Duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksektir. Antibiyotik veya omeprazol tedavisi sırasında bu test yalancı negatif sonuçlar verebileceğinden uygulanmamalı, tedavi bitiminden en az bir ay sonra uygulanmalıdır (88).

3.1.8.2.2 Serolojik yöntemler

H. pylori tanısında kullanılan yaygın yöntemlerden biride 'serolojik yöntemler' dir. Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır (88). En sık

kullanılan serolojik yöntem, enzim işaretli katı faz immünassay (ELISA) yöntemidir (89). *H. pylori* infeksiyonu sistemik ve lokal antikor yanıtına neden olur. Özgül IgM antikorlar kısa süreli olarak yükselir, IgG ve IgA infeksiyon süresince artar ve tedavi edilmedikçe yüksek kalır. Tedavinin devamında eradikasyon sağlandıysa IgG ve IgA düzeyleri düşer ancak IgG düzeyi hiçbir zaman tamamen negatifleşmez. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, tedavi öncesi ve tedavi bitiminden itibaren 3 - 6 ay sonra olacak şekilde iki titrasyonun karşılaştırılması gereklidir (90). Bu testlerde kullanılacak antijenler çok önemlidir.

Genellikle üç tip antijen kullanılmaktadır;

- 1) Tam hücreler ve tam hücre parçaları gibi ham antijenler,
- 2) Isı değişken olmayan antijenler ve glisin ekstraktları gibi hücre parçacıkları,
- 3) 120 kDa antijen ve üreaz gibi zenginleştirilmiş antijenler (88).

Virulans genlerinin tesbit edildiği serolojik kitler de geliştirilmiştir (91).

“Western Blot”, immüno blotlama, bakterinin çeşitli bölümlerine karşı oluşan sıvısal bağışık yanıtı belirlemede kullanılan oldukça özgül ve duyarlı bir yöntemdir (92).

Serolojik olarak bir damla kan veya serum ile uygulanabilen hasta başı testleri idrarda IgG antikorlarını belirlemeye yönelik geliştirilmiştir ama bunların özgüllükleri ve duyarlılıkları düşüktür (91, 93, 94).

3.1.8.2.3 Dışkı örnekleri için kullanılan tanı yöntemleri

3.1.8.2.3.1 Dışkı kültürü

H. pylori safraya duyarlı bir bakteridir. Dışkı, anaerop ve fakültatif anaerop bakterilerden oluşan zengin bir normal floraya sahip ve safra asitlerinin yüksek oranda bulunduğu bir ortamdır. Bu nedenlerden dolayı pasajın çok hızlı olduğu diyareli olgularda dışkıda *H. pylori* üretilmişse de dışkı kültüründe *H. pylori* üretmek oldukça zordur (95).

3.1.8.2.3.2 Dışkı antijen testleri

Ticari olarak hazırlanmış monoklonal ve poliklonal antikor testleri bulunmaktadır. Poliklonal testlerin duyarlılığı değişken olmakla beraber özgüllüğü oldukça yüksek saptanmıştır (96, 97, 98). Monoklonal testler ise yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermiştir (99). Monoklonal antikor test hasta başı test olarak geliştirilmiş sonuçları oldukça duyarlı ve özgül olan testlerdendir (Tablo 2) (100).

3.1.8.2.3.3 Dışkıda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR inhibitörleri açısından dışkı ortamı çok zengindir. Bu yüzden uygulanacak inhibitör uzaklaştırılması ve DNA ekstraksiyon yöntemi dışkıda PCR uygulamasında çok önemlidir.

Inhibitörlerin uzaklaştırılmasında dışkı filtrasyon yöntemi kullanılır. PCR inhibitörlerine, polipropilen membran ile süzülen dışkı örneklerinde rastlanmamıştır (101).

Bir diğer inhibitör uzaklaştırma yöntemide immünmanyetik ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, antikorlarla kaplı manyetik boncuklar *H. pylori* yüzey antijenlerine karşı kullanılır. Basil ve kok formunda dışkıda bulunan *H. pylori* bu boncuklara yapışır, yıkamayla örnekteki inhibitörler uzaklaştırılır (102).

Dışkıdan DNA ekstraksiyonu için kullanılan bir başka yöntemde biyokimyasal saflaştırma yöntemidir (103).

H. pylori saptanması için dışkıda PCR yöntemi kullanılacağı zaman en az iki set primer kullanılması önerilmektedir (104). Ayrıca, *H. pylori* saptanmasında nested PCR yöntemleri, reamplifikasyon dışkıda testin duyarlılığını arttıracaktır (Tablo 2).

Tablo 2. *H. pylori* enfeksiyonunu göstermek için kullanılan testler

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Endoskopi gerekliliği
Histoloji	93-98	95-98	Evet
Kültür	77-95	100	Evet
Hızlı Üreaz Testi	89-98	93-98	Evet
¹³ C-UBT*	90-95	90-95	Hayır
¹⁴ C-UBT**	90-95	90-95	Hayır
Seroloji	88-95	86-95	Hayır
PCR yöntemleri	85-96	90-100	Evet(biyopsi) Hayır(tükürük)
Dışkı antijen testleri (Monoklonal)	90-94	98-99	Hayır

*Üre soluk testi (UBT-Urea Broath Test). Karbon 13 ile işaretlenmiş üre

** Üre soluk testi (UBT-Urea Broath Test). Karbon 14 ile işaretlenmiş üre

3.1.9 Tedavi

Bulaşıcı olduğundan ve uzun dönemde gastrit kanser, peptik ülser gibi bazı ciddi hastalık riskleri taşıdığından *H. pylori* enfeksiyonu mutlaka tedavi edilmelidir. Günümüzde kime test yapılacağı tartışma konusudur. Çoğu görüşler enfekte hastaların tedavi edilmesi ve dispepsili hastaların test edilmesi yönündedir. Enfeksiyon tedavi edilmediği zaman peptik ülser gelişeceği düşünülür. Non ülser dispepside çoğu hasta semptomatik olarak *H. pylori*

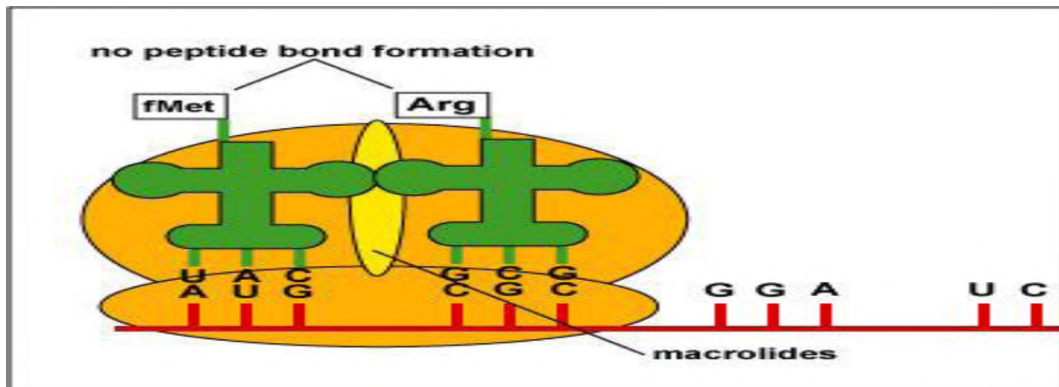
tedavisinden fayda görmez. Tedaviden kimin fayda göreceğini önceden ayırt eden bir metot olmadığından çoğu klinisyen test ve tedavi metodunu seçer (105).

H. pylori' nin standart üçlü tedavisinde; Klaritromisin 1000 mg (2 eşit dozda) + Amoksisilin 2000 mg (2 eşit dozda) + proton pompa inhibitörü (lansoprazol 30 mg. günde iki defa veya omeprazol 20 mg. günde iki defa) veya bizmut bileşiği kullanılır. 14 günlük tedavi ile en iyi sonuçlar alınmıştır (% 95 iyileşme oranı) (106). Tedavinin başarılı olup olmadığı tedaviden 4 - 6 hafta sonra dışkı antijen testi veya üre nefes testi ile değerlendirilir (105).

3.1.10 İlaç Direnci

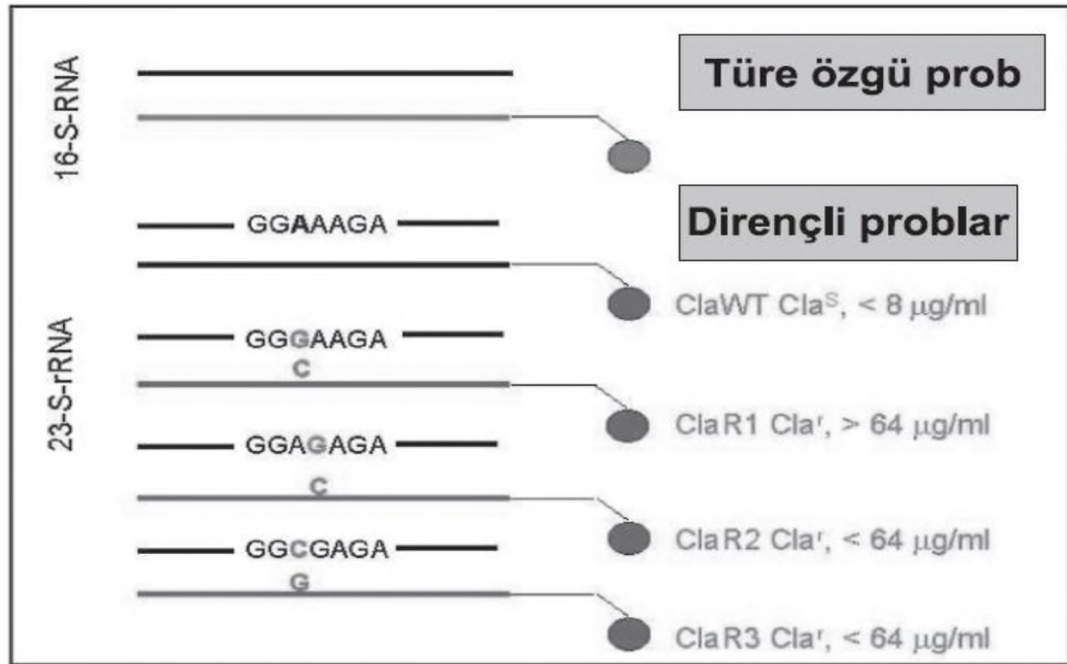
3.1.10.1 Klaritromisin Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

Klaritromisin, makrolid gruba ait olan, 23S rRNA molekülü V domaininin peptidil transferaz bölgesine bağlanan, bakteriyostatik bir antibiyotiktir. Bu bağlanma protein elongasyonunu engeller ve böylece etkili olarak bakteriyal protein sentezini durdurur (Şekil 3) (107, 108). Klaritromisinin diğer makrolitlerle antibakteriyal aktivitesi benzerdir ancak Klaritromisin asidik gastrit mukus tabakasında daha iyi absorbe olur ve bu yüzden *H. pylori*' ye karşı daha etkilidir (107).

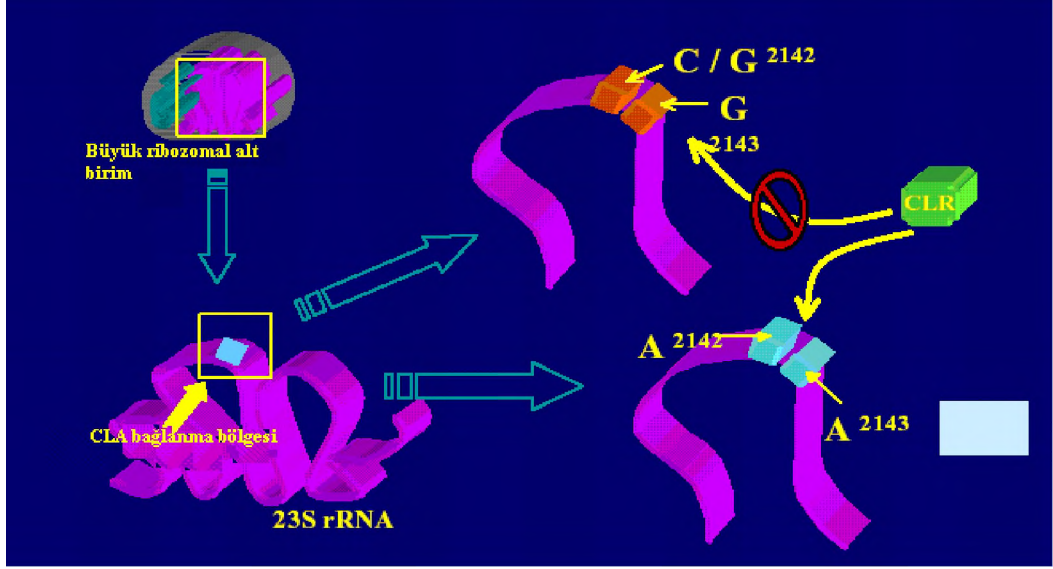


Şekil 3. Makrolidlerin inhibisyon mekanizması

Klaritromisin direnci *H. pylori*' de 23S rRNA' nın peptidil transferaz bölgesinde 2142, 2143 ve 2144 pozisyonlarındaki adeninin guanin ile yer değiştirdiği ve 2142 ve 2143 pozisyonlarındaki adeninin sitozinle yer değiştirdiği nokta mutasyonlarıyla meydana gelir (109 - 116). Birçok makrolid için ribozomların afinitesinin azalmasına neden olan *H. pylori*'de bu yer değişiklikleri artan dirençle sonuçlanır (Şekil 4). A2143G yer değişikliği düşük MIC (<64 mg/L)' li izolatlarda sık bulunurken, A2142G ve A2142C özellikle yüksek Klaritromisin MIC (>64 mg/L)' li izolatlarda daha çok görülmektedir. A2142G ve A2143G mutasyonları çok sık görülürken, A2142C mutasyonu daha az görülmektedir (107,117). Aynı zamanda A2115G, G2141A ve T2717C gibi diğer 23S rRNA mutasyonları da gösterilmiştir, ancak bu mutasyonlar çok nadir gözlenmektedir (110, 118, 119, 120).



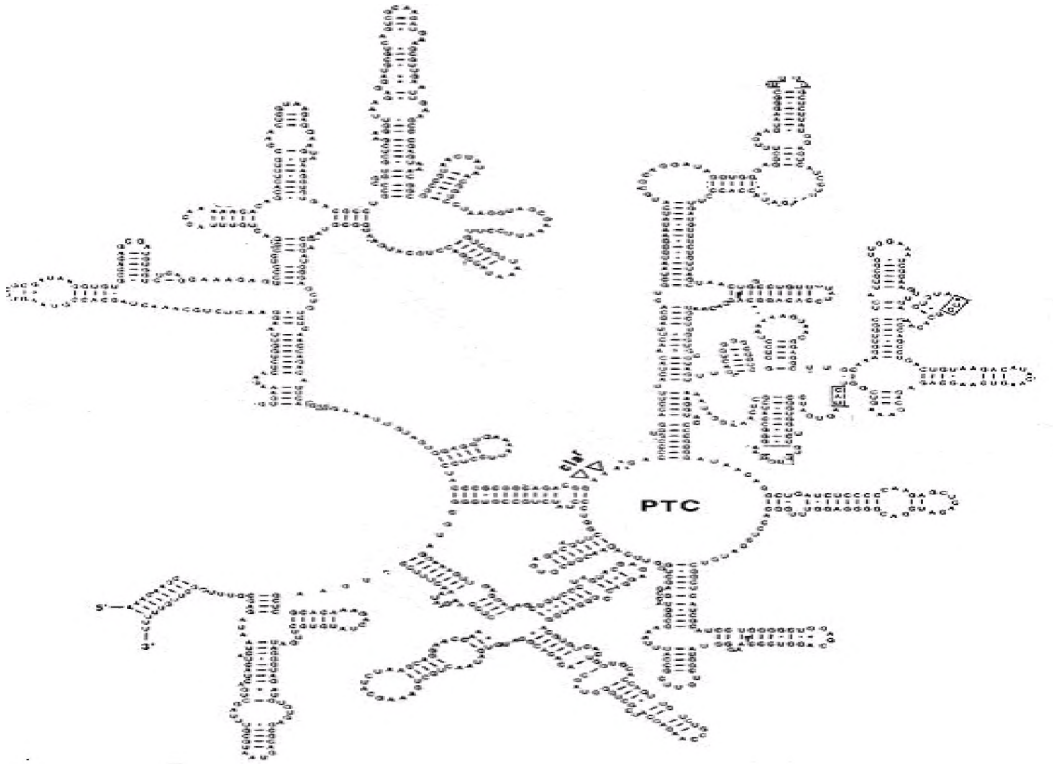
Şekil 4. *H. pylori*'ye özgül oligonükleotid problemleri



Şekil 6. Klaritromisinin etki mekanizması.

CLA: Klaritromisin.

(http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Image:Helicobacter_Pylori.png..2007)



Şekil 7. *H. pylori* 23S rRNA' sı (Monstein ve ark., 2001).

PTC: Peptidil transferaz kodlayan bölge

3.1.10.2 Florokinolon Aktivitesi ve Direnç Mekanizması

DNA giraz ve topoizomerazları inhibe eden bakterisidal etkili antibiyotiklerdir. DNA giraz 2A alt ünitesi ve 2B alt ünitesini içeren tetramer yapıda bir enzimdir. *H. pylori*' de Florokinolonlara karşı direnç DNA giraz A alt ünitesini kodlayan *gyrA* geninde mutasyon gelişimine bağlıdır (107, 119, 121). Direnç *gyrA* geninin 87, 88, 91 ve 97. aminoasit pozisyonunda kinolon direnç belirleme bölgesindeki (QRDR) nokta mutasyonlarla oluşur (107).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1 Örneklerin Alınması ve *H. pylori* Teşhisi

H. pylori'nin Klaritromisin ve Florokinolon antibiyotiklerine olan direnci moleküler yöntemlerle tespit etmek amacı ile 48 adet duodenal ülserli hastanın 25' i kadın (% 52), 23' ü erkek (% 48), üre nefes testi pozitif ve hastaların yaş ortalaması 44,45 (20 - 79) olan hasta grubu çalışmaya alınmıştır. Endoskopik işlem esnasında *H. pylori* araştırması için antrum ve korpustan en az birer adet biyopsi alındı. % 10 formol solüsyonu içerisinde patoloji labarotuvârına biyopsi örnekleri ulaştırıldı. Patoloji laboratuvarında 4 µm kalınlığında doku kesitleri elde edildi. Doku teşhisi için kesitler hematoksilin - eozin, *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için Giemsa ile boyandı. *H. pylori* enfeksiyonu ışık mikroskobunda spiral (yay) şeklinde basillerin görülmesiyle teşhis edildi. *H. pylori* pozitif olan biyopsi numuneleri DNA ekstraksiyonu için -20 °C de muhaza edildi.

İşlemin tamamı üç basamaktan oluşur:

- 1) Dokudan DNA'nın izolasyonu
- 2) Biotinlenmiş primerlerle mültipleks amplifikasyon (PCR)
- 3) Revers hibridizasyon

4.2 DNA İzolasyonu

4.2.1 Dokulardan DNA İzolasyonu için ön hazırlık aşaması

QIAamp DNA Mini Kit kullanılarak dokulardan toplam (mitokondrial, genomik ve viral) DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu işlem süresince bütün santrifüj adımları oda sıcaklığında (15 - 25 °C) yürütüldü. Örneklerin çözünüp tekrar donmasından kaçınıldı. Yıkama solüsyonu için oda sıcaklığında Buffer AE

yada damıtılmış distile su hazırlandı. Tamponlar AW1 ve AW2' nin doğru bir şekilde hazırlanmış olduğu kontrol edildi. Buffer ATL veya Buffer AL' de çözelti oluşmuş ise 56 °C' de inkübe ederek çözüldü.

4.2.2 DNA izolasyon aşaması

1) Her örnek için 25 mg. doku örneği kullanıldı. 1 mg. Dokudan yaklaşık 0,2 - 1,2 mg. DNA elde edileceği hesaplandı.

2) Doku örneğinin parçalanması;

Dokuyu küçük parçalar halinde 25 mg. (10 mg.) kadar kesildi. 1,5 ml.' lik mikrosantrifüj tüpüne koyuldu ve üzerine Buffer ATL' den 180 µl. eklendi adım 3 ile devam edildi.

Lizis zamanını azaltmak için dokunun küçük parçalar halinde kesilmiş olmasına dikkat edildi. Örnekler 2 ml.' lik mikrosantrifüj tüplerinde lizize kondu.

3) 20 µl. Proteinaz K karıştırıldı ve 56 °C' de inkübe edildi. Doku Velp scientifica vortex cihazı aracılığı ile karıştırıldı. Inkübasyon süresince arada bir vortexlendi örneğin dağılması sağlandı.

4) 1,5 ml.' lik mikrosantrifüj tüpündeki damlaları kaldırmak için kısa bir santrifüj yapıldı.

5) Örneğe 200 µl. Buffer AL eklendi, 15 sn. süre ile mix vortexlendi ve 10 dk. 70 °C' de Major science Dry Bath incubator cihazında inkübe edildi. Mikrosantrifüj tüpünün kapağının içindeki damlaları kaldırmak için kısa bir santrifüj yapıldı.

Homojenizasyonda iyi bir verim için örneğin ve Buffer AL' nin iyice karıştırıldı.

6) 200 µl. Etanol (96 - 100%) eklendi ve 15 sn. vortexle karıştırıldı. Karıştırdıktan sonra mix kısa bir süre santrifüj yapıldı. Homojen bir çözelti elde etmek için Buffer AL ve Etanolün iyice karıştırılmasına dikkat edildi.

Etanol ilavesi bazı tüplerde beyaz bir tortu oluşturdu. QIAamp mini spin kolon tortu engelini ortadan kaldırmak için her uygulamada kullanıldı.

7) Adım 6' dan gelen miksi (çözelti dahil olmak üzere) kapak kısmına değmeden mini spin kolona (2 ml. Bir toplama tüp içinde) dikkatli bir şekilde uygulandı. Kapağı kapatıldı ve 1 dk. boyunca 6000xg (8000 rpm)' de santrifüj yapıldı. QIAamp mini spini 2 ml. toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntü içeren tüp atıldı.

Santrifüj esnasında kabarcık oluşumunu önlemek için her bir spin kolon kapatıldı. QIAamp mini spin kolon çözeltilerin tümüne uygulandı. Santrifüjleme 6000xg (8000 rpm)' de gerçekleştirildi.

8) QIAamp mini spin kolon dikkatli bir şekilde açıldı ve kapağa değdirmeden 500 µl. Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatıldı ve 6000xg (8000 rpm)'de 1 dk. boyunca santrifüj edildi. Temiz bir şekilde sağlanan 2 ml. toplama tüpü QIAamp mini spin kolona yerleştirildi ve süzüntü içeren toplama tüpü atıldı.

9) QIAamp mini spin kolon dikkatli bir şekilde açıldı ve 500 µl. Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatıldı ve tam hız (20.000xg; 14.000 rpm)'de 3 dk. boyunca santrifüj yapıldı.

10) Daha sonra yeni bir 2 ml. toplama tüpüne koyuldu ve süzüntü ile eski toplama tüpü atıldı.

NOT: Bu adım Buffer AW2' nin muhtemel taşınma olasılığını ortadan kaldırmaya yardımcı olur.

11) Temiz bir 1,5 ml.' lik mikrosantrifüj tüpüne QIAamp mini spin kolon yerleştirildi ve süzüntü içeren tüp atıldı. QIAamp mini spin kolon dikkatli bir şekilde açıldı ve 200 µl. Buffer AE ilave edildi. Bunu takiben 1 dk. boyunca 6000xg (8000 rpm) santrifüj yapıldı.

12) Adım 11 tekrarlandı.

Santrifüj öncesinde 200 µl. Buffer AE eklendi. 5 dk. inkübasyon işlemi genellikle DNA verimini arttırdığından inkübe edildi. 200 µl. Buffer AE ile üçüncü bir yıkama % 15 verimi arttırdığından işlem tekrar edildi.

DNA' nın uzun süre saklanması için Buffer AE ile yıkandıktan sonra -20 °C' de muhaza edildi.

Bu işlem sonunda 400 µl. suyun içinde 25 mg. dokudan yaklaşık olarak 10 - 30 mg. DNA elde edildi.

4.3 Biotinlenmiş primerlerle multipleks amplifikasyon PCR

İstenilen gen bölgelerini çoğaltmak için biotinlenmiş primerlerle multipleks PCR amplifikasyon yöntemi ve Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler PCR cihazı kullanılarak uygulandı.

Her bir örnek için PCR karışımı Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. PCR karışımı hazırlanması

Reaktif	Miktarı
PNM (5' biotinlenmiş primerler ve nükleotid mix)	35 µl
10xPCR Buffer (Hotstart Tag Polimeraz enzimi için)	5 µl
MgCl ₂	2 µl
Su (moleküler çalışmalar için)	2.8 µl
Hotstart Tag DNA polimeraz enzimi (IU)	0,2 µl
Örnek <i>H. pylori</i> DNA'sı alınacak ve hazırlanan mix PCR cihazına yüklenecek. (PCR cihazı: Applied Biosystems 2720 Termal Cyler)	5 µl
Toplam PCR reaksiyon hacmi (mix)	50 µl

Biotinlenmiş primerlerle multipleks amplifikasyon PCR döngüleri Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4. PCR Döngüleri

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 °C'de	15 dk.	1 döngü
95 °C'de	30 sn.	10 döngü
58 °C' de	2 dk.	10 döngü
95 °C'de	25 sn.	20 döngü
53 °C'de	40 sn.	20 döngü
70 °C'de	40 sn.	20 döngü
70 °C'de	8 dk.	1 döngü

Sonuç olarak elde edilen PCR ürünlerinden 5 µl. alınarak % 2' lik agaroz jel elektroforezler basamağı yapıldı. Amplikonların beklenen baz ağırlıkları gyrA için 145 bp 23S rRNA için 100 bp ve amplifikasyon kontrolü için 63 bp' dir.

4.4 ELEKTROFOREZ

Kullanılan Malzemeler: Fluka (Agarose), TBE (Tris Borate EDTA) (1X), Etidyum bromür, Xayanol, Marker

1) 5xTBE solusyonundan 100 ml.' ye 400 ml. distile su katılarak 500 ml.' lik 1xTBE solusyonundan 2 g. Agarose alındı ve ısı bloğunda kaynatıldı.

2) Daha sonra soğumaya bırakıldı ve ılık iken 10 µl. etidyum bromür eklendi.

3) Karıştırıldıktan sonra elektroforez tankına döküldü. Taraklar takıldı. TBE solusyonu ile dolduruldu.

4) PCR ürünlerinden 10 µl. alındı ve 1 µl. Xayanol ile karıştırıldı ve herbir kuyucuğa sıra ile yüklendi.

5) Elektroforez kapağı ve elektrik devreleri düzenlenip ve akım geçirildi. Bu işlem Thermo scientific EC 300XL serisi elektroforez cihazı ile jelde yürütüldü.

6) Daha sonra Benchtop 3UV Transilluminator UVP cihazında bandlara bakıldı.

4.5 HİBRİDİZASYON (MANUEL)

4.5.1 Ön İşlemler

Etüvün ısısı 45 ± 1 °C' ye ayarlandı. 37- 45 °C' ye kadar HYB ve STR solüsyonları ısıtıldı. Tüm solüsyonlar oda sıcaklığında bekletilerek ısıtıldı (CON -

C ve SUB - C (+4 °C' de korunur) hariç). CON - C ve SUB - C konsantreleri uygun tüpler kullanılarak kendi sulandırma solüsyonları ile 1:100 oranında sulandırıldı (CON - C, CON - D ile SUB - C, SUB - D ile).

Her bir strip için;

4.5.2 Hibridizasyon aşaması

1 ml (1000 µl) sulandırma solüsyonu + 10 µl konsantre

1) DEN solüsyonuna 20 µl PCR ile çoğaltılmış örnekler pipetlenerek karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

2) Önceden ısıtılmış 1 ml HYB (yeşil renkli solüsyon) solüsyonu Tray' in örneklerin konulduğu kuyucuklarına dikkatlice konuldu ve homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalandı.

3) Trayin kuyularına stripler dikkatlice yerleştirildi.

4) Tray önceden hazırlanan etüvde 45 ± 1 °C' de 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi.

5) Pastör pipet kullanılarak HYB Hibridizasyon solüsyonu kuyucuklardan tamamen boşaltıldı.

6) 1 ml STR (Stringent Wash Solution) (kırmızı renkli solüsyon) solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi ve 15 dakika 45 ± 1 °C' de çalkalanarak inkübe edildi.

7) Tray atık kabına STR solüsyonu kuyucuklardan komple şekilde dökülerek boşaltıldı ve yine tray ters çevrilerek üst ucu kurutma kağıdına emdirilerek kuyucuklar içerisinde kalan bir miktar sıvıda uzaklaştırıldı.

8) Her bir kuyucuktaki strip üzerine bir kez 1ml RIN (Rinse Solution) solüsyonu eklenip 1 dakika çalkalanarak yıkandı. Daha sonra bir önce ki maddede anlatıldığı gibi bu sıvı dökülerek boşaltıldı.

9) 1 ml daha önceden sulandırılmış (Ön İşlemler) Conjugate kuyucuklarda ki striplerin üzerine eklenip ve 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi.

10) İnkübasyondan sonra Conjugate dökülerek boşaltıldı. Her bir strip 2 kez 1 ml RIN (Rinse Solution) 1 kez de 1 ml distile su ile 1 'er dakika çalkalanarak yıkandı.

11) Daha önceden 1 ml sulandırılmış Substrat (Ön İşlemler) solüsyonu her bir strip üzerine eklendi ve karanlık ortamda test koşullarına bağlı olarak (oda sıcaklığı gibi) 3 ile 20 dakika arasında bantların oluşmasına göre çalkalamadan inkübe edildi.

Yanlış değerlendirmelere yol açabileceği için çok uzun süreli inkübasyonlar stribin kararmasına sebep olabileceği için inkübasyon süresi kontrollü bir şekilde takip edilerek sonlandırıldı.

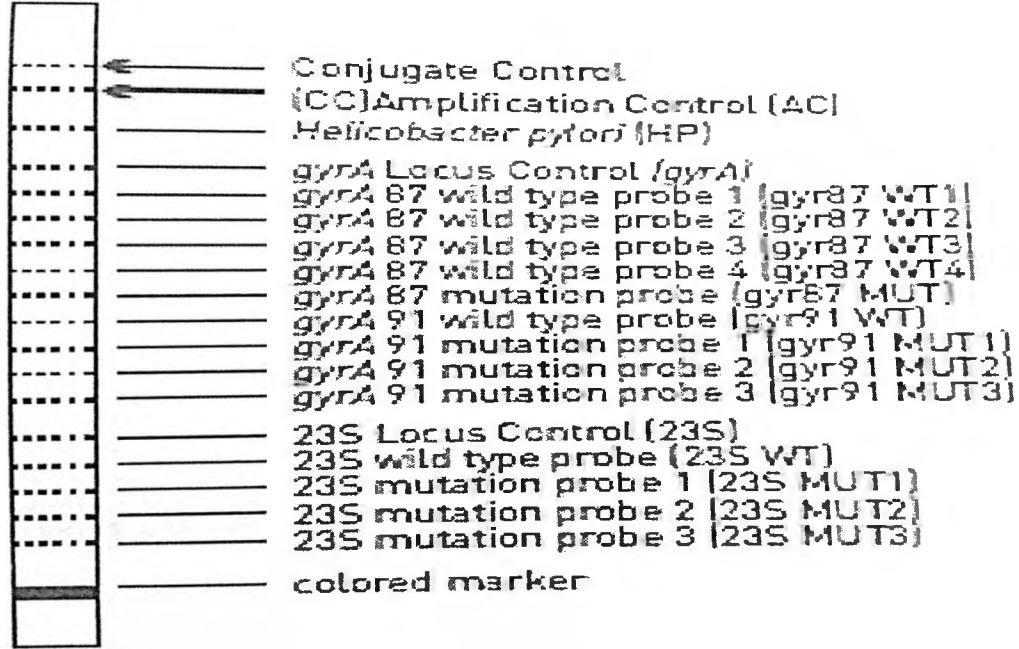
12) İki kez distile su ile striplerin yıkanması ile bant oluşma işlemi sonlandırıldı.

13) Son olarak, stripler kuyucukların içinden alınarak kurutma kağıdının arasına konularak kurutuldu ve değerlendirme aşamasına geçildi.

4.6 GenoType® HelicoDR sonuç değerlendirme

GenoType® HelicoDR testi kullanılarak elde edilen sonuçların yorumlanıp değerlendirilebilmesi ve çalışmanın kabul edilebilir olması için bütün sonuçların

kitin içindeki kontrol stribi ile kıyaslanması gerekmektedir. Pozitif strip üzerindeki bantlar ve kıyaslamaları Şekil 8’ de görülmektedir.



Şekil 8.Kontrol stribi üzerindeki bantlar

Probe	Codon	Nucleotides	Associated phenotype ^a
<i>gyrA</i> 87-WT1	N87	AAC	FO-S
<i>gyrA</i> 87-WT2	N87	AAT	FO-S
<i>gyrA</i> 87-WT3	T87	ACC	FO-S
<i>gyrA</i> 87-WT4	T87	ACT	FO-S
<i>gyrA</i> 87-MUT	N87K	AAA	FO-R
<i>gyrA</i> 91-WT	D91	GAT	FO-S
<i>gyrA</i> 91-MUT1	D91N	AAT	FO-R
<i>gyrA</i> 91-MUT2	D91G	GGT	FO-R
<i>gyrA</i> 91-MUT3	D91Y	TAT	FO-R
23S-WT	2146 and 2147	AA	CLA-S
23S-MUT1	2146	A2146G	CLA-R
23S-MUT2	2146	A2146C	CLA-R
23S-MUT3	2147	A2147G	CLA-R

Şekil 9. Direnç problemleri

Konjugat kontrol (CC)

Konjugat kontrolü strip üzerinde konjugat bağlanma ve substrat reaksiyonunun verimliliğini göstermektedir. Konjugat kontrol bandının oluşması gerekmektedir.

Amplifikasyon kontrol (AC)

PCR reaksiyonunun doğru şekilde çalıştığını gösterir. Bandın oluşmadığı durumlarda izolasyon ve amplifikasyon sırasında bir hatanın olduğu ya da ortamda PCR inhibitörlerinin varlığı düşünülmelidir. Bazı pozitif test sonuçlarında amplifikasyon kontrol bandı silik yada tamamen oluşmayabilir. Bu durum reaksiyon boyunca gerçekleşen rekabetten kaynaklanmaktadır. Böyle durumlarda amplifikasyon reaksiyonu doğru çalışmış kabul edilir ve test değerlendirmeye alınır. Negatif test sonuçlarında AC bandı mutlaka oluşmalıdır bandın oluşmadığı durumlarda PCR reaksiyonu doğru çalışmamış kabul edilir ve test tekrarlanır

***Helicobacter pylori* (HP)**

Bu bant *Helicobacter pylori* varlığını gösterir. Oluşan bantın yoğunluğu başlangıçtaki DNA yoğunluğuna bağlıdır.

Lokus Kontrol (gyrA, 23S RNA)

Her bir lokusa ait genin varlığını kontrol eder. HP bandının varlığında mutlaka pozitif olmalıdır.

gyrA87 WT (1, 2, 3, 4)

87. Kodonda Florokinolon duyarlılığını gösterir.

gyrA87 MUT

87. Kodonda mutasyon olduğunu ve Florokinolon direncini gösterir.

gyrA91 WT

91. Kodonda Florokinolon duyarlılığını gösterir.

gyrA91 MUT (1, 2, 3)

91. Kodonda mutasyon olduğunu ve Florokinolon direncini gösterir.

23S WT

23S rRNA' da Klaritromisin duyarlılığını gösterir.

23S MUT (1, 2, 3)

23S rRNA' da mutasyon olduğunu ve Klaritromisin direncini gösterir.

5. BULGULAR

Bu çalışmada, Fırat Üniversitesi Gastroenteroloji Anabilim Dalına gelen 48 duodenal ülserli hastalardan alınan biyopsi numuneleri kullanıldı. Bu numunelerden elde edilen *H. pylori* bakterisinin GenoType HelicoDR ticari kiti kullanılarak Klaritromisin ve Florokinolon antibiyotiklerine dirençleri tespit edilmiştir.

Çalışmaya alınan 48 adet hastanın 25 kadın (% 52), 23' ünün erkek (% 48) olduğu gözlenmiştir. Hastaların yaş ortalaması 44,45 (20 - 79) dir.

Çalışmaya alınan 48 adet duodenal ülserli hastanın yaş ve cinsiyete göre dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. *H. pylori*' nin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Yaş Grupları	Kadın		Erkek		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
0-20	0	0	1	2,1	1	2,1
21-34	3	6,2	10	20,8	13	27,1
35-44	5	10,4	4	8,3	9	18,8
45-54	7	14,6	3	6,2	10	20,8
55-64	9	18,8	3	6,2	12	25
65+	1	2,1	2	4,2	3	6,2
Toplam	25	52,1	23	47,9	48	100

Çalışmaya alınan 48 adet duodenal ülserli hastanın GenoType HelicoDR ticari kiti kullanılarak Klaritromisin ve Florokinolon antibiyotiklerine dirençleri dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 6, 7).

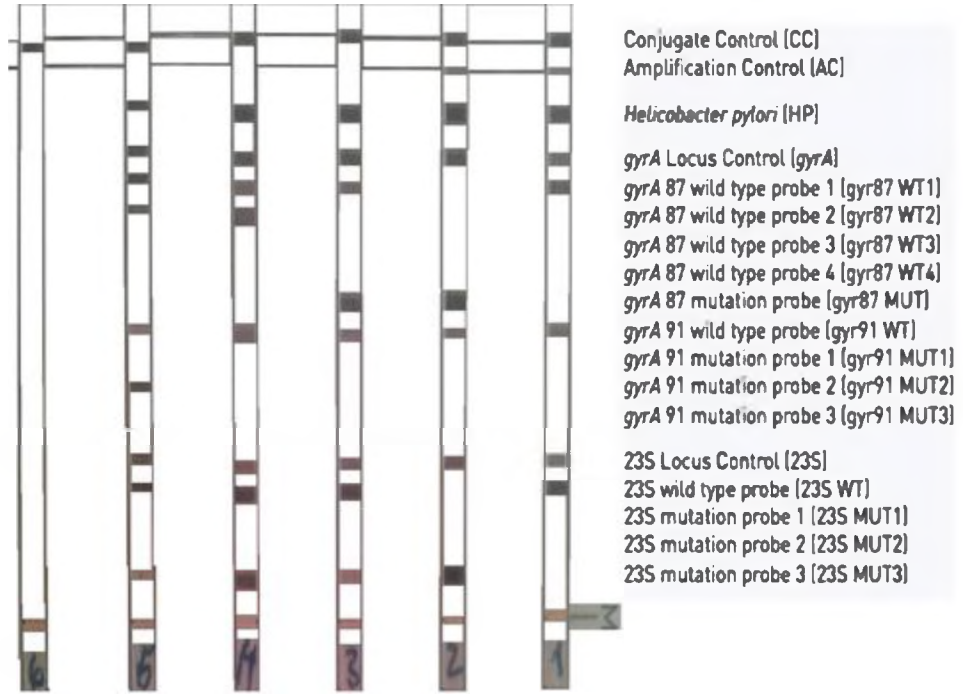
Tablo 6. *H. pylori* ilaç dirençleri

İlaç	Dirençli		Duyarlı		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
Florokinolon	33	68,8	15	31,2	48	100
Klaritromisin	40	83,3	8	16,7	48	100
Florokinolon+ Klaritromisin	32	66,7	16	33,3	48	100

Tablo 7. Gen bölgeleri

Klaritromisin		n	%
WT		8	16,7%
WT+MUT3		30	62,5%
WT+MUT1+MUT3		1	2,1%
WT+MUT1+MUT2+MUT3		5	10,4%
MUT3		4	8,3%
TOPLAM		48	100%
Florokinolon	Gen Bölgeleri	n	%
gyrA87	WT1	1	2,1%
	WT2	3	6,3%
	WT1+WT2	24	50,0%
	MUT	2	4,2%
	WT1+MUT	1	2,1%
	WT1+WT2+MUT	11	22,9%
	WT1+WT2+WT3+MUT	5	10,4%
	WT2+MUT	1	2,1%
TOPLAM		48	100%
gyrA91	MUT1	4	8,3%
	MUT2	2	4,2%
	WT	23	47,9%
	WT+MUT1	1	2,1%
	WT+MUT1+MUT2	3	6,3%
	WT+MUT1+MUT2+MUT3	4	8,3%
	WT+MUT1+MUT3	1	2,1%
	WT+MUT2	4	8,3%
	WT+MUT2+MUT3	1	2,1%
	WT+MUT3	5	10,4%
TOPLAM		48	100%

GenoType HelicoDR testinde, DNA striplerinin hibridizasyon sonucu oluşan tipik görüntüleri görülmektedir (Şekil 10).



Şekil 10. GenoType HelicoDR testi sonucu DNA stripleri

Şekil 10 da görülen ilk 5 strip hasta grubuna 6. strip kontrol grubuna aittir. Mutasyonlar, Florokinolonlar için; 2. ve 3. striplerde gyrA 87. kodonda, 5. stripde gyrA 91. kodonunda ve Klaritromisin için; 23S rRNA' da 2. 3. 4. ve 5. hastalarda görülmektedir. Mutasyon gerçekleşen hastalarda bu antibiyotiklere direnç gelişmiştir.

6. TARTIŞMA

Helicobacter pylori ile enfekte kişilerin % 10-15' inde semptomatik enfeksiyon oluştururken, bu olguların % 2-4' ünde gastroduodenal patoloji seyrini değiştirerek başta adenomatöz kanserler olmak üzere çeşitli mide kanseri ile sonlanmaktadır (122, 123 - 125). Bununla birlikte enfekte kişilerin çoğu (% 80 - 90) bakteriyi hastalığın herhangi bir semptomu olmadan taşımakta ve bulaştırmaktadır. Özellikle erken çocukluk döneminde elde edilen *H. pylori* enfeksiyonu uygun etmenler varlığı altında kronik dönemde MALT lenfoma ve mide kanseri riskini artırması nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1994 yılında *H. pylori*' yi Tip I karsinojen olarak sınıflandırmıştır.

Sınıf I karsinojen olarak kabul edilen *H. pylori* enfeksiyonunda tanı ve direnç son derece önemlidir. Aynı zamanda seçilen tanısal yöntemin uygulaması kolay, hasta uyumu açısından ideal ve her yaş grubuna uygulanabilir olmalıdır.

H. pylori hakkında bilinenler her geçen yıl artmaktadır. Ancak artan bilgi birikimi ile birlikte bakterinin gastrointestinal sistem dışı tutulumları, tüm dünyadaki yaygınlığı, antibiyotik direnci, eradikasyonundaki başarısızlıklar da her geçen gün ayrı bir tartışma konusuna neden olmaktadır. Bu kadar yaygın görülen bir hastalık etkeni için kolay uygulanabilir, ucuz ve toplum taramasına uygun bir tanı testinin geliştirilmesi gereklidir. Şimdiye kadar yapılmış bir çok çalışma ile kültür, histoloji gibi invaziv testler güvenilirlik konusunda ön planda olsa da moleküler yöntemler duyarlılık ve özgüllük bakımından çok daha önemli bir yere sahiptir.

Son yıllarda tanısında güçlük çekilen birçok bakteriyel ve viral enfeksiyonun tanısında olduğu gibi *H. pylori* enfeksiyonlarının tanısı ile aynı zamanda bakteriye ait *vacA*, *cagA* ve *iceA* gibi virulans genleri ve antibiyotik direncine yol açan mutasyonların tespitinde PCR bazlı moleküler yöntemler başarı ile uygulanmaya başlamıştır. Gastrik biyopsi materyali ve gastrik sıvı gibi klinik materyalde *H. pylori* tanısı için bakteriye ait çeşitli gen bölgelerini hedef alan, farklı klinik materyali örnek olarak kullanabilen oldukça yüksek sensitivite ve spesivitede PCR protokolleri geliştirilmiş, bu yöntemler sadece tanı amaçlı değil epidemiyolojik amaçlı veya virulans ile direnç genlerinin eş zamanlı olarak tanısı amacı ile de kullanılmıştır (126 - 128).

Hindistanda bir çalışmada tükürük ve dışkı örneklerinin analizinde PCR yöntemi kullanılmış (129), ve çalışma PCR bazlı yorumlamaların pahalı ve DNA izolasyonlarından kaynaklanan bazı dezavantajları olduğu gösterilmiştir (130, 131). Bildirilen prevelanslar Japonya’ da çocuklarda % 4 iken Avustralya’ daki Afrikalı mültecilerde bu oran % 82’ lere ulaşmaktadır (132, 133). Avustralya laboratuvar örneklerinde, Malezya kan bağışçılarında, Çin ve Japon okul çağı çocuklarında yapılan araştırmalarda prevelans % 15 veya daha az olarak bildirilmiştir (134, 135 - 137). İsrailli çocuk bakım merkezlerinde ise % 24 - 25 oranında prevelans tespit edilmiştir (138). İtalya kırsal kesimlerinde (ortalama yaş= 59), prevelans % 58 olarak bulunurken kuzey İsveç’te benzer bir çalışmada (ortalama yaş= 52) anlamlı olarak % 34 gibi oldukça düşük oranlarda tespit edilmiştir (139). Ülkemizin de aralarında bulunduğu Mısır, İran, Arnavutluk ve Çin gibi ülkelerde ise prevelans % 60 veya daha fazla olarak bildirilmiştir (140).

H. pylori eradikasyonunun % 100 oranında sağlanamaması; *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde çoklu ilaç rejiminin kullanılması, hastaların bu tedaviye uyum sorunu, *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan ilaçların çeşitli hastalıklarda sıklıkla kullanılması nedeniyle gelişen antibiyotik direnci ile ilişkili olabilir.

H. pylori enfeksiyonunun tedavisinde Klaritromisin direnci Belçika' da % 16.6, Fransa' da % 21, İspanya' da % 21.1, Almanya' da % 22, Polonya' da % 23.5, Portekiz' de % 44.8, doğu Avrupa' da % 9,5, Japonya' da % 29, Meksika' da % 21.6 ve Amerika' da % 41 oranında saptanmıştır (141 - 143, 144).

Megraud ve arkadaşları *H. pylori* enfeksiyonunun eradikasyon oranını Klaritromisine duyarlı *H. pylori* suşlarında % 87.8, Klaritromisine dirençli *H. pylori* suşlarında % 18.3 oranında saptamışlardır (145).

Branca ve arkadaşları *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde Klaritromisin direncini % 91 oranında tespit etmişlerdir (146).

Shimoyama ve arkadaşları Doğu Japonya' da *H. pylori* eradikasyonunda başarısızlığın majör nedenin % 83.9 oranındaki Klaritromisin direnci olduğunu bildirmişlerdir (147).

Bizim çalışmamızda Klaritromisin direnci % 83,3 olarak tespit edilmiş ve bulgularımız literatürle uyumlu bulunmuştur.

H. pylori ' de makrolid direnç gelişmesi antibiyotik eradikasyon tedavisinin başarısızlığının en önemli nedenidir. Makrolidlere direncin mekanizması özellikle Klaritromisin direnci 23S rRNA' da üç belirgin mutasyona dayanır ve antibiyotiğin bakteriyal ribozoma bağlanmasındaki azalmayla sonuçlanır (148).

Ribozoma bağlanan makrolid aminoasitler arasında peptit bağı oluşumunu engeller ve bu sayede protein sentezini durdurur. Direnç gelişiminde antibiyotiğin azalan bağlanması söz konusu olduğundan azda olsa bir protein sentezi gerçekleşebildiği bildirilmektedir. Buda sonuçlardaki duyarlı ve dirençli suşların varlığını açıklayabileceği kanısına varılmıştır.

Biyopsiye dayalı yöntemlerden olan hızlı üreaz testi, histopatolojik inceleme ve kültür *H. pylori*' nin mide mukozasında yama tarzında dağılımı nedeniyle düşük saptama oranına sahip yöntemlerdir (149). Çalışmamızda hastalardan hem antrum hem de korpus örneklerinin alınması *H. pylori*' nin saptanma oranını arttırmak için önerilmektedir (150).

H. pylori tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan noninvaziv ve güvenilir bir test olarak kullanılan üre nefes testi altın standart bir testtir. Üre nefes testinin duyarlılığı % 90 - 100 ve özgüllüğü % 89 - 100 arasındadır (151 - 153). Bu nedenle çalışmamızda ÜNT referans yöntem olarak kullanılmış ve ÜNT pozitif hastalar *H. pylori* pozitif olarak kabul edilmiştir.

Noninvaziv testler *H. pylori* varlığı veya yokluğu konusunda bilgi vermesine rağmen, genotipik özellikler ve bakterinin antimikrobiyal direnç profili gibi bilgileri öğrenmeye olanak vermez. Gerek kültür sonucu üretilen mikroorganizmaya uygulanacak duyarlılık testleri, gerekse moleküler yöntemlerle direnç genlerinin saptanması (154) eradikasyonda uygun protokolün seçiminde klinisyene yol gösterecektir.

Testin doğruluğunu etkileyen faktörler arasında bakteri yoğunluğu, örneğin hazırlanması, primer ve hedef DNA seçimi, PCR uygulaması ile ilgili

teknik konular yer almaktadır (155). Değişik protokollerin uygulandığı farklı hedef bölge ve primerlerin tercih edildiği PCR yöntemlerinde duyarlılık ve özgüllük değişmektedir (154).

H. pylori negatif duodenal ülserlerin olguların ancak % 5'ini oluşturduğu ve duodenal ülser patogeneğinde en önemli faktörün *H. pylori* olduğu kabul edilmiştir. Literatür gözden geçirildiğinde, özellikle bakteri tanımlandıktan hemen sonraki yıllarda yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda duodenum ülserinde *H. pylori* pozitifliği çok yüksek oranlarda bildirilirken, sadece İngiltere' den 1986' da serolojik değerlendirilmiş bir çalışmada % 59 oranının verildiği görülmektedir (156).

Kombine antibiyotik kullanımı ile *H. pylori* enfeksiyonu tedavi edilebilmektedir. Enfeksiyonun tedavisinde seçilen antimikrobiyal ajanlar: Klaritromisin, Amoksisilin, Metronidazol, Tetrasiklin ve siprofloksasindir. *H. pylori* de antibiyotiklere karşı gelişen yüksek direnç oranları eradikasyon tedavisinde başarısızlığa neden olmaktadır (157, 158, 159).

106 hasta üzerinde Kolombiya' da yapılan bir çalışmada, PCR-RFLP ile araştırılan direnç oranları sırasıyla; % 1.9, % 82 ve % 3.8 olarak belirlenmiş; Klaritromisin direnci olan A2143G dört suşun üçünde, A2142G nokta mutasyonu ise birinde saptanmıştır (160).

Sezgin ve arkadaşlarının ülkemizde 2008 yılında yaptıkları çalışmada, Klaritromisin direnci *H. pylori* suşlarında % 40.5 (15/37) oranında tespit edilmiş ve izolatların % 73.3 (11/15)'ünde A2144G, % 26.7 (4/15)'sinde ise A2143G mutasyonları belirlenmiştir (161).

Bizim çalışmamızda Klaritromisin direnç oranları 2146 – 2147 (WT) % 16,7, 2146 – 2147 + A2147G (WT + MUT3) % 62,5, 2146 -2147 + A2146G + A2147G (WT + MUT1 + MUT3) % 2,1, 2146 – 2147 + A2146G + A2146C + A2147G (WT + MUT1 + MUT2 + MUT3) % 10,4, A2147G (MUT3) % 8,3 olarak belirlenmiştir.

Daha az sıklıkla kullanılan antibiyotikler için de direnç oranları belirlenmiştir, ancak bu çalışmalar az sayıdadır ve az sayıda örnekle çalışılmıştır. Bu çalışmalarda Florokinolonlar için % 3 - 20 arasında değişen oranlarda direnç bildirilmektedir (162, 163).

Çalışmamızda Florokinolon direnç oranı % 68,8 olarak bulundu. Gen bölgelerinde ise gyrA87 kodonunda WT1 % 2,1, WT2 % 6,3, WT1 + WT2 % 50, MUT % 4,2, WT1 + MUT % 2,1, WT1 + WT2 + MUT % 22,9, WT1 + WT2 + WT3 + MUT % 10,4, WT2 + MUT % 2,1, gyrA91 kodonunda MUT1 % 8,3, MUT2 % 4,2, WT % 47,9, WT + MUT1 % 2,1, WT + MUT1 + MUT2 % 6,3, WT + MUT1 + MUT2 + MUT3 % 8,3, WT + MUT1 + MUT3 % 2,1, WT + MUT2 % 8,3, WT + MUT2 + MUT3 % 2,1, WT + MUT3 % 10,4 oranları belirlenmiştir.

Bu veriler literatür ile karşılaştırıldığında performans ve kullanılabilirlik açısından değerlendirildiği zaman GenoType HelicoDR testi diğer yöntemlere göre oldukça üstün bir yöntemdir. Bu yöntemle Klaritromisin ve Florokinolon antibiyotiklerine karşı gelişen direnç mekanizmasının karakterizasyonu yaklaşık 3 saat içinde belirlenebilmektedir. Bu moleküler testte PCR ve hibridizasyon uygulamaları kombine olarak kullanılmaktadır. İlaç direncinin tespiti için

Helicobacter pylori'nin 23S - rRNA geninin spesifik bölgesi hedef alınır. Klaritromisin direnci için 23S - rRNA bölgesinin 2146 ve 2147 pozisyonundaki mutasyonlara bakılmıştır. Florokinolon direnci için en önemli mutasyon bölgeleri ise gyrA geninin 87 ve 91. kodonlarındaki mutasyonlardır (164, 165).

Sonuç olarak hasta bu yöntem ile kültüre gerek kalmadan endoskopiye girdiği gün içinde *H. pylori*'nin bulunup bulunmadığı, Klaritromisine ve Florokinolona dirençli olup olmadığı ve hastalığın patojenitesi ile ilgili bilgiyi bir tek PCR sonucu ile görülebilecek ve hasta, biyopsi örneği laboratuvara ulaştıktan 3 saat sonra bu sonuçları öğrenebilecektir. Hızlı sonuç alabilmek Rutin laboratuvarlar için önem taşımakta olup klinisyen, bu sonuçları değerlendirerek, aynı gün içinde ilaç reçete edebilecek ve gastrik kansere kadar ilerleme olasılığı olan dispeptik yakınmaların, gelecekteki patojenitesi ile ilgili bilgi sahibi olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983; 1: 1273-75.
2. Brooks GF, Janet SB, Stephen AM, Jawetz M. Melnick&Adelberg's Medical Microbiology, 21.Edition, Appleton&Lange, Connecticut, 1995; 242-243.
3. Breuer T, Graham DY. Cost of diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection: When does choosing the treatment regimen based on susceptibility testing become cost effective? Am J Gastroenterol 1999; 94: 725-729.
4. Sandıkçı MÜ, Köksal F Helicobacter enfeksiyonları. Topçu A, Söyletir G, DoğanayM. (Eds), Enfeksiyon Hastalıkları. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevi, 1996; 1005-1009.
5. Graham DY. Therapy of *Helicobacter pylori*: current status and issues. Gastroenterology 2000; 118: 2-5.
6. TaylorDN, BlaserMJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infections. Epidemiol Rev 1991; 13: 42-59.
7. Beşışık FS. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu: Epidemiyoloji ve patogenezi. Flora 1996; 3: 160-166.
8. Crabtree JE, Wyatt JT, Sobala GM, et al. Systemic andmucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. Gut 1993; 1339-1343.

9. Dooley CP, Fitzgibbon PL, Cohen H, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. N Eng J Med 1989; 321: 1562-1566.
10. Rokkas T, Pursey C, Uzzochina E, et al. Non-ulcer dyspepsia and short-term De-Nol therapy: a placebo-controlled trial with particular reference to the role of *Campylobacter pylori*. Gut 1988; 29: 1386-1391.
11. The EUROGAST Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet 1993; 341: 1359-1362.
12. Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: When to perform which test? Ann Med 2001; 33: 91-97.
13. Rautelin H, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2003; 8: 53-60.
14. Vaira D, Ricci C, et al. The clinical role of stool test (HpSA) in non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Lancet 1999; 354: 30-33.
15. Altındış M, Özdemir M. *Helicobacter pylori* ve tanısı. The Med J of Kocatepe 2003; 2: 1-12.
16. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. Gut 1997; 41: 8-13.
17. Dunn BE, Cohen B, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720-741.
18. Marshall BJ and Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 21: 1311-1315.

19. Kidd M, Modlin IM. A Century of *Helicobacter pylori*. Digestion 1998; 59: 1-15.
20. Özden A. Midenizdeki Yabancı. Türk Gastroenteroloji Vakfı yayınları, 2003; 1-160.
21. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* Phenotypes Associated With Peptic Ulceration. Scand J Gastroenterol 1994; 29: 1-5.
22. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to Fulfil Koch's Postulates for pyloric Campylobacter. Med J Aust 1985; 142: 436-439.
23. The European *Helicobacter pylori* Study Group. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. Gut 1997; 41: 8-13.
24. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am 1993; 22(1): 15-19.
25. Forman D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 1995; 9(2): 71-76.
26. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb A, Warnke R. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 1994; 330: 1267-1271.
27. Ahmed N, Sechi LA. *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Pathology: New Threats of the Old Friend. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2005; 4 (1): 1-10.
28. Zhang ZF, Robert C, Kurtz D, Klimstra S et al. *Helicobacter pylori* Infection on the Risk of Stomach Cancer and Chronic Atrophic Gastritis. Cancer Detection and Prevention, 1999; 23(5): 357.

- 29.** Duynhoven YTHP, de Jonge R. Transmission of *Helicobacter pylori*: a Role for Food? Bulletin of the World Health Organization 2001; 79: 455-460.
- 30.** Köksal F. *Helicobacter pylori* Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Haziran-01 Temmuz, Ankara, Program ve Bildiri Özet Kitabı 2004; 99-111.
- 31.** Kikuchi S, Jean E, Crabtree DF, Kurosawa M. Association between Infections with *cag A* - positive or -negative Strains of *Helicobacter pylori* and Risk for Gastric Cancer in Young Adults. American Journal of Gastroenterology, 1999; 94(12): 3455.
- 32.** Pincock S. Nobel Prize winners Robin Warren and Barry Marshall. Lancet 2005; 366(9495): 1429.
- 33.** Megraud F. A Humble Bacterium Sweeps This Year's Nobel Prize. Cell 2005; 123(6): 975-976.
- 34.** Cave DR. Transmission and epidemiology of *H. pylori* AMJ Med 1996; 100: 12-17
- 35.** Maifheimer P, Michetti P, Price A, et al. *H. pylori* on Atlas. Science press. Ltd, 1996.
- 36.** Atherton JC, Blaser MJ. *H. pylori* infections. Harrison's Principles of Internal Medicine 2001; 1: 960-963
- 37.** Chang J, Marshall BJ, Barkin BS, et al. Occupational exposure to *H. pylori* for the endoscopy professional. AMJ Gastroenterol. 1994; 89: 1987-1992

- 38.** Goodwin CS, Blincow ED, Warren JR, Waters TE, Anderson CR, Easton L. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. J Clin Pathol 1985; 38: 1127-1131.
- 39.** Goodwin CS, Armstrong JA, Marshall BJ. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. J Clin Pathol 1986; 39: 353-365.
- 40.** Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. Nov. As *Helicobacter pylori* comb. Nov. And *Helicobacter mustelae* comb. Nov. Respecyively. Int J Syst Bacteriol 1989; 39: 397-405.
- 41.** Vale FF, Vitor JMB. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas. Int J Food Microbiol 2010; 138: 1-12.
- 42.** Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastrit. Lancet 1983; 1273-1275.
- 43.** Koneman MD, Schreckenberger PC, Allen SD, Winn WC, Janda WM. Curved Gram- Negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: *Campylobacter* and *Vibrio* Species. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fourth Edition. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992; 188-196.
- 44.** Velazquez M, Feirtag JM. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. Int J Food Microbiol 1999; 53: 95-104.

45. Jenkins CC, Basset JR. *Helicobacter* infection. Small Anim Gastroenter 1997; 19: 267-279.
46. Dunn BE, Cohen H, Blaser M. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720-741.
47. Windsor HM, O'Rourke J: Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am 2000; 29: 633-648
48. Soykan İ *Helicobacter pylori* ve diğer *Helicobacter*'lerin mikrobiyolojisi. Sivri B(Editör). Modern Tıp seminerleri'nde 1.baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 1: 1-8
49. Kikuchi S, Nada O, Nakajima T: Serum anti *Helicobacter pylori* antibody and gastric carcinoma among young adults. Cancer 1995; 75: 2789-2793
50. Erdem B *Campylobacter* ve *Helicobacter*. Ustaçelebi Ş(Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji'de 1.baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 531-541
51. Aydın Y, Ceran F, Ateş Y, Yıldız M: *Helicobacter pylori* enfeksiyonu. Progres 2003; 4: 123-127.
52. Küçüker AM, Özmutlu Ö *Helicobacter pylori*'nin morfolojik, biyokimyasal ve kültür özellikleri. Klimik Dergisi 1992; 5: 6-10
53. Clearfield RH: *Helicobacter pylori*: Aggressor or innocent bystander? Med Clin of North Am 1991; 75: 815-829
54. Josenhans C, Suerbaum S Flagella and motility of *Helicobacter pylori*. In Moran AP, O'Morain CA (Eds). Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter pylori* Infections. Bad Homburg: Normed-Verl, 1997; 6-15

55. Turhanoglu M, Goral V, Arkan E, Degertekin H, Kadayifcioglu N, Aksoy N ve ark. Çeşitli üst gastrointestinal sistem hastalıklarında *Helicobacter pylori* sıklığı. Klimik Dergisi 1992; 5: 19-21
56. Graham DY, Graham KS (Çeviri: M.Kahramanoğlu): *H pylori*'ye bağlı Gastrointestinal hastalıklar. İstanbul: AND Yayıncılık, 2002: 5-11
57. Boer WA, Laar L, Megraud F: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol 2000; 16: 5-10
58. Goodwin CS: Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am 1993; 22: 5-19
59. Kocabeyoglu Ö: *Helicobacter pylori* infeksiyonlarının epidemiyolojisi, patogenezi ve laboratuvar tanısı. Klimik Dergisi 1992; 5: 11-14
60. Xia HX, Keane CT et al. Transportation of *Helicobacter pylori* culture by optimal systems. J Clin Microbiol 1994; 32: 3075-3077
61. Lee A, Fox J, Hazell S Pathogenicity of *Helicobacter pylori*. Infect Immunol 1993; 61: 1601-1610
62. Marais A, Mendz GL, Hazell SL, Megraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genomic era. Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR) 1999; 63(3): 642-674
63. Erdem B. Campylobacter ve Helicobacter. Mutlu G, Dmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi S, Tumbay E, Mete Ö (editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Günes Kitabevi, Ankara. 1999; 531-540.

64. Hachem CY, Clarridge JE, Evans DG, Graham DY. Comparision of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol. 1995; 48: 714-716.
65. Francis M, Philippe L. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews, 2007; 280–322
66. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Curved Gram-Negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: Campylobacteraceae and Vibrionaceae. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2006; 392-428.
67. Özkaya İA. Hemodiyaliz Hastalarında H. pylori İnfeksiyonu Sıklığı ve Bunun Dispeptik yakınmalarla ilişkisi. Uzmanlık tezi. Bakırköy Dr. Sadikonuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 2005; 19-20
68. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiolgy of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am. 1993; 22(1): 15-19.
69. Sandıkçı M, Köksal F. Helikobakter infeksiyonları. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (Eds.), Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1996; 1005-1009.
70. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. Am J Gastroenterol. 1994; 89: 116-119.
71. Sandıkçı M, Köksal F, Topçu A, Söyletir G, Doganay M: *Helicobacter pylori* enfeksiyonları. Enfeksiyon Hastalıkları Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul. 1996; 9: 1005.

72. Graham DY. Therapy of *Helicobacter pylori*: Current status and issues. Gastroenterology, 2000; 118: 2-5.
73. Nichols RL and Smith JW. Intragastric microbial colonization in common disease states of the stomach and duodenum. Ann Surg, 1973; 182: 57-61.
74. O'Connor HJ: *Helicobacter pylori* and gastro-oesophageal reflux diseaseclinical implications and management. Aliment Pharmacol Ther, 1999; 13: 117-120.
75. Anand BS, Graham DY. Ulcer and gastritis. Endoscopy, 1999; 31: 215, 218.
76. Blaser MJ. Hypothesis: The changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: Implications for health and disease. J Infect Dis, 1999; 179: 1523-1525.
77. Memik F. Her Yönüyle Peptik Ülser Hastalığı. Nobel&Güneş Kitabevi. 2003; 49-173.
78. Altındış M, Özdemir M. *Helicobacter pylori* and Diagnosis. The Medical Journal of Kocatepe. 2003; 2: 1-12.
79. Megraud F. How should *Helicobacter pylori* infection be diagnosed? Gastroenterology 1997; 113 (Suppl 6): S93-98.
80. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and other gastric Helicobacter species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's Principles of Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 2557-2567.

- 81.** Bonamico M, Strappini PM, Bonci E ve ark. Evaluation of stool antigen Test, PCR on Oral samples and serology for the noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter* 2004; 9: 69–76.
- 82.** Li C, Ha T, Ferguson DA Jr ve ark. A newly developed PCR assay of H. pylori in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of H. pylori in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2142-2149.
- 83.** Kabir S. Clinic-based testing for *Helicobacter pylori* infection by enzyme immunoassay of faeces, urine and saliva. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1345–1354.
- 84.** Gramley WA, Asghar A, Frierson HF Jr, Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2236–2240.
- 85.** Lim CY, Lee KH, Cho MJ ve ark. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of patients with gastroduodenal diseases by PCR restriction analysis using the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3387–3391.
- 86.** Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720–741.
- 87.** Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* 2004; 9: 115–123.
- 88.** Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-741.

89. Taylor D, Parsonnet J. Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. In: Blaser MJ, Smith PF, Ravdin J, Greenberg H, Guerrant RL (eds). Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, 1995; 551-564.
90. Hirschl AM, Rotter ML. Serological tests for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. J Gastroenterol 1996; 31: 33-36.
91. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16(Suppl 1): 16-23.
92. Herbrink P, vanDoorn LJ. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 164-173.
93. Leodolter A, Vaira D, Bazzoli F, et al. European multicentre validation of two new non-invasive tests for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18: 927-931.
94. Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Vaira D. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 489-496.
95. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from human feces. Lancet 1992; 340: 1194-1195.
96. Carvalho Costa Cardinali L, Rocha GA, Rocha AM, et al. Evaluation of [13C] urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. J Clin Microbiol 2003; 41: 3334-3335.

- 97.** El-Nasr MS, Elibiary SA, Bastawi MB, et al. Evaluation of a new enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens. J Egypt Soc Parasitol 2003; 33: 905-915.
- 98.** Zambon CF, Basso D, Navaglia F, et al. Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: simplified ¹³C-urea breath test, stool antigen testing, or DNA PCR in human feces in a clinical laboratory setting? Clin Biochem 2004; 37: 261-270.
- 99.** Koletzko S, Konstantopoulos N, Bosman D, et al. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection for *Helicobacter pylori* antigen in stool from children. Gut 2003; 25: 804-806.
- 100.** Wu IC, Ke HL, Lo YC, et al. Evaluation of a newly developed office-based stool test for detecting *Helicobacter pylori*: an extensive pilot study. Hepatogastroenterology 2003; 50: 1761-1765.
- 101.** Cavallini A, Notarnicola M, Berloco P, et al. Use of macroporous polypropylene filter to allow identification of bacteria by PCR in human fecal samples. J Microbiol Methods 2000; 39: 265-270.
- 102.** Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. J Clin Microbiol 1995; 33: 2162-2165.
- 103.** Gramley WA, Asghar A, Frierson HF, Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. J Clin Microbiol 1999; 37: 2236-2240.

- 104.** Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. J Med Microbiol 2001; 50: 1021-1029.
- 105.** Graham DY: Infection caused by *Helicobacter pylori*. In; Humes HD, DuPont HL, Gardner LB, eds.: Kelley's Textbook of Internal Medicine, 4th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2000; 284: 2012-2020.
- 106.** Metz CD, Walsh HJ: Gastroduodenal ulcer disease and gastritis. In; Humes HD, DuPont HL, Gardner LB, eds.: Kelley's Textbook of Internal Medicine, 4th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2000; 107: 824-844
- 107.** Gerrits MM. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Erasmus MC, Netherlands 2004; 21-28.
- 108.** <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/macrespilus.html>
- 109.** Rüssmann H, Kempf VAJ, Koletzko S, Heesemann J et al. Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 2001; 39: 304-308.
- 110.** Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridization. Gut 2000; 46: 608-614.
- 111.** Schmidt AF, Rüssmann H, Lehn N, Fischer A et al. Fluorescence in situ hybridization vs. epsilometer test for detection of clarithromycin-susceptible and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains in gastric biopsies from children. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 2073-2079.

- 112.** Rüssmann H, Adler K, Haas R, Gebert B et al. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 2001; 39: 4142-4144.
- 113.** Rüssmann H, Schmidt AF, Adler K, Aust D et al. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in shock-frozen gastric biopsy samples by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 2003; 41: 813-815.
- 114.** Debets-Ossenkopp YJ, Sparrius M, Kusters JG, Kolkman JJ et al. Mechanism of clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 1996; 142: 37-42.
- 115.** Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Grify MV et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 477-480.
- 116.** Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T et al. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2621-2628.
- 117.** Van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F et al. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. Antimicrob Agents Chemother 2001; 5: 1500-1504.
- 118.** Lascols C, Lamarque D, Costa J-M, Copie-Bergman C et al. Fast and Accurate Quantitative Detection of *Helicobacter pylori* and Identification of

Clarithromycin Resistance Mutations in *H. pylori* Isolates from Gastric Biopsy Specimens by Real-Time PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 4573–4577.

119. Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004; 53: 1374-1384.

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

121. Kusters JG, Kuipers EJ. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*. J Appl Microbiol 2001; 90: 134-144.

122. Köksal F. *Helicobacter pylori* Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Haziran-01 Temmuz, Ankara, Program ve Bildiri Özet Kitabı, 2004; 99-111.

123. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb A, Warnke R. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med, 1994; 330: 1267-1271.

124. Ahmed N, Sechi LA. *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Pathology: New Threats of the Old Friend. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2005; 4: 1-10.

125. Zhang ZF, Robert C, Kurtz D, Klimstra S et al. *Helicobacter pylori* Infection on the Risk of Stomach Cancer and Chronic Atrophic Gastritis. Cancer Detection and Prevention (CDP), 1999; 23(5): 357.

126. Benson JA, Fode-Vaughan KA, Collins ML. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. Lett Appl Microbiol 2004; 39: 221-225.

127. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. J Med Microbiol 1993; 39: 338-344.

- 128.** Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 192-200.
- 129.** Mishra S, Singh V, Rao GR, Dixit VK, Gulati AK, Nath G. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic subjects – a nested PCR based study. Infect Genet Evol 2008; 8: 815–819.
- 130.** Goodman KJ, Cockburn M. The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. Epidemiology 2001; 12: 266–271.
- 131.** Naito Y, Shimizu T, Haruna H, Fujii T, Kudo T, Shoji H, et al. Changes in the presence of urine *Helicobacter pylori* antibody in Japanese children in three different age groups. Pediatr Int 2008; 50: 291–294.
- 132.** Cherian S, Forbes D, Sanfilippo F, Cook A, Burgner D. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in African refugee children resettled in Australia. Med J Aust 2008; 189: 438-441.
- 133.** Naito Y, Shimizu T, Haruna H, Fujii T, Kudo T, Shoji H, et al. Changes in the presence of urine *Helicobacter pylori* antibody in Japanese children in three different age groups. Pediatr Int 2008; 50: 291–294.
- 134.** Naito Y, Shimizu T, Haruna H, Fujii T, Kudo T, Shoji H, et al. Changes in the presence of urine *Helicobacter pylori* antibody in Japanese children in three different age groups. Pediatr Int 2008; 50: 291–4.
- 135.** Moujabber T, MacIntyre CR, Backhouse J, Gidding H, Quinn H, Gilbert GL. The seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Australia. Int J Infect Dis 2008; 12: 500 4.

136. Sasidharan S, Uyub AM. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among asymptomatic healthy blood donors in Northern Peninsular Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 395–398.
137. Tam YH, Yeung CK, Lee KH, Sihoe JD, Chan KW, Cheung ST, et al. A population-based study of *Helicobacter pylori* infection in Chinese children resident in Hong Kong: prevalence and potential risk factors. *Helicobacter* 2008; 13: 219–224.
138. Kori M, Goldstein E, Granot E. *Helicobacter pylori* infection in young children detected by a monoclonal stool antigen immunoassay. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 157–159.
139. Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, et al. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult Swedish population: a Kalixanda study report. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 275–85.
140. Azevedo NF, Huntington J and Goodman KJ, The Epidemiology of *Helicobacter pylori* and Public Health Implications. 2009, *Helicobacter* 14 (Suppl. 1): 1–7.
141. Dupont C, Kalach N, Raymond J. *Helicobacter pylori* and antimicrobial susceptibility in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 311–313.
142. Boyanova L, Mentis A, Gubina M, Rozynek E, Gosciniak G, Kalenic S, Goral V, Kupcinskas L, Kantarceken B, Aydin A, Archimandritis A, Dzierzanowska D, Vcev A, Ivanova K, Marina M, Mitov I, Petrov P, Ozden A,

Popova M. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Eastern Europe. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 388-396.

143. Watanabe K, Tanaka A, Imase K, Tokunaga K, Sugano H, Kai A, Ishida H, Itoh T, Takahashi S. Amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: studies from Tokyo, Japan from 1985 to 2003. *Helicobacter* 2005; 10: 4-11.

144. Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, Sulka A, Swaminathan B, Taylor T, Hoekstra M, Griffin P, Smoot D, Peek R, Metz DC, Bloom PB, Goldschmidt S, Parsonnet J, Triadafilopoulos G, Perez-Perez GI, Vakil N, Ernst P, Czinn S, Dunne D, Gold BD. Antimicrobial resistance, incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1088-1094.

145. Mégraud F. H. pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004; 53: 1374-1384.

146. Branca G, Spanu T, Cammarota G, Schito AM, Gasbarrini A, Gasbarrini GB, Fadda G. High levels of dual resistance to clarithromycin and Metronidazole and in vitro activity of levo-floxacin against *Helicobacter pylori* isolates from patients after failure of therapy. Int J Antimicrob Agents 2004; 24: 433-438.

147. Shimoyama T, Fukuda S, Mikami T, Fukushi M, Munakata A. Efficacy of Metronidazole for the treatment of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection in a Japanese population. J Gastroenterol 2004; 39: 927-930.

148. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridization. Gut 2000; 46: 608-614.

149. Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS, Berg DE et al. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1995; 33: 918-923.
150. Kim JJ, Kim JG, Kwon DH. Mixed infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. Helicobacter 2003; 8: 202-206.
151. Hooton C, Keohane J, Clair J, Azam M, O'Mahony S, Crosbie O, Lucey B Comparison of three stool antigen assays with the 13C- urea breath test for the primary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring treatment outcome. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2006; 18: 595-599.
152. Öztürk E, Yeşilova Z, Ilgan S, Arslan N, Erdil A. A new, practical, low-dose 14C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: clinical validation and comparison with the standard method. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003; 30(11): 1457-1462.
153. Gonzalez P, Galleguillos C, Massardo T, Rivera M, Morales A, Smok G, Moyano L et al. Could the [14C] urea breath test be proposed as a 'gold standard' for detection of *Helicobacter pylori* infection ? Med Sci Monit. 2004; 10(8): 4-5.
154. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. Helicobacter 2004; 9: 115–23.
155. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720–741.

- 156.** Jones DM, Eldridge J, Fox AJ, Sethi AJ, Whorwell PJ. Antibody to gastric Campylobacter like organisms (Campylobacter pylori): Clinical correlation and distribution in the normal population. J Med Microbiol 1986; 22: 57-62.
- 157.** Dzieniszewski J, Jarosz M. Guidelines in the medical treatment of *Helicobacter pylori* infection. J Physiol Pharmacol 2006; 57: 143-154.
- 158.** Akyon Yılmaz Y. *Helicobacter pylori*'de antimikrobiyal ajanlara karşı direnc oluşturan mekanizmalar ve moleküler tanı yöntemleri. 3. Ulusal Molekuler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 28 Haziran-1 Temmuz 2004, Ankara. Program ve Bildiri Özet Kitabı, s: 42.
- 159.** Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 280-322.
- 160.** Alvarez A, Moncayo JJ, Santacruz JJ, et al. Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the Western Central Region of Colombia. Antimicrob Chemother 2009; 53(9): 4022-4024.
- 161.** Sezgin O, Aslan G, Altıntaş E, et al. Detection of point mutations on 23S rRNA of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin with PCR-RFLP in gastric biopsy specimens in Mersin, Turkey. Turk J Gastroenterol 2008; 19(3): 163-167.
- 162.** Gerritis MM, Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG, *H. pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis 2006; 6: 699-709

- 163.** Megraud F, *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384
- 164.** Deyi VYM, Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y, Bontems P, Lepage P, Reynders M. Practical use of GenoType® HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (DIAGN MICR INFEC DIS)* 2011; 557–560.
- 165.** Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy CJ, Delchier MJ, Megraud F. Evaluation of a New Test, GenoType HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 3600–3607.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Elazığ' da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Elazığ' da tamamladı. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2006 yılında mezun oldu. 2011 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı, eğitimi halen devam etmektedir. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında Biyolog olarak çalışmaya başladı ve halen devam etmektedir.