

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

DIŞKI VE MİDE BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDEN
HELICOBACTER PYLORI ENFEKSİYONUNUN VE
KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER
İLE SAPTANMASI

Dr. NEŞE İNAL

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2022

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

DIŞKI VE MİDE BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDEN
HELICOBACTER PYLORI ENFEKSİYONUNUN VE
KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER
İLE SAPTANMASI

Dr. NEŞE İNAL

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. YAKUT AKYÖN YILMAZ

ANKARA
2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen her konuda rahatlıkla ulaşıp danışabildiğim ve engin tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz'a çok teşekkür ederim.

Başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağlı olmak üzere değerli katkılarından dolayı ve öğrenim sürecim boyunca ilgi ve desteklerini hissettiğim her konuda desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç, Prof. Dr. Burçin Şener, Prof. Dr. Banu Sancak, Prof. Dr. Özgen Eser, Prof. Dr. Zeynep Sarıbaş, Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu, Prof. Dr. Ahmet Pınar ve Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitimim süresince her zaman bana yardımcı olan desteğini hissettiren tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Alpaslan Alp, Doç. Dr. Gülşen Hazirolan'a ve Merkez Laboratuvar ekibine ve tüm teknik personelimize teşekkür ederim.

Mide biyopsi örneklerinin alınması aşamasında çalışmaya katkı sağlayan Uzm. Dr. Tevhide Şahin, Prof. Dr. H. Yasemin Balaban, Prof. Dr. Halis Şimşek ve Uzm. Dr. Cem Şimşek'e teşekkür ederim.

Helicobacter pylori ATCC 43504 suşunu çalışmamız için bizimle paylaşan Prof. Dr. Bekir Kocazeybek ve Doğukan Özbey'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca yanımda olan değerli destekleri için Berke Kurumanastırlı, Ekin Kırbaş, Aybüke Özyar Kurtçu'ya ve bölümdeki tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bütün eğitim hayatım boyunca sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla hep yanımda olan her konuda bana yardımcı olan kardeşim Menekşe İnal'a ve yine bana her konuda destek olan ve emeği geçen aileme çok teşekkür ederim.

THD-2021-19430 numaralı bu projeye destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

İnal Neşe, Dışkı ve Mide Biyopsi Örneklerinden *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun ve Klaritromisin Direncinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) dünya nüfusunun yarısını enfekte eden ve tedavi edilmediği sürece midede varlığını sürdüren bir bakteridir. Tanısı için birçok invaziv ve noninvaziv yöntem geliştirilmiştir. Noninvaziv yöntemlerle tanı hasta açısından daha kolay olduğu için, birçok noninvaziv yöntemin duyarlılık ve özgüllüğün artırılmasına çalışılmaktadır. Dışkı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *H. pylori* varlığının ve klaritromisin nokta mutasyonunun saptanması noninvaziv bir yöntemdir. Dışkı örnekleri kullanılarak yapılan bir polimeraz zincir reaksiyonu testi, endoskopi yapılmasının zor olduğu durumlarda, pediyatrik hastalarda, gebelerde ve *H. pylori*'nin tedavisinin takibinde etkili olabilir. Bu çalışmada; (i) mide biyopsi ve dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* enfeksiyonunun ve klaritromisin nokta mutasyonlarının saptanması; (ii) kültürden izole edilen *H. pylori* izolatlarına antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması; (iii) antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlarını klaritromisin nokta mutasyonları ile karşılaştırmaktır. Çalışmaya dahil edilen 63 hastanın *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı için kültür, hızlı üreaz testi, dışkıda antijen testi (HpSA), histopatolojik inceleme ve mide biyopsi PZR yöntemleri uygulandı. Çalışmamızda iki testin kombinasyonu veya gastik biyopsi kültürü pozitifliği "referans sonuç" olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda *H. pylori*'nin tespiti ve 23S rRNA genindeki klaritromisin direncinden sorumlu en sık görülen nokta mutasyonlarının (A2142G, A2143G) saptanması için tasarlanmış "Ezplex HP-CLA" (SML Genetree, Kore) PZR tanı kiti kullanıldı. Mide biyopsi örneklerinden hızlı üreaz testi ile %30,2'sinde, histopatolojik incelemede %38,1'inde, mide biyopsi PZR testi ile %58,7'sinde *H. pylori* tespit edildi. HpSA testi ile dışkı örneklerinin %28,5'inde *H. pylori* pozitif saptandı. Mide biyopsi kültürü ile 63 örneğin %17,5'inde üreme oldu. Kültürden izole edilen dokuz izolata EUCAST standartlarına göre gradiyent şerit

yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi uygulandı. Levofloksasin, tetrasiklin ve amoksisiline karşı direnç saptanmadı. İzolatların üçünde klaritromisin direnci ve üçünde ise metronidazol direnci saptandı. Dışkı örneklerinden PZR ile %28,5’inde *H. pylori* pozitif saptandı. Dışkı PZR sonuçlarının referans yöntem sonuçları ile karşılaştırdığımızda *H. pylori*’nin tespiti açısından duyarlılık %66,6, özgüllük %100, pozitif prediktif değer %100, negatif prediktif değer %80 ve tanısal doğruluk oranı %85,7 bulundu. Dışkı örneklerinden klaritromisin nokta mutasyonlarının saptanmasında referans olarak mide biyopsi PZR sonuçları dikkate alınarak değerlendirildiğinde genel uyumu %65 olarak bulundu. Dışkı PZR klaritromisin nokta mutasyonları ile fenotipik antibiyotik duyarlılık sonuçları karşılaştırıldığında %66,6 oranında uyumlu bulundu. Çalışmamızda dışkı örneklerinden PZR’nin, özellikle invaziv işlemlerin zor olacağı çocuk hastalarda, gebelerde ve tedavinin takibinde, *H. pylori* tanısında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Dışkı örneklerinden klaritromisin nokta mutasyonlarını tespit etme oranı beklendiği gibi olmasa da yine de umut vericidir, ancak ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: *H. pylori*, Gerçek Zamanlı PZR, klaritromisin direnci

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi
Proje No: THD-2021-1943

ABSTRACT

Inal Neşe, Detection of *Helicobacter pylori* Infection and Clarithromycin Resistance in Stool and Gastric Biopsy Samples by Molecular Methods, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis In Medical Microbiology, Ankara, 2022. *Helicobacter pylori* is a bacterium that infects half of the world population and continues to exist in the stomach, unless treated. Many invasive and non-invasive methods have been developed for diagnosis. Since the diagnosis with non-invasive methods is more suitable and easy for the patient, there are many studies to increase the specificity and sensitivity of non-invasive methods. Detection of *H. pylori* and clarithromycin point mutations from stool samples by polymerase chain reaction (PCR) is a non-invasive method. In cases where endoscopy is difficult to perform or not available as in pediatric patients and pregnant women, and also in the follow-up of *H. pylori* treatment, a real-time PCR test using stool samples may be effective. The aims of this study were (i) to detect *H. pylori* infections and the point mutations that lead to clarithromycin resistance by using real-time PCR from gastric biopsy and stool samples (ii) to perform antibiotic susceptibility test, (iii) to compare the results of antibiotic susceptibility tests and the point mutations that lead to clarithromycin resistance. The study included 63 patients whom have undergone gastroduodenal endoscopy. Culture, rapid urease test, histopathological examination, HpSA and gastric biopsy methods were used for the diagnosis of *H. pylori*. In our study, the combination of two tests or gastric biopsy culture positivity were accepted as the “reference result”. The “Ezplex HP-CLA real-time PCR” (SML Genetree, Korea) diagnostic kit was used for detecting *H. pylori* and the most common point mutations (A2142G, A2143G) that lead to clarithromycin resistance in the 23S rRNA gene. *H. pylori* was detected in 30.2% of the gastric biopsy samples by rapid urease test, 38.1% by histopathological examination, and 58.7% by gastric biopsy real-time PCR test. *H. pylori* was positive in 28.5% by HpSA test. Growth was achieved in 17.5% of 63 specimens by the culture. Antibiotic susceptibility tests were applied by gradient strip test for nine isolates according to EUCAST standards. Resistance to levofloxacin, tetracycline, and amoxicillin was not detected. Clarithromycin resistance

was found in three of the isolates and metronidazole resistance was found in three of the isolates. *H. pylori* was detected positive in 28.5% by stool real-time PCR test. When the reference methods results were compared to “Ezplex” stool real-time PCR; the sensitivity in terms of *H. pylori* detection was 66.6%, the specificity was 100%, PPV was 100%, NPV was 80%, and the diagnostic accuracy was 85.7%. In the detection of clarithromycin point mutations from stool samples with “Ezplex” real-time PCR, the overall agreement was 65% when compared to the “Ezplex” gastric biopsy real-time PCR results. When the phenotypic antimicrobial susceptibility results were compared to clarithromycin point mutations detected by stool real-time PCR, it was found to be correlated in 66.6%. In this study, it is concluded that real-time PCR from stool samples can be used in diagnosis of *H. pylori*, especially where invasive tests are hard to perform, like in the pediatric patients, pregnant women and follow-up of treatment. Although the clarithromycin point mutations detection rate from stool samples were not as expected, it is still promising, but more studies should be performed.

Keywords: *H. pylori*, real-time PCR, clarithromycin resistance

Supporting Organisation: Hacettepe University Scientific Research Project Unit
Project No: THD-2021-1943

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
⁰ C	Santigrat derece
bç	Baz çifti
BHI	Beyin-Kalp İnfüzyon
BabA	Kan grubu antijenlerini bağlayan adezyon geni
g	Gravite
gr	Gram
L	Litre
µg	Mikrogram
C	Sitozin
<i>CagA</i>	Sitotoksin ilişkili gen A
<i>cagPAI</i>	<i>cag</i> patojenite adası
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CLA	Klaritromisin
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
ELISA	“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
G	Guanin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
kbç	Kilobaz çifti
kD	Kilodalton
IL	İnterlökin

LPS	Lipopolisakkarit
MALT	Mukoza ile ilişkili lenfoid doku
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
mg	Miligram
MIK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MH-F	Mueller Hinton Fastidiyöz Agar
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
NPV	Negatif prediktif değer
OMP	Dış membran proteini
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PPV	Pozitif prediktif değer
PPI	Proton pompa inhibitörü
PPI-AC	Proton pompa inhibitörü+ amoksisilin+klaritromisin
rRNA	Ribozomal RNA
Sab	Sialik asit bağlayan adezin
Oip	Dış membran enflamatuvar proteini
TE	Tris-Etilen diamin tetra asetat
<i>ureA</i>	Üreaz A
<i>vacA</i>	Vakuolize Edici Sitotoksin

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. <i>H. pylori</i> 'nin virölans faktörleri ve patogenezdaki rolü.....	11
3.1. EUCAST 2022 v.12.0 standartlarına göre <i>H. pylori</i> 'nin MİK sınır değerleri.....	30
3.2. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR amplifikasyon protokolü.....	34
3.3. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR sonuçlarının yorumlanması.....	35
4.1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri (s:63).....	41
4.2. Hastaların hızlı üreaz testi, mide biyopsi kültürü, histopatoloji, dışkıda antijen testi ve mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	42
4.3. <i>H. pylori</i> izolatlarının klaritromisin, amoksisilin, levofloksasin, tetrasiklin ve metronidazol için MİK (µg/mL) sınır değerleri.....	43
4.4. “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ile pozitif bulunan örneklerin Ct sonuçları.....	44
4.5. “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ve mide biyopsi kültürü sonuçlarının karşılaştırılması.....	44
4.6. Hastaların cinsiyetlerine göre “Ezplex” mide biyopsi ve dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.....	45
4.7. Hastaların “referans sonuç” ile “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.....	45
4.8. “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonucu pozitif bulunan örneklerin Ct sonuçları.....	46
4.9. Mide biyopsi kültürü ve “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.....	47
4.10. Histopatoloji ve “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.....	48

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. <i>H. pylori</i> antibiyotik direnç mekanizmalarının şematik çizimi.....	19
3.1. CampyGen kiti içeren mikroaerofilik kapalı kap sistemi.....	27
3.2. <i>H. pylori</i> 'nin koloni ve Gram boyama görünümü.....	27
3.3. Üreli sıvı besiyerinin görünümü.....	28
3.4. Mide biyopsi örneğinin Giemsa ile boyalı histopatolojik preparatı.....	28
3.5. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR testi ile internal kontrollerin sonuçları.....	36
3.6. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR testinde <i>H. pylori</i> pozitif, klaritromisin A2142G veya A2143G nokta mutasyonu saptanmayan örneklerin görünümü.....	36
3.7. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR testinde <i>H. pylori</i> pozitif, klaritromisin A2142G ve A2143G nokta mutasyonu saptanan pozitif kontrol.....	36
4.1. “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR yönteminin duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV ve tanısal doğruluk oranı sonuçları.....	46
4.2. “Ezplex” dışkı ve “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ile pozitif bulunan hastaların Ct sonuçlarının karşılaştırılması.....	47
4.3. “Ezplex” mide biyopsi ve dışkı gerçek zamanlı PZR arasında <i>H. pylori</i> klaritromisin nokta mutasyonlarının karşılaştırılması.....	49
4.4. Hastaların hızlı üreaz testi, mide biyopsi kültürü, histopatoloji, dışkıda antijen testi, mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ve referans sonuçların incelenmesi.....	50
4.5. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR yöntemi ile mide biyopsi ve dışkı örneklerinde <i>H. pylori</i> ve klaritromisin nokta mutasyonlarının incelenmesi.....	51

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
TABLolar	x
ŞEKİLLER	xi
1. GİRİŞ-AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	4
2.3. Bulaş Yolları	4
2.4. Sınıflandırma.....	5
2.5. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	6
2.6. Üreme ve Kültür Özellikleri.....	6
2.7. Genom ve Plazmitler.....	7
2.8. Patogenez ve Virülans Faktörleri	8
2.8.1. Patogenez	8
2.8.2. Virülans Faktörleri	10
2.9. Laboratuvar Tanısı	12
2.9.1. İnvaziv Testler.....	12
2.9.2. Noninvaziv Testler	15
2.10. <i>H. pylori</i> Tedavisi.....	17
2.11. <i>H. pylori</i> Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Çalışma Grubu	25
3.2. Örneklerin Alımı ve Laboratuvara Getirilmesi.....	25
3.3. Mide Biyopsi Örneğinden <i>H. pylori</i> 'nin İzolasyonu.....	25

3.4. <i>H. pylori</i> İzolatlarının Saklanması	29
3.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	29
3.6. Dışkıda <i>Helicobacter pylori</i> Antijen Testi (HpSA)	30
3.7. Mide Biyopsi Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	31
3.8. Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	32
3.9. Toplam DNA'nın Görüntülenmesi ve Safılık Kontrolü.....	33
3.10. İzole Edilen DNA'dan <i>H. pylori</i> 'nin ve Klaritromisin Direncinin Gerçek Zamanlı PZR ile Saptanması.....	33
3.11. İstatistiksel Analiz.....	37
3.12. <i>H. pylori</i> Kültürü için Kullanılan Besiyerleri ve Reaktifler.....	37
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
7. KAYNAKLAR.....	63
8. EKLER.....	75
EK 1: Etik Kurul Onay Belgesi.....	75
EK 2: Özgeçmiş	76

1. GİRİŞ-AMAÇ

Helicobacter pylori (*H. pylori*) yaklaşık olarak dünyada dört milyar insanı etkileyen bir bakteridir. Bu bakteri kronik gastrit, atrofik gastrit, peptik ülser hastalığı, gastrik adenokarsinom ve mide mukozasıyla ilişkili lenfoid doku lenfoması (MALT) ile ilişkilidir (1) *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı dünyada %25-80 arasında değişmektedir. Türkiye’de ise *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı %77,2’dir (2).

Klaritromisin (CLA) *H. pylori* eradikasyonunda en çok tercih edilen antibiyotiktir; ancak günümüzde klaritromisin direncinin giderek artması eradikasyon tedavisinin başarısını sınırlamaktadır (3, 4). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), klaritromisine dirençli *H. pylori*’yi antibiyotik araştırma ve geliştirme için yüksek öncelikli olarak belirlemiştir. Dünya’da *H. pylori*’nin klaritromisin direnci 2006-2008 yılları arasında %13’ten; 2012-2016 yılları arasında %21’e yükselerek önemli ölçüde artmıştır (5). Türkiye’de ise *H. pylori*’nin klaritromisin direnç prevalansı %24,8 olarak saptanmıştır (6).

Klaritromisin direncine en sık neden olan mekanizma, 23S rRNA’nın peptidil transferaz bölgesinin V domainindeki metilasyon veya nokta mutasyonuyla modifikasyona uğramasıdır. Klaritromisine dirençli *H. pylori* izolatlarının 23S rRNA mutasyonları Japonya’da %95 oranında A2143G ve A2142G, Avrupa’da %97,7 oranında A2143G, A2142G ve A2142C, Amerika Birleşik Devlet’inde %91,4 oranında A2143G ve A2142G içerdiği bildirilmiştir (7). Bu nokta mutasyonların analizi ile çoğu klaritromisine dirençli *H. pylori*’nin tespit edilebileceği gösterilmiştir.

Dışkı örneklerinden gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gen mutasyonunun saptanması, noninvaziv bir yöntemdir ve mide biyopsi örneğinden kültür yöntemi ile *H. pylori* izolasyonu olmadan gerçekleştirilebilir. Dışkı örnekleri kullanılarak yapılan bir gerçek zamanlı PZR testi, endoskopik incelemenin yapılmasının zor olduğu durumlarda pediyatrik hastalarda, gebelerde ve *H. pylori* tedavisinin takibinde etkili olabilir. Klaritromisin direnci, moleküler yöntemlerle nokta mutasyonları saptanarak, fenotipik olarak uygulanan antibiyotik duyarlılık

testlerinden daha hızlı tespit edilebilir. Dışkı örneklerinden gerçekleştirilecek bir gerçek zamanlı PZR, *H. pylori*'nin hızlı tespitini sağlayabilir. Dışkı örnekleri aynı zamanda *H. pylori* antijenlerinin saptanması için de kullanılmaktadır. Ancak dışkıda antijen testi antibiyotik duyarlılığı açısından bilgi vermemektedir. Literatürde dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile klaritromisin nokta mutasyonlarının kültür bazı duyarlılık testlerine göre daha hızlı, tekrarlanabilirliğinin daha yüksek ve standardizasyonunun daha kolay olduğuna dair veriler bulunmaktadır (8, 9). *H. pylori* CLA nokta mutasyonları moleküler yöntemlerle dışkıda saptanabilmektedir. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olacak şekilde tasarlanmış, diğer bakteri türleri arasında olabildiğince az homoloji gösteren ve mutasyon bölgelerine mümkün olduğu kadar yakın olan primerlerin kullanımı saptama başarısını arttırmaktadır (10).

Bu çalışmada, mide biyopsi ve dışkı örneklerinden moleküler yöntemlerle *H. pylori*'nin tespit edilmesi; mide biyopsi örneklerinin kültüründen izole edilen *H. pylori* izolatlarının fenotipik yöntemlerle antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi; gerçek zamanlı PZR yöntemi ile dışkı ve mide biyopsi örneklerinde tespit edilen klaritromisin nokta mutasyonlarının belirlenmesi ve klaritromisin direnci saptamada ilgili yöntemlerin karşılaştırılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İnsan midesinde bakterilerin varlığının gözlenmesi 100 yıl öncesine dayanmakta olup, bakterilerin gastrit ve peptik ülser ile ilişkisi 1970'lerden itibaren bilinmektedir (11). Barry Marshall ve Robin Warren'in 1984 yılında yaptığı çalışmada gastroskopi için başvuran 100 hastanın antral mukozasından biyopsi örnekleri alınmış ve 58 hastada sarmal ve kıvrık basiller gözlenmiştir. Mide biyopsi örneklerinin 11'inde kültürde flajellalı ve mikroaerofilik gram negatif basiller saptanmış ve bu bakteri *Campylobacter pyloridis* olarak tanımlanmıştır (12). Bu buluşun ardından yapılan tiplendirme çalışmaları ile mikroorganizmanın *Campylobacter* cinsi içinde olmadığı belirlenmiş ve bu bakteri *Helicobacter pylori* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (13). Histopatolojik incelemelerde polimorfonükleer enflamasyon ve kronik aktif gastrite neden olduğu gözlenmiştir (14). Koch'un patojenite varsayımı *H. pylori* keşfinin ilk günlerinden beri belgelenmiştir (15).

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü 1994 yılında *H. pylori*'nin peptik ülserle neden olduğunu ve eradikasyonu için tedavi edilmesi gerektiği bildirmiştir. DSÖ altında bir yapı olan Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı, *H. pylori*'nin insanlarda birinci sınıf karsinojen olduğunu bildirmiştir (16). *H. pylori* eradikasyon tedavisi ile enfeksiyon hastalığının komplikasyonları en aza indirilebilir ve mide kanseri riski azaltılabilir.

H. pylori eradikasyon tedavisinde en sık kullanılan antibiyotiklerden biri olan klaritromisine karşı artan direnç nedeniyle DSÖ, 2017 yılında *H. pylori* 'yi antibiyotik araştırmaları için yüksek öncelikli patojen olarak belirlemiştir (17).

H. pylori'nin mide hastalıkları üzerindeki patojenik etkisinin yanı sıra, bakterinin irritable bağırsak sendromu, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, nörolojik, kardiyovasküler, serebrovasküler, metabolik hastalıklar gibi ektragastrik hastalıklarla da ilişkili olabileceğine dair kanıtlar giderek artmaktadır (18).

2.2. Epidemiyoloji

H. pylori, dünya nüfusunun yaklaşık yarısını enfekte eden bir insan patojeni olarak kabul edilmektedir (2). Gelişmekte olan ülkelerde prevalansının yüksek olması kişilerin yaşam tarzıyla ilişkilendirilebilir. Epidemiyolojik açıdan yaş, yaşam standartları, sosyoekonomik durum ve coğrafi bölgeye göre farklılıklar gözlenmektedir (19).

H. pylori prevelansı ülkeler ve yerel bölgeler arasında değişkenlik göstermektedir. *H. pylori* prevalansı en yüksek Afrika (%79,1), Latin Amerika ve Karayipler (%63,4) ve Asya'da (%54,7) görülmektedir. Buna karşılık, *H. pylori* prevalansı en düşük Kuzey Amerika (%37,1) ve Okyanusya'da (%24,4) görülmektedir (2). Çocuklarda *H. pylori* enfeksiyonunun küresel prevalansı %32,3 olarak saptanmıştır (20). Ülkemizde *H. pylori* prevalansını inceleyen en kapsamlı çalışma 2013 yılında yapılan Türkiye *H. pylori* prevalans araştırmasının sonuçlarıdır. Bu çalışmada, 18 yaş üstü 5.549 kişiye ¹³C üre nefes testi uygulanmıştır. *H. pylori* pozitifliği %82,5 olarak saptanmıştır. En yüksek prevalans Türkiye'nin doğu bölgesinde %88 oranında saptanırken, en düşük prevalans güney bölgesinde %79 oranında saptanmıştır. Türkiye'nin merkezinde *H. pylori* pozitifliği %85, kuzey bölgesinde %82,3, batı bölgesinde ise %80,3 olarak bildirilmiştir (21).

H. pylori'de antibiyotik direnç prevalansına bakıldığında klaritromisin, metronidazol ve levofloksasine karşı primer ve sekonder direnç oranlarının incelendiği sistematik derlemede Amerika ve Güneydoğu Asya'da primer klaritromisin direnci ve Avrupa'da primer levofloksasin direnci hariç tüm DSÖ bölgelerinde direnç oranları ise $\geq$ %15 olarak saptanmıştır. *H. pylori*'nin antibiyotik direncinin dünya çapında artmış olması endişe vericidir ve eradikasyon tedavisinin etkinliğini büyük ölçüde etkilemektedir (5).

2.3. Bulaş Yolları

H. pylori'nin kabul edilen bulaş yollarından en önemlisi fekal-oral yolla bulaştır (22, 23). *H. pylori*'nin diğer bulaş yolları ise gastro-oral, oral-oral yol olarak

bildirilmiştir (24, 25). Genetik olarak özdeş *H. pylori* suşlarının birden fazla aile üyesinde saptanması aynı yaşam ortamını paylaşan kişiler arasında bulaşmayı desteklemektedir (26, 27). Yetersiz şekilde dezenfekte edilmiş endoskopik malzemelerin kullanımını takiben iyatrojenik enfeksiyonlar da belgelenmiştir (28).

Mayalar *H. pylori* bulaşı için rezervuar olabilir. Şili’de yapılan bir çalışmada, 102 term gebe kadından alınan vajinal örneklerin %43’ünde maya saptanmıştır. Vajinal maya örneklerinin yarısında *H. pylori* 16S rDNA pozitif bulunmuştur. *H. pylori*’nin vajinal mayalar ile endosimbiyotik olarak yaşayabileceği ve doğum sırasında vertikal bulaşma olabileceği düşünülmektedir (29). Başka bir çalışmada, Şili’li öğrencilerden alınan 72 oral örneğin üçte birinde mayalar saptanmış ve bunların %62,5’inde *H. pylori* 16S rDNA’sı da bulunmuştur (30).

Dore ve arkadaşlarının çalışmasında koyun ve çoban köpeklerinden elde edilen dışkılarda *H. pylori* antijeni ve serumlarda anti *H. pylori* IgG pozitifliği saptanmıştır. Kontamine hayvan ürünleri veya yiyeceklerle bulaş olabileceğini düşündürmektedir (31). Su, yiyecek, evcil hayvanlar veya vektörler aracılığı ile bulaş yolları araştırılmaktadır (32, 33).

2.4. Sınıflandırma

H. pylori sarmal morfolojisi, zorunlu mikroaerofilik olması ve biyokimyasal özellikleriyle *Campylobacter* cinsine benzemektedir. *H. pylori* ayrıca üreaz aktivitesine ve çoklu kılıflı flajellaya sahiptir. *Campylobacter* cinsine göre farklılık gösteren bu özellikler nedeniyle 1988 yılında taksonomik olarak *Helicobacteraceae* ailesi *Helicobacter* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Günümüzde *Helicobacter* cinsine ait 41 onaylanmış tür tanımlanmıştır (34). *Helicobacter* cinsinin tüm üyeleri mikroaerofilik olup katalaz ve oksidaz pozitifdir. Tüm türler olmasa da birçoğu üreyi hidrolize edebilmektedir. *H. pylori* dışında birçok yeni *Helicobacter* türü tanımlanmıştır. *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. caesarodunensis*, *H. burdigaliensis* ve *H. labetoulli* dahil olmak üzere bu yeni türlerin bazıları insanlarda da tespit edilmiştir (4). *H. heilmannii*, *H. felis* ve *H. suis*’in insanda gastritle ilişkisi olduğunu gösteren vaka serileri bulunmaktadır (35). Bu türlere aynı zamanda kedi, köpek ve insan dışı diğer

primatlarda rastlanılması, enfeksiyonun insanlara zoonoz olarak bulaşabileceğini düşündürmektedir (36, 37). *H. pylori* dışındaki türlerin insan hastalıklarındaki rolü hakkındaki verilere rağmen, bildirilen ilişkilerin çoğu sınırlı kanıta dayanmaktadır. *H. pylori* dışındaki türlerin insanda mide hastalıklarındaki rolü hakkında daha fazla araştırma gerekmektedir (38).

2.5. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

H. pylori 2.5-5.0 µm uzunluğunda ve 0.5-1.0 µm genişliğinde sarmal şekilli, mikraerofilik, gram negatif, hareketli bir bakteridir (39). İki veya altı adet ve yaklaşık üç µm uzunluğunda unipolar flajellası bulunmaktadır. Bu yapılar *H. pylori*'nin, gastrik mukoza içinde hareket etmesini ve kolonize olmasını sağlar. Sıvı veya katı besiyerinde kültürü yapıldığında, Gram boyama ile tipik sarmal veya basil şeklindeki görünümüyle morfolojik olarak karakterize edilebilir. *H. pylori*'nin olumsuz koşullar altında morfolojik olarak varyasyona uğrayabileceği gösterilmiştir. *H. pylori*'nin kokoidal formu değişken pH, antimikrobiyal tedavi ve yüksek oksijene maruziyet gibi çevresel koşullar tarafından indüklenmektedir. Bu durumda bakteri hücresi enzimatik olarak inaktif hale gelir. Kokoidal formda *H. pylori* canlı ancak kültüre edilemez olarak tanımlanmaktadır. Bu durum *H. pylori*'nin saptanmasında zorluklara neden olmaktadır. Kokoidal formda *H. pylori*'nin virülans faktörleri kaybolmamaktadır ve bu form tedavi başarısızlığının önemli bir nedeni olarak görülmektedir (40-42).

Dokudan hazırlanan kesit ve yaymalar veya kültürden hazırlanan preparatlar Gram boyası ile boyanarak gram negatif kıvrık basiller görülebilir. *H. pylori*'nin tanısında mide biyopsi örneği hematoksilen ve eozin, Giemsa, Warthin-Starry veya Genta boyası gibi özel boyalar kullanılarak incelenmektedir (43-45).

2.6. Üreme ve Kültür Özellikleri

H. pylori mikraerofilik, hareketli bir bakteridir. *H. pylori* optimal yaşam koşulları için yüksek nemli ortam, pH 5,5-8, %5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂ seviyeleri ve 34-40 °C (optimal 37 °C) sıcaklık gereklidir (46). *H. pylori*'nin in-vitro koşullarda üremesi için kan, hemin, serum, kömür, mısır unu, yumurta sarısı gibi katkı maddeleri ile hazırlanan özel bir besiyeri kullanılmalıdır. Kültür için besiyerine antimikrobiyal

bileşikler eklenirse kontaminasyon engellenerek izolasyon şansı artırılır. Gram pozitif kokları inhibe etmek için vankomisin veya teikoplanin; gram negatif basilleri inhibe etmek için polimiksin, nalidiksik asit, kolistin, trimetoprim veya sefsulodin ve mantarları inhibe etmek için nistatin veya amfoterisin B tercih edilmektedir. Sefsulodin ve amfoterisin B'nin eklendiği Skirrow formülünün bir modifikasyonu olan Dent takviyesi ticari olarak bulunmaktadır (47).

Morfolojik karakterizasyona ek olarak, biyokimyasal özellikleri katalaz, oksidaz ve üreaz pozitif olmasıdır (48).

2.7. Genom ve Plazmitler

Tomb ve arkadaşlarının 1997'de *H. pylori* 26695 suşunun ve Honcock ve arkadaşlarının 1998 yılında J99 suşunun genomik dizi analizini yapmalarıyla *H. pylori*'nin genomu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu suşların gen büyüklükleri yaklaşık 1.700.000 baz çifti (bç) olup G+C içerikleri %35-40 kadardır. Bu düşük G+C oranı sık görülen rekombinasyonların başlıca nedenidir. *H. pylori* 26695 suşunun genomu 1.587 gen, J99 suşunun genomu 1.491 gen içermektedir. Her iki genom da 16S, 23S ve 5S rRNA genlerinin iki kopyasını bulundurmaktadır. Genlerin 300'den fazlası bakterinin membran yapısı ile ilişkilidir. Virülansla ilişkili *vakuolize edici sitotoksin geni (vacA)*, *sitotoksinle ilişkili gen A (cagA)*, *adezin geni (hpaA)*, *flagellin genleri (flaA ve flaB)*, üreaz gen kümesinin yapısal alt birimlerini kodlayan *ureA* ve *ureB* geni, üreaz aktivitesi için gerekli olan *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* ve *ureI* genleri gibi birçok gen bölgesi bulunmaktadır (49-51).

H. pylori ATCC 43504 ise 1.680.829 bç'lik dairesel bir kromozomdan oluşur. G+C içeriği ise %38,82 kadardır. Kromozomu 1.615 kodlama dizisi, üç rRNA geni (5S, 16S ve 23S), 36 tRNA kodlama bölgesi ve 59 kodlama yapmayan “small RNA” içerir. *Cag patojenite adası (cagPAI)*, *vacA*, *babA* gibi virülans gen bölgelerini içermektedir (52).

Yapılan çalışmalarda *H. pylori* suşlarının %40 oranında plazmit taşıdığı gösterilmiştir. Büyüklükleri 1,5-23,3 kb arasında değişen plazmitler bulundurulur, ancak plazmitler virülans faktörü içermezler (53, 54).

2.8. Patogenez ve Virülans Faktörleri

2.8.1. Patogenez

H. pylori, gastrik mukus tabakasının içinde veya altında yaşamakta olup, mide ortamına yüksek oranda uyum sağlamıştır. *H. pylori*, enfeksiyon başlangıcında üreaz aktivitesi ile midenin asidik durumunu nötralize eder. *H. pylori*’nin konak mide epitel hücrelerine doğru hareket etmesi için flajella aracılı motilite gereklidir. Takiben bakteriyel adezinler ile konak hücre reseptörleri arasındaki özgül etkileşimler sonucunda kolonizasyon ve kalıcı enfeksiyon gelişir. *H. pylori*, *cagA* ve *vacA* gibi birçok efektör protein ve toksin salgılayarak doku hasarına neden olur. Ayrıca *H. pylori* ile konak arasındaki mide epitel tabakası, doğal bağışıklık araçları nötrofilleri aktive eden kemokinler salgılar. Gastrit ve peptik ülser gibi klinik hastalıkların oluşumuna yol açarlar.

Özetle, *H. pylori* kolonizasyonu ve patogenezi için dört adım kritiktir:

- (1) Asidik mide koşulları altında hayatta kalma
- (2) Flajella ile epitel hücrelerine doğru hareket
- (3) Adezinler tarafından konak hücre yüzey reseptörlerine bağlanma
- (4) Toksin salınımı yoluyla doku hasarı

Bakteriye Ait Faktörler

H. pylori’nin midenin asidik ortamına uyumunda en önemli faktörlerden biri üreaz enzimi salgılayabilmesidir. Üreaz enzimi, birkaç heterodimerden oluşmakta ve ürenin CO₂ ve NH₃’e metabolizmasını katalize etmektedir. Böylece midenin asiditesini nötralize eder ve *H. pylori*’nin etrafında bir “tampon tabaka” oluşturur. Üreaz negatif olan *H. pylori* mutantları azalmış patojenite ile ilişkilidir (55). Üreaz aktivitesi mononükleer fagosit aktivasyonunu ve sitokin üretimini uyaran bir faktördür (56).

Gastrik lümen ve gastrik mukoza arasında viskoelastik bir mukus tabakası bulunmaktadır. *H. pylori*'nin flajellası mukus tabakasında motiliteyi sağlayarak bakterinin mide epitel hücrelerine kolonizasyonuna izin verir. *H. pylori*'de 4-8 adet unipolar flajellası bulunmaktadır. *H. pylori* flajellasının elektron mikroskopik görüntüsünde kılıf ve flajella ucunda ampul şeklinde bir genişleme görülmektedir (57).

Bakteriyel adezyon, kısmen bir dizi adezin ve dış membran proteinleri tarafından gerçekleştirilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunun patogeneğinde BabA (HopS), OipA (HopH) ve SabA (HopP) üç Hop proteini rol oynar (58). Bu adezin proteinlerinden en iyi bilineni Hop protein ailesinden BabA dış membran proteindir. Konak hücrelerde fukozillenmiş kan grubu antijenlerine bağlanmaya aracılık eder (59). OipA bir adezin görevi görebilir, aynı zamanda interlökin-8 ekspresyonunu artırarak enflamasyonu da destekler (60). SabA, sialik asit içeren glikokonjugatlara bağlanmaya aracılık eder ve nötrofillerin aktivasyonunda rol oynar (61). Bununla birlikte, *H. pylori* lipopolisakkariti ve konak LewisX kan grubu antijenlerinin homolog yapıları, hücre hasarı ile birlikte otoimmün tepkimeye yol açabilir (62). *H. pylori* ayrıca mide epitel hücrelerinin yüzeyindeki sınıf II majör histokompatibilite kompleksi (MHC) moleküllerine bağlanabilir ve apoptozu indükleyebilir (63).

H. pylori, lipit A omurgasının 1' ve 4' pozisyonlarından fosfat gruplarının çıkarılmasıyla dış membrandaki lipit A yapısını değiştirir. *H. pylori*'nin lipit A alanının 4'-fosfat grubunun fosforilasyonundan sorumlu enzim, Jhp1487 (LpxF), tanımlanmıştır. *H. pylori* lipopolisakkaritinin lipit A alanının LpxE ve LpxF tarafından defosforilasyonunun memeli konağı kolonize etmede anahtar rolü olduğu gösterilmiştir (64).

H. pylori suşlarının büyük kısmı 95-kD molekül ağırlığındaki bir toksin olan vacA proteinini üretir. Toksin epitel hücre membranına etki eder ve burada voltaja bağımlı anyon transport kanalı oluşturarak, konak hücre polaritesini bozar. T hücre proliferasyonunu indükler ve efektör fonksiyonunu baskılar (65). VacA, potansiyel olarak gastrik epitelin üreye geçirgenliğini artıran ve böylece *H. pylori* enfektivitesi için uygun bir ortam yaratan pasif bir üre taşıyıcısı gibi davranmaktadır (66).

Çoğu *H. pylori* suşu *cag* patojenite adasını (*cagPAI*) bulundurur. *CagPAI* 40 kb büyüklüğünde *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagI*, *cagL*, *cagM* ve *virB* gibi 31 gen içeren bir açık okuma bölgesidir. Bu gen adası virülans ve adaptasyonla ilgili proteinleri ve özellikle Tip-IV sekresyon sisteminde rol alan proteinleri kodlar. Tip-IV sekresyon sistemi 120-kD molekül ağırlığındaki *cagA* proteinin taşınmasında rol oynar. *VacA* ve *cagA* üreten suşlar sitokin üretimini indüklerler ve daha yoğun doku enflamasyonuna neden olurlar (67, 68).

Konağa Ait Faktörler

H. pylori enfeksiyonlarında hastaya ait yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, eğitim düzeyi, aile yapısı ve genetik yatkınlık gibi faktörler önemlidir (69).

Sonuç olarak, *H. pylori* enfeksiyonunun patofizyolojisi ve klinik sonucu, konak ile bakteri arasındaki karmaşık bir etkileşim olarak görülmektedir.

2.8.2. Virülans Faktörleri

H. pylori'de bulunan üreaz, katalaz, müsinaz, fosfolipaz gibi enzimleri, nötrofil aktive edici protein (NAP), lipopolisakkarit, *sitotoksin ile ilişkili gen A* (*cagA*), *vakuolize edici sitotoksin A* (*vacA*), dış inflamatuvar protein A (*oipA*), *duodenal ülseri destekleyen gen A* (*dupA*), sialik asit bağlayıcı adezin (*sabA*) ve kan grubu bağlayıcı adezin antijeni (*babA*) gibi patojenik faktörler bakterinin artan virülansı ile ilişkilidir (70-73). *H. pylori*'nin virülans faktörleri ve patogenezdaki rolleri Tablo 2.1'de sunulmaktadır.

Tablo 2.1. *H. pylori*'nin virölans faktörleri ve patogenezdaki rolü

Virölans Faktörleri	Patogenezdaki Rolü
Üreaz	Midedeki asidik ortamın nötralizasyonu ve mononükleer fagosit aktivasyonu
Katalaz	Gastrik mukozada yaşama
Fosfolipaz	Mukus katmanını ve epitel hücre membranını sindirme
Flajella	Hareket ve kolonizasyon
NAP	İnflamatuvar hücrelerin oksidatif metabolizmasının aktivatörü, kemotaktik
BabA	Dış membran proteini; fukozillenmiş kan grubu antijenine bağlanma ve adezyon
CagA	Konak hücreye girme, konak hücrelerinin sıkı bağlantılarını parçalama, malignite oluşumu
CagPAI	Tip IV sekresyon sistemini kodlayan 29 geni içeren bölge
OipA	Dış membran proteini; proinflamatuvar sitokin ekspresyonu ile MMP-1'in uyarılması, beta-kateninin nukleusa göçü
DupA	Antrumda IL-8 indüksiyonu, monositlerdeki IL-12'yi indükleme
SabA	Dış membran proteini; epitel hücresindeki siyalize-Lex'e bağlanma ve nötrofillerin aktivasyonu
VacA	Konak hücre polaritesini bozma, T hücre proliferasyonunu indükleme ve efektör fonksiyonunu baskılama, epitel hücre hasarı

2.9. Laboratuvar Tanısı

H. pylori enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler invaziv (histoloji, kültür, hızlı üreaz testi, moleküler yöntemler) ve noninvaziv (üre nefes testi, antikor testleri, dışkıda antijen testi, moleküler testler) yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

2.9.1. İnvaziv Testler

Hızlı Üreaz Testi

Gastroduodenal endoskopi ile alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneklerine uygulanan hızlı üreaz testi maliyet etkin, 15 dakikada sonuç alınabilen kolay bir tekniktir. *H. pylori*’nin üreaz aktivitesi ile üre parçalanır ve oluşan amonyak, ortamın pH’sını yükselterek fenol kırmızısı indikatörün renginin değişmesine neden olur. Hızlı üreaz testinin reaksiyon hızı kısmen sıcaklığa da bağlıdır.

Proton pompa inhibitörü, antibiyotik kullanımı veya örnekte az miktarda bakteri bulunması yanlış negatif üreaz testi sonucuna; üreyi parçalayan diğer mikroorganizmaların varlığı ise yanlış pozitif sonuca yol açabilir. Jel bazlı (CLOtest, HpFast), kâğıt bazlı (PyloriTek, ProntoDry) veya sıvı bazlı (UFT300, EndoscHp) ticari test formları ve laboratuvarlarda hazırlanmış üreli besiyerleri kullanılabilmektedir (74, 75). Birincil tanı testi olarak çeşitli üreaz testlerinin duyarlılığının yaklaşık %80-100 arasında ve özgüllüğünün %97-99 arasında olduğu bildirilmiştir (76).

Histopatolojik İnceleme

H. pylori’nin tanısında histopatolojik inceleme ile gastroduodenal patolojiler, preneoplastik ve neoplastik oluşumlar (atrofi, metaplazi, displazi, malignite, lenfoma) saptanabilir. Pahalı bir yöntemdir ve deneyimli personel gerektirir. Histopatolojik inceleme ile güncellenmiş “Sydney System” sınıflandırması kullanılarak skorlama yapılmaktadır (77). “Sydney” skorlaması gastrit aktivitesi ve *H. pylori*’nin bakteri yoğunluğunu derecelendirmek için kullanılmaktadır. Histopatolojik inceleme %94

duyarlılık ve %99 özgüllük değerleri ile *H. pylori* enfeksiyonu tanısında kullanılan konvansiyonel bir yöntemdir (78).

Kültür

H. pylori'nin kültürü için en iyi örnek, gastroduodenal endoskopi esnasında alınan mide antrum ve korpus biyopsi örnekleridir. Tanıda altın standart olarak kabul edilmekle birlikte uygulanmasındaki zorluklardan dolayı rutin pratikte tercih edilmemektedir. Ancak son yıllarda kılavuzlarda eradikasyon tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi nedeniyle tedaviye yanıt alınamayan vakalarda mide biyopsi örneklerinin kültürü ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir (4).

Tanı yöntemlerinin duyarlılığını arttırmak için antibiyotik veya antisekretuar ilaçların, özellikle proton pompa inhibitörlerinin (PPI) endoskopiden iki hafta önce kesilmesi önerilmektedir. PPI'ların direk antimikrobiyal etkisi olmamakla birlikte, midedeki *H. pylori* dağılımını değiştirirler ve özellikle antrumdaki *H. pylori* kolonizasyonunu azaltırlar (79). *H. pylori*'nin midenin farklı bölgelerinde yerleşmiş olabileceği göz önünde bulundurularak, antrumdan iki biyopsi örneğinin yanı sıra anterior ve posterior korpustan birer adet olmak üzere iki biyopsi örneğinin alınması duyarlılığı artırması nedeniyle tavsiye edilmektedir. Kültür için alınan mide biyopsi örnekleri, histopatolojik inceleme için alınan örneklerden önce alınmalıdır. Aksi takdirde fiksasyon için kullanılan sıvının az da olsa kültür örneğini kontamine etme ihtimali olabilir (48).

H. pylori dayanıksız bir mikroorganizma olduğundan, kültür için alınan örneğin laboratuvara taşınması aşamasında da dikkatli olunmalıdır. Oksijen ile maruziyeti engellenmelidir. Gastroduodenal endoskopi ile alınan örnekler laboratuvara yaklaşık iki saat içerisinde ve transport besiyerinde (%20 gliserollü Brucella sıvı besiyeri veya 0,5 ml steril serum fizyolojik) gönderilebilir. Örnekler kültürü yapılanaya kadar +4 C⁰'de en fazla dört saat bekletilebilir (80).

Mide biyopsi örneklerinin steril petri kabında öğütücü veya bistüri ile parçalanarak homojenize edilmesi tavsiye edilmektedir. Örnekler at veya koyun kanı ile zenginleştirilmiş Beyin-kalp infüzyon (BHI), Columbia, Wilkins-Chalgren veya Brucella gibi katı besiyerlerine inoküle edilebilir. Mide biyopsi kültürlerinin duyarlılığı %77- 95, özgüllüğü %100 olarak bildirilmektedir. Kültürün dezavantajı alınan mide biyopsi örneklerinin tüm mide mukozasını temsil etmemesidir. *H. pylori* antimikrobiyal duyarlılık testi olarak Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) *H. pylori* için gradient şerit ve agar dilüsyon yöntemlerini önermektedir (81). Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI M45-A2) kriterlerine göre ise agar dilüsyon yöntemi önerilmektedir (82-84).

Mide biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin kültürü, özel besiyeri ve transport koşulları, uzman laboratuvar ekibi ve uygun ekipman gerektirmektedir. *H. pylori* %5 oksijen bulunan ortamlarda üremektedir. Mide biyopsi örneklerinden antimikrobiyal duyarlılık testleri için dezavantaj; *H. pylori*'nin uzun süreli oksijen maruziyeti nedeniyle ürememesidir. Bu nedenle antimikrobiyal duyarlılık sonuçları her zaman elde edilememektedir.

Moleküler Tanı Yöntemleri

Mide biyopsi, tükürük, dental plak, dışkı gibi klinik örneklerden *H. pylori* tespitinde PZR kullanılmaktadır (85). PZR tabanlı moleküler tanı yöntemleri *H. pylori*'nin tiplendirilmesi, antibiyotik duyarlılık tespiti ve virülans faktörlerinin saptanması gibi amaçlarla kullanılabilir. Moleküler yöntemler ile *ureA*, *glmM*, *ureC*, 16S rRNA, 23S rRNA, *hsp60* ve *vacA* genleri dahil olmak üzere çeşitli hedef genler *H. pylori* tespiti için kullanılmıştır (86). 23S rRNA genini hedefleyen PZR'nin diğer yöntemlere kıyasla mide biyopsilerinde *H. pylori* tespiti için çok daha duyarlı bir yöntem olduğu doğrulanmıştır (87).

2.9.2. Noninvaziv Testler

Üre Nefes Testi (ÜNT)

Üre nefes testi, aktif *H. pylori* enfeksiyonunun tespit edilmesinde pratik ve güvenilir bir yöntemdir. Hastaya suda çözünmüş [^{13}C] işaretli üre çözeltisi içirilir; ardından 60 dakika süreyle nefes örnekleri toplanarak $^{13}\text{CO}_2$ varlığı açısından incelenir. Eğer midede *H. pylori* mevcutsa, üre bakterinin üreazı tarafından hızla hidrolize edilir; işaretli CO_2 kandan emilir ve solunan hava ile dışarı verilir (88).

Bir diğer yöntem ise [^{14}N] içeren radyoaktif işaretli üre kullanılarak üreaz aktivitesinin saptanmasıdır. Hasta enfekte değilse, işaretli CO_2 üretilemez ve izotopun çoğu değişime uğramadan idrarla atılır. *H. pylori* enfeksiyonunun şiddetini yansıtan [^{14}N] üre miktarı, idrarla atılan amonyak içerisindeki ^{14}N yoğunluğu ve atılım hızının ölçülmesiyle değerlendirilir (89). Üre nefes testinin avantajı, midenin tüm mukozasından kaynaklanan üreaz aktivitesini değerlendirmesidir. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde en duyarlı ve özgül yöntem üre nefes testidir (90).

Antikor Testleri

Antikor testleri *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı için yüksek doğruluk ve düşük maliyet nedeniyle rutin pratikte en sık kullanılan testler haline gelmiştir. Serolojik testlerin prensibi hastanın serumunda özgül anti-*H. pylori* IgG antikorlarının saptanmasına dayanır.

Serolojik testlerin avantajları, özel ekipman veya teknik gerektirmeyerek çoğu klinik laboratuvar tarafından uygulanabilmeleridir. Testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü kullanılan antijene, klinik duruma, altın standart olarak karşılaştırılan yönteme ve toplumdaki *H. pylori* prevalansına bağlıdır. Genel olarak yapılan çalışmalarda duyarlılık (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (ELISA) tabanlı testler için) %90-97 ve özgüllük %50-96 arasında bildirilmiştir (91-94).

Serolojik testlerin dezavantajı ise aktif enfeksiyon ile önceden *H. pylori* maruziyeti arasında ayırım yapamamasıdır. *H. pylori* antikor seviyeleri, enfeksiyon

sonrasında iyileşen kişilerin serumunda uzun süre kalabilir. Bu nedenle, bir popülasyonda *H. pylori* için başarılı bir şekilde tedavi edilen hasta sayısı arttıkça seroloji ile yanlış pozitif testlerin oranı artmaktadır (95).

Dışkıda Antijen Testleri

Dışkıda antijen testi uygulaması kolay ve hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Dışkıda antijen testleri, *H. pylori* enfeksiyonu tanısında %94 duyarlılık ve %97 özgüllükle kullanılan noninvaziv yöntemlerden biridir (96).

Dışkıda *H. pylori*'nin tespiti için kullanılan ELISA veya immünkromatografi temelli yöntemler bulunmaktadır. Bu amaçla kullanılan monoklonal antikor temelli testler, poliklonal antikor temelli testlere göre daha yüksek doğruluk oranına sahiptir (96).

Monoklonal antikor içeren antijen testleri, *H. pylori*'nin eradikasyon tedavisinin etkinliğini değerlendirmek için kılavuzlar tarafından önerilen güvenilir bir testtir. Eradikasyonun değerlendirilmesi için tedavinin üzerinden en az dört hafta geçmiş olması gerekmektedir (97). Eradikasyon tedavisinin değerlendirilmesine ek olarak monoklonal antikor içeren antijen testleri, pediyatrik hastalarda *H. pylori* enfeksiyonunun tespiti için uygun olan noninvaziv bir yöntemdir (98).

Dışkıda antijen testleri antibiyotik, proton pompa inhibitörü, N-asetilsistein, üst gastrointestinal kanama gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (99). Test öncesi sıcaklık ve laboratuvara taşınma süresi tanısal doğruluğu etkileyen faktörlerdir (100).

Dışkı Örneklerinden PZR ile *H. pylori* Tespiti

Dışkı örneklerinden PZR ile *H. pylori* DNA'sını saptamaya yönelik ilk girişimler 1993 yılında Mapstone ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (101). Başarısız sonuçlardan, dışkıda hedef DNA'nın düşük miktarda bulunması ve PZR reaksiyonunu kısıtlayıcı inhibitör maddelerin varlığının sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Bu inhibitörleri bitkisel kökenli karmaşık polisakkaritler olarak tanımlamışlardır. Bu bileşikler ortadan kaldırmak için göreceli olarak daha uzun süren, kompleks

ekstraksiyon yöntemleri önerilmektedir (48). Dışkı örnekleri, PZR öncesi DNA izolasyon adımlarının oldukça önemli olduğu klinik materyallerdir.

Dışkı örneklerinden PZR yönteminde sebze içermeyen 48 saatlik diyet, dışkıda bulunan inhibitörlerin miktarını azaltabilir. Bu gözlem, çeşitlendirilmiş gıdalarla beslenmeyen bebeklerden alınan iyi sonuçlarla uyumludur. Dışkı örneklerinden saf DNA elde etmek için çok fazla sayıda çalışma protokolü bulunmaktadır (102-104).

Dışkıdaki kompleks polisakkarit konsantrasyonları, makro gözenekli polipropilen filtreler ve QIAamp doku kiti (Qiagen, Almanya), Xtraksiyon DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) gibi ticari kitler ve otomatize sistemler kullanılarak önemli ölçüde azaltılmıştır (105).

H. pylori, ekstraintestinal bir patojen olarak dışkıda düşük miktarda bulunur. Bu nedenle doğru sonuçlar elde etmek için yüksek düzeyde duyarlı ve özgül primerlerin seçimi çok önemlidir. *H. pylori* için özgül hedeflerin kullanılması zorunludur çünkü dışkıda *H. cinaedi*, *H. pullorum* ve *H. canis* gibi diğer *Helicobacter* türleri de bulunabilir (48).

Dışkı örneklerinden PZR, dışkıdaki düşük sayıda *H. pylori* miktarı veya intestinal geçiş sırasında DNA'nın bozulması gibi nedenlerle sınırlı performansa sahip olabilir. Ancak noninvaziv bir yöntem olması, hızlı sonuç vermesi açısından geliştirilmeye açık bir yöntemdir.

2.10. *H. pylori* Tedavisi

H. pylori için etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesinde antibiyotik direncine yönelik bölgesel veriler önemlidir. Söz konusu verilerde eksiklik nedeniyle tedavi için uygun strateji belirlemek zordur. *H. pylori* dünyada en yaygın enfeksiyon etkeni olup yeterli ve etkili olmayan tedavi bakterinin direnç kazanmasına yol açmakta ve dirençli *H. pylori* suşları toplumda yayılmaktadır (106).

Dünyanın birçok yerinde, proton pompa inhibitörü (PPI+amoksisilin+klaritromisin (PPI-AC)) içeren üçlü tedavi en sık kullanılan birinci

basamak tedavidir. Antibiyotiklerin kullanım kombinasyonlarına göre farklı tedavi protokolleri bulunmaktadır. Ardışık tedavide standart doz PPI tedavisine ilaveten ilk hafta amoksisilin, ikinci hafta diğer iki antibiyotik (metronidazol, klaritromisin) kullanılmaktadır. Kombinasyon tedavilerinde standart doz PPI tedavisi ile birlikte üç antibiyotik (amoksisilin, metronidazol, klaritromisin) de aynı zaman diliminde kullanılmaktadır. Hibrit tedavide standart doz PPI tedavisi ile birlikte ilk hafta amoksisilin, ikinci hafta amoksisiline ilaveten diğer iki antibiyotik (metronidazol, klaritromisin) kullanılmaktadır (4).

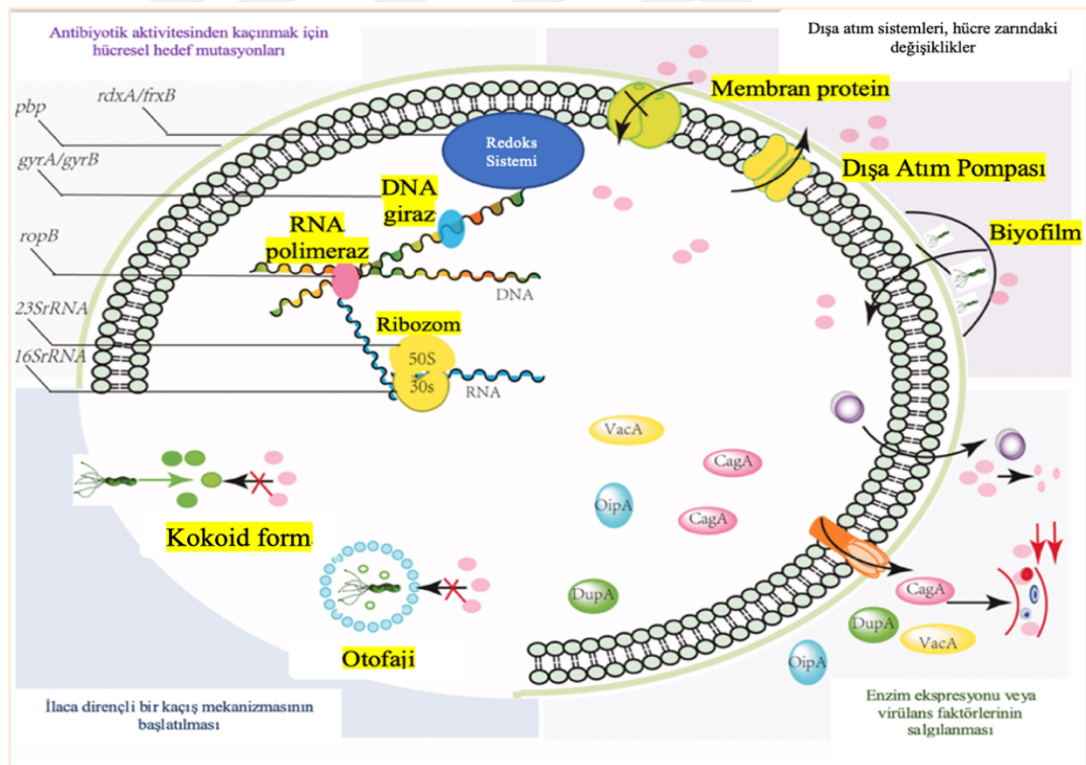
Primer klaritromisin direnç oranlarının %15-20 veya daha fazla olduğu bilinen bölgelerde standart üçlü tedavinin ilk seçenek olarak kullanılması önerilmemektedir. Primer klaritromisin direncinin yüksek olduğu bölgelerde birinci basamak tedavi için diğer temel seçim hala bizmut bazlı dörtlü tedavidir. Bu tedavi rejimi PPI, bizmut, tetrasiklin ve metronidazol içermektedir. Tetrasiklin yerine amoksisilini ikame eden dörtlü bir tedavi de bulunmakta olup daha az kullanılmaktadır. Tetrasiklin direnci nadir, metronidazol direnci ise yaygındır. Metronidazol direnci tedavi süresi uzatılarak aşılabılır. PPI-AC üçlü tedavisine bizmut eklenerek dörtlü tedaviye dönüştürüldüğü ve olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Bizmut olmayan dörtlü tedaviler ise PPI-AC üçlü tedavisine metronidazol eklenmesi anlamına gelir. İkinci basamak tedavi protokollerinde levofloksasin içeren üçlü tedaviler, üçüncü basamak tedavilerde ise antimikrobiyal duyarlılık ve kültür sonuçlarına göre tedavi planlaması yapılması önerilmektedir (33).

Potasyum iyonlarına karşı yarışmalı asit bloker vonoprazan, geri dönüşümlü olarak mide asidi sekresyonunu inhibe eder. H^+/K^+ ATPaz'ın sistein molekülü ile disülfür bağları oluşturur. Uzun süreli asit baskılama, yüksek gastrin salınımı, hipoklorhidri ve emilim bozukluğuna neden olabilir. Eradikasyon tedavisinde PPI yerine vonoprazan gibi potasyum-yarışmalı asit blokerler, CYP2C19 polimorfizmlerinden etkilenmezler ve gastrik asit sekresyonunun daha homojen ve güçlü inhibisyonuna neden olurlar (107). *H. pylori*'nin eradikasyonu için vonoprazan ve amoksisilin ile ikili tedavi yeni bir tedavi stratejisi olabilir (108).

2.11. *H. pylori* Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

H. pylori 'nin antibiyotik direnci, bu patojenin başarılı bir şekilde eradikasyonu için önemli bir sorun oluşturmaktadır. *H. pylori* 'nin antibiyotik direnç mekanizmaları patojen ve konak açısından incelenmektedir. Hem patojene hem de konağa bağlı olarak *H. pylori* ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının kapsamlı bir şekilde anlaşılması, uygun tedavi rejimlerinin uygulanmasına ve eradikasyona yardımcı olacaktır.

H. pylori 'nin antibiyotik direncinde rol oynayan mekanizmalar hedef bölge mutasyonları, antibiyotiklerin hücre içi konsantrasyonunu azaltan dışa atım pompaları, hücre membranının geçirgenliğinin azalması, antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin ekspresyonu, virülans faktörlerinin salgılanması, sekresyon sistemleri, biyofilm üretimi, *H. pylori* kokoid formu ve indüklenmiş otofaji olarak sıralanabilir (40).



Şekil 2.1. *H. pylori* antibiyotik direnç mekanizmalarının şematik çizimi

1) Antibiyotik aktivitesinden kaçmak için hedef bölge mutasyonları, 2) Dışa atım pompası, hücre membranındaki değişiklikler, 3) İlaç dirençli kaçış mekanizmasının başlatılması, 4) Enzim ekspresyonu ve virülans faktörlerinin salgılanması (40).

Biyofilm oluşumu bakterilerin dış ortamda çevresel strese karşı direncini artırır. Biyofilm oluşturan patojenler, 10 ila 1000 kat daha fazla antibiyotik direnci sergilemektedir. Yonezawa ve arkadaşları, biyofilm oluşumunun *H. pylori*'nin klaritromisin direncini 4–16 kat arttırdığını saptamışlardır (109, 110).

İlaç metabolizmasında görev yapan enzimlere ait genlerdeki polimorfizmler, mide asidi sekresyonunda rol oynayan genlerdeki polimorfizmler, konak bağışıklık durumundaki farklılıklar ve konağın geçmişindeki hastalıklar *H. pylori*'nin antibiyotik direncinde rol oynayan konağa ait faktörlerden önemli başlıklardır (111-114).

Klaritromisin Direnci

Dünya genelinde *H. pylori* eradikasyon oranı antibiyotik direncinin artması nedeniyle giderek azalmıştır. Özellikle klaritromisin direnci 2006-2008 yılları arasında %13'ten 2012-2016 yılları arasında %21'e yükselerek önemli ölçüde artmıştır (5).

Klaritromisin, *H. pylori* eradikasyonunda kullanılan en etkili antibiyotiktir. Bu antibiyotiğin asit pH'daki stabilitesi ve midede iyi emilimi diğer makrolidlerden daha üstün olmasını sağlayan yönleri olup, *H. pylori*'nin eradikasyonu için iyi bir seçenek oluşturmaktadır (115). Klaritromisinin antibakteriyel etkisi bakteride 23S ribozomal RNA molekülünün V alanının peptidil transferaz halkası ile etkileşime girmesi sonucunda protein sentezini inhibe etmesine bağlıdır.

Makrolidlerin hedef bölgesi olan 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesinin V domaininde oluşan metilasyon veya bu bölgede gelişen nokta mutasyonlar sonucunda ribozom modifikasyona uğrar ve antibiyotik bağlanamaz. Ribozomal hedef değişiklikleri içerisinde 2142. pozisyonunda bir adeninin sitozin ile yer değiştirmesi ya da 2142. ve 2143. pozisyonlarından birinde adeninin guanin ile yer değiştirmesi söz konusudur. Bu mutasyonlar birçok makrolid için ribozomların afinitesinin azalmasına neden olur ve direnç artışıyla sonuçlanır. A2143G, A2142G ve A2142C mutasyonları klaritromisin direncinin %80-90'ından sorumludur (116). Ayrıca A2115G, G2141A, G2172T, T2182C, T2190C, C2195T, A2223G, G2224A, G2245T, G2254T, T2289C

ve C2611A mutasyonları da primer ve sekonder klaritromisin direnciyle ilişkilendirilmiştir (117).

Ribozomal proteinlerden L22'yi kodlayan hp1314 (*rpl22*) geni ve translasyon başlatma faktörü IF-2'yi kodlayan hp1048 geni (*infB*) mutasyonları ve aktif dışa atım pompaları da makrolid direncinden sorumludur. Bir dışa atım pompası inhibitörü olan “Phe-Arg- β -naftilamidin”, klaritromisinin minimum inhibitör konsantrasyonunu düşürdüğü saptanmıştır (41, 118).

Dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu veya hücre zarının geçirgenliğindeki değişiklikler, antibiyotiklerin hücre içi konsantrasyonunu azaltarak etkilerini düşürür. Smiley ve arkadaşlarının klaritromisine duyarlı ve dirençli *H. pylori* izolatlarını karşılaştırmalı proteomik analizlerle değerlendirdiği çalışmalarında klaritromisine dirençli *H. pylori*'de “iron-regulated membrane protein”, “urease B”, “elongation factor thermo unstable” ve “putative OMP”nin aşağı regüle edildiği; hopT (*BabB*) transmembran proteini, hofC ve OMP31'in ise yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada *H. pylori*'de OMP değişikliklerinin klaritromisin direncinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (119).

Birinci basamak sağlık kuruluşlarında solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde sık klaritromisin kullanımının, *H. pylori* izolatlarının klaritromisin direncine önemli katkı sağladığı düşünülmektedir (120). Yaygın antibiyotik direnci ve ampirik eradikasyon tedavisinin başarısızlığı nedeniyle, yüksek klaritromisin direnci oranlarına (>%15) sahip bölge veya popülasyonlarda, kültür ve standart antibiyotik duyarlılık testleri veya moleküler yöntemler ile saptanan direnç sonuçlarına göre tedavi önerilmektedir (4).

H. pylori'nin ve klaritromisin direncine neden olan mutasyonların 2-4 saat içinde yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptanmasına izin veren tanısal ticari kitler bulunmaktadır (10, 121, 122). Gerçek zamanlı PZR kitleri, 23S rRNA geninde oluşan üç nokta mutasyona (A2142G, A2143G ve A2142C) bağlı olarak ortaya çıkan klaritromisin direncini saptama yeteneğine sahiptir. *H. pylori* ve klaritromisin direncinin tespiti için “*H. pylori* ClariRes” (Ingenetix, Viyana, Avusturya), “Allplex

H. pylori ve ClariR” (Seegene, Kore), “Lightmix® *H. pylori*” (TIB Molbiol, Almanya), “*H. pylori* Taqman® real-time PCR” kiti (Meridian Bioscience, ABD) gibi ticari olarak temin edilebilen bir dizi moleküler testler bulunmaktadır. Bu testler çoğunlukla gerçek zamanlı PZR ile erime eğrisi analizini birleştirir ve mide biyopsisi ve dışkı örneklerine uygulanabilen oldukça özgül ve hızlı (<2 saat) moleküler yöntemlerdir. Bir başka ticari kit olan “Genotype HelicoDR” kiti (Hain Lifescience, Almanya), klaritromisin ve levofloksasin direncini belirlemek için hem 23S rRNA geninde hem de *gyrA* geninde (N87K, D91G, D91N, D91Y) bulunan yaygın nokta mutasyonlarını saptamaktadır (3, 122-124).

Artan antibiyotik direnci *H. pylori*’nin eradikasyonunda kritik bir sorun olmaya devam etmektedir. Kültür öncesi yapılan gerçek zamanlı PZR, yüksek duyarlılık ve özgüllük, hızlı sonuç verme süresi ve örneğin uygun taşınma koşulları nedeniyle daha fazla kullanılmaktadır. Ancak maliyetle ilgili endişeler, mevcut ekipman ve moleküler tekniklerde uzman ekip gereksinimi, gerçek zamanlı PZR’nin uygulanabilir olmasını etkilemektedir.

Metronidazol Direnci

Metronidazol bir öncül ilaçtır. Metronidazolün aktif olabilmesi için bakteriye penetrasyonu ve takiben imidazol halkasının nitro grubu hidroksilamin türevine indirgenmesi gerekir. İndirgenmiş ürün bakteride DNA hasarına neden olur ve hücre ölür (125).

Oksijene duyarsız NADPH redüktaz geninde (*rdxA*) görülen mutasyonlar sonucunda inaktif *rdxA* oluşur ve genin ekspresyonu erken sonlanır. Dirençli suşlardaki *rdxA* genlerinde çerçeve mutasyonları, yanlış anlamlı mutasyonlar, nükleotit delesyonları ve insersiyonları gibi birçok farklı nükleotit değişimlerine rastlanmıştır. Suşların büyük çoğunluğunda *rdxA* geninde mutasyon saptanmıştır. Diğer mekanizmaların daha az rol oynadığı gösterilmiştir (126).

FrxA (NADPH flavin oksidoredüktazı kodlayan) ve *fdxB* (ferredoksin benzeri protein kodlayan gen) genlerinin inaktivasyonu *H. pylori*'nin metronidazole karşı direncini de indükleyebilir (127).

Amoksisilin Direnci

Bir beta-laktam antibiyotik olan amoksisilin, penisilin bağlayıcı proteinlerle (PBP) kovalan bağlanır, peptidoglikan sentezini bloke eder ve hücre duvarı oluşumunu inhibe eder. Bakterisidal etkilidir (128).

Orta veya düşük seviyeli amoksisilin direncine yol açan en yaygın mekanizma *pbp1A* geninde gelişen nokta mutasyonlardır. *H. pylori*'nin amoksisilin direncinde *pbp2*, *pbp3*, *hefC*, *hopC* ve *hofH* mutasyonları da rol oynar (129).

Kinolon Direnci

DNA giraz *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan bakteriyel liyazlar sınıfına aittir. DNA sarmal yapısını korumak için gerekli bir enzimdir. DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve transkripsiyonunda rol oynar.

H. pylori kinolon direncinde *gyrA* geninde amino asit 87, 88, 91 veya 97'yi kodlayan kodon pozisyonlarında nokta mutasyonlar tanımlanmıştır. Düşük seviyeli kinolon direnci 91. Pozisyondaki bir nokta mutasyonla ilişkilendirilirken, 87. Pozisyondaki mutasyon yüksek seviyede bir dirençle sonuçlanabilir (130).

Rifabutin Direnci

Rifabutin, *H. pylori*'de *rpoB* geni tarafından kodlanan DNA'ya bağımlı RNA polimerazın β -alt birimini inhibe eder (131). Literatürde *H. pylori* izolatlarında rifabutine karşı düşük bir direnç oranı kaydedilmiştir (132, 133). Rifabutin içeren tedavi, genellikle çoklu eradikasyon rejimlerinin başarısız olduğu hastalarla sınırlı kullanım alanı olan alternatif bir tedavi seçeneğidir.

Tetrasiklin Direnci

Tetrasiklin bakteride 30S ribozomal alt birime bağlanır ve aminoasil-tRNA'nın bağlanmasını bloke ederek yeni oluşan peptit zincirlerinin sentezini engeller. *H. pylori*'de tetrasiklin direncinde esas olarak AGA (926–928) mutasyonları rol oynamakta olup, mutasyon sayısı tetrasiklin direncinin düzeyiyle yakından ilişkilidir (134).

Proton motif güce bağlı dışa atım inhibitörü olan karbonil siyanür m-klorofenilhidrazon varlığında tetrasiklin minumum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) düşük olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem proton motif güce bağlı dışa atım mekanizmalarının *H. pylori*'nin tetrasikline karşı direncinde rol oynayabileceğini göstermektedir. *H. pylori*'nin tetrasiklin direncinde dışa atım pompasının kesin mekanizmasının anlaşılması için daha fazla çalışma gerekmektedir (135).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma 6 Ocak 2021 ve 31 Temmuz 2022 arasında gerçekleştirildi. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Erişkin Gastroenteroloji Polikliniği'ne dispepsi şikâyeti ile başvuran ve gastroduodenal endoskopi yapılan hastalar çalışmaya dahil edildi. Gastroduodenal endoskopi işleminden iki hafta öncesine kadar *H. pylori* tedavisi almayan ve en geç bir hafta içerisinde dışkı örneğini getirecek hastalar çalışmaya dahil edildi. Prospektif, kesitsel bir çalışma olarak planlandı.

Proje kapsamında örneklerin toplanması, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06.01.2021 tarihli GO 01/44 sayılı kararıyla etik açıdan uygun bulundu.

3.2. Örneklerin Alımı ve Laboratuvara Getirilmesi

Gastroduodenal endoskopi ile alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneği taşıyıcı besiyeri olarak Beyin-kalp infüzyon (Becton, Dickinson and Company, ABD) sıvı besiyerine ve ayrıca üreli sıvı besiyeri içerisine aktarılacak 15 dakika içerisinde, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Gastroduodenal endoskopi işlemi sonrasında çalışmaya dahil edilen her hastadan 1-7 gün süresinde taze dışkı örneği alınıp homojenize edildikten sonra gerçek zamanlı PZR yöntemiyle çalışılmak üzere -20 °C'de saklandı (48).

3.3. Mide Biyopsi Örneğinden *H. pylori*'nin İzolasyonu

Kültür

H. pylori'nin tanımlanması için, taşıyıcı besiyeri olarak BHI sıvı besiyeri içinde gönderilen mide biyopsi örnekleri steril bistüri ile parçalandıktan sonra %7 at kanı ve vankomisin, trimetoprim, sefsulodin ve amfoterisin B içeren "*H. pylori* selektif supplement" (SR 147E Oxoid, İngiltere) ilave edilmiş seçici BHI agara (Sigma-Aldrich- ABD) yayılarak ekildi. Plaklar 35 °C'de, nemli, mikroaerofil ortamda kapalı kap sisteminde inkübe edildi. Mikroaerofilik ortam CampyGen kiti (CN 25-Oxoid, İngiltere) (%5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂) ile sağlandı (Şekil 3.1). Kültürler üçüncü,

beşinci ve yedinci günlerde üremeleri açısından kontrol edildi. Primer kültürde on günlük inkübasyon sonunda sonuç “negatif” olarak değerlendirildi (48).

***H. pylori*’nin Fenotipik Tanısı**

Üreme olan plaklardaki şüpheli koloniler %7 at kanı içeren BHI besiyerine pasajlandı. Makroskopik olarak birbirinden ayrık, yarı saydam ve birleşmeyen koloniler; mikroskopik incelemede ise gram negatif, kıvrık veya sarmal şeklinde basil varlığı gözlemlendiğinde katalaz, oksidaz, üreaz testleri uygulandı. Katalaz, oksidaz, üreaz testleri pozitif olan bakteriler *H. pylori* olarak tanımlandı (Şekil 3.2; A-B) (48, 136).

Hızlı Üreaz Testi

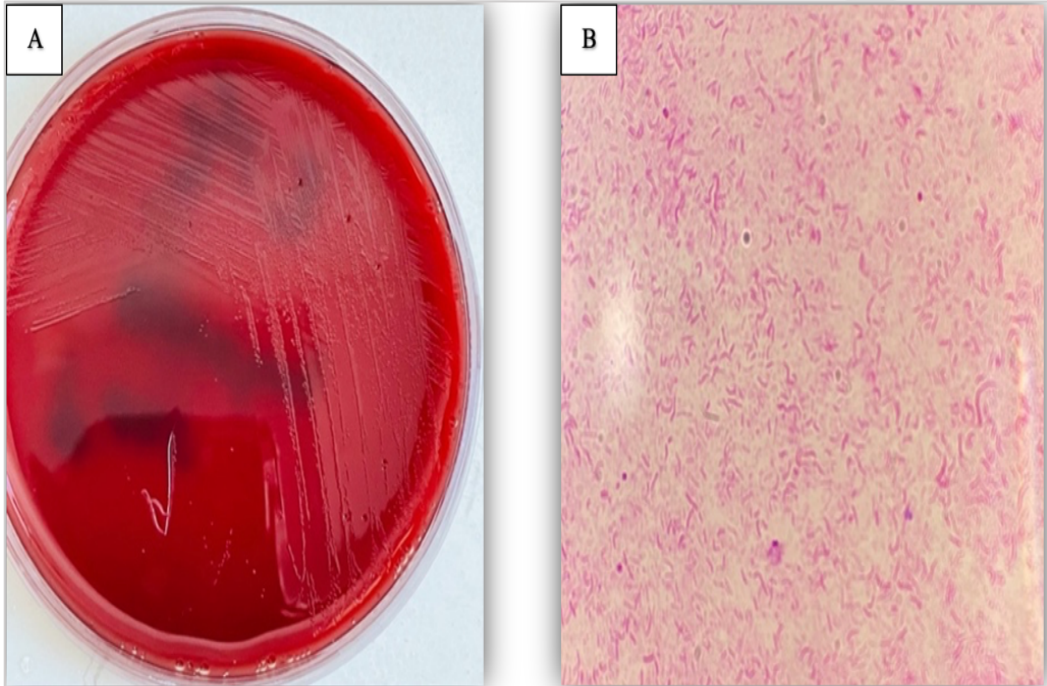
Çalışmamızda mide antrum ve korpus biyopsi örnekleri %2 üreli sıvı besiyerine (Neogen, ABD) inoküle edilerek mikroorganizmanın hızlı üreaz aktivitesi tespit edildi. Her örnek için üreli sıvı besiyerinde *H. pylori* ATCC 43504 pozitif kontrol ve *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 negatif kontrol olarak kullanıldı. Test edilecek örnek üreli sıvı besiyerine 37 °C’de dört saat inkübe edildikten sonra sonuçlar kontrol edildi (Şekil 3.3) (48).

Histopatolojik İnceleme

Hastalardan gastroduodenal endoskopi ile alınan mide antrum ve korpus biyopsi örnekleri iki lam arasında ezildikten sonra metanolle fikse edildi. Histopatolojik inceleme için “Giemsa Azur Eozin Metilen Mavisi” (Merck, Almanya) çözeltisi distile su ile 1/10 oranında seyreltilti. Hazırlanan preperat Giemsa boyasında 35 dakika beklenerek boyandı. Mikroskopik incelemede *Helicobacter* benzeri mikroorganizmalar gözlemlendi (Şekil 3.4) (48, 90).

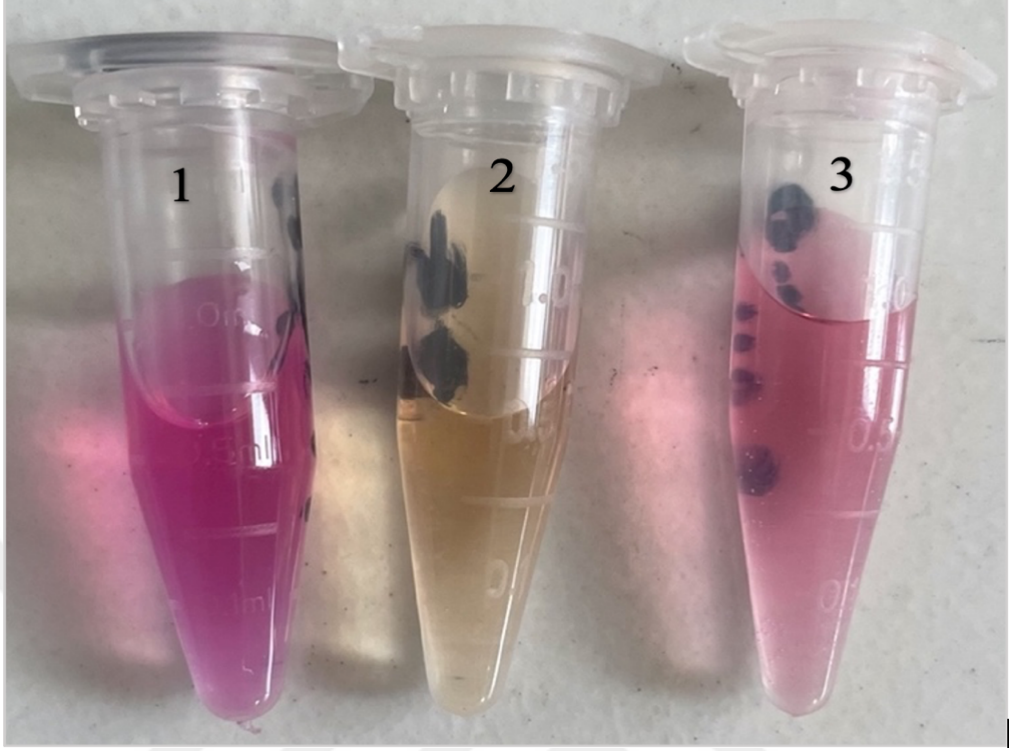


Şekil 3.1. CampyGen kiti içeren mikroaerofilik kapalı kap sistemi.



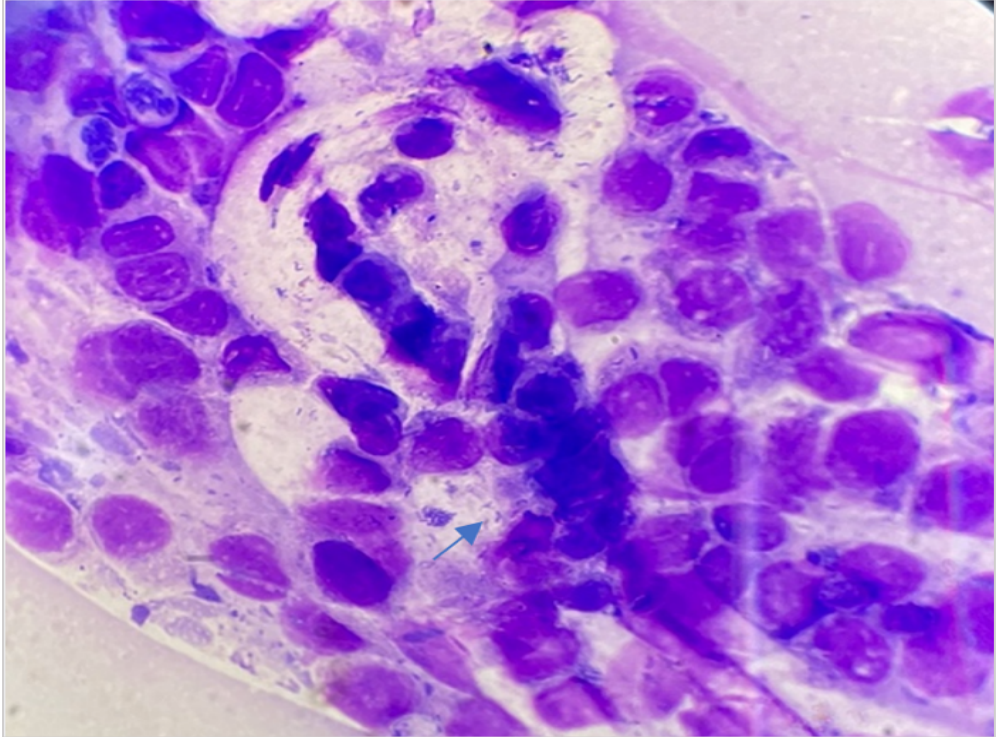
Şekil 3.2. *H. pylori*'nin koloni ve Gram boyama görünümü

A. *H. pylori*'nin %7 at kanı içeren BHI besiyerinde ayırık, yarı saydam kolonilerin görünümü, **B.** Koloniden yapılan Gram ile boyalı preperatta gram negatif, kıvrık veya sarmal şekilli basil görünümü, $\times 1.000$.



Şekil 3.3. Üreli sıvı besiyerinin görünümü

1) ATCC 43504 (pozitif kontrol), 2) *E. coli* (negatif kontrol), 3) Klinik örnek sonucunun görünümü.



Şekil 3.4. Mide biyopsi örneğinin Giemsa ile boyalı histopatolojik preparatı, $\times 1.000$.

3.4. *H. pylori* İzolatlarının Saklanması

H. pylori izolatları, %20 gliserol eklenen BHI sıvı besiyerine steril boncuk eklenerek kriyotüplerde stoklandı. Bu işlem için, bir besiyeri plağının tüm yüzeyinde üremiş olan kolonilerin tamamı boncuklu tüplere steril eküvyon ile aktarıldı. Stok alınan tüpler -80 °C’de saklandı.

3.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testi için %7 at kanı içeren BHI besiyerine pasajı yapılan *H. pylori* izolatları saf kültür olması açısından kontrol edildi. Üç gün mikroaerofilik koşullarda inkübe edilen *H. pylori* izolatlarından Mueller Hinton sıvı besiyeri (Merck, Almanya) içinde üç McFarland süspansiyon hazırlandı. İzolatların antibiyotik duyarlılık testi için “Mueller Hinton Fastidious Agar” (MH-F) (Becton Dickinson GmbH, Almanya) kullanıldı. Hazırlanan süspansiyon MH-F agara steril eküvyon ile inoküle edildi. Klaritromisin, amoksisilin, levofloksasin, tetrasiklin ve metronidazol gradiyent şeritler (Etest, bioMérieux, Fransa) agar üzerine yerleştirilip mikroaerofilik koşullar altında 35 °C’de üç gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, elips şeklindeki inhibisyon zonunun gradiyent şerit ile kesiştiği noktaya karşılık gelen antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi (136, 137).

Kalite kontrol açısından standart suş olarak *H. pylori* ATCC 43504 kullanıldı. Kalite kontrol suşunun MİK aralığı klaritromisin için 0,016-0,125 µg/mL, amoksisilin 0,016-0,125 µg/mL, metronidazol 64-256 µg/mL, tetrasiklin 0,125-1 µg/mL olarak alındı (138).

H. pylori’nin MİK sınır değerleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir. EUCAST 2022 v.12.0 standartlarına göre klaritromisin için minimum inhibitör konsantrasyonu “MİK ≤ 0,25 mg/L ise duyarlı, MİK > 0,5 mg/L ise dirençli” olarak belirlendi (81).

Tablo 3.1. EUCAST 2022 v.12.0 standartlarına göre *H. pylori* 'nin MİK sınır değerleri

<i>Helicobacter pylori</i>	MİK Sınır Değerleri (mg/L)	
	S≤	R>
Amoksisilin (oral)	0,125	0,125
Levofloksasin	1	1
Klaritromisin	0,25	0,5
Tetrasiklin	1	1
Metronidazol	8	8

3.6. Dışkıda *Helicobacter pylori* Antijen Testi (HpSA)

“HpSA *H. pylori* antijen kiti” (GA Generic Assay GmbH, Almanya), monoklonal antikorlara bağlı olarak dışkıda *H. pylori* antijeninin belirlenmesinde kullanılan kalitatif veya kantitatif ELISA tabanlı bir yöntemdir. Test üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı (139).

Çalışma Protokolü

Dışkı örnekleri -20 °C’de saklandı. Çalışma için dondurulmuş örnekler oda sıcaklığına getirildi ve 1000 µl ekstraksiyon çözeltisi bulunan tüplerin içerisine dışkı katıysa yaklaşık 100 mg veya dışkı sıvıysa 100 µl eklendi. Homojenize olana kadar vorteks ile karıştırıldı. Santrifüjleme adımı ile yüzen partiküller çöktürüldü.

1. Kontrol, kalibratör, hasta örnekleri *H. pylori*’ye karşı monoklonal antikorlarla kaplanmış mikropalak çukurlarına dağıtıldı.
2. “Horseradish” peroksidaz enzimi ile işaretli anti-*H. pylori* antikorları mikropalak çukurlarına dağıtıldı.
3. Plak 22-25 °C’de 60 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda çukurlar yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı.
5. Renksiz 3,3’,5,5’-tetrametilbenzidin substrat çözeltisi eklendi. “Horseradish” peroksidaz enzimi kromojen substratı mavi bir ürüne dönüştürdü.
6. Plak 22-25 °C’de 15 dakika inkübe edildi.
7. Reaksiyon kuyucuklarına dağıtılan durdurma çözeltisi (sülfürik asit) ile enzim reaksiyonu sonlandırıldı.

8. Reaksiyon durdurulduktan sonra reaksiyon ürününün sinyal yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçüldü.
9. Spektrofotometrede çözeltinin optik yoğunluğu 450 nm’de okundu.
10. Kalitatif değerlendirmede iki kalibratörün optik dansitesinin toplamının yarısı sınır değer (cut-off) olarak kabul edildi. Bunun altındaki değerler negatif; üzerindeki değerler ise pozitif olarak kabul edildi.

Cut-off OD=(OD CAL2 +OD CAL1)/2 (OD: Optik dansite, CAL:Kalibratör)

3.7. Mide Biyopsi Örneklerinden DNA İzolasyonu

Mide biyopsi örnekleri DNA izolasyon işlemi için steril tüpte Tris-EDTA tamponunda -20 °C’de saklandı. Çalışmada mide biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu ticari bir izolasyon kiti olan “QIAamp DNA Mini Kit” (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici firma talimatları doğrultusunda kitin içeriğindeki çözeltiler kullanılarak aşağıdaki işlemler uygulandı (140).

Çalışma Protokolü

1. Mide biyopsi örneği 25 mg’a kadar küçük parçalar halinde kesildi. Her örneğin parçalanması sırasında yeni bir steril petri ve bistüri kullanıldı. 1,5 ml’lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 180 µl ATL tamponu eklendi. 20 µl proteinaz K eklendi, vortekslenerek karıştırıldı ve doku tamamen parçalanana kadar 56 °C’de inkübe edildi.
2. 200 µl AL tamponu eklendi, 15 saniye vorteksle karıştırıldı.
3. 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Kapağın içindeki damlaları gidermek için mikrosantrifüj tüpü kısa süre santrifüjde çevrildi.
4. 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Kapağın içindeki damlaları gidermek için kısa süre santrifüjde çevrildi.
5. Adım 4’teki karışım QIAamp Mini spin kolonuna eklendi. 8000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi. QIAamp Mini spin kolonu temiz bir 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi.
6. QIAamp Mini spin kolonuna 500 µl AW1 tamponu eklendi. 8000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi. QIAamp Mini spin kolonunu 2 ml’lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.

7. QIAamp Mini spin kolonuna 500 µl AW2 tamponu eklendi. Üç dakika boyunca 14.000 rpm’de santrifüj edildi.

8. QIAamp Mini spin kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve süzüntü içeren toplama tüpü atıldı. QIAamp Mini spin kolonuna 200 µl AE tamponu eklendi. Bir dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından bir dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi.

Saflaştırılmış DNA, kullanılabildiği kadar -20 °C’de saklandı.

3.8. Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu

Plastik dışkı kabında toplanan dışkılar -80 °C’de saklandı. DNA saflaştırma işlemi için “QIAamp DNA Mini Stool Kit (Qiagen, Almanya)” kullanıldı. Dışkı izolasyonu için üretici firma talimatları doğrultusunda aşağıdaki işlemler uygulandı (141).

Çalışma Protokolü:

1. Dışkı örneği 180-220 mg tartılıp 2 ml mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve buz üzerinde tutuldu.
2. 1 ml InhibitEX tamponu eklenip bir dakika vortekslendi.
3. Süspansiyon 70 °C’de 5 dakika inkübe edilip 15 saniye vortekslendi.
4. 20000 g’de bir dakika santrifüj uygulandı.
5. Yeni bir 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne 15 µl Proteinaz K eklendi.
6. Dördüncü adımda hazırlanan süspansiyonun üstte kalan süpernatant kısmından 200 µl pipetlenip Proteinaz K içeren mikrosantrifüj tüpüne eklendi.
7. 200 µl AL tamponu süspansiyona eklenip 15 saniye vortekslendi.
8. 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
9. 200 µl etanol (%96-100) süspansiyona eklendi.
10. Süspansiyondan 600 µl pipetlenip QIAamp spin kolona aktarıldı. Bir dakika 20000 g’de santrifüj uygulandı. Spin kolon yeni bir 2 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp filtratı içeren tüp atıldı. Bu aşama tüm lizat kolona eklenene kadar tekrarlandı.

11. QIAamp spin kolona 500 µl AW1 tamponu eklenip 1 dakika 20000 g'de santrifüj uygulandı. Spin kolon yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp filtratı içeren tüp atıldı.

12. QIAamp spin kolona 500 µl AW2 tamponu eklenip 3 dakika 20000 g'de santrifüj uygulandı. Spin kolon yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

13. QIAamp spin kolonu yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üç dakika boyunca 20000 g'de santrifüj edildi.

14. QIAamp spin kolonu yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp 200 µl ATE tamponu membranın üzerine eklendi. Bir dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra 1 dakika 20000 g'de santrifüj uygulandıktan sonra kolon atıldı.

Başlangıç materyali olarak her dışkı örneğinden yaklaşık 200 mg kullanıldı ve 200 µL'lik bir hacimde saflaştırılmış DNA elde edildi. Saflaştırılmış DNA alikotlandı ve -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.9. Toplam DNA'nın Görüntülenmesi ve Saflık Kontrolü

Dışkı ve mide biyopsi örneklerinden elde edilen nükleik asitlerin miktarı ve saflık tayini, spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm'deki absorbanis ölçümlerinin karşılaştırılması şeklinde yapıldı. Bu amaçla saflaştırılması yukarıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilen 126 örnekte kullanılan elüsyon tamponu arka plan okuması olarak değerlendirildi. Epoch spektrofotometre (BioTek Instruments, Vermont, ABD) ile ölçüme alındı. A260/ A280 oranı 1,8'in altında olduğu durumlarda örneğin protein ve aromatik bileşiklerle, ikinin üzerinde olduğu durumlarda ise RNA ile kontamine olduğu değerlendirilmesi yapıldı (142).

3.10. İzole Edilen DNA'dan *H. pylori*'nin ve Klaritromisin Direncinin Gerçek Zamanlı PZR ile Saptanması

Çalışmamızda *H. pylori*'nin tespiti ve 23S rRNA genindeki klaritromisin direncinden sorumlu en sık görülen nokta mutasyonları (A2142G, A2143G) saptanması için tasarlanmış "Ezplex HP-CLA real-time PCR" (SML Genetree, Kore) tanı kiti kullanıldı. "Ezplex HP-CLA real-time PCR" kiti TaqMan tabanlı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniklerini kullanmaktadır (143).

Mide biyopsi ve dışkı örneklerinden “Ezplex” gerçek zamanlı PZR kiti ile çalışma aşamasında Capacity 2X Master Mixture’den 10 µL, HP P+P Mix’den 5 µL toplamda 15 µL reaksiyon karışımı PZR tüplerine dağıtıldı. Mide biyopsi ve dışkı örneklerinden elde edilen kalıp DNA, her PZR tüpüne 5 µL eklendi. Karışımın çukurlara yerleşmesi amacıyla uygulanan kısa bir santrifüj sonrasında DFX96 Dx gerçek zamanlı PZR cihazında (Bio-Rad, ABD) amplifikasyon gerçekleştirildi. *H. pylori* enfeksiyonunun ve klaritromisin direncinin saptanması için polimeraz aktivasyonu ve kalıp DNA’nın denatürasyonu için 50 °C’de 2 dakika ve 95 °C’de 10 dakika inkübasyonun ardından 95 °C’de 20 saniye, 65 °C’de 1 dakikadan oluşan 38 döngüden oluşan amplifikasyon protokolü uygulandı (Tablo 3.2). Sonuçlar FAM (A2142G), HEX (A2143G), Cy5 (*H. pylori*) ve Quasar 705 (internal kontrol) için eşik değerlerine (Ct) göre yorumlandı (Tablo 3.3).

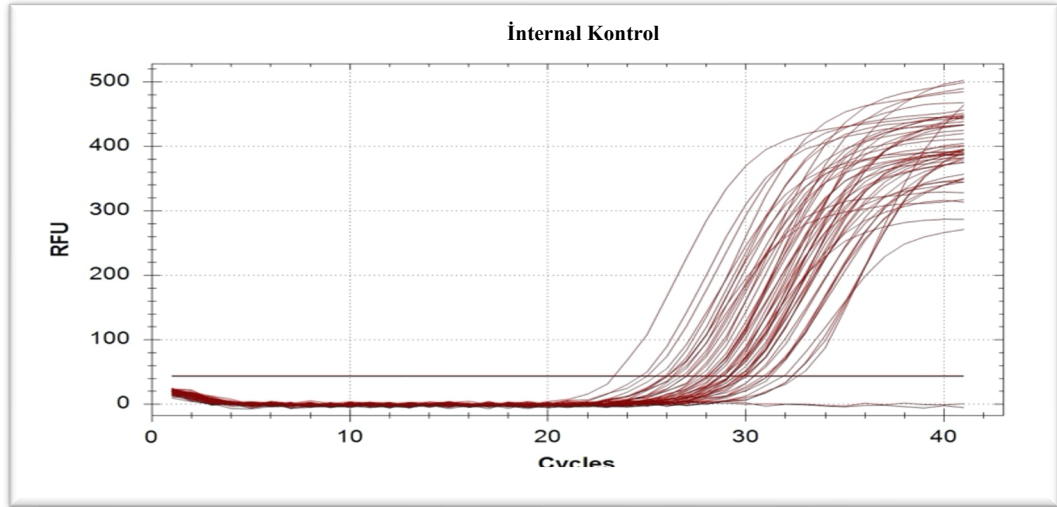
Kitte bulunan negatif kontrol, dış kaynaklı nükleik asit kontaminasyonu için genel bir kontrol işlevi görmektedir. DNA ekstraksiyonu ve PZR reaksiyon kurulum adımları sırasında çapraz kontaminasyonu izlemek için çalışmada her PZR reaksiyonunda negatif kontrol kullanıldı. Kite bulunan pozitif kontrol, her bir gen hedefi için sentezlenmiş plazmit DNA’dan oluşmaktadır. İnhibitörlerin varlığını ve polimeraz zincir reaksiyonunun etkinliğini izlemek için çalışmada her PZR reaksiyonunda pozitif kontrol kullanıldı. Klinik örneklerin başarıyla amplifiye edildiğini saptamak için “housekeeping” geni içeren internal kontrol kullanıldı. İnternal kontrol amplifikasyonu izlenmeyen örneklerle ait sonuçlar değerlendirme dışı bırakıldı.

Tablo 3.2. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR amplifikasyon protokolü.

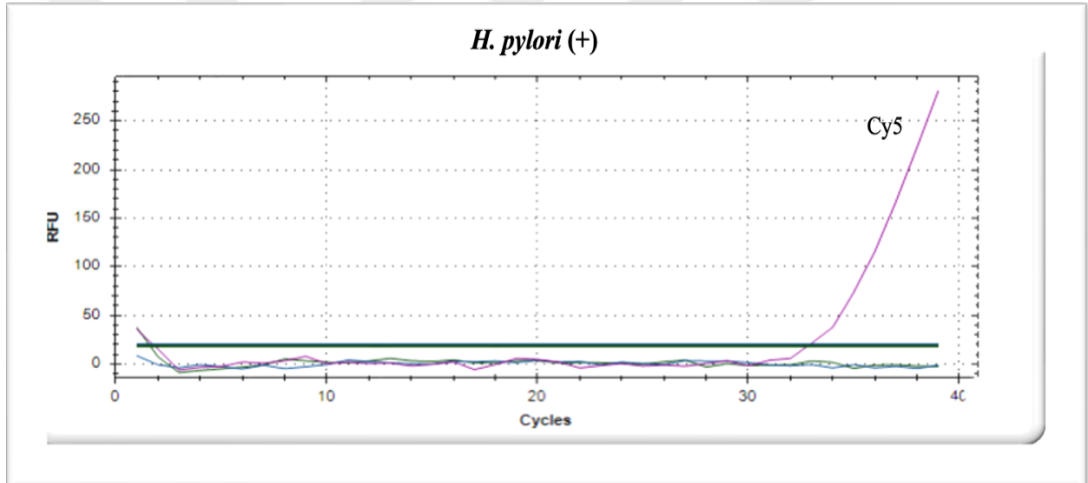
Adım	No	Sıcaklık/Zaman	Döngü
İnkübasyon	1	50 °C / 2 dk	1 döngü
	2	95 °C / 10 dk	
Döngü	3	95 °C / 20 sn	38 döngü
	4	65 °C / 1 dk	

Tablo 3.3. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR sonuçlarının yorumlanması.

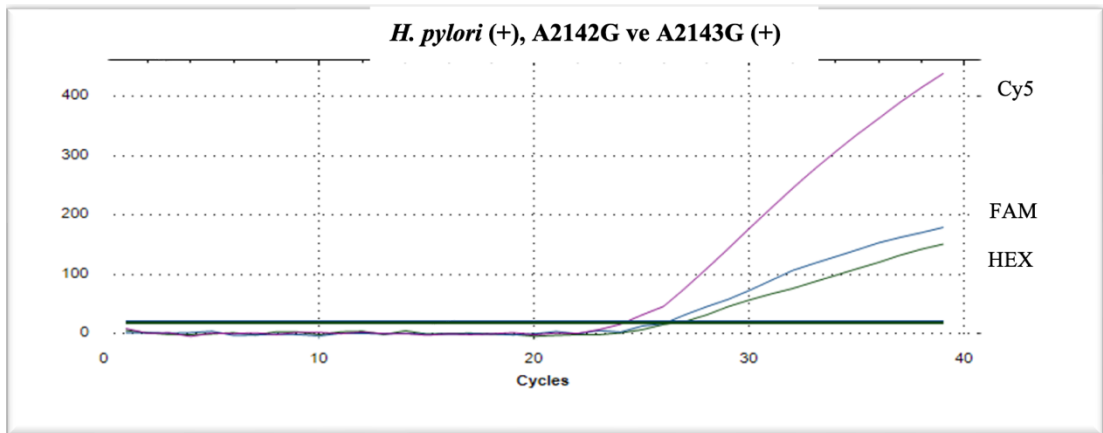
FAM	HEX	Cy5	Quasar705	Sonuçlar
Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <38	Ct <36	<i>H. pylori</i> pozitif (Şekil 3.6)
Ct <38	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <38	Ct <36	Klaritromisin dirençli (A2142G)
Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <38	Ct <38	Ct <36	Klaritromisin dirençli (A2143G)
Ct <38	Ct <38	Ct <38	Ct <36	Klaritromisin dirençli (A2142G, A2143G) (Şekil 3.7)
Ct <38	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <36	<i>H. pylori</i> negatifse ve A2142G veya A2143G pozitifse-tekrar
Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <38	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <36	
Ct <38	Ct <38	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <36	
Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct $\geq$ 36 veya tespit edilmedi	İnternal kontrol negatif- tekrar (Şekil 3.5)
Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct $\geq$ 38 veya tespit edilmedi	Ct <36	Negatif



ŞEKİL 3.5. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR testi ile internal kontrollerin sonuçları.



ŞEKİL 3.6. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR testinde *H. pylori* pozitif, klaritromisin A2142G veya A2143G nokta mutasyonu saptanmayan örneklerin görünümü.



ŞEKİL 3.7. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR testinde *H. pylori* pozitif, klaritromisin A2142G ve A2143G nokta mutasyonu saptanan pozitif kontrolün görünümü.

3.11. İstatistiksel Analiz

Veriler “IBM SPSS Statistics Version 23” (Copyright SPSS Inc. 1989, 2015) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Sürekli veriler aritmetik ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer ile değerlendirildi. Kategorik veriler sayı (yüzde) ile değerlendirildi. Nitelik olarak belirtilen bir değişken yönünden aynı bireylerden değişik zaman ya da durumda elde edilen iki gözlemin farklı olup olmadığını test etmek için McNemar testi uygulandı. Bağımsız değişkenler için ki-kare testi uygulandı. Uygulanan tüm istatistiksel testlerde 0,05’ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Tanı testlerinin performansı için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer, tanısal doğruluk oranı gibi faktörler değerlendirildi (144).

3.12. *H. pylori* Kültürü için Kullanılan Besiyerleri ve Reaktifler

Beyin-Kalp İnfüzyon Besiyeri (Sigma-Aldrich, 70138)

Distile suya 52 gr/L agar tartılarak karıştırıldı ve otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası 25 °C’de pH 7,4±0,2 olarak ayarlandı. Besiyerine “*H. pylori* selektif supplement” (SR 147E Oxoid, İngiltere) ve %7 at kanı ilave edilerek steril 90 mm’lik steril plastik petri kaplarına dağıtıldı (145).

Formül (Litre)

-	Agar.....	15 g/L
-	Beyin ekstraktı.....	7,8 g/L
-	D (+)-Glukoz.....	2 g/L
-	Disodyum fosfat.....	2,5 g/L
-	Kalp ekstraktı.....	9,7 g/L
-	Proteoz pepton.....	10 g/L
-	Sodyum klorit.....	5g/L
-	pH’sı 7,4±0,2	

“*Helicobacter pylori* Selektif Supplement” (SR 147E Oxoid, İngiltere)

Her bir flakon içeriği 500 ml besiyeri için vankomisin 5 mg, trimetoprim 2,5 mg, sefsulodin 2,5 mg, amfoterisin B 2,5 mg içermektedir (146).

Bir flakon 500 ml’lik besiyeri için iki ml distile su ile sulandırılıp yaklaşık 50 °C’ye soğutularak 465 ml’lik BHI agar üzerine eklendi. Otuz beş ml at kanı eklendikten sonra iyice karıştırılarak steril 90 mm’lik petri kaplarına döküldü.

Mide biyopsi örneklerinin kültürü ve *H. pylori*’nin izolasyonu için “*H. pylori* selektif supplement” ve %7 at kanı ilave edilen BHI agar kullanıldı. Sterilite kontrolü için besiyeri 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Üreme kontrolü için %7 at kanı ve “*H. pylori* selektif supplement” (SR 147E Oxoid, İngiltere) ilave edilmiş seçici BHI agar *H. pylori* ATCC 43504 ile ekim yapılarak 37 °C’de mikroaerofil ortamda (%5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂) 3-5 gün inkübe edildi. Sterilite ve üreme kontrolü yapıldıktan sonra ekim yapıldı.

Beyin-Kalp İnfüzyon Sıvı Besiyeri (BD Difco™, 2375009)

Otuz yedi gram besiyeri bir litre distile su içinde süspanse edilerek çözüldü. 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Steril 1,5 ml’lik tüplere dağıtıldı. BHI sıvı besiyeri mide biyopsi örneklerinin laboratuvara transportu aşamasında kullanıldı (147).

Formül (Litre)

- Dana beyni infüzyonu.....7,7 g/L
- Sığır kalbi infüzyonu.....9,8 g/L
- Proteoz pepton10 g/L
- Dekstroz2 g/L
- Disodyum fosfat2,5 g/L
- Sodyum klorür5 g/L
- pH: 7,4 ± 0,2

Üreli Sıvı Besiyeri (Neogen, 7226)

Yirmi dokuz gram üre agar tartılıp 100 mL distile su ile tamamen homojenize olana kadar karıştırıldı. Yirmi iki µm'lik membran filtre ile sterilize edildi ve steril 1,5 ml'lik tüplere 4-5 ml miktarında dağıtıldı (148).

Formül (Litre)

- Enzimatik sindirilmiş jelatin.....1 g/L
- Dekstroz.....1 g/L
- Sodyum klorür.....5 g/L
- Monosodyum fosfat.....2 g/L
- Üre20 g/L
- Fenol kırmızısı.....0,012 g
- pH: 6,8 ± 0,2, 25 °C'de saklandı.

“Mueller Hinton Fastidious Agar” (BD, 257491)

Mueller Hinton Fastidiyöz agar, %5 mekanik olarak defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD ile zenginleştirilmiş Mueller Hinton agardan oluşan hazır besiyeridir (149).

Formül (Litre)

- Et özü.....2 g
- Kazein asit hidrolizat.....17,5 g
- Nişasta.....1,5 g
- Agar.....17 g
- At kanı, mekanik olarak defibrine.....%5
- β-NAD.....0,02 g

pH: 7,3 ± 0,1

Kalite kontrolü *H. pylori* ATCC 43504 suşu ile gerçekleştirildi.

Oksidaz Testi

Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür.....0,1 g
Distile su.....10 ml

Oksidaz deneyi için, tetrametil parafenilendiamin dihidroklorür (%1) kullanıldı. Filtre kağıtlarının üzerlerine hazırlanan çözelti damlatıldı ve sonra koloniler plastik öze ile filtre kağıdına yayıldı. 15 saniye içerisinde mavi-siyah renk oluşması pozitif olarak değerlendirildi. Test değerlendirilirken *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pozitif kontrol, *E. coli* ATCC 25922 ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

Katalaz Testi

Kültürde üreyen saf koloni temiz bir lamel üzerine alınıp üstüne bir damla %3 oranında hidrojen peroksit damlatıldı. Hidrojen peroksit damlatıldıktan hemen sonra baloncuk oluşumu görülürse sonuç pozitif olarak değerlendirildi.

CampyGen Kiti (CN0025-Oxoid)

CampyGen kiti kapalı bir kavanoza yerleştirilip kavanozdaki atmosferik oksijen, eş zamanlı karbondioksit üretimi ile hızla emilip mikroaerofilik ortam koşulları oluşturmak için kullanıldı (150). Kitin kalite kontrolü *H. pylori* ATCC 43504 ile gerçekleştirildi.

Tris-EDTA (TE) Tamponu

DNA izolasyonu için mide antrum ve korpus biyopsi örnekleri 500 µl Tris-EDTA tamponu içeren mikrosantrifüj tüpüne alınarak çalışma için -20 °C’de saklandı. 0,5 ml 2M Tris HCL (Sigma-Aldrich, ABD) ve 0,2 ml 0,5M EDTA eklendi. Hacim steril distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

4. BULGULAR

Ocak 2021-Temmuz 2022 arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Endoskopi Ünitesinde gastroduodenal endoskopi yapılan 73 hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışma kriterlerine uymayan 10 hasta çalışma dışı bırakıldı. Çalışma gastroduodenal endoskopi uygulanan 63 hastayı kapsamaktadır. Çalışmaya alınan hastaların gastroduodenal endoskopik tanısında %66,6'sında (s:42) gastrit, %7,9'unda (s:5) özefajit ve gastroduodenit, %7,9'unda (s:5) gastrit ve ülser, %6,3'ünde (s:4) gastroduodenit, %1,5'inde (s:1) duodenit, %1,5'inde (s:1) özefajit ve hiatal herni, %3'ünde (s:2) özefajit ve gastrit, %4,5'inde (s:3) normal endoskopik bulgular izlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 63 hastanın demografik ve klinik özelliklerinin dağılımları Tablo 4.1'de yer almaktadır. Çalışma dahilindeki hastaların yaşları 19 ile 80 arasında değişmekte olup yaş ortalaması $51,25 \pm 13,83$ yıldır. Hastaların beden kitle indeksleri 18 ile 46 arasında değişmekte olup beden kitle indeksi (BMI) ortalaması $27,66 \pm 6,00 \text{ kg/m}^2$ 'dir. Hastaların %19,7'sinde (s:12) sigara kullanımı, %90,5'inde (s:57) sistemik hastalık, %34,4'ünde (s:21) ailede mide hastalığı özgeçmişi mevcuttur. Öğrenim durumları incelendiğinde ilkokul %27,1 (s:18), ortaokul %5,1 (s:3), lise %25,4 (s:15), lisans %27,1 (s:16), ön lisans %3,4 (s:5) ve yüksek lisans %8,5 (s:2) olarak gözlenmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri (s:63).

		Sayı (s)	Yüzde (%)
Cinsiyet	Erkek	23	%36,5
	Kadın	40	%63,5
Sigara Kullanımı	Yok	49	%80,3
	Var	12	%19,7
Sistemik Hastalık Varlığı	Yok	6	%9,5
	Var	57	%90,5
Ailede Mide Hastalığı Özgeçmişi (Mide kanseri, gastrit, ülser vb.)	Yok	40	%65,6
	Var	21	%34,4

Hastaların 63 mide biyopsi örneğine *H. pylori*'nin tespiti için kültür, hızlı üreaz testi, histopatolojik inceleme ve gerçek zamanlı PZR yöntemleri uygulanmıştır. Çalışmamızda mide biyopsi örneklerinin hızlı üreaz testi ile 19'unda (%30,2) üreaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Histopatolojik incelemede mide biyopsi örneklerinin 24'ünde (%38,1) *H. pylori* benzeri mikroorganizmalar gözlemlenmiştir. Mide biyopsi kültürü ile örneklerinin 11'inde (%17,5) *H. pylori* izole edilmiştir (Tablo 4.2). Bunlardan dokuz izolata antibiyotik duyarlılık testi uygulanmıştır. Levofloksasin, tetrasiklin ve amoksisiline karşı direnç saptanmamıştır. İzolatların üçünde klaritromisin direnci, üçünde ise metronidazol direnci saptanmıştır (Tablo 4.3).

Çalışmamızda “referans sonuç” olarak *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında mide biyopsi kültürü pozitif olanlar veya hızlı üreaz testi, histopatolojik inceleme, dışkıda antijen testi ve mide biyopsi gerçek zamanlı PZR yöntemlerinden en az ikisi pozitif olanlar “*H. pylori* pozitif” kabul edilmiştir (87). Çalışmaya dahil edilen 63 hastanın referans sonucuna göre 27'si (%42,9) “*H. pylori* pozitif”, 36'sı (%57,1) ise “*H. pylori* negatif” grubu oluşturmaktadır.

Tablo 4.2. Hastaların hızlı üreaz testi, mide biyopsi kültürü, histopatoloji, dışkıda antijen testi ve mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçları.

s:63		S	%
Hızlı Üreaz Testi	Pozitif	19	(%30,2)
	Negatif	44	(%69,8)
Mide Biyopsi Kültürü	Üreme Var	11	(%17,5)
	Üreme yok	52	(%82,5)
Histopatoloji	HP (+)	24	(%38,1)
	HP (-)	39	(%61,9)
Dışkıda Antijen Testi	HPSAg (+)	18	(%28,6)
	HPSAg (-)	45	(%71,4)
Mide Biyopsi Gerçek Zamanlı PZR	HP (+)	37	(%58,7)
	HP (-)	26	(%41,3)

(HP (+): *H. pylori* pozitif, HP (-): *H. pylori* negatif, HPSAg (+): *H. pylori* dışkıda antijen testi pozitif, HPSAg (-): *H. pylori* dışkıda antijen testi negatif)

Tablo 4.3. *H. pylori* izolatlarının klaritromisin, amoksisilin, levofloksasin, tetrasiklin ve metronidazol için MİK ($\mu\text{g/mL}$) sınır değerleri (S: Duyarlı, R: Dirençli)

İzolat	Klaritromisin	Metronidazol	Levofloksasin	Tetrasiklin	Amoksisilin
Nİ-8	0,125	0,25 S	0,047 S	0,032 S	<0,016 S
Nİ-10	<0,016 S	<0,016	0,004 S	<0,016 S	<0,016 S
Nİ-13	16 R	<0,016 S	0,08 S	0,032 S	<0,016 S
Nİ-14	<0,016 S	>256 R	0,023 S	0,064 S	<0,016 S
Nİ-16	<0,016 S	<0,016 S	0,125 S	<0,016 S	<0,016 S
Nİ-24	8 R	12 R	0,006 S	0,25 S	0,064 S
Nİ-37	<0,016 S	0,064 S	0,023 S	0,032 S	<0,016 S
Nİ-42	<0,016 S	<0,016 S	0,004 S	<0,016 S	<0,016 S
Nİ-56	8 R	>256 R	0,023 S	0,032 S	<0,016 S

Hastaların cinsiyetine göre “referans sonuç” ile karşılaştırıldığında *H. pylori* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Erkek hastalardaki *H. pylori* pozitifliği kadın hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Hastaların yaşına göre “referans sonuç” ile karşılaştırıldığında ise *H. pylori* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

“Ezplex” gerçek zamanlı PZR ile 63 mide biyopsi örneğinin 37’sinde (%58,7) *H. pylori* pozitif bulunmuştur. *H. pylori* pozitif saptanan örneklerin 27’sinde (%72,9) nokta mutasyonu saptanmamıştır. *H. pylori* pozitif saptanan örneklerin 10’unda (%27) ise klaritromisin nokta mutasyonu saptanmıştır. Klaritromisin nokta mutasyonu açısından 3’ünde (%30) A2142G ve 7’sinde (%70) A2143G mutasyonu bulunmuştur. “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR testi ile pozitif bulunan hastaların eşik değer sonuçları 19,40 ile 37,45 arasında değişmekte olup mide biyopsi Ct ortalaması $27,48\pm6,33$ bulunmuştur (Tablo 4.4)

Tablo 4.4. “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ile pozitif bulunan örneklerin Ct sonuçları.

	Mide Biyopsi Gerçek zamanlı PZR (s:37)	
	$\bar{X} \pm SS$	min-maks
“Ezplex” Mide Biyopsi (Ct)	27,48 $\pm$ 6,33	19,40-37,45
<i>Sürekli veriler $\bar{X}$: Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma, minimum, maksimum değer ile değerlendirilmiştir.</i>		

“Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR altın standart yöntem mide biyopsi kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılık %100, özgüllük %50, PPV %29,8, NPV %100 olarak saptanmıştır. Mide biyopsi kültüründen *H. pylori* izole edilen tüm örneklerde “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA’sı pozitif saptanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ve mide biyopsi kültürü sonuçlarının karşılaştırılması.

s:63		Mide Biyopsi Kültürü	
		HP+ (s:11)	HP- (s:52)
Mide Biyopsi Gerçek Zamanlı PZR	HP+ (s:37)	11 (%17,5)	26 (%41,3)
	HP- (s:26)	0	26 (%41,3)
<i>Kategorik veriler sayı (yüzde) ile değerlendirilmiştir. Mc-Nemar testi uygulanmıştır.</i>			

Hastalara dışkı kabının teslimi ve laboratuvarında dışkı tüpünün dondurulması arasındaki ortalama süre 4,75 $\pm$ 2 gündür. Dışkı örneklerine dışkıda antijen testi ve dışkı gerçek zamanlı PZR yöntemleri uygulanmıştır. Dışkıda antijen testi ile örneklerin 18’inde (%28,5) *H. pylori* antijeni pozitif saptanmıştır.

Hastaların cinsiyetine göre “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p=0,185). Hastaların cinsiyetine göre “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (p=0,047). Erkek hastalardaki “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR pozitifliği kadın hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Hastaların cinsiyetlerine göre “Ezplex” mide biyopsi ve dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.

		Cinsiyet				p
		Erkek (s:23)		Kadın (s:40)		
		n	%	n	%	
Mide Biyopsi Gerçek Zamanlı PZR	HP+	16	(69,6)	21	(52,5)	0,185
	HP-	7	(30,4)	19	(47,5)	
Dışkı Gerçek Zamanlı PZR	HP+	10	(43,5)	8	(20,0)	0,047
	HP-	13	(56,5)	32	(80,0)	
Kategorik veriler sayı (yüzde) ile değerlendirilmiştir. Ki kare testi uygulanmıştır.						

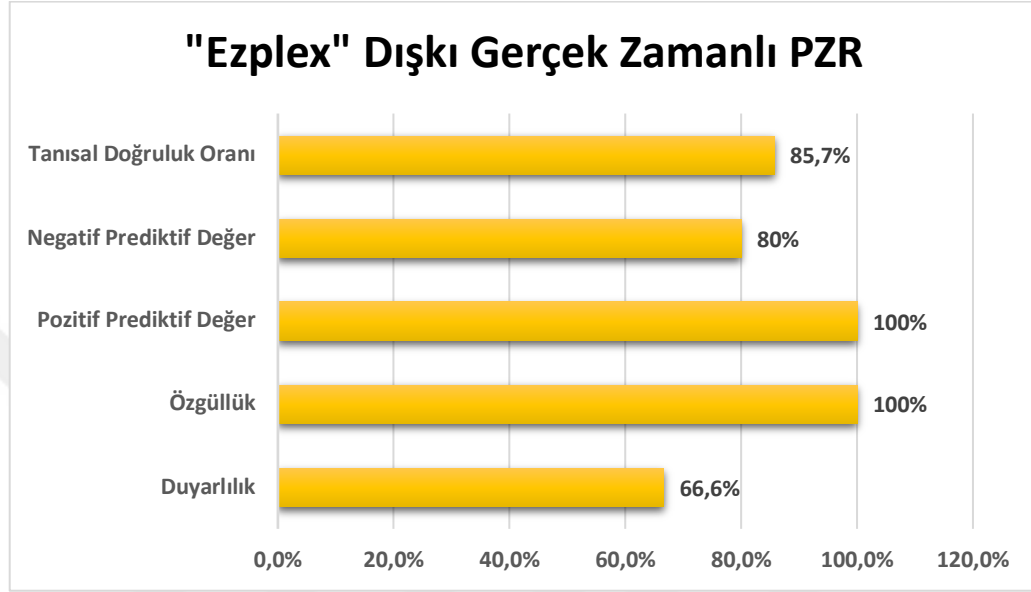
“Ezplex” gerçek zamanlı PZR ile dışkı örneklerinin 18’inde (%28,5) *H. pylori* DNA’sı pozitif bulunmuştur. Dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA’sı pozitif bulunan %33,3’ünde (s:6) klaritromisin nokta mutasyonu saptanmıştır. Dışkı gerçek zamanlı PZR yöntemi ile klaritromisin dirençli örnekler nokta mutasyonları açısından incelendiğinde üç örnekte A2142G ve üç örnekte ise A2143G mutasyonu saptanmıştır.

“Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR yönteminin “referans sonuç” ile uyumu Tablo 4.7’de gösterilmiştir. “Referans sonuca” göre 27 hastanın %66,7’sinde (s:18) “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA’sı pozitif saptanmıştır. “Referans sonuçlara” göre 36 hastanın %100’ünde (s:36) “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA’sı negatif bulunmuştur.

Tablo 4.7. Hastaların “referans sonuç” ile “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.

s:63		“Referans Sonuç”	
		HP+ (s:27)	HP- (s:36)
“Ezplex” Dışkı Gerçek zamanlı PZR	HP+ (s:18)	18 (%28,6)	-
	HP- (s:45)	9 (%14,2)	36 (%55,2)
<i>Kategorik veriler sayı (yüzde) ile değerlendirilmiştir.</i>			

“Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR testinin “referans sonuca” göre analitik performansı değerlendirildiğinde duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPV), negatif prediktif değer (NPV) ve tanısal doğruluk oranı Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



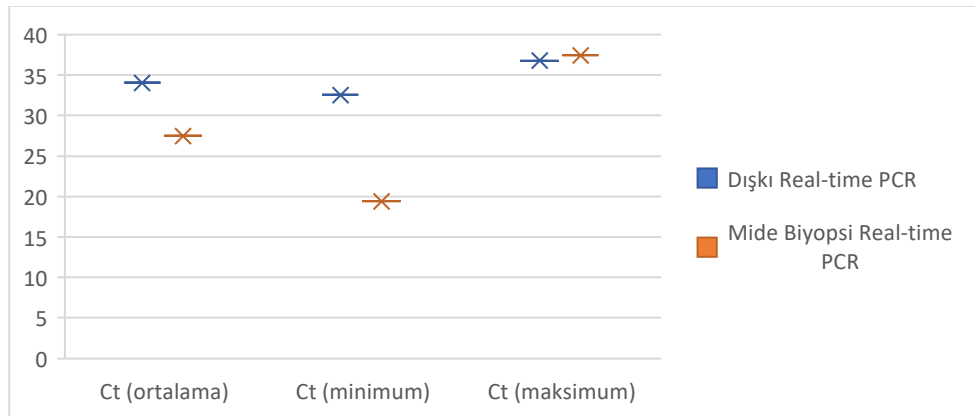
Şekil 4.1. “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR yönteminin duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV ve tanısal doğruluk oranı sonuçları.

“Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR yönteminde pozitif bulunan hastaların eşik değer (Ct) sonuçları Tablo 4.8’de gösterilmiştir. “Ezplex” dışkı Ct sonuçları 32,56 ile 36,79 arasında değişmekte olup “Ezplex” dışkı Ct ortalaması $34,00 \pm 1,39$ ’dur.

Tablo 4.8. “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonucu pozitif bulunan örneklerin Ct sonuçları.

	“Ezplex” Dışkı Gerçek Zamanlı PZR (s:18)	
	$\bar{X} \pm SS$	min-maks
“Ezplex” Dışkı Ct	$34,00 \pm 1,39$	32,56-36,79
Sürekli veriler $\bar{X}$: Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma, minimum, maksimum değer ile değerlendirilmiştir.		

“Ezplex” dışkı ve mide biyopsi örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile pozitif bulunan hastaların Ct sonuçlarının karşılaştırılması Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. “Ezplex” dışkı ve “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ile pozitif bulunan hastaların Ct sonuçlarının karşılaştırılması.

H. pylori’nin tespiti için “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarını altın standart mide biyopsi kültürü ile karşılaştırdığımızda duyarlılık %81,9, özgüllük %82,7, PPV %50, NPV %95,6, tanısal doğruluk oranı %82,6 olarak saptanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Mide biyopsi kültürü ve “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.

s:63		Mide biyopsi Kültürü	
		HP+ (s:11)	HP- (s:52)
Dışkı Gerçek Zamanlı PZR	HP+ (s:18)	9 (14,2)	9 (%14,2)
	HP- (s:45)	2 (%3,1)	43 (%68,3)
Kategorik veriler sayı (yüzde) ile değerlendirilmiştir. Mc-Nemar testi uygulanmıştır.			

Literatürde histopatolojik incelemenin referans olarak kabul edildiği çalışmalar bulunmaktadır (87). Bu nedenle “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının referans olarak histopatolojik inceleme sonuçları ile karşılaştırdığımızda *H. pylori*’nin tespiti için duyarlılık %70,8, özgüllük %97,4, PPV %94,4, NPV %84,4 ve tanısal doğruluk oranı %87,3 olarak saptanmıştır. Histopatolojik inceleme ve “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının istatistiksel analizinde anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,034$). “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının referans olarak histopatolojik inceleme arasındaki uyumu Tablo 4.10’da gösterilmiştir. Histopatolojik incelemede *H. pylori* negatif saptanan bir hastanın dışkıda antijen testi, hızlı üreaz testi ve mide biyopsi gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile *H. pylori* pozitif saptanmıştır.

Tablo 4.10. Histopatoloji ve “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR sonuçlarının karşılaştırılması.

s:63		Histopatoloji	
		HP+ (s:24)	HP- (s:39)
Dışkı Gerçek Zamanlı PZR	HP+ (s:18)	17 (%27)	1 (%1,6)
	HP- (s:45)	7 (%11,1)	38 (%60,3)
<i>Kategorik veriler sayı (yüzde) ile değerlendirilmiştir. Mc-Nemar testi uygulanmıştır.</i>			

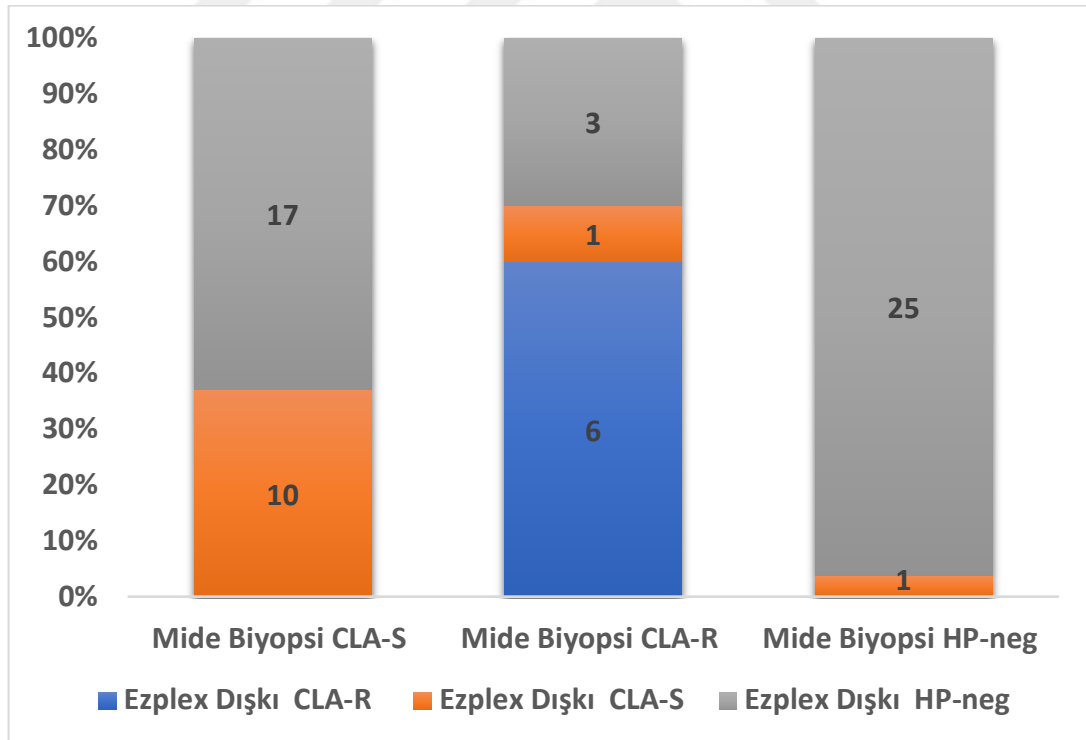
Kültür ile fenotipik antibiyotik duyarlılık testi yapılan dokuz izolat klaritromisin duyarlılığı açısından incelendiğinde “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçlarıyla tamamen uyumlu bulunmuştur. “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR ile klaritromisin direncinin saptanmasında referans olarak fenotipik duyarlılık sonuçlarını karşılaştırdığımızda duyarlılık %100, özgüllük %75, tanısal doğruluk oranı %66,6 bulunmuştur. Gradyent test ile klaritromisin duyarlı bulunan iki izolat dışkı gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* negatif bulunmuştur. Bir izolat ise gradyent test ile klaritromisin dirençli (MİK=8 µg/mL) bulunurken; dışkı gerçek zamanlı PZR ile klaritromisin nokta mutasyonu saptanmamıştır.

Klaritromisin direncinin tespitinde “Ezplex” mide biyopsi ve dışkı gerçek zamanlı PZR arasında *H. pylori* klaritromisin nokta mutasyonlarının karşılaştırılması Şekil 4.3’te gösterilmiştir. Dışkı örneklerinden klaritromisin nokta mutasyonlarının saptanmasında referans test olarak mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçları dikkate alınarak değerlendirildiğinde genel uyumu %65 (41/63) olarak bulunmuştur. “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ile klaritromisin nokta mutasyonu saptanan 10 örneğin sonuçlarını karşılaştırdığımızda dışkı gerçek zamanlı PZR ile altısında uyumlu sonuç elde edilmiştir. Uyumsuz saptanan örneklerin üçünde ise dışkı gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* negatif bulunmuştur. Dışkı gerçek zamanlı PZR ile bir örnekte ise *H. pylori* saptanmış fakat klaritromisin A2142G veya A2143G nokta mutasyonu saptanmamıştır. “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR’de *H. pylori* pozitif ve klaritromisin nokta mutasyonunun saptandığı ancak dışkı gerçek zamanlı PZR yönteminde negatif bulunan üç örneğin mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçlarının Ct ortalaması $35,5 \pm 1,83$ bulunmuştur. Mide biyopsi gerçek zamanlı PZR testinde Ct

arttıkça dışkı örneğinde gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* saptama olasılığı düşmektedir.

“Ezplex” mide biyopsi örneğinde gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* pozitif ve klaritromisin nokta mutasyonu saptanmayan 27 örneğin sonuçları incelendiğinde dışkı gerçek zamanlı PZR ile 10 örnekte uyumlu sonuç elde edilmiştir. Uyumsuz bulunan 17 örnekte ise dışkı gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* negatif saptanmıştır. Uyumsuz bulunan 17 örneğin mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçlarının Ct ortalaması $30,4 \pm 6,5$ olarak tespit edilmiştir.

Histopatolojik inceleme ve dışkıda antijen testi pozitif bir hastanın, “Ezplex” mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA’sı negatif saptanmış; “Ezplex” dışkı gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA’sı pozitif ve klaritromisin nokta mutasyonu saptanmamıştır.



Şekil 4.3. “Ezplex” mide biyopsi ve dışkı gerçek zamanlı PZR arasında *H. pylori* klaritromisin nokta mutasyonlarının karşılaştırılması.(CLA-R: Klaritromisin A2142G veya A2143G mutasyonu saptanan, CLA-S: Klaritromisin A2142G veya A2143G nokta mutasyonu saptanmayan, HP-neg: *H. pylori* negatif)

s:63	Üreaz Aktivitesi	Kültürde Üreme	Dışkıda Antijen Testi	Histopatoloji	Ezplex Mide Biyopsi Gerçek Zamanlı PZR	Referans Sonuç
Nİ-1	Pozitif	Üreme yok	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-2	Negatif	Üreme yok	HP+	HP+	NEG	HP+
Nİ-3	Negatif	Üreme yok	HP+	NEG	NEG	NEG
Nİ-4	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-5	Pozitif	Üreme yok	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-6	Negatif	Üreme yok	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-7	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-8	Pozitif	Üreme Var	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-9	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-10	Pozitif	Üreme Var	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-11	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-12	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-13	Pozitif	Üreme Var	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-14	Pozitif	Üreme Var	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-15	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-16	Pozitif	Üreme Var	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-17	Pozitif	Üreme Var	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-18	Negatif	Üreme yok	HP+	NEG	NEG	NEG
Nİ-19	Negatif	Üreme yok	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-20	Pozitif	Üreme yok	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-21	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-22	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-23	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-24	Pozitif	Üreme Var	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-25	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-26	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-27	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-28	Pozitif	Üreme var	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-29	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-30	Negatif	Üreme yok	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-31	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-32	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-33	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-34	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-35	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-36	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-37	Pozitif	Üreme Var	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-38	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-39	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-40	Pozitif	Üreme yok	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-41	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-42	Pozitif	Üreme Var	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-43	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-44	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-45	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-46	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-47	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-48	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-49	Pozitif	Üreme yok	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-50	Negatif	Üreme yok	HP+	NEG	HP+	HP+
Nİ-51	Pozitif	Üreme yok	HP+	NEG	HP+	HP+
Nİ-52	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-53	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-54	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-55	Pozitif	Üreme yok	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-56	Pozitif	Üreme var	HP+	HP+	HP+	HP+
Nİ-57	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-58	Negatif	Üreme yok	HP+	HP+	NEG	HP+
Nİ-59	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-60	Negatif	Üreme yok	NEG	HP+	HP+	HP+
Nİ-61	Negatif	Üreme yok	NEG	NEG	HP+	NEG
Nİ-62	Negatif	Üreme yok	HP+	NEG	HP+	HP+
Nİ-63	Pozitif	Üreme yok	HP+	HP+	HP+	HP+

Şekil 4.4. Hastaların hızlı üreaz testi, mide biyopsi kültürü, histopatoloji, dışkıda antijen testi, mide biyopsi gerçek zamanlı PZR ve referans sonuçların incelenmesi (HP+: *H. pylori* pozitif, NEG: *H. pylori* negatif)

s:63	Ezplex Mide Biyopsi Gerçek Zamanlı PZR	Ezplex Mide Biyopsi Ct	Ezplex Mide Biyopsi CLA Mutasyonu	Ezplex Dışkı Gerçek Zamanlı PZR	Ezplex Dışkı Ct	Ezplex Dışkı CLA Mutasyonu
Nİ-1	HP+	25,57	CLA-R	HP+	35,33	CLA-R
Nİ-2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-5	HP+	20,03	CLA-S	HP+	32,87	CLA-S
Nİ-6	HP+	21,55	CLA-R	HP+	32,66	CLA-R
Nİ-7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-8	HP+	27,11	CLA-S	HP+	33,43	CLA-S
Nİ-9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-10	HP+	20,02	CLA-S	HP+	33,54	CLA-S
Nİ-11	HP+	34,22	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-13	HP+	21,38	CLA-R	HP+	34,45	CLA-R
Nİ-14	HP+	22,51	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-15	HP+	35,23	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-16	HP+	22,92	CLA-S	HP+	35,97	CLA-S
Nİ-17	HP+	22,12	CLA-S	HP+	32,62	CLA-S
Nİ-18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-19	HP+	28,55	CLA-S	HP+	32,56	CLA-S
Nİ-20	HP+	20,82	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-22	HP+	36,46	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-24	HP+	19,88	CLA-R	HP+	32,66	CLA-R
Nİ-25	HP+	37,45	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-27	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-28	HP+	21,93	CLA-S	HP+	33,85	CLA-S
Nİ-29	HP+	34,59	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-30	HP+	24,72	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-32	HP+	35,43	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-34	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-37	HP+	23,93	CLA-S	HP+	36,79	CLA-S
Nİ-38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-40	HP+	19,40	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-42	HP+	25,69	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-44	HP+	32,85	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-46	HP+	32,48	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-47	HP+	32,96	CLA-R	NEG	NEG	NEG
Nİ-48	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-49	HP+	22,05	CLA-R	HP+	34,0	CLA-R
Nİ-50	HP+	25,81	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-51	HP+	23,82	CLA-S	HP+	34,98	CLA-S
Nİ-52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Nİ-55	HP+	25,43	CLA-S	HP+	32,8	CLA-S
Nİ-56	HP+	21,99	CLA-R	HP+	36,26	CLA-S
Nİ-57	HP+	36,83	CLA-R	NEG	NEG	NEG
Nİ-58	NEG	NEG	NEG	HP+	33,94	CLA-S
Nİ-59	HP+	27,04	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-60	HP+	37,26	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-61	HP+	36,88	CLA-R	NEG	NEG	NEG
Nİ-62	HP+	37,38	CLA-S	NEG	NEG	NEG
Nİ-63	HP+	22,17	CLA-R	HP+	33,36	CLA-R

Şekil 4.5. “Ezplex” gerçek zamanlı PZR yöntemi ile mide biyopsi ve dışkı örneklerinde *H. pylori* ve klaritromisin nokta mutasyonlarının incelenmesi (HP+: *H. pylori* pozitif, NEG: *H. pylori* negatif, CLA: Klaritromisin, CLA-R: Klaritromisin A2142G veya A2143G mutasyonu saptanan, CLA-S: Klaritromisin A2142G veya A2143G nokta mutasyonu saptanmayan)

5. TARTIŞMA

H. pylori dünyada en sık görülen enfeksiyonlardan biridir ve dünya nüfusunun yaklaşık yarısı bu mikroorganizmayı taşımaktadır (151). *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında noninvaziv yöntemlerin rutin pratikte kullanılması için bu testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde bu nedenle *H. pylori*'nin tespitinde noninvaziv bir yöntem olan dışkıda gerçek zamanlı PZR'nin standardizasyonuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır (87).

H. pylori'nin antimikrobiyal direnci acil ve küresel bir sorundur (4, 17). *H. pylori* enfeksiyonunun yönetimiyle ilgili yayımlanan Maastricht VI raporunda, özellikle dirençli *H. pylori* olgularında tedavi edilmeden önce duyarlılık testi yapılması önerilmektedir (4). Mide biyopsi kültüründen *H. pylori* antibiyotik duyarlılık testleri emek yoğun ve invaziv bir yöntemdir. Bu nedenle *H. pylori* ve klaritromisin direncinin tespitinde noninvaziv bir yöntem olan dışkıda gerçek zamanlı PZR yöntemlerinin kullanımı hasta açısından daha kolay, hızlı sonuç alınması, maliyet etkin olması açısından önemlidir.

Çalışmamızda erkek hastalarda “referans sonuca” göre *H. pylori* pozitifliği açısından incelendiğinde kadın hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Aynı zamanda erkeklerde dışkı örneklerinden “Ezplex” gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* pozitifliği kadınlara oranla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Demirtaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer olarak erkek hasta grubunda *H. pylori* pozitifliği kadınlardan anlamlı oranda yüksektir (152). Bu durum dispepsi şikâyeti olan erkek hastaların sağlık kuruluşlarına daha geç başvurması gibi sebeplerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

H. pylori enfeksiyonlarının tanısında invaziv ve noninvaziv çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda mide biyopsi örneklerinin hızlı üreaz testi ile örneklerin %30,2'sinde üreaz aktivitesi pozitif tespit edilmiştir. Histopatolojik incelemede örneklerin %38,1'inde *H. pylori* benzeri mikroorganizmalar gözlemlenmiştir. Kültür ile mide biyopsi örneğinin %17,5'inde *H. pylori* izole edilmiştir. Mide biyopsi örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile örneklerin %58,7'sinde

H. pylori tespit edilmiştir. Maçın ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 87 hastanın mide biyopsi örneğinde histopatoloji ile %87,5, mide biyopsi kültürü ile %63,2, mide biyopsi örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile %87,5 oranında pozitiflik saptanmıştır. *H. pylori* enfeksiyonlarının saptanması için birçok invaziv ve non-invaziv tanı testi bulunmaktadır. Her testin bazı avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle seçilecek tanı yöntemi kolay ve tüm yaş gruplarına uygulanabilir olmalıdır (153).

Çalışmamızda gradient şerit testi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde levofloksasin, tetrasiklin ve amoksisiline karşı direnç saptanmamıştır. İzolatların üçünde klaritromisin direnci, üçünde ise metronidazol direnci saptanmıştır. Türkiye’de *H. pylori*’nin primer antimikrobiyal direnç durumunun değerlendirildiği sistematik bir derlemede %0,9 amoksisilin, %24,8 klaritromisin, %33,7 metronidazol, %3,5 tetrasiklin ve %23,7 levofloksasin direnci saptanmıştır. Amoksisilinin düşük direnç oranları nedeniyle, *H. pylori*’nin tedavisinde en iyi seçeneklerden biri olabileceği vurgulanmıştır (6). Maçın ve arkadaşlarının Hacettepe Üniversitesi’nde yaptığı çalışmada *H. pylori* tedavisi almayan pediyatrik yaş grubundaki hastalarda klaritromisin, metronidazol, amoksisilin ve tetrasikline karşı MİK değerleri gradient şerit yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tetrasiklin ve amoksisiline karşı direnç saptanmamıştır. Suşların 28’inde (%30,1) klaritromisin direnci, 45’inde (%48,4) metronidazol direnci saptanmıştır. Keşli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *H. pylori* izolatlarının dokuzunda (%6,4) amoksisiline, 22’sinde (%15,7) klaritromisine, 17’sinde (%12,1) levofloksasine ve 57’sinde (%40,7) metronidazole karşı direnç saptanmıştır (154).

H. pylori’nin küresel antibiyotik direnç prevalansına bakıldığında klaritromisin, metronidazol ve levofloksasine karşı direnç oranlarının incelendiği sistematik derlemede Amerika ve Güneydoğu Asya’da primer klaritromisin direnci ve Avrupa’da primer levofloksasin direnci hariç tüm DSÖ bölgelerinde direnç oranları $\geq$ %15 olarak saptanmıştır (5).

Hussein ve arkadaşlarının çalışmasında, 115 mide biyopsi örneğinden izole edilen toplamda 55 (%47,8) *H. pylori* izolatının antibiyotik duyarlılık testinde levofloksasin, klaritromisin, siprofloksasin ve metronidazol için sırasıyla %29,1,

%69,1, %36,4 ve %72,7 oranında direnç saptanmıştır (155). Sonuç olarak, bizim çalışmamızda da olduğu gibi *H. pylori*'nin eradikasyonunda önemli bir role sahip klaritromisine karşı yüksek direnç görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde klaritromisine karşı direnç oranlarında makrolidlerin yaygın kullanımı nedeniyle artış gözlenmektedir.

Dışkıda antijen testleri *H. pylori* tanısında “test et, tedavi et” stratejisi kapsamında kullanılan noninvaziv bir yöntemdir (4). Dışkıda antijen testlerinin ucuz, kolay ulaşılabilir ve pediyatrik hastalarda kolay uygulanabilir olması avantajlıdır. Çalışmamızda dışkı örneklerinin %28,5’inde HpSA (GA Generic Assay GmbH, Almanya) antijen testi ile *H. pylori* antijeni saptanmıştır. Özbey ve arkadaşlarının yaptığı beş yıllık retrospektif incelemede 4.696 hastanın %25’inde dışkıda *H. pylori* antijen testi (CerTest *H. pylori* One Step Card Test, CerTest Biotec, İspanya) sonucu pozitif bulunmuştur (156). Çalışmamızın sonuçlarının, bu çalışma ile uyumlu olduğu gözlenmektedir. Dışkıda antijen testlerinin dezavantajı klaritromisin direnci hakkında bilgi vermemesidir.

H. pylori'nin tanı ve tedavisinde kültür ve antibiyogram gibi standart yöntemlerin yanı sıra artık moleküler yöntemlerin de kullanımı önerilmektedir (4). *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavisi için yayımlanan Toronto uzlaşi raporunda artan direnç oranları dikkate alınarak hastalara gastroduodenal endoskopi yapıldığında duyarlılık testinin yapılmasının teşvik edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (157). Ticari olarak mide biyopsi örneklerinde hem *H. pylori* varlığı hem de klaritromisin nokta mutasyonlarını saptayabilen, duyarlılık ve özgüllükleri yüksek gerçek zamanlı PZR kitleleri bulunmaktadır (158).

Fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri, *H. pylori*'nin kültürünü gerektiren, zaman alıcı ve emek yoğun testlerdir. Bu amaçla agar dilüsyon yöntemi veya gradiyent test yöntemi kullanılmaktadır. Bu nedenle antibiyotik direncini tespit etmek için kültürden bağımsız noninvaziv yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. *H. pylori*'nin klaritromisine karşı geliştirdiği direnç en sık olarak 23S rRNA genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. A2143G, A2142G ve A2142C nokta mutasyonları neredeyse tüm klinik izolatlarda dirençten sorumlu mekanizmalardır (4).

Çalışmamızda mide biyopsi ve dışkı örneklerinden *H. pylori*'nin tespiti ve klaritromisin direncinden sorumlu en sık görülen 23S rRNA genindeki nokta mutasyonlarının (A2142G, A2143G) saptanması için tasarlanmış ticari tanı kiti kullanılmıştır. Mide biyopsi örneklerinden klaritromisin ve kinolon direncinin tespitinde genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığı metaanalizde; 23S rRNA ve *gyr A* genindeki mutasyonların tespit edilmesinin güvenilir olduğu bulunmuştur. A2142G/C veya A2143G nokta mutasyonları, klaritromisin direncinin saptanması için en yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip mutasyonlar olarak bildirilmiştir. Ancak metronidazol direncinin genotipik yöntemlerle saptanmasında ise henüz tatmin edici sonuçlara ulaşamadığı bildirilmiştir (159).

Dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile *H. pylori*'nin ve klaritromisin direncinin tespitinde hızlı sonuç verme süresi ve noninvaziv olması nedeniyle önemlidir. Çalışmamızda dışkı örneklerinden “Ezplex” gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori*'nin tespiti için analitik performansa bakıldığında duyarlılık %66,6, özgüllük %100, PPV %100, NPV %80 ve tanısal doğruluk oranı %85,7 olarak saptanmıştır. Klaritromisin direncinin saptanmasında referans olarak alınan gradiyent test yöntemi sonuçlarına göre dışkıda gerçek zamanlı PZR ile klaritromisin direnci saptanmasının tanısal doğruluk oranı %66,6 bulunmuştur. Klaritromisin nokta mutasyonlarının saptanmasında referans test olarak mide biyopsi gerçek zamanlı PZR sonuçları dikkate alınarak değerlendirildiğinde ise dışkıda gerçek zamanlı PZR sonuçları %65 oranında uyumlu saptanmıştır. Çalışmamızda *H. pylori* tespitinde, dışkı örneklerinde gerçek zamanlı PZR yönteminin pozitif sonuçlarına güvenebiliriz ancak negatif sonuçlar dikkatle izlenmelidir. Dışkı örneklerinden klaritromisin nokta mutasyonlarının saptanmasında, referans olarak mide biyopsi örneklerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları dikkate alınarak değerlendirildiğinde yöntemin tanısal doğruluk oranı açısından umut vericidir ve daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Klinik açıdan klaritromisin nokta mutasyonlarının saptanmasında bu yöntemin kültür ve fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri ile birlikte kullanılması daha uygundur. Klinik laboratuvarlarda kullanılmadan önce dışkı örneklerinden *H. pylori*'nin saptanması ve klaritromisin direncinin tespitinde gerçek zamanlı PZR ticari

kitlerinin verifikasyon, validasyon çalışmalarının yapılması ve analitik performansının göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR, *H. pylori* enfeksiyonunun saptanmasında çok yararlı bir yöntem olabilir ancak dışkıda *H. pylori* DNA'sının saptanması için bildirilen başarı oranları bu yöntem ile %25 ila %100 arasında değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik gastrointestinal sistemdeki *H. pylori* DNA'sının bozulmasından ve/veya kompleks polisakkaritler gibi PZR inhibitörlerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (160, 161).

Çalışmamızda dışkı kabının laboratuvara teslimi ve laboratuvarında dışkı tüpünün dondurulması arasındaki ortalama süre $4,75 \pm 2$ gün bulunmuştur. Dışkıda *H. pylori* DNA'sının saptanmasını amaçlayan PZR testlerinin uygulanması sırasında; dışkının oda sıcaklığında uzun süre saklanması veya taşınması, örneklerin tekrar tekrar dondurulması ve çözündürülmesi, DNA ekstraktının PZR'den önce dondurulması ve çözündürülmesi, uzun süre saklanması gibi durumlar sonucu olumsuz etkileyebilmektedir (162). Çalışmamızda dışkı örneklerinin laboratuvara transferi aşamasında örneğin uygun olmayan koşullarda transportu PZR yönteminin duyarlılığını etkilediği düşünülmüştür. Bu nedenle dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi için preanalitik ve analitik dönemdeki bu parametrelere özellikle dikkat edilmelidir.

Türkiye'de Şen ve arkadaşlarının çalışmasında, *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı histopatoloji pozitifliği ve/veya hızlı üreaz testi pozitifliği olarak tanımlanmıştır. Dispepsi şikâyeti olan 54 hastanın 46'sına (%85,2) pozitif, sekizine (%14,8) negatif tanı konulmuştur. Dışkı örneklerinden PZR yöntemi ile 32 (%59,3) örnekte *H. pylori* pozitif, 22'sinde (%40,7) negatif saptanmıştır. Duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV değerleri sırasıyla %65,2, %75, %93,75, %27,7 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *H. pylori* tespitinde duyarlılığın düşük olmasının nedeni hastaların sebze ve meyve içermeyen sıkı bir diyetle uymaması olabileceğini bildirmişlerdir (163).

Almanya’da Lottspeich ve arkadaşlarının çalışmasında ise *H. pylori*’nin saptanması için “*H. pylori* ClariRes Real-time PCR” (Ingenetix, Viyana, Avusturya) kiti ile semptomatik çocuklardan alınan dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile duyarlılık %63, özgüllük %100 olarak saptanmıştır. “*H. pylori* ClariRes” gerçek zamanlı PZR ile tespit edilen klaritromisin nokta mutasyonları ve gradiyent şerit yönteminde fenotipik klaritromisin duyarlılık sonuçları karşılaştırıldığında tüm sonuçlar uyumlu bulunmuştur. Araştırmacılar, *H. pylori* DNA’sının saptanmasının zor olduğunu ve bu yöntemin dışkıda antijen testinin yerini alamayacağını bildirmişlerdir (164).

Pichon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *H. pylori* tespiti için “Amplidiag *H. pylori*+ClariR Real-time PCR” (Espoo, Finlandiya) kiti kullanılmıştır. Erişkin hastalardan alınan dışkı örneklerinde gerçek zamanlı PZR performansı sırasıyla duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV %96,3, %98,7, %92,2, %99,3 olarak saptanmıştır. Klaritromisin direnci için ise duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV sırasıyla %100, %98,4, %93,1, %100 saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre yüksek performans saptanan bu noninvaziv testin histopatolojik incelemenin gerekli olmadığı tüm durumlarda kullanılması önerilmiştir (10). Söz konusu çalışma ile çalışmamızın sonuçları arasındaki farklılık kullanılan kitin analitik performansı, örneklerin transport ve saklama koşullarındaki farklılıklar, kullanılan dışkı ekstraksiyon yöntemi, dışkıda bulunabilecek PZR inhibitörlerine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda fenotipik antibiyotik duyarlılık yöntemi ile dışkı ve mide biyopsi gerçek zamanlı PZR’de saptanan klaritromisin nokta mutasyonları karşılaştırıldığında dirençli genotipi saptamasındaki başarısızlık karışık popülasyonlarla ilişkili olabilir. Çalışmamızla uyumlu olarak, Gurtner ve arkadaşlarının çalışmasında ise gastroduodenal endoskopi yapılan 92 hastanın 45’inin mide biyopsi kültürü pozitif bulunmuştur. Dışkı örneklerinden *H. pylori*’nin tespiti için kullanılan biprob gerçek zamanlı PZR ile %98 duyarlılık, %98 özgüllük saptanmıştır. Bu çalışmada, *H. pylori* tespit edilen 45 izolattan 11’inin gradiyent şerit yöntemi ile fenotipik olarak klaritromisine dirençli olduğu bildirilmiştir. Klaritromisine duyarlı tüm vakalar 23S rRNA genine özgül PZR testi ile mide biyopsi

ve dışkı örneklerinde duyarlı olarak tanımlanmıştır. Dışkı örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile sekiz vaka, mide biyopsi örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile dokuz vaka klaritromisine dirençli olarak tanımlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR'nin dışkı DNA'sında dirençli genotipi saptamadaki başarısızlığı, karışık popülasyonlarla ilişkilendirilmiştir (124). Karışık popülasyonların değerlendirilmesi açısından gerçek zamanlı PZR'de erime eğrisi analizi ile duyarlı ve dirençli fenotiplerin saptandığı ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Brezilya'da Scaletsky ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, çocuk hastalarda "H. pylori ClariRes" (Ingenetix, Viyana, Avusturya) ticari kiti ile dışkı örneklerinde A2142G/A2143G klaritromisin nokta mutasyonları değerlendirilmiştir. H. pylori enfeksiyonunun tanısı için "referans" olarak pozitif mide biyopsi kültürü veya pozitif histopatolojik inceleme ve hızlı üreaz testi kabul edilmiştir. Dışkı örneklerinde H. pylori'nin tespitinde duyarlılık, özgüllük ve testin tanısallık doğruluk oranı sırasıyla %69, %100 ve %93,9 olarak saptanmıştır. Dışkı örneklerinde klaritromisin direncinin saptanması için ise duyarlılık, özgüllük ve kitin tanısallık doğruluk oranı sırasıyla %83,3, %100 ve %95 bulunmuştur. İnvaziv olmayan bu yöntemin özellikle gelişmekte olan ülkelerde klaritromisine dirençli H. pylori izolatlarının prevalansının değerlendirilmesinde uygun olduğu gösterilmiştir (165).

Gramley ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 22 hastadan dışkı, mide biyopsi ve serum örnekleri alınmış olup histopatoloji, seroloji ve PZR sonuçlarına göre karşılaştırılma yapılmıştır. Mide biyopsi örneklerinde PZR ile 22 hastanın 11'inde (%50), dışkı örneklerinde PZR yöntemi ile ise 11 hastanın sekizinde (%72,7) H. pylori DNA'sı saptanmıştır. Dışkı örneklerinde PZR sonuçları; histopatoloji, seroloji ve mide biyopsi PZR analizleriyle karşılaştırıldığında duyarlılık %73, özgüllük ise %100 bulunmuştur (166).

Khadangi ve arkadaşlarının H. pylori tespitinde dışkı PZR yönteminin tanısallık doğruluğunu inceledikleri ve 26 çalışmanın dahil edildiği metaanalizde, dışkı PZR testinin performansı; %71 (%95 CI: 68-73) duyarlılık, %96 (%95 CI: 94-97) özgüllük ve %65,6 (%95 CI: 54-77) tanısallık doğruluk oranına sahip olduğu saptanmıştır. Dışkı PZR ile H. pylori tespitinde en güçlü aday genler olan 23S rRNA, 16S rRNA ve glmM

olduğu saptanmıştır. Metaanaliz sonucunda en yüksek performansa sahip yöntemin 23S rRNA PZR olduğu ve *H. pylori* enfeksiyonunun tespiti için uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (87).

Vécsei ve arkadaşlarının biprob gerçek zamanlı PZR testini değerlendirdikleri çalışmalarında *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında referans olarak hızlı üreaz testi ve histopatoloji pozitifliği veya yalnızca mide biyopsi kültürü pozitifliğinde “*H. pylori* pozitif” kabul edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesinde ise gradiyent testi referans yöntem olarak kabul edilmiştir. *H. pylori* tespiti için biprob gerçek zamanlı PZR ile erime eğrisi analizinde duyarlılık, özgüllük ve testin tanısal doğruluğu sırasıyla %83,8, %98,4 ve %90,2 bulunmuştur. Klaritromisin direncinin saptanması için duyarlılık, özgüllük ve doğruluk ise sırasıyla %89,2, %100 ve %94 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada dışkı gerçek zamanlı PZR testinin klaritromisin direncinin yüksek olduğu pediatrik popülasyonda, *H. pylori*’nin ve klaritromisin direncinin saptanması için güvenilir, noninvaziv bir yöntem olarak önerilmiştir (167).

Dışkı örneklerinden *H. pylori* klaritromisin direncinin saptanmasında PZR tabanlı testlerin incelendiği ve 11 çalışmanın dahil edildiği bir metaanalizde, toplam 592 hasta değerlendirilmiştir. Dışkı örneklerinde PZR tabanlı testler kullanılarak *H. pylori* ile enfekte hastalarda klaritromisin nokta mutasyonlarının saptanmasının yüksek tanısal doğruluğa sahip olduğu ifade edilmiştir (168).

Xiong ve arkadaşlarının çocuklarda dışkı örneklerinde PZR ile klaritromisine dirençli *H. pylori*’nin saptanması ile ilgili literatür incelemesinde, kültüre dayalı duyarlılık testleri ile karşılaştırıldığında; dışkı PZR yönteminin sonuç verme hızı, bakteri üremesinden bağımsız olması, tekrarlanabilirliği ve kolay standardizasyonu açısından iyi performansa sahip olduğu bulunmuştur (169).

Çalışmamızda mide biyopsi örneklerinden gerçek zamanlı PZR yönteminde yüksek Ct değerleri ile *H. pylori* DNA’sı saptanan hastaların, dışkı örneklerinde ise gerçek zamanlı PZR yöntemi ile *H. pylori*’nin negatif saptanması dikkat çekmektedir. Mide biyopsi örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile Ct değerinin yüksek olması örnekte bakteriye ait DNA’nın az olduğunu ve intestinal sistemde *H. pylori* DNA’sının

enzimatik veya mekanik bozunmaya maruziyeti nedeniyle dışkı ile atılıma yansıdığını göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olarak Falsafi ve arkadaşları, şiddetli gastrit formu ile dışkı PZR pozitifliği arasında ilişki gözlemlemiştir. *H. pylori*'nin midede kolonizasyon derecesi, dışkı örneklerinden başarılı sonuç alınması için önemli bir kriter olabileceği ileri sürülmüştür (170). Çalışmamızın aksine, Gurtner ve arkadaşlarının çalışmasında ise gerçek zamanlı PZR yönteminde mide biyopsi ve dışkı örnekleri arasındaki Ct değerlerinin zayıf korelasyonu, Ct değerlerinin mide mukozasındaki gerçek bakteri yoğunluğuna karşılık gelmeyebileceğini bildirmişlerdir (124).

Çalışmamızda *H. pylori*'nin tespiti açısından, dışkı örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile histopatolojik inceleme arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Falsafi ve arkadaşlarının çalışmasında, 28 pediyatrik hastanın mide biyopsi örneğinin 16srRNA analizinde 18 hastada *H. pylori* DNA'sı pozitif saptanmıştır. Dışkı örneklerinin 11'inde (%39) PZR ile *H. pylori* DNA'sı pozitif bulunmuştur. Dışkı örneklerinden *H. pylori*'nin tespitinde PZR duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %62,5 ve %92,3 olarak saptanmıştır. Dışkı örneklerinde PZR pozitif 11 hastanın 10'unda histopatolojik incelemede *H. pylori* gözlenmiştir. Histopatolojik incelemede yüksek "Sydney" skoru ile dışkı PZR pozitifliği arasında ilişki gözlenmiştir (170).

Çalışmamızda histopatolojik inceleme ve dışkıda antijen testleri pozitif saptanan bir hastanın mide biyopsi örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA'sı negatif saptanmıştır. Dışkı örneğinde ise gerçek zamanlı PZR ile *H. pylori* DNA'sı pozitif bulunmuştur. Gastroduodenal endoskopi ile alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneklerinin tüm mide mukozasını yansıtmaması nedeniyle yalancı negatif sonuçlar elde edileceği akılda tutulmalıdır.

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında "Ezplex" dışkı gerçek zamanlı PZR yönteminin, *H. pylori*'nin tedavisinde ek olarak kullanılabilecek diğer antimikrobiyal ajanlar hakkında duyarlılık bilgisi sağlamıyor olmasıdır. Çalışmamızda sadece A2142G ve A2143G klaritromisin nokta mutasyonları tespit edilmiştir. Genotipik

olarak klaritromisin direncine neden olan diğer nokta mutasyonların tespiti açısından DNA dizileme yöntemleri kullanılmalıdır.

Mide biyopsi kültüründen izole edilen *H. pylori* 'nin antibiyotik duyarlılık testi, emek yoğun ve invaziv bir yöntemdir. *H. pylori* kültür ile izole edilse bile oksijene çok duyarlı olması nedeniyle tekrar üretilmeyebilir ve antibiyotik duyarlılık sonucu elde edilemeyebilir. Bu nedenle, konvansiyonel yöntemlerle klaritromisin duyarlılık sonucu elde edilmeden önce duyarlılık bilgisinin gerekli olması veya fenotipik klaritromisin duyarlılık testinin başarılı olmaması gibi durumlarda, dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile klaritromisin nokta mutasyonları saptanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Dışkı örnekleri kullanılarak yapılan bir gerçek zamanlı PZR testi, gastroduodenal endoskopik incelemenin yapılmasının zor olduğu ve histopatolojik incelemenin gerekmediği durumlarda veya *H. pylori*'nin tedavisinin takibinde etkili olabilir.
2. *H. pylori* tespitinde dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yönteminin pozitif sonuçlarına güvenebiliriz ancak negatif sonuçlar dikkatle izlenmelidir.
3. Mide biyopsi kültüründen izole edilen *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılık testleri, emek yoğun ve invaziv bir yöntemdir. *H. pylori* kültür ile izole edilse bile oksijene çok duyarlı olması nedeniyle tekrar üretilmeyebilir ve antibiyotik duyarlılık sonucu elde edilemeyebilir. Bu nedenle, konvansiyonel yöntemlerle klaritromisin duyarlılık sonucu elde edilmeden önce duyarlılık bilgisinin gerekli olması veya fenotipik klaritromisin duyarlılık testinin başarılı olmaması gibi durumlarda, dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi ile klaritromisin nokta mutasyonları saptanabilir.
4. Dışkı örneklerinden gerçek zamanlı PZR yöntemi, mide biyopsi kültürü ve konvansiyonel antibiyotik duyarlılık testleri ile birlikte kullanılmalıdır.
5. Dışkı örneklerinden DNA ekstraksiyonu ile elde edilen verimin artması için preanalitik ve analitik süreçlere dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu durum, kullanılacak gerçek zamanlı PZR kitinin duyarlılığının artmasını sağlayabilir.
6. Klinik laboratuvarlarda kullanılmadan önce dışkıdan *H. pylori* ve klaritromisin direncinin tespitinde gerçek zamanlı PZR ticari kitlerinin verifikasyon, validasyon çalışmalarının yapılması ve analitik performansının göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerekmektedir.
7. *H. pylori*'nin dışkı örneklerinden 23S rRNA gerçek zamanlı PZR ile nokta mutasyonlarının saptanmasında, yöntemin geliştirilerek tanısal doğruluğunun artırılması için daha geniş çaplı ve ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.
8. Mide biyopsi örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile Ct değerinin yüksek olması örnekte bakteriye ait DNA'nın az olduğunu ve intestinal sistemde *H. pylori* DNA'sının enzimatik veya mekanik bozunmaya maruziyeti nedeniyle dışkı ile atılıma yansıdığını göstermektedir.

9. Gastroduodenal endoskopi ile alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneklerinin tüm mide mukozasını yansıtmaması nedeniyle yalancı negatif sonuçlar alınmaktadır.
10. Fenotipik antibiyotik duyarlılık yöntemi ile dışkı ve mide biyopsi gerçek zamanlı PZR’de saptanan klaritromisin nokta mutasyonları karşılaştırıldığında dirençli genotipi saptamasındaki başarısızlık karışık popülasyonlarla ilişkili olabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Khademi F, Sahebkar AH, Vaez H, Arzanlou M, Peeridogaheh H. Characterization of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains in Iran: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017; 10:171-8.
2. Hooi JK, Lai WY, Ng WK, Suen MM, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2017; 153:420-9.
3. Güven B, Gülerman F, Kaçmaz B. *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in a pediatric population in Turkey: A cross-sectional study. *Helicobacter*. 2019; 24:e12581.
4. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou J-M, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022; 71:1724-62.
5. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology*. 2018; 155:1372-82.e17.
6. Kocazeybek B, Tokman HB. Prevalence of Primary Antimicrobial Resistance of *H. pylori* in Turkey: A Systematic Review. *Helicobacter*. 2016; 21:251-60.
7. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, 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; 45:1500-4.
8. Xiong LJ, Tong Y, Wang Z, Mao M. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by stool PCR in children: a comprehensive review of literature. *Helicobacter*. 2013;18(2):89-101; doi: 10.1111/hel.12016.
9. Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3636-40; doi: 10.1128/jcm.41.8.3636-3640.2003.
10. Pichon M, Pichard B, Barrioz T, Plouzeau C, Croquet V, Fotsing G, et al. Diagnostic accuracy of a noninvasive test for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in stool by the Amplidiag *H. pylori*+ ClariR real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2020; 58:e01787-19.
11. Blaser MJ. *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease: Igaku-Shoin Medical Publishers; 1989.
12. Marshall B, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The lancet*. 1984; 323:1311-5.
13. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1989; 39:397-405.
14. Marshall B. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1983; 1:1273-5.

15. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Clancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Medical Journal of Australia*. 1985; 142:436-9.
16. Correa P. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Helicobacter pylori Infection and Immunity*: Springer; 2002. p. 35-47.
17. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18:318-27.
18. He J, Liu Y, Ouyang Q, Li R, Li J, Chen W, et al. *Helicobacter pylori* and unignorable extragastric diseases: Mechanism and implications. *Frontiers in microbiology*. 2022; 13.
19. Hunt R, Xiao S, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, Van der Merwe S, et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. *Journal of gastrointestinal and liver diseases: JGLD*. 2011; 20:299-304.
20. Yuan C, Adeloye D, Luk TT, Huang L, He Y, Xu Y, et al. The global prevalence of and factors associated with *Helicobacter pylori* infection in children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Child & Adolescent Health*. 2022.
21. Ozaydin N, Turkyilmaz SA, Cali S. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the 13C-Urea breath test. *BMC public health*. 2013; 13:1-12.
22. Queralt N, Bartolome R, Araujo R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *Journal of applied microbiology*. 2005; 98:889-95.
23. Bellack N, Koehoorn M, MacNab Y, Morshed M. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiology & Infection*. 2006; 134:439-49.
24. Megraud F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 1995; 9:85-91.
25. Mladenova I, Durazzo M. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Minerva gastroenterologica e dietologica*. 2018; 64:251-4.
26. Bamford K, Bickley J, Collins J, Johnston B, Potts S, Boston V, et al. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. *Gut*. 1993; 34:1348-50.
27. Kivi M, Johansson A, Reilly M, Tindberg Y. *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. *Epidemiology & Infection*. 2005; 133:645-52.
28. Tytgat G. Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 1995; 9:105-10.
29. Sánchez-Alonzo K, Matamala-Valdés L, Parra-Sepúlveda C, Bernasconi H, Campos VL, Smith CT, et al. Intracellular presence of *Helicobacter pylori* and its virulence-associated genotypes within the vaginal yeast of term pregnant women. *Microorganisms*. 2021; 9:131.
30. Sánchez-Alonzo K, Parra-Sepúlveda C, Vergara L, Bernasconi H, García-Cancino A. Detection of *Helicobacter pylori* in oral yeasts from students of a Chilean university. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2020; 66:1509-14.

31. Dore M, Pes G, Sanna G, Sepulveda A, Graham D. *Helicobacter pylori* infection in shepherds, sheep and sheep-dogs. *Microb Health Dis.* 2020; 2:e306.
32. Zamani M, Vahedi A, Maghdouri Z, Shokri-Shirvani J. Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. *Caspian journal of internal medicine.* 2017; 8:146.
33. Katelaris P, Hunt R, Bazzoli F, Cohen H, Kwong M, Gemilyan M, et al. World gastroenterology organisation global guidelines: *Helicobacter pylori*. World Gastroenterology Organisation. 2021.
34. Berthenet E, Bénéjat L, Ménard A, Varon C, Lacomme S, Gontier E, et al. Whole-genome sequencing and bioinformatics as pertinent tools to support *Helicobacteraceae* taxonomy, based on three strains suspected to belong to novel *Helicobacter* species. *Frontiers in Microbiology.* 2019; 10:2820.
35. Rimbara E, Suzuki M, Matsui H, Nakamura M, Morimoto M, Sasakawa C, et al. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* from human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021; 118.
36. Fox JG, Lee A. Gastric campylobacter-like organisms: their role in gastric disease of laboratory animals. *Lab Anim Sci.* 1989; 39:543-53.
37. Mladenova-Hristova I, Grekova O, Patel A. Zoonotic potential of *Helicobacter* spp. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017; 50:265-9.
38. Smet A, Yahara K, Rossi M, Tay A, Backert S, Armin E, et al. Macroeolution of gastric *Helicobacter* species unveils interspecies admixture and time of divergence. *The ISME journal.* 2018; 12:2518-31.
39. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:720-41.
40. Gong Y, Yuan Y. Resistance mechanisms of *Helicobacter pylori* and its dual target precise therapy. *Critical reviews in microbiology.* 2018; 44:371-92.
41. Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance—from biology to clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2021; 18:613-29.
42. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am.* 1993; 22:5-19.
43. Kolts BE, Joseph B, Achem SR, Bianchi T, Monteiro C. *Helicobacter pylori* detection: a quality and cost analysis. *American Journal of Gastroenterology (Springer Nature).* 1993; 88.
44. Fallone CA, Loo VG, Lough J, Barkun AN. Hematoxylin and eosin staining of gastric tissue for the detection of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 1997; 2:32-5.
45. Genta RM, Robason GO, Graham DY. Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. *Hum Pathol.* 1994; 25:221-6.
46. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *Journal of Infectious diseases.* 1990; 161:626-33.
47. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1988; 7:555-8.
48. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:280-322.

49. Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997; 388:539-47.
50. Alm RA, Ling L-SL, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1999; 397:176-80.
51. Boneca IG, Reuse Hd, Epinat JC, Pupin M, Labigne A, Moszer I. A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes. *Nucleic Acids Research*. 2003; 31:1704-14.
52. Kinoshita-Daitoku R, Ogura Y, Kiga K, Maruyama F, Kondo T, Nakagawa I, et al. Complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain ATCC 43504, a type strain that can infect gerbils. *Microbiology Resource Announcements*. 2020; 9:e00105-20.
53. Kleanthous H, Clayton C, Tabaqchali S. Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*. 1991; 5:2377-89.
54. Minnis JA, Taylor TE, Knesek JE, Peterson WL, McIntire SA. Characterization of a 3.5-kbp plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid*. 1995; 34:22-36.
55. Debowski AW, Walton SM, Chua E-G, Tay AC-Y, Liao T, Lamichhane B, et al. *Helicobacter pylori* gene silencing in vivo demonstrates urease is essential for chronic infection. *PLoS pathogens*. 2017; 13:e1006464.
56. Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology*. 1996; 111:419-25.
57. Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Microbiol*. 2017; 74:863-9.
58. Kusters JG, Van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews*. 2006; 19:449-90.
59. Ansari S, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* BabA in adaptation for gastric colonization. *World journal of gastroenterology*. 2017; 23:4158.
60. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. AM r 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97:7533-8.
61. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 2002; 297:573-8.
62. Sakamoto J, Watanabe T, Tokumaru T, Takagi H, Nakazato H, Lloyd KO. Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer research*. 1989; 49:745-52.
63. Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, et al. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *The Journal of experimental medicine*. 1998; 187:1659-69.

64. Cullen TW, Giles DK, Wolf LN, Ecobichon C, Boneca IG, Trent MS. *Helicobacter pylori* versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS pathogens*. 2011; 7:e1002454.
65. Szabò I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, et al. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *The EMBO journal*. 1999; 18:5517-27.
66. Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *The Journal of clinical investigation*. 2001; 108:929-37.
67. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 93:14648-53.
68. Odenbreit S, Püls Jr, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. 2000; 287:1497-500.
69. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic reviews*. 2000; 22:283-97.
70. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Disease models & mechanisms*. 2017; 10:89-104.
71. Nejati S, Karkhah A, Darvish H, Validi M, Ebrahimpour S, Nouri HR. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. *Microbial pathogenesis*. 2018; 117:43-8.
72. Mobley HL. Defining *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. *The American journal of medicine*. 1996; 100:2S-11S.
73. Sabbagh P, Mohammadnia-Afrouzi M, Javanian M, Babazadeh A, Koppolu V, Vasigala VR, et al. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019; 38:55-66.
74. Uotani T, Graham DY. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann Transl Med*. 2015; 3:9.
75. Okuda M, Mabe K, Lin Y, Chaochen W, Taniguchi Y, Kato M, et al. Rapid urine antibody test for *Helicobacter pylori* infection in adolescents. *Pediatrics International*. 2017; 59:798-802.
76. Graham DY, Miftahussurur M. *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review. *Journal of advanced research*. 2018; 13:51-7.
77. Kodama M, Murakami K, Okimoto T, Sato R, Uchida M, Abe T, et al. Ten-year prospective follow-up of histological changes at five points on the gastric mucosa as recommended by the updated Sydney system after *Helicobacter pylori* eradication. *Journal of gastroenterology*. 2012; 47:394-403.
78. Calvet X, Sánchez-Delgado J, Montserrat A, Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, Quesada M, et al. Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a reappraisal. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1385-91.

79. Logan R, Walker M, Misiewicz J, Gummert P, Karim Q, Baron J. Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. *Gut*. 1995; 36:12-6.
80. Han S, Flamm R, Hachem C, Kim H, Clarridge J, Evans D, et al. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1995; 14:349-52.
81. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2022. p. 81.
82. Versalovic J. Manual of clinical microbiology: American Society for Microbiology Press; 2011.
83. Blanchard TG, Nedrud JG. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. *Current protocols in microbiology*. 2012; 24:8B. 1.-8B. 1.19.
84. Citron DM, Culver City C. Susceptibility Testing for Fastidious Organisms: CLSI M45-A2 update. Update. 2010; 45:A2.
85. Momtaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J Gastroenterol*. 2012; 18:2105-11.
86. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*. 2015; 21:11221-35.
87. Khadangi F, Yassi M, Kerachian MA. Diagnostic accuracy of PCR-based detection tests for *Helicobacter Pylori* in stool samples. *Helicobacter*. 2017; 22:e12444.
88. Gisbert J, Pajares J. 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection—a critical review. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004; 20:1001-17.
89. Wu J, Liu G, Zhang Z, Mou Y, Chen Q, Wu J, et al. 15NH₄⁺ excretion test: a new method for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of clinical microbiology*. 1992; 30:181-4.
90. Kasapoğlu B, Türkay C. *Helicobacter pylori*'de tedavi ve direnç. *Güncel gastroenteroloji*. 2008; 12:141-5.
91. Ekesbo R, Toth E, Fork F-T, Held M, Nilsson I, Wadström T, et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection in a population in southern Sweden analysed by histopathology, immunoblot and ELISA serology. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2006; 18:589-93.
92. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, Flores-Gutiérrez JP, Maldonado-Garza HJ, Pérez-Pérez GI. Comparison of endoscopy-based and serum-based methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Canadian journal of gastroenterology*. 2003; 17:101-6.
93. Kullavanijaya P, THONG-NGAM D, Hanvivatvong O, Nunthapisud P, Tangkijvanich P, Suwanagool P. Analysis of eight different methods for the detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with dyspepsia. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2004; 19:1392-6.
94. Zúñiga-Noriega JR, Bosques-Padilla FJ, Pérez-Pérez GI, Tijerina-Menchaca R, Flores-Gutiérrez JP, Garza HJM, et al. Diagnostic utility of invasive tests and

serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in different clinical presentations. *Archives of Medical research*. 2006; 37:123-8.

95. Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2007; 21:299-313.

96. Gisbert JP, de la Morena F, Abaira V. Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101:1921-30.

97. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*. 2012; 61:646-64.

98. Zhou X, Su J, Xu G, Zhang G. Accuracy of stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a meta-analysis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2014; 38:629-38.

99. Demirtürk L, Yazgan Y, Tarçın O, Özel M, Diler M, Oncül O, et al. Does N-acetyl cystein affect the sensitivity and specificity of *Helicobacter pylori* stool antigen test? *Helicobacter*. 2003; 8:120-3.

100. Shimoyama T. Stool antigen tests for the management of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2013; 19:8188-91.

101. Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, et al. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet*. 1993; 341:447.

102. Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods*. 2001; 45:89-94.

103. Shuber AP, Ascaño JJ, Boynton KA, Mitchell A, Frierson HF, Jr., El-Rifai W, et al. Accurate, noninvasive detection of *Helicobacter pylori* DNA from stool samples: potential usefulness for monitoring treatment. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:262-4.

104. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Schneider BG. Detection and typing of *Helicobacter pylori* *cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J Microbiol Methods*. 2003; 52:197-207.

105. Argyros FC, Ghosh M, Huang L, Masubuchi N, Cave DR, Gröbel P. Evaluation of a PCR primer based on the isocitrate dehydrogenase gene for detection of *Helicobacter pylori* in feces. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38:3755-8.

106. Kaplan M, Tanoglu A, Duzenli T, Tozun AN. *Helicobacter pylori* treatment in Turkey: Current status and rational treatment options. *North Clin Istanbul*. 2020; 7:87-94.

107. Yang X, Li Y, Sun Y, Zhang M, Guo C, Mirza IA, et al. Vonoprazan: A Novel and Potent Alternative in the Treatment of Acid-Related Diseases. *Dig Dis Sci*. 2018; 63:302-11.

108. Suzuki S, Esaki M, Kusano C, Ikehara H, Gotoda T. Development of *Helicobacter pylori* treatment: How do we manage antimicrobial resistance? *World J Gastroenterol*. 2019; 25:1907-12.

109. Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its involvement for antibiotic resistance. *BioMed research international*. 2015; 2015.

110. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Ochiai K, Kamiya S. Impact of *Helicobacter pylori* biofilm formation on clarithromycin susceptibility and generation of resistance mutations. *PloS one*. 2013; 8:e73301.
111. Furuta T, Shirai N, Kodaira M, Sugimoto M, Nogaki A, Kuriyama S, et al. Pharmacogenomics-based tailored versus standard therapeutic regimen for eradication of *H. pylori*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 81:521-8.
112. Stokkers P, Van Aken B, Basoski N, Reitsma P, Tytgat G, Van Deventer S. Five genetic markers in the interleukin 1 family in relation to inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998; 43:33-9.
113. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Ikuma M, Hishida A, Ishizaki T. Influences of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine polymorphisms on eradication rates of clarithromycin-sensitive strains of *Helicobacter pylori* by triple therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 80:41-50.
114. Gao W, Cheng H, Hu F, Li J, Wang L, Yang G, et al. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China. *Helicobacter*. 2010; 15:460-6.
115. Marques AT, Vitor JM, Santos A, Oleastro M, Vale FF. Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: from phenotypic to genomic approaches. *Microbial Genomics*. 2020; 6.
116. Binh TT, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Trang TTH, Kwon DH, et al. Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014; 69:1796-803.
117. Hu Y, Zhu Y, Lu NH. Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:168.
118. Hirata K, Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Muraoka H, Saito Y, et al. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010; 25:S75-S9.
119. Smiley R, Bailey J, Sethuraman M, Posecion N, Showkat Ali M. Comparative proteomics analysis of sarcosine insoluble outer membrane proteins from clarithromycin resistant and sensitive strains of *Helicobacter pylori*. *Journal of Microbiology*. 2013; 51:612-8.
120. Klesiewicz K, Nowak P, Karczewska E, Skiba-Kurek I, Wojtas-Bonior I, Sito E, et al. PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains. *Acta Biochimica Polonica*. 2014; 61.
121. Li Y, Lv T, He C, Wang H, Cram DS, Zhou L, et al. Evaluation of multiplex ARMS-PCR for detection of *Helicobacter pylori* mutations conferring resistance to clarithromycin and levofloxacin. *Gut Pathogens*. 2020; 12:1-12.
122. Jehanne Q, Bénégat L, Mégraud F, Bessède E, Lehours P. Evaluation of the Allplex™ *H. pylori* and ClariR PCR Assay for *Helicobacter pylori* detection on gastric biopsies. *Helicobacter*. 2020; 25:e12702.
123. Redondo JJ, Keller PM, Zbinden R, Wagner K. A novel RT-PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mediated by mutations in the 23S rRNA gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018; 90:1-6.

124. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovách Z, et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:4512-8.
125. Atmaca S. Anaerob Bakterilerde Metronidazole Direnç ve nim Genleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi.* 2021; 51:197-202.
126. Mirzaei N, Poursina F, Moghim S, Rahimi E, Safaei HG. The mutation of the *rdxA* gene in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Advanced biomedical research.* 2014; 3.
127. Saranathan R, Levi MH, Wattam AR, Malek A, Asare E, Behin DS, et al. *Helicobacter pylori* Infections in the Bronx, New York: Surveying Antibiotic Susceptibility and Strain Lineage by Whole-Genome Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2020; 58.
128. de Marco BA, Natori JSH, Fanelli S, Tótolí EG, Salgado HRN. Characteristics, properties and analytical methods of amoxicillin: a review with green approach. *Critical reviews in analytical chemistry.* 2017; 47:267-77.
129. Qureshi NN, Gallaher B, Schiller NL. Evolution of amoxicillin resistance of *Helicobacter pylori* in vitro: characterization of resistance mechanisms. *Microbial drug resistance.* 2014; 20:509-16.
130. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: role of mutations at position 87 and 91 of GyrA on the level of resistance and identification of a resistance conferring mutation in GyrB. *Helicobacter.* 2012; 17:36-42.
131. Glocker E, Bogdan C, Kist M. Characterization of rifampicin-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2007; 59:874-9.
132. Nishizawa T, Suzuki H, Matsuzaki J, Muraoka H, Tsugawa H, Hirata K, et al. *Helicobacter pylori* resistance to rifabutin in the last 7 years. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:5374-5.
133. Gisbert JP. Rifabutin for the Treatment of *Helicobacter Pylori* Infection: A Review. *Pathogens.* 2020; 10.
134. Gerrits MM, de Zoete MR, Arents NL, Kuipers EJ, Kusters JG. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2002; 46:2996-3000.
135. Anoushiravani M, Falsafi T, Niknam V. Proton motive force-dependent efflux of tetracycline in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of medical microbiology.* 2009; 58:1309-13.
136. Smith SM, O'Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World journal of gastroenterology: WJG.* 2014; 20:9912.
137. Maçın S, Demir H, Özen H, Yüce A, Akyön Y. Determination of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns in pediatric gastroenterology patients: the Hacettepe experience. *The Turkish Journal of Pediatrics.* 2015; 57:254.
138. Best L, Haldane D, Keelan M, Taylor D, Thomson A, Loo V, et al. Multilaboratory comparison of proficiencies in susceptibility testing of *Helicobacter pylori* and correlation between agar dilution and E test methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2003; 47:3138-44.

139. "GA Generic Assay GmbH, *Helicobacter pylori* Antigen", <https://www.medipan.de/products/6012-helicobacter-pylori-antigen/>. Eriřim Tarihi= 10.05.2022
140. QIAamp DNA Mini Kiti, <https://www.qiagen.com/li/spotlight-pages/ias/automated-qpcr-workflow/detection/qiaamp-dna-mini-kit/>. Eriřim Tarihi= 12.05.2022
141. QIAamp DNA Mini Kiti, <https://www.qiagen.com/li/spotlight-pages/ias/automated-qpcr-workflow/detection/qiaamp-dna-mini-kit/>. Eriřim Tarihi= 12.05.2022
142. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
143. "SML Genetree, Ezplex HP-CLA real-time PCR" <https://www.smlgenetree.com/hp-cla>, Eriřim Tarihi: 10.06.2022
144. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. Nat Rev Microbiol. S21. 2010.
145. Sigma-Aldrich, Brain Heart Infusion Agar. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/70138>. Eriřim Tarihi= 12.05.2022
146. Oxoid *Helicobacter Pylori* Selective Supplement (Dent), <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SR0147E>, Eriřim Tarihi= 10.06.2022
147. Boey M, Liu Z, Teo J, Octavia S, Ahidjo BA, Chew KL. MIC Ranges of Quality Control Strain Mycobacterium peregrinum ATCC 700686 against Rifabutin, Eravacycline, Delafloxacin, Clofazimine, and Bedaquiline. J Clin Microbiol. 2020; 59.
148. Neogen, Üreli Sıvı Besiyeri <https://www.neogen.com/categories/microbiology/urea-agar-base-christensen/>.
149. BD, Mueller Hinton Fastidious Agar, 257491, <https://www.bd.com/resource.aspx?idx=35101>. Eriřim Tarihi= 10.06.2022
150. Oxoid CampyGen Kiti, CN0025, http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CN0025&org=154&c=uk&lang=en. Eriřim Tarihi= 10.06.2022
151. Sharndama HC, Mba IE. Helicobacter pylori: An up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms. Brazilian Journal of Microbiology. 2022;1-18.
152. Demirtaş L, Sayar İ, Akbaş EM, Özçiçek A, Özçiçek F, Timuroğlu A, et al. Endoskopi yapılan hastalarda Helicobacter pylori sıklığı ve yerleşim yerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı. Dicle Tıp Dergisi. 2014; 41:507-11.
153. Maçın S, Alp A, Şener B, Sökmensüer C, Orhan D, Özen H, et al. Comparison of culture, Real-time-PCR, ELISA, and histopathological examination methods for identification of Helicobacter pylori. Istanbul Medical Journal. 2018; 19.
154. Keşli R, Bilgin H, Ünlü Y, Güngör G. Helicobacter pylori İnfeksiyonu Tanısında Kültür, Hızlı Üreaz Testi ve Histopatolojinin Tanı Değerlerinin ve Çeşitli Antimikrobiyallerin Helicobacter pylori'ye Karşı İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi. Klimik Journal/Klimik Dergisi. 2022; 35.
155. Hussein RA, Al-Ouqaili MT, Majeed YH. Detection of clarithromycin resistance and 23SrRNA point mutations in clinical isolates of Helicobacter pylori isolates: Phenotypic and molecular methods. Saudi Journal of Biological Sciences. 2022; 29:513-20.

156. Sarp TZ, Dinç HÖ, Özbey D, Akkuş S, Aslan B, Cihan M, et al. Gastroduodenal yakınmaları olan hastaların dışkı örneklerinde *Helicobacter pylori* antijen pozitifliğinin retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2021; 51:61-9.
157. Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, et al. The Toronto consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Gastroenterology.* 2016; 151:51-69. e14.
158. Bénéjat L, Ducournau A, Lehours P, Mégraud F. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* diagnosis. The best tools available. *Helicobacter.* 2018; 23:e12512.
159. Wang Yh, Li Z, Wang L, Zhu-ge Ly, Zhao Rl, Wu S, et al. A systematic review and meta-analysis of genotypic methods for detecting antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2018; 23:e12467.
160. Delgado S, Suárez A, Otero L, Mayo B. Variation of microbiological and biochemical parameters in the faeces of two healthy people over a 15 day period. *European journal of nutrition.* 2004; 43:375-80.
161. van Tongeren SP, Slaets JP, Harmsen H, Welling GW. Fecal microbiota composition and frailty. *Applied and environmental microbiology.* 2005; 71:6438-42.
162. Puz S, Innerhofer A, Ramharter M, Haefner M, Hirschl AM, Kovách Z, et al. A novel noninvasive genotyping method of *Helicobacter pylori* using stool specimens. *Gastroenterology.* 2008; 135:1543-51.
163. Şen N, Yılmaz Ö, Şımşek İ, Küpelioğlu AA, Ellıdokuz H. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. *Helicobacter.* 2005; 10:353-9.
164. Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, Rüssmann H. Evaluation of the novel *Helicobacter pylori* ClariRes real-time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *H. pylori* in stool specimens from symptomatic children. *Journal of clinical microbiology.* 2007; 45:1718-22.
165. Scaletsky IC, Aranda KR, Garcia GT, Goncalves ME, Cardoso SR, Iriya K, et al. Application of real-time PCR stool assay for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in Brazilian children. *Helicobacter.* 2011; 16:311.
166. Gramley WA, Asghar A, Frierson Jr HF, Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *Journal of clinical microbiology.* 1999; 37:2236-40.
167. Vécsei A, Innerhofer A, Binder C, Gizci H, Hammer K, Bruckdorfer A, et al. Stool polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in children. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2010; 8:309-12.
168. Gong R-J, Xu C-X, Li H, Liu X-M. Polymerase chain reaction-based tests for detecting *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance in stool samples: a meta-analysis. *World Journal of Clinical Cases.* 2021; 9:133.
169. Xiong LJ, Tong Y, Wang Z, Mao M. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by stool PCR in children: a comprehensive review of literature. *Helicobacter.* 2013; 18:89-101.
170. Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of stool-PCR test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *World journal of gastroenterology: WJG.* 2009; 15:484.

8. EKLER

EK 1: ETİK KURUL ONAY BELGESİ



EK-2: ÖZGEÇMİŞ

NEŞE İNAL

E-posta: nese-inal-108@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıp Doktoru: 2011-2017

Uzmanlık: Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 2018-2023

ARAŞTIRMA İLGİ ALANLARI

Antibiyotik direncinin epidemiyolojisi

Helicobacter pylori virülans ve direnç mekanizmaları

Dientamoeba fragilis, *Blastocystis* sp., moleküler parazitoloji

YAYINLAR

1. İnal, N., Karagöz, A., Turhan, E., Hazirolan, G. (2021). First pediatric case of osteomyelitis caused by *Robinsoniella peoriensis*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 10.1556/030.2020.01122. Advance online publication. <https://doi.org/10.1556/030.2020.01122>
2. İnal, N., Hazirolan, G. (2021). A case of bacteremia caused by *Leptotrichia trevisanii* in pediatric patient with febrile neutropenia and review of literature. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 10.1556/030.2021.01358. <https://doi.org/10.1556/030.2021.01358>
3. İnal, N., Hazirolan, G. (2021). Misidentification of *Brucella melitensis* as *Octobactrum deafoenense* with MALDI-TOF MS: A report of three cases. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)*, S0213-005X(21)00069-0. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.03.004>
4. Ismayilov, R., Koray, N., İnal, N., Telli Dizman, G., Hazirolan, G., Tanrıöver, M. D., Akova, M. (2021). Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia abscessus* mimicking pulmonary thromboembolism in a patient with atypical anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. Atipik anti-glomerüler bazal membran glomerülonefriti tanılı hastada pulmoner

tromboemboliyi taklit eden *Nocardia abscessus* nedenli pulmoner nokardiyozis. *Tuberkuloz ve toraks*, 69(2), 237–241. <https://doi.org/10.5578/tt.20219813>

5. **İnal, N.**, Ünal Altıntop, T., Ergüven, S., Akyön Yılmaz, Y. (2022). Retrospective Results of Hacettepe University Faculty of Medicine Parasitology Laboratory Between 2014-2019. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nın 2014-2019 Yılları Arası Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 46(2), 114–118. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2022.84429>

KONGRELER

1. **Neşe İnal**, Alper Karagöz, Gülşen Hazirolan. Nötropenik Hastada *Leptotrichia Trevisanii* ile Gelişen Bakteriyemi Olgusu, 28 Ekim-1 Kasım 2019, 5.Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi (Poster Sunumu), İzmir, 2019.
2. Mervenur Demir, **Neşe İnal**, Gülşen Hazirolan, Deniz Gür. Hacettepe İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde Yatan Hastalarda Kümülatif Antibiyogram ile Antibiyotik Duyarlılığının İzlenmesi, 28 Ekim-1 Kasım, 5. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, İzmir, 2019.
3. **Neşe İnal**, Mervenur Demir, Gülşen Hazirolan, Deniz Gür. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Yoğun Bakım Ünitelerinde Kümülatif Antibiyogram ile Antibiyotik Duyarlılığının İzlenmesi, 28 Ekim-1 Kasım, 5. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi (Poster Sunumu), İzmir, 2019.
4. **Neşe İnal**, Sibel Ergüven, Yakut Akyön. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nın 2014-2019 Yılları Retrospektif Sonuçları, 25-27 Aralık 2020, 39. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Poster Sunumu), 2020, Online Kongre.
5. Hazal Gür, Aybüke Özyar, **Neşe İnal**, Orhan Kaya Köksalan, Zeynep Sarıbaş. 01359- Detection of drug susceptibility patterns of *Mycobacterium abscessus subspecies abscessus* clinical isolates, 32. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (ECCMID), Lizbon, 2022.

6. Serra Örsten, İpek Baysal, Neslihan Akdoğan, **Neşe İnal**, Ecem Bostan, Yakut Akyön: Kronik Spontan Ürtikerli Hastalarda *Blastocystis sp.* Varlığının MikroRNA Ekspresyon Profiline Etkisi, 16-20 Kasım 2022, XL. Uluslararası TMC Kongresi (Sözlü Sunum), Belek, Antalya, 2022
7. **Neşe İnal**, Berke Kurumanastırlı, Tutku Taşkınoğlu, Alev Çetin Duran, Alper Togay, Fatma Mutlu Sarıgüzel, Nilgün Kaşifoğlu, Mehmet Soylu, Yavuz Doğan, Ebru Us, Zeynep Sarıbaş, Neşe Kaklıkkaya, Burçin Şener, Anti-Nükleer Antikor (ANA) İndirekt İmmünfloresan (IIF) Testinde Saptanan Halkalar ve Çubuklar (“*Rings and Rods*”) Paterninin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi, 16-20 Kasım 2022, XL. Uluslararası TMC Kongresi (Sözlü Sunum), Belek, Antalya, 2022
8. Dolunay Gülmez, **Neşe İnal**, Beyzanur Kaşaltı, Gülşen Hazırolan, Sevtap Arıkan Akdağlı, Identification of rare moulds by MALDI-TOF MS using three different extraction methods, 6-8 Ekim 2022, 2. Balkan Conference on Medical Mycology and Mycotoxicology (Oral Presentation), Thessaloniki, Greece, 2022
9. Serra Örsten, İpek Baysal, Neslihan Akdoğan, **Neşe İnal**, Ecem Bostan, Yakut Akyön, Determination of the Effect of *Blastocystis* Presence on MicroRNA expression Profile in Healthy Individuals-Evaluation of Preliminary Data, 21-22 Mayıs 2021, International Marmara Science Congress, Kocaeli, 2021