

T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKUMANTASYON MERKEZİ

**HELİCOBACTER PYLORİ ANTİMİKROBİYAL  
DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİNDE  
E-TEST YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Alpay AZAP**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tuncay Hasip SÖZEN**

51971

**Ankara-2000**

## **TEŞEKKÜR**

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile yetişmemde büyük katkıları olan, başta Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Emin Tekeli olmak üzere kliniğimizin tüm öğretim üyelerine,

Tezimin planlanmasından sonuçlanmasına kadar her aşamada yol gösteren tez danışmanım Prof.Dr. Tuncay Hasip Sözen'e,

Bakterilerin toplanmasında yardımcılarını esirgemeyen, laboratuar olanaklarından faydalananmamı sağlayan Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Ali Özden'e ve laboratuar çalışanı Ömer Koç'a,

Çalışmalarım sırasında büyük desteklerini gördüğüm, klinikte birlikte çalıştığım araştırma görevlisi ve laborant arkadaşlarına teşekkürlerimi sunarım.

## **İÇİNDEKİLER**

GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
BULGULAR .....	37
TARTIŞMA .....	40
ÖZET .....	48
KAYNAKLAR.....	49

## GİRİŞ

Peptik ülser (gastrik ve duodenal), gastrit, gastrik lenfoma ve gastrik adenokarsinom patogenezinde rol oynayan gram negatif bir basil olan *Helicobacter pylori*, son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan mikroorganizmalardan biridir(1).

*H. pylori* infeksiyonu insanlar arasında en yaygın görülen kronik bakteriyel infeksiyondur. Dünya nüfusunun %60'ının bu bakteri ile kolonize olduğu tahmin edilmektedir(1,2). Yaygınlığı ve sebep olduğu hastalıkların ciddiyeti düşünüldüğünde *H. pylori*'nin bir halk sağlığı sorunu olduğu söylenebilir.

Diğer tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi *H. pylori*'de de antibiyotiklere karşı gelişen direnç, tedavi sorunlarına neden olmaktadır. *H.pylori* infeksiyonunun tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılık, ırklar ve ülkeler arasında önemli değişiklikler göstermektedir. Örneğin metronidazole direnç oranı, gelişmiş ülkelerde %25 civarında iken az gelişmiş ülkelerde %90'lara kadar ulaşabilmektedir(1). Bu nedenle antibiyotik duyarlılığının bilinmesi etkin tedavi rejimlerinin belirlenmesinde önem taşımaktadır.

*H. pylori*'nin uzun sürede ve zor üreyebilen bir bakteri olması, antibiyotik duyarlılığının belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu sorunu aşmak için, kolay uygulanabilir ve kantitatif bir yöntem olan epsilometre testi (E-test) yöntemi son yıllarda giderek daha çok kullanılmaktadır.

Çalışmamızın amacı, *H. pylori* antibiyotik duyarlılığının tespitinde E-test yönteminin etkinliğinin belirlenmesidir. Bu amaçla E-test yöntemi, antimikrobial duyarlılık tespitinde standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

## **GENEL BİLGİLER**

### **TARİHÇE:**

*Campylobacter* türleri ve benzeri bakteriler belki de insanlık tarihi kadar eski mikroorganizmalar oldukları halde, insan organizmasından izolasyonları ve insanlarda yaptıkları hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar henüz yeni sayılabilir. 1980'li yıllarda fiber optik endoskopinin kullanıma girmesiyle ve bununla gastrik mukozadan biyopsi örneklerinin alınarak incelenmesinin mümkün hale gelmesiyle mide hastalıklarının etiyolojisine yönelik yapılan çalışmalarda bir patlama yaşanmıştır. Nitekim bugün üzerinde en fazla çalışılan mikrobik ajanlar arasında *Helicobacter pylori* ilk sıralarda gelmektedir(1,2).

Bugün *Campylobacter jejuni* adı altında incelenmekte olan bakteri *Vibrio jejuni* adıyla, ilk defa 1931 yılında sığırlarda kış dizanterisi etkeni olarak Jones ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir(3). Bundan 26 yıl sonra, 1957'de, King, akut dizanteri geçirmekte olan çocuk hastaların kanlarında mikroaerofilik, hareketli, kıvrımlı mikroorganizmalar izole etmiş ve bunları *Vibrio fetus*'a çok benzeyen özelliklerinden dolayı "vibrio benzerleri" olarak isimlendirmiştir(4). King dizanterili çocukların kanlarından izole edilen bu bakterilerin Jones'un 1931'de *V. jejuni* olarak tarif ettiği bakterilerle akraba olabileceğini ve daha önceden nedeni bilinmemeyen çocukluk çağrı diyarelerinin önemli bir kısmının etkeni olabileceğini belirtmiştir. Ancak, bu kehanete varan değerlendirmenin kabul görmesi için aradan 15 yıl geçmesi gerekmıştır. 1972 yılında Dekeyser ve arkadaşları akut gastroenteritli hastaların dışkılarından, barsak florası bakterilerinin önemli kısmını tutan fakat kıvrımlı kokoidlerin geçmesine izin veren bir süzme tekniğinin yardımıyla "vibrio benzerleri"ni

izole etmeyi başarmışlardır(5). Kısa süre içinde, gastroenteritli hastalarda benzer mikroorganizmaların üretildiğine dair dünyanın her tarafından raporlar bildirilmiştir(3,6).

Önceleri *Campylobacter pylori* olarak adlandırılan *Helicobacter pylori*'nin keşfi ise çok daha karmaşıktır.

1893 yılında Bizzozera bir çok hayvanın (kedi, köpek) midesinde spiral mikroorganizmaların bulunduğuunu bildirmiştir(7). Bizzozera'nın bu bulgusu 1896'da Saloman tarafından kedi ve köpek mide örneklerinde yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. İnsan midesinde螺旋 bakterilerin olduğunu gösteren kişi Krienitz olmuştur. 1906'da Krienitz mide kanserli bir hastanın midesinden "spirokete benzer bakteriler" izole etmiştir(8). Doenges 1938 yılında yaptığı bir çalışmada postmortem incelediği 242 insan midesinin %43'ünde spiral mikroorganizmalar saptamıştır. Maymunlarda da benzer mikroorganizmaların bulunduğuunu bildirmiştir(7). Freedberg ve Barron 1940'da mide ülseri veya mide kanseri nedeniyle rezeke edilen 35 mide örneğinin 13'ünde spiral mikroorganizmalar tesbit etmişlerdir(9). Bu arada Lucky ve Bliss 1924'te hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarla kedi ve diğer pek çok hayvanın midesinde üreazın varolduğunu keşfetmişler, Fitzgerald ve Murphy ise 1950 yılında peptik ülser hastalığı ile mukoza yüzeyindeki üreaz aktivitesi arasında ilişki olduğunu gastrektomi ile alınan parçalar üzerinde göstermişlerdir. Ancak Fitzgerald ve Murphy, üreazın meydana getirdiği amonyum ile mide mukozasını aside karşı koruduğunu düşünmüştür hatta peptik ülser hastalarını üre ile tedavi etmişlerdir. Böylelikle üreazın kaynağına ilişkin belirsizlik sürmüştür(7). 1959 yılında Liebre ve Le fevre üreazın bakteriyel kaynaklı olduğunu ileri sürmüşler ve tetrasiklin tedavisinin ardından midedeki üreaz aktivitesinin kaybolduğunu göstermişlerdir(5). Ancak bu çalışmalar çoğu

bilim adamlarınca göz ardı edilmiştir. 1960-1980 yılları arasında pek çok klinisyen ve mikrobiyolog, mide asidi nedeniyle midenin steril olduğunu, midenin bakteriyel kültürlerinin negatif olduğunu savunmuştur. Midenin steril olmadığını ilk gösterenler Avustralya’lı bir patolog olan Warren ile yine Avustralya’lı bir gastroenterolog olan Marshall olmuşlardır(10). Patoloji örneklerinde midede gördüğü spiral bakterilerin mide hastalıkları ile ilişkili olabileceğini düşünen Warren, Marshall ile birlikte biyopsi örneklerinde aktif gastritis saptanan hastalar üzerinde çalışmışlar ve aynı hastanede çalışan mikrobiyologların da yardımı ile bu hastalardan aldıkları biyopsi örneklerini *Campylobacter* besi yeri ve seçici olmayan besi yerlerine ekmişlerdir. Besi yerlerini 48 saat inkübe ettiğlerinden ilk 34 örnekte bakteri ürememişken, 1982 yılında paskalya tatilinin hemen öncesinde ekildiği için 5 gün etüvde kalan 35. örnekte *Campylobacter* cinsine benzer çok miktarda bakteri üremiştir. Böylece Koch kurallarının ikincisi, “etken hasta organizmadan izole edilmeli ve organizma dışında üretilmeli” koşulu gerçekleşmiş olur. Ancak izole edilen bu bakterinin mide hastalıklarının etkeni olduğunu ispatlamak için üçüncü (“üretilen mikroorganizma duyarlı canlıya verildiğinde hastalık oluşturmalı”) ve dördüncü (“deneysel olarak hastalandırılan canlıdan yeniden izole edilebilmeli”) Koch kurallarının da gerçekleştirilmesi gereklidir. Üçüncü kuralın gerçekleştirilmesi için yapılan hayvan deneyleri sonuç vermeyince Marshall bakteriyi kendi üzerinde denemeye karar verir. Endoskopi ile mide mukozasının sağlıklı olduğu gözlemlendikten sonra peptik ülserli hastanın lezyonundan ürettiği bakteri kültüründen hazırlanan bir suspansyonu içer. Bir hafta sonra akut gastrit semptomları gelişen Marshall’ın ikinci hafta sonunda yapılan endoskopik inceleme ve alınan biyopsi örneğinde mukus altında yerleşmiş kıvrımlı bakteriler ve

inflamasyon gözlenir. Bu çalışma sayesinde mide hastalıklarının etiyolojisinde mikroorganizmaların rolü olduğu pek çok araştırmacı tarafından kabul edilir hale gelmiştir(11). 1984'te Marshall tarafından *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırılan mikroorganizma, 1987'de *Campylobacter pylori*, 1989'da ise *Helicobacter pylori* adını almıştır(3).

### MİKROBİYOLOJİ:

*Campylobacter* ve akraba bakterilerin sınıflandırılması, Vandamme ve arkadaşlarının 1990'lı yılların başında yaptıkları çalışmalarla büyük ölçüde bugünkü haline ulaşmıştır; İmmün tiplendirme, DNA-rRNA hibridizasyon ve 16s ribozomal RNA zincir analizleri gibi yöntemler kullanarak, bütün *Campylobacter* ve akraba türlerin “rRNA süperailesi VI” olarak adlandırdıkları filogenetik gruba dahil olduğunu göstermişlerdir(12,13). Bugün için bu süperaile içinde *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* ve *Flexispira* olmak üzere beş cins yer almaktadır. Bu akraba cinslerin özellikleri ve ayrımları tablo-1'de özetlenmiştir.

**Tablo-1: VI. rRNA Süperailesi'ne dahil olan cinsler ve özellikleri. (kaynak 3)**

Cins	Nitrat redüksi yonu	%0.5 glisinde üreme	Üre Hidroliz	Üreme Isısı			Hücre Morfolojisi	Flagella kılıfı
				15°C	30 °C	42 °C		
<i>Arcobacter</i>	+	?	D	+	+	-	Kıvrımlı, spiral	Yok
<i>Campylobacter</i>	+	D	-	-	+	D	Kıvrımlı, spiral	Yok
<i>Wolinella</i>	+	-	-	-	-	Z	Spiral	Yok
<i>Helicobacter</i>	D	+	D	-	D	D	Kıvrımlı, spiral	Var
<i>Flexispira</i>	-	+	+	-	-	+	Düz, fuziform	Var

+: Suşların %90 ve fazlası pozitif, -: Suşların %90 ve fazlası negatif, D: Suşların

%11-89'u pozitif, Z: Zayıf reaksiyon, ?: Bu konuda yeterli veri yok.

Thompson ve arkadaşlarının 16S rRNA zincirleri üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda, VI. rRNA Süperailesi'ne dahil olan türler üç farklı rRNA grubu içinde toplanmışlardır(14):

**rRNA Grup I:** Gerçek *Campylobacter* türlerini içerir; *C. fetus*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyoilei*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum*, *C. upsaliensis* ve önceden yanlış adlandırılmış bazı *Campylobacter* türleri (*Bacteroides ureolyticus*)

**rRNA Grup II:** *Arcobacter* türlerini içerir; *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis* ve *A. skirrowii*.

**rRNA Grup III:** *Flexispira*, *Wolinella* ve *Helicobacter* türlerini içerir; *H. pylori*, *H. acinonyx*, *H. bilis*, *H. bizzozeronii*, *H. canis*, *H. cinaedi*, *H. felis*, *H. fennelliae*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. mustelae*, *H. nemestrinae*, *H. pometensis*, *H. pullorum*.

rRNA Grup III aslında dört cins (*Helicobacter*, *Flexispira*, *Wolinella* ve *Gastrospirillum*) ve bir adet henüz adı konulmamış *Campylobacter* benzeri tür (*Campylobacter* like organism:CLO-3) içermektedir. Bu gruptaki bakterilerin özellikleri ayrıntılı olarak incelenecək olursa:

#### *Flexispira rappini:*

Genetik olarak *H. pylori*'nin yakın akrabası olan bu mikroorganizma üreaz pozitiftir(13). Morfolojik olarak düz, periplazmik lifler nedeniyle buruşuk yüzeyli ve fuziform yapıdadır. İki ucunda çok sayıda flagella taşır. *H.pylori*'nin aksine, alkanen fosfataz üretmez, 30°C'de üremeyip 43°C'de ürer ve metronidazole dirençlidir(15). *Campylobacter* türlerinden katalaz

negatif olması, nitratı redükte etmemesi ve %1'lik glisinde üreyememesi ile ayrılır(16). *Helicobacter* cinsi içine alınması halen tartışılmakta olan *Flexispira rappini*, insan ve köpek dışkısından ve düşük olmuş koyun fetüs örneklerinden izole edilmiştir(16,17). İnsandan izole edilmiş olan suşların iki tanesi, gastroenterit semptomları olan iki hastadan izole edilmiştir(17).

#### *Gastrospirillum hominis:*

Henüz kültürü yapılamamış olan *Gastrospirillum hominis* insan mide mukozasında bulunan, *H. pylori*'ye göre daha geniş olan, daha sıkı kıvrımları bulunan bir bakteridir. Helikal yapıda, 3,5-7,5 mikrometre uzunlukta ve 0,9 mikrometre genişlikte ve 6-8 kıvrımlıdır. Her iki ucta sayısı 12'ye varan kılıflı flagellaları vardır(18). McNulty ve arkadaşlarında *G. hominis* adı verilen bakterinin sonradan, daha önce Alman patolog Heilmann tarafından geniş bir hasta serisinde gösterilen ve *Helicobacter heilmannii* adıyla bilinen bakteri olduğu anlaşılmıştır(18,19,20). Bugün için daha çok *G. hominis* adı kullanılmakla birlikte bu ad da henüz Uluslararası Sistemik Bakteriyoloji Komitesi tarafından resmen kabul edilmiş değildir(3). Bakterinin evcil hayvanlarda çok yaygın olarak bulunuyor olması insanlarda neden olduğu kronik gastrit hastalığının bir zoonoz olduğunu düşündürmektedir (21).

#### *Wolinella succinogenes:*

Anaerop, katalaz negatif ve hidrojen sülfid ( $H_2S$ ) pozitif özelliklere sahip *Wolinella* cinsinin prototipidir. *W. succinogenes* oksidaz pozitif olup, normal atmosfer koşullarında olmasa bile mikroaerofilik ortamda (%2  $O_2$ ) son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanabilir(14). *W. succinogenes*' in insanda hastalık yaptığı tesbit edilememiştir(3).

*Campylobacter* benzeri mikroorganizma (*Campylobacter* like organism)

CLO-3:

Fennell ve arkadaşları tarafından 1984'te homoseksüel bir erkekten yapılan rektal sürüntü örneğinden izole edilmiştir(22). 42 °C'de üreyebilmesi, sefalonine dirençli olması ve nitrati redükte edememesi ile diğer *Campylobacter* benzeri mikroorganizmalardan ayrılır.

*Helicobacter* türleri:

Tüm *Helicobacter* türleri içinde, üzerinde en fazla çalışılan tür *H. pylori*'dir(1). Bu çalışmanın da konusu olduğundan diğer türlere kısaca degeinildikten sonra *H. pylori* üzerinde daha ayrıntılı durulacaktır.

Tıbbi Açıdan Önem Gösteren Türler: *H. pylori* dışında pek çok *Helicobacter* türü insanlardan izole edilmiştir. Bunların da bir çoğu (*H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *Helicobacter* türü *Mainz* suşu, *H. pullorum*) insanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır.

***H. cinaedi:*** İlk olarak *Campylobacter* benzeri organizma-1 (CLO-1), sonradan *Campylobacter cinaedi* olarak adlandırılmış olan *H. cinaedi* sadece 37°C'de ürer, sefalonine (30µg disk) orta düzeyde duyarlıdır, nitrati nitrite indirger. Doğada bilinen tek rezervuarı hamsterlerdir(23). *H. cinaedi* semptomatik ve asemptomatik homoseksüel erkeklerden alınan rektal sürüntü örneklerinden izole edilmiştir(22,24). Tüberküloz infeksiyonu olan homoseksüel erkeklerde, AIDS hastalarında, AIDS olmayıp HIV pozitif olanlarda bakteriyemiye neden olduğu gösterilmiştir(25,26,27). *H. cinaedi* infeksiyonları homoseksüel veya biseksüel erkeklerle sınırlı olmayıp bu erkeklerle temas öyküsü olmayan kadınlardan ve çocuklardan izole edilebilmektedir(28). Literatürde yenidogan menenjiti yaptığına dair bir vaka bildirilmiştir(29). *H. cinaedi* insanlarda genellikle ateş, bakteriyemi,

tekrarlayan selülit, artrit, lökositoz ve trombositopeni ile karakterli hastalık tablolarına neden olmaktadır. Tedavisinde penisilin, tetrasiklinler ve aminoglikozit antibiyotiklerin sefalosporinler, makrolidler ve kinolonlardan daha etkili olduğu bildirilmektedir(30).

***H. fennelliae*:** İlk olarak *Campylobacter* benzeri organizma-2 (CLO-2), sonradan *Campylobacter fennelliae* olarak adlandırılmış olan *H.fennelliae* sefalotine duyarlıdır, nitrati nitrite indirmeyecektir. Kültürlerinde çamaşır suyuna benzer özel kokusu tipiktir. Tıpkı *H. cinaedi* gibi semptomatik veya asemptomatik homoseksüel erkeklerden alınan rektal sürüntü örneklerinden izole edilmiştir. İtravenöz ilaç bağımlısı, HIV pozitif biseksüel bir erkek hastanın kan kültüründen izole edildiği bildirilmiştir (26).

İnsan dışı canlılardan izole edilen *Helicobacter* türleri de bildirilmektedir. *H. acinonyx*, *H. bilis*, *H. bizzozeronii*, *H. canis*, *H. felis*, *H. hepaticus*, *Helicobacter* türü Mainz suyu, *H. muridarum*, *H. mustelae*, *H. nemestrinae* ve *H. pullorum* bu türlerdir. Coğunlukla hayvanların mide ve alt gastrointestinal sistemlerinde bulunan bu bakteriler eğer midede yerleşmişlerse büyük olasılıkla gastrit yapmaktadır. Adı geçen türlerin bir kısmının insanlardan da izole edilebildiği bildirilmektedir(3). *Helicobacter* türleri, bunlarla ilişkili canlılar ve izolasyon yerleri tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2: Helicobacter türleri ve izolasyon yerleri. (Kaynak 3)

Tür	Konakçı	İzolasyon Yeri
<i>H. acinonyx</i>	Çita	Mide mukozası
<i>H. bilis</i>	Fare	Safra, karaciğer, bağırsak
<i>H. bizzozeronii</i>	Köpek	Mide mukozası
<i>H. canis</i>	Köpek, insan	Gaita
<i>H. cinaedi</i>	İnsan, hamster	Kan, rektal sürüntü (insan), bağırsak (hamster)
<i>H. felis</i>	Köpek, kedi	Mide mukozası
<i>H. fennelliae</i>	İnsan	Kan, rektal sürüntü
<i>H. hepaticus</i>	Fare	Karaciğer, bağırsak
<i>Mainz suşu</i>	İnsan	Diz eklemi, kan
<i>H. muridarum</i>	Sıçan, fare	Bağırsak
<i>H. mustelae</i>	Yaban gelinciği	Mide mukozası
<i>H. nemestrinae</i>	Makak maymunu	Mide mukozası
<i>H. pometensis</i>	Vahşi kuşlar, domuz	Gaita
<i>H. pullorum</i>	Tavuk, insan	Bağırsak, karaciğer (tavuk), gaita (insan)
<i>H. pylori</i>	İnsan, maymun, kedi	Mide mukozası
<i>Flexispira rappini</i>	Koyun, köpek, insan	Karaciğer (koyun), mide (köpek), gaita (insan)
<i>Gastrospirillum hominis</i>	Çita, insan	Mide mukozası
<i>CLO-3</i>	İnsan	Rektal sürüntü

### *Helicobacter pylori*

Önceleri *Campylobacter pyloridis*, daha sonra *Campylobacter pylori* olarak adlandırılan *Helicobacter pylori*'nin artık *Campylobacter* cinsine dahil olmadığı konusunda şüphe kalmamıştır. *H. pylori*'yi kampilobakterlerden ayıran özellikleri; çok sayıda ve kılıflı flagellalarının olması, üreyi güçlü bir şekilde hidrolize edebilmesi ve yağ asidi profilidir (14:0 asit oranı yüksektir, 16:0 asit oranı düşüktür, ve 3-OH-18:0 asit bulundurur)(15). Bu nedenlerden dolayı Goodwin ve arkadaşlarının önerisiyle, *C. pylori* 1989'da yeni bir cins olan *Helicobacter* cinsine transfer edilmiştir(15).

#### **Morfolojik Özellikleri ve Patogenez:**

*H. pylori* 0,5-1,0 $\mu$ m eninde, 2,5-4,0 $\mu$ m boyunda, küçük, mikroaerofilik, kıvrımlı, gram negatif basildir. Çok sayıda, polar, kılıflı kirpikleri sayesinde son derece hareketli bir bakteridir. Sayısı 4-6 olan kirpiklerin her biri 2,5x30 $\mu$ m boyutlarındadır ve tipik çift katlı membran yapısında bir örtü ile kaplıdır. *Helicobacter* cinsini *Campylobacter*'den ayıran önemli bir yapı olan bu örtü uçlarda karakteristik bir şişkinlik (terminal bulp) oluşturmaktadır(3,8,10,15,31,32).

Kirpikler bakterinin virulansında önemli rol oynarlar. Mikroorganizma spiral şekli yanında, kirpiklerin sağladığı son derece güçlü hareket yeteneği sayesinde mukus tabakasını kolayca geçebildiği gibi, mukus içinde hızlı hareket ederek en uygun yaşam koşullarının bulunduğu bölgelere ulaşabilmektedir. Kirpikler ve bir takım düzenleyici genler sayesinde *H. pylori*, toksik ortamlardan uzaklaşma ve olumlu uyararlara doğru hareket etme (kemotaksis) yeteneği kazanmaktadır. Nitekim yapılan hayvan deneylerinde kirpikten yoksun hale getirilmiş mutant *H. pylori* suşlarının kolonize olamadıkları gösterilmiştir(33,34,35)

*H. pylori*, kanlı agarda yapılan primer kültürlerinde, 37° C 'de mikroaerofil

(%5O<sub>2</sub>, %10CO<sub>2</sub>, %85N<sub>2</sub>) ve yüksek nem (%98) içeren koşullarda, 3-5 günlük inkübasyonda, yuvarlak, 1-2 mm çapında kubbe şeklinde, yüzeyi parlak, şeffaf görünümde, hafif hemolitik koloniler yapmaktadır(36).

Taze kültürlerde spiral veya kıvrımlı olan, beklemiş kültürlerinde yuvarlak (kokoid) şekele giren *H. pylori* tipik gram negatif bakteri hücre duvarı yapısına sahiptir(8,10,15,37). Ancak gram negatif bakterilere kıyasla hücre duvarı lipopolisakkaritlerinin (LPS) antijenik özelliği son derece düşüktür. LPS, diğer gram negatif bakterilere kıyasla 1000 kat daha az toksik olduğundan bakterinin organizmadan temizlenmesini sağlamaya yetecek düzeyde bir immün yanıt oluşturamamaktadır(33). Bazı suşlarda LPS'lerin O spesifik yan zincirleri, yapı olarak insan Lewis kan grubu抗原leri ve O grubu insan eritrositlerindeki H-1抗原i ile benzerlik göstermektedir. Bu özellik sayesinde gastrik mukus sekrete eden hücrelerde selektif kolonizasyon meydana gelmektedir. Lewis抗原i azaldıkça bakterinin mukoza hücrelerine yapışması zorlaşır ve azalır. Bu durum O kan grubuna sahip kişilerde peptik ülserlerin daha fazla görülmemesini açıklamaktadır(31,33,38,39).

Mukus bariyerini aşarak mide mukoza hücrelerine ulaşan bakterinin kolonize olabilmesi için hücrelere yapışması gereklidir. Aktif bir olay olan yapışmadan *H. pylori*'ye ait bazı proteinlerin sorumlu oldukları düşünülmektedir. Hemaglutinin, intimin benzeri protein, Lewis kan grubu抗原i bağlayan adezinler, adezin lipoprotein ve ısı şok proteinleri en çok üzerinde durulanlar arasındadır(33,39,40,41).

*H. pylori*'nin en göze çarpan kimyasal özelliği kuvvetli ve bol miktarda üreaz üretmesidir. Üreaz aynı zamanda, en önce tanımlanmış, en belirgin ve üzerinde en fazla çalışılmış virülans faktörüdür. Doğada az rastlanan nikel metalloenzimlerinden biri olan üreaz, toplam hücre proteinlerinin

%5'ini oluşturacak kadar fazla üretilmektedir(33). Aktive olabilmesi için iki değerlikli nikel ( $Ni^{++}$ ) katyonuna ihtiyaç duyar(42). *H. pylori*'nin ürettiği üreaz, her ikisi de aktivite için gerekli olan 61 ve 28kD'luk iki alt birimden (ÜreA ve ÜreB) oluşur. Üreaz üretiminin kontrolü en az sekiz genin rol aldığı karmaşık bir işlemidir(31,42). Klinik izolatların tamamı üreaz pozitifken, laboratuvara üreaz negatif suşlar türetilmişdir(43,44). Bu suşlarla yapılan hayvan deneylerinde, gastrik asit sekresyonu baskılandığında bile kolonize olamadıkları görülmüştür(43). Üre hidrolizi sonucu açığa çıkan amonyak, asidi nötralize ederek bakterinin etrafında pH'sı düşük bir mikroçevre yaratır ve bakteriyi korur. Amonyak sadece bakteriyi midenin güçlü asidik ortamından korumakla kalmayıp, gastrik mukoza hücreleri üzerinde doğrudan toksik etkisiyle, mukoza hücrelerinin gelişimini mitozun S fazında duraklatarak hastalık gelişiminde rol oynar(33,41). Amonyak aynı zamanda, adezyonda rol alan bir takım proteinlerin sentezi için gerekli nitrojen kaynağıdır(41). Amonyak, mukus tabakasından hidrojen iyonu geri difüzyonunu da bozmaktadır(33).

Patogenezde rol alan diğer önemli enzimler lipaz, katalaz ve proteazdır. Lipaz ve proteaz gastrik mucusu parçalamakta ve mukus tabakasının koruyucu etkisini azaltmaktadır(41). *H. pylori*'nin katalaz enzimi diğer bakteriyel katalazlardan 3-10 kat daha yüksek aktiviteye sahip olup bakteriyi toksik oksijen radikallerinin etkisinden korumaktadır(8).

*H. pylori*'nin gen diziliminin 1997 yılında belirlenmesiyle birlikte, bu bakteriyle ilgili çalışmalarında yeni bir çığır açılmıştır(45). Örneğin bu gelişme sayesinde; virülanssta rol oynayan önemli genetik özellikler ortaya çıkarılmış, *H. pylori*'nin az sayıda, iki bileşenli düzenleyici proteinlerinin bulunduğu ve belli bakteriyel enzimlerin ORF (open reading frame)'lerinde frameshiftlerin geliştiği gösterilmiş, bu yolla bakterinin fenotipi

belirlemede mutasyonları kullanarak belli gastrik koşullar için en uygun bakteriyel metabolizmayı bulduğu öğrenilmiştir(31).

*H. pylori* oksidaz ve katalaz pozitifliği gibi biyokimyasal özellikler açısından her ne kadar son derece homojen bir populasyonu temsil ediyorsa da genetik düzeyde ciddi varyasyonlar izlenebilmektedir(46). Bu varyasyonları saptayan yöntemlerle yapılan çalışmalarda, insanların spontan olarak birden fazla *H. pylori* suşu ile kolonize olabileceği anlaşılmıştır(47).

*H. pylori* suşları arasındaki en önemli ayırm noktası, sitotoksin ilişkili gen A (*cagA*) kodlayan 40 kilobazlık kromozomal bölgenin, *cag* patojenite adasının, bulunup bulunmamasıdır. Bu gen bölgesi sadece *cagA* genini değil, patojen suşlarca oluşturulan inflamasyonun artması için gerekli diğer genleri de içermektedir. *CagA* geni taşıyan suşlar, taşımayanlara göre daha virulandırlar ve daha ciddi hastalıklara, örneğin gastrik kanser ve peptik ülsere, neden olmaktadır(31,33,41). Başlangıçta, bundan hareketle *cagA* geninin ve bu genin kodladığı *cagA* proteininin hastalıklara neden olduğu düşünülmüşse de *cagA*'nın korunup patojenite adasındaki diğer genlerin tahrip edildiği mutant suşlarla yapılan çalışmalarda ciddi hastalık gelişmediğinin gösterilmesi ile bu görüşten uzaklaşılmıştır(48,49). Bugün için *cagA* proteini bir sitotoksinden çok sitotoksine yardımcı toksin olarak kabul edilmekte ve pratik uygulamada *cag* patojenite adasının varlığının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır(41).

Bir diğer heterojen gen bölgesi vakuol yapıcı sitotoksin geni (*vacA*)'dır. *VacA* geni, ökaryot hücreleri ile etkileşime girerek vakuoller oluşturan vakuol yapıcı sitotoksini kodlayan gen bölgesidir. *H. pylori* suşlarının tamamı *VacA* geni içeriği halde genomik farklılıklardan dolayı tox- veya tip2 denilen bazı suşlar toksini üretmezken, tip1 veya tox+ olarak

tanımlanan suşlar bol miktarda enzim üretebilmektedirler. *VacA*, *H. pylori*'nin tanımlanan ilk toksinidir ve peptik ülser gelişiminde önemli rol oynamaktadır(31,33,41,50).

*H. pylori*'nin patogenezde rol oynayan bir diğer özelliği, 100 kilodalton ağırlığında bir büyümeye önleyici faktör (growth inhibitory factor-GIF)'e sahip olmasıdır. Bu proteinin gastrik epitelyal hücrelerin proliferasyonunu durdurduğu gösterilmiştir(41).

*H. pylori*'nin mide mukozasında kolonize olması mide fizyolojisinde de bir takım değişikliklere neden olur. Bakterinin yapışmasıyla uyarılan mide epitel hücrelerinden salınan interlökin-8 (IL-8), nötrofil infiltrasyonunun yanısıra lipopolisakkarit抗原lerle birlikte gastrin salgılayan G hücrelerinden gastrin salınımını artırıp D hücrelerinden gastrin inhibitörü olan somatostatin salınımını azaltarak hipergastrinemiye, dolayısıyla hiperasiditeye neden olur. Bir grup insanda kolonizasyon bu şekilde hiperasiditeye neden olurken, bir grup insanda ise tam tersine gastrik asit salgısında çok az bir artış, multifokal atrofik gastrite ilerleyebilen pangastrit ve bunun sonucunda asit salgısında azalma (hipoasidite) gelişmektedir. Hiperasidite gelişen grupta, asitin etkisiyle duodenumda gastrik metaplazi gelişir. Metaplazik hücrelerin *H. pylori* ile infiltrasyonu ve duodenal ülser oluşumu sıktır. Buna karşılık hipoasidite gelişen grupta ise mide ülseri ve adenokarsinom oluşumu sıktır(50,51).

*Helicobacter pylori* infeksiyonunun klinik gidişi ve ülseratif lezyonların oluşumu büyük ölçüde midedeki immüncevabın, bir başka ifadeyle sitokinlerin kontrolündedir. *H. pylori* hücre proteinlerinin hemen hepsi mide epitelinde nötrofiller, makrofaj ve lenfositlerde çeşitli sitokinlerin üretimini uyarırlar. Bu uyarı sonucu salınan IL-1, IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-alfa, TNF-gamma, granülosit makrofaj koloni

stimule edici faktör, İnterferon-gamma gibi sitokinler ve intersellüler adezyon molekülleri'nin rol aldığı ve her konakta farklı gelişebilen karmaşık olaylar dizisi klinik gidişi belirlemektedir(31,50,51).

*H. pylori* infeksiyonu patogenezi için sonuç olarak söylenebilecek şey; mide histolojik yapısında ve fizyolojisinde değişikliğe yol açan ve bugüne kadar belirlenmiş bakteriye ait virülans faktörlerinden hiç birisinin tek başına, infeksiyon nedeniyle midede gelişen fizyopatolojik olayları açıklamadığıdır. İnsanların önemli bir kısmının *H. pylori* ile infekte olmasına karşın çok az bir bölümünde gastroduodenal hastalıkların gelişmesi, asit salgısı üzerine olan çelişkili etkilere benzer başka çelişk durumlarının varlığına ilişkin bulgular, gastrik patolojilerin gelişiminde bakteriye ait virulans faktörleri, konağa ait genetik ve fizyolojik faktörler ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşiminin belirleyici olduğunu göstermektedir(50,51).

### ***H. pylori* İnfeksiyonunun Epidemiyolojisi:**

*H. pylori* infeksiyonu insanlar arasında en yaygın görülen kronik bakteriyel infeksiyondur. Dünya nüfusunun %60'ının bu bakteri ile kolonize olduğu tahmin edilmektedir(1,52,53,54). Warren ve Marshall'ın 1982'de bakteriyi izole etmelerinin üzerinden yirmi yıla yakın bir zaman geçmesine rağmen infeksiyonun epidemiyolojisi hakkında bilinmeyenler bilinenlerden hala daha fazladır. Toplum içinde *H. pylori*'nin nasıl bulaştığı tam olarak aydınlatılamamıştır. Üzerinde herkesin anlaştığı bir gerçek varsa, o da bakterinin invazyon yeteneği olmadığı ve mide mukozasına ancak ağız yolu ile ulaşabileceği gerçeğidir(52).

İnfeksiyonun prevalansı yaşa ve ülkelere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Yapılan kesitsel ve çoğunluğu serolojik olan çalışmalarda

infeksiyonun çocukluk çağında kazanıldığı ve yaşla birlikte infeksiyon hızının azaldığı saptanmıştır(52,53,54,55,56,57,58). Özellikle yaşamın ilk iki yılında hem infeksiyona yakalanmanın hem de *H. pylori* klirensinin yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer enterik patojenlerde olduğu gibi, *H. pylori*'ye olan duyarlılık çocuklarda daha fazladır. Ancak herhangi bir yaşı grubu için minimal infeksiyöz dozun ne kadar olduğu bilinmemektedir(52).

Gelişmekte olan ülkelerle gelişmiş ülkeler arasında epidemiyolojik açıdan belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Tüm yaş gruplarında gelişmiş ülkelerdeki seropozitiflik oranları gelişmekte olan ülkelere kıyasla daha düşüktür. Gelişmekte olan ülkelerde infeksiyon, gelişmiş ülkelere göre daha küçük yaşınlarda kazanılmaktadır. 10 yaşında toplumun %70'i seropozitifken, 20 yaşına gelindiğinde toplumun neredeyse tamamında *H. pylori*'ye karşı antikorlar tespit edilebilmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise seropozitiflik 50 yaşından sonra ciddi bir artış göstermektedir. 50 yaş üzerindekilerde görülen bu yüksek seropozitivitenin, bu kişilerin çocukları sırasında henüz sanitasyonun yeterli olmamasına bağlı olduğu, bir başka deyişle aslında yine çocuklukta kazanılmış infeksiyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zaman diliminde doğanlarda aynı prevalans oranlarının saptanmasıyla karakterli bu epidemiyolojik özellik, "doğumsal kohort etkisi" olarak tanımlanmaktadır. Alkol, sigara ve antiinflamatuar tüketimi ile *H. pylori* prevalansı arasında bir ilişki saptanmamıştır(52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63).

Ülkemizde *Helicobacter pylori* infeksiyonu prevalansı ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalardan çıkan sonuçlar, daha çok gelişmekte olan ülkelerdekine benzer bir grafik çizmektedir. Tüm yaş grupları için *H. pylori* insidansının yüksek olduğu görülmektedir. Ülkemizde *H. pylori*

infeksiyonu prevalansı ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalardan çıkan sonuçlar tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3: Ülkemiz insanlarında değişik yaş gruplarında *H. pylori* prevalansı (%).

Merkez	0-5 yaş	6-7 yaş	8- 10y	11- 12y	13- 15y	16- 18y	19- 20y	21- 24y	25- 29y	30- 34y	35- 39y	40- 49y	50- 59y	60y üstü
Ankara(59)	-	-	79		83		75		96	91	83		94	
İstanbul(60)			57				79			74			79-100	
D.bakır(64)	28	44		69		68		72		-	-	-	-	-
Ankara(65)			71,4			75,8			79,5		87	64	58,3	

*H. pylori* infeksiyonunun epidemiyolojik özellikleri hakkında yukarıda aktarılan bilgiler üzerinde büyük oranda görüş birliğine varılmış olmakla birlikte, bulaşma yolları hakkında tartışmalar halen sürdürmektedir. İnsan dışında, bazı gelişmiş primatlardan ve nadiren evcil kedilerden *H. pylori* izole edilmiştir. Ancak insanlara bu canlılardan bulaşma olduğunu gösteren bir kanıt bulunmamaktadır(3,31,54,66). Dolayısıyla, *H. pylori*'nin doğal rezervuarı insandır denilebilir. Buna bir de aynı aile içinde yaşayanlarda veya denizaltı mürettebatı, yurt sakinleri gibi kapalı gruptarda infeksiyonun kontrol gruplarına göre daha sık görüldüğü bilgisi eklendiğinde, bakterinin insandan insana bulaştığı daha da açık hale gelir. Nitekim *H. pylori*, gaita, kusmuk, tükürük ve diş plaklarından izole edilebilmiştir(31,66,67,68,69). Potansiyel olarak insandan insana gaita, tükürük ve kusmuk ile bulaşabilir. Bu yollar dışında yeterince temizlenmemiş endoskoplar veya pH ölçme problemleri aracılığıyla bulaşma olabilmektedir(52,54). Fekal-oral yolun bulaşmada daha önemli olduğunu düşünenler çoğunluktaysa da bulaşmanın temel olarak hangi yolla gerçekleştiği henüz anlaşılamamıştır(67).

Oral-oral bulaşmaya kanıt olarak, gastroenterologlarda *H. pylori* prevalansının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunması gösterilebilir. Özellikle endoskopik girişimler sırasında eldiven kullanmayan gastroenterologlarda oran daha da yüksek bulunmuştur(52). Süt çocukluğu döneminde infekte bebeklerin kusmuklarının kreşlerde infeksiyonun yayılmasına neden olabileceği bildirilmektedir(70).

Aklorhidrili hastalarda ve çocuklarda gaitadan *H. pylori* izole edilebilmesi infeksiyonun fekal-oral yolla bulaşabileceğini göstermektedir(54,71). Fekal-oral yolla bulaşı destekleyen önemli bir kanıt *H. pylori*'nin kokoid form denilen bir canlılık biçimine dönüşebilme özelliğinin olmasıdır. İlk izolasyonlarda helikal yapıda ve hareketli olan bakteri (replikatif form) gecikmiş kültürlerde, nitrojen ve karbon kaynaklarının yokluğunda, antibiyotik veya proton pompası inhibitörlerine maruz kalma gibi faktörlerin etkisiyle kokoid forma dönüşür. Kokoid formun kirpik taşıyabiliyor olması, kokoid forma dönüşürken yeni proteinlerin sentezlenmesi ve bazı proteinlerin kaybolması, kokoid formun kromozomal DNA ve polifosfat içermesi, oksidatif enzimlerinin faaliyetlerini devam ettirmesi gibi bulgular kokoid forma dönüşmenin bir dejenerasyondan çok programlanmış bir yanıt olduğunu, bir diğer deyişle kokoid formun bakterinin canlı bir formu olduğunu göstermektedir(52). Kokoid formun uygun koşullarda replikatif forma dönüşüp dönüşmediği henüz tam olarak bilinmemektedir. Kokoid formun, tekrar spiral replikatif forma dönüştüğüne dair bir takım çalışmalar vardır(72). Fekal-oral bulaşmada kokoid formun rolü olmasa bile +4°C'deki nehir suyunda replikatif formun 10 gün kadar canlı kalabildiğinin gösterilmiş olması, infeksiyonun bu yolla bulaşabileceğinin önemli bir kanıtı olarak görülmektedir(52). Son yıllarda yapılan çalışmalar kuyu ve yağmur suyu tüketimi ile *H. pylori* infeksiyonu

arasındaki ilişkiyi güçlendirmiştir(67). Örneğin, Peru'da PCR ile yapılan bir dizi çalışmada içme suyunda *H. pylori* DNA'sı gösterilmiştir(73).

*H. pylori* epidemiyolojisinde üzerinde durulan bir diğer nokta bulaşmada vektörlerin rolünün olup olmadığıdır. Enterik infeksiyonların bulaşmasında kara sineklerin rolü olduğu çok uzun yıllardır bilinmektedir. *H. pylori*'nin mekanik olarak taşınmasında kara sineklerin rolü olduğu Grubel ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmayla gösterilmiştir. Özellikle kötü sanitasyon koşullarının söz konusu olduğu ülkelerde, kontamine insan gaita ve kusmuklarına konan sineklerin daha sonra besinlerin üzerine veya daha çok küçük çocuklarda görüldüğü üzere doğrudan ağız mukozasına konarak bakterileri bulaştırdığı, öne sürülen ve destek bulan bir hipotezdir(52).

*H. pylori* infeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerinin daha açık ve kesin olarak ortaya konması için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

#### ***H. pylori* İle İlişkili Klinik Tablolar:**

*H. pylori* hangi yolla alınırsa alınsın, invaziv bir bakteri olmadığından mide mukozasına ağız yoluyla ulaşır. Coğu kişide infeksiyonun akut dönemi semptomuz geçirilir. Az sayıda olguda birkaç gün içinde gelişen ve etkenin alınımını takip eden birinci hafta sonunda en üst düzeyine ulaşan bulantı, kusma, karın ağrısı, açlık hissi, mide gurultusu ve hazırlıksızlık, nadiren ateş yüksekliği gibi semptomlarla karakterli bir klinik tablo görülür. Bu semptomlar genellikle bir hafta içinde iyileşirse de 14 güne kadar uzayabilmektedir(38,74).

Akut dönem semptomatik veya asemptomatik olarak geçirildikten sonra, bakterinin mide mukozasında yıllarca sürecek olan kolonizasyonu gerçekleşir. Mide mukozasında *H. pylori* kolonize olmuş kişilerin de büyük

çoğunluğunda herhangi bir semptom bulunmaz. Ülser olmaksızın, üç aydan daha uzun süreyle ülser benzeri yakınmaları, gastroözefagial reflü veya başka motilite bozukluğu yakınmaları bulunan (non-ülser dispepsi) kişilerde, bu yakınmaların *H. pylori*'den kaynaklanıp kaynaklanmadığına dair çelişkili yayınlar mevcuttur(75,76). Bu gün için non-ülser dispepsinin etiyolojik ajanının *H. pylori* olduğunu gösteren yeterli bulgu yoktur(38). Dolayısıyla kronik *H. pylori* kolonizasyonunun ülser veya malign hastalık gelişmedikçe herhangi bir semptoma neden olmadığı söylenebilir.

**Duodenal Ülser:** Duodenal ülserli hastaların %95'inde *H. pylori* pozitiftir ve bu oran kontrol gruplarına göre belirgin olarak daha yüksektir. Non steroid antiinflamatuvar ilaç (NSAİ) kullanımına ve Zollinger-Ellison Sendromuna bağlı olarak gelişen duodenal ülserler dışındaki duodenal ülserlerden *H. pylori* sorumludur. *H. pylori*'nin hipergastrinemi ve hiperasiditeye neden olduğu, hiperasiditenin de duodenumda gastrik metaplazi ve *H. pylori* infeksiyonuna yol açtığı, tüm buların sonucunda duodenumda inflamasyon ve sonrasında ülser geliştiği bilinmektedir(77). Nitekim duodenumda gastrik metaplazi ve *H. pylori* saptanan hastalarda, saptanmayanlara göre duodenum ülseri, 51 kat daha fazla bulunmuştur(78). Duodenal ülseri olan hastaların tek başına antibiyotik tedavisi ile iyileşebiliyor olması, ülser rekürrens oranlarının *H. pylori* eradikasyon tedavisi alanlarda anlamlı olarak düşük olması duodenal ülser etiyolojisinde *H. pylori*'nin rolünü pekiştiren bulgulardır(79,80,81,82,83). Yine *H. pylori*'ye bağlı antral gastriti bulunan kişilerde gastrik veya duodenal ülser gelişme riski, gastriti bulunmayan sağlıklı kontrollere göre 10-50 kat fazla bulunmuştur(84).

**Gastrik Ülser:** Duodenal ülser olgularında *H. pylori* varlığı %90 ve üzerindeyken, gastrik ülserde bu oranının %65 civarında (%50-80) olduğu bulunmuştur(85,86). Oranın gastrik ülserde düşük olmasının sebebi *H. pylori*'nin gastrik ülsere daha az neden olduğu anlamına gelmemektedir. Gastrik ülserin, sık kullanılan ilaçlar olan aspirin ve diğer NSAİ'dan da kaynaklanabilmesi nedeniyle, tüm gastrik ülserler içinde *H. pylori*'ye bağlı olanların oranı düşük görülmektedir. Nitekim ilaç kullanımına bağlı gastrik ülserler değerlendirme dışı bırakıldığında gastrik ülserli hastaların çoğunda *H. pylori* kolonizasyonu saptanabilmektedir(77). Tıpkı duodenal ülserde olduğu gibi antibiyotik kullanımıyla tedavi oranlarının artması ve nükslerin azalması gastrik ülser etiyolojisinde *H. pylori*'nin rolünü pekiştirmektedir(81).

**Gastrik Adenokarsinom:** *H. pylori* kolonizasyonu mide mukozasında bir dizi inflamatuvar değişiklikle karakterli kronik gastrite neden olduğundan ve kronik gastrit zemininde gastrik adenokarsinom gelişme riskinin arttığından yola çıkılarak, *H. pylori*'nin adenokarsinom gelişiminde rolü olabileceği düşünülmüştür(31). Gelişmiş ülkelerde *H. pylori*'nin insidansının azalmasıyla gastrik karsinom insidansındaki azalma arasında paralellik olması, *H. pylori* infeksiyonu ile gastrik karsinomun epidemiyolojik özellikleri arasında benzerlikler bulunması, *H. pylori* kolonizasyonunun intestinal metaplazi ve atrofik gastrit gibi her ikisi de kanser riski taşıyan patolojik değişikliklere neden olması, *H. pylori*'nin midenin kardiya dışında kalan bölgelerinde görülen adenokarsinomlardan sorumlu olduğunu düşündürmektedir(77,87,88,89,90,91,92,93). Mukozal atrofi çoğunlukla antrumda meydana gelir. Bu da kardia bölgesi kanserlerinde neden *H. pylori*'nin katkısı olmadığını açıklayabilir(77,93).

Karsinom gelişmesinde temel patolojik mekanizma, kronik inflamasyon ve bunun tetiklediği olaylar sonucunda yıllar içerisinde öncelikle gastrik atrofi ve ardından metaplastik değişikliklerin meydana gelmesidir. Atrofi ve metaplastinin oluşumunda *H. pylori*'nin yanısıra genetik, yaş, çevresel faktörler (diyet, tuz, ilaçlar, sigara, alkol), duodenogastrik reflü, intralüminal bakteri aşırı çoğalması gibi faktörler önemli rol oynarlar(38).

**Gastrik Lenfoma:** Normalde mide lenfoid doku bulunmaz. Ancak bakterinin mukozada kolonizasyonuyla dokuya bol miktarda lenfosit göçü olur. Böylelikle mide, *H. pylori* infeksiyonu nedeniyle lenfoid doku kazanılmış olur. Mukozada lamina propria'nın derin kısımlarında jerminal merkezli B hücre follikülleri gelişir. Aynı zamanda plazmositoz da izlenir(38). Gastrik lenfomaların çoğu bu B hücrelerinden köken alır ve mukozayla ilişkili lenfoid tümör (mucosa associated lymphoid tissue tumors-MALToma) adını alır(94). MALToma ile *H. pylori* arasındaki ilişki bugün üzerinde anlaşılan bir konudur. Epidemiyolojik çalışmalarдан elde edilen veriler gastrik MALT lenfomaların %95'inin *H. pylori* ile ilişkili olduğunu göstermektedir(95). *H. pylori*'nin neden olduğu kronik antijenik uyarı poliklonal lenfoid yanıtına yol açmakta ve neoplastik transformasyon geçirerek aşırı çoğalan bir B lenfosit klonu, MALToma ile sonuçlanmaktadır. MALT'dan köken alan lenfomada blast transformasyonu, subepitelial plazma hücre farklılaşması, lenfoid follikül merkezlerinin neoplastik hücrelerle spesifik kolonizasyonu ve spesifik antikorların bağlanması, tümörün *H. pylori*'ye karşı gelişen aşırı bir immünolojik cevap olduğunu düşündürmektedir(38). *H. pylori*'nin eradikasyonu ile tümör ilerlemesinin durduğunu, hatta gerilediğini gösteren vaka sunuları ve geniş vaka serilerini içeren çalışmalar

bulunmaktadır(96,97,98). Bu verilerden hareketle, Dünya Sağlık Örgütü'nün bir kolu olan Uluslararası Kanser Araştırmaları Kuruluşu (International Agency for Research on Cancer -IARC), *H. pylori*'nin insanlar için kanserojen olduğunu açıklamıştır(99).

**Özefagus Hastalıkları:** Gelişmiş ülkelerde *H. pylori* insidansının azalmasıyla birlikte gastroözefagial reflü (GÖR), Barret's özefagus ve özefagus adenokarsinomu görülme sıklığı artmıştır. Bu üç klinik antite aslında birbiriyle ilişkilidir. GÖR olan hastaların bir kısmında Barret's özefagus gelişmekte, Barret's özefagus gelişenlerin bir kısmında da adenokarsinom ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde *H. pylori* insidansının azalmasıyla birlikte özefagus adenokarsinomu görülme sıklığının artması, *H. pylori* infeksiyonunun GÖR ve dolayısıyla adenokarsinomdan koruyucu bir faktör olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar da özellikle *cagA*<sup>+</sup> suşlarla Barret's özefagus ve adenokarsinom arasında ters orantı olduğunu göstermektedir. *H. pylori* eradikasyon tedavisi verilenlerde GÖR sıklığının artması ve GÖR bulunan kişilerde *H. pylori* kolonizasyonunun düşük olması da *H. pylori*'nin koruyucu rolünü doğrulamaktadır(100,101).

#### ***Helicobacter pylori* İnfeksiyonunda Tanı:**

*H. pylori* infeksiyonunun tanısında çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler invaziv olanlar ve invaziv olmayanlar olarak iki grupta incelenebilir.

#### **İnvaziv Yöntemler:**

Endoskopi sırasında alınan biyopsi örneğinde kültür, histoloji ve hızlı üreaz testleri ile *H. pylori* araştırılması temeline dayanan yöntemlerdir.

Endoskopi eşliğinde biyopsi, tanıda kullanılan en invaziv ve pahalı yöntemdir(102). Ancak lezyonun doğrudan ve detaylı incelenmesine olanak sağladığından son derece değerlidir.

Kültür: Tanı için en spesifik yöntemdir. Ancak duyarlılığı düşüktür, sonuç almak birkaç gün sürmektedir ve duyarlılık uygulanan merkezlere göre değişiklik göstermektedir(67,103). Duyarlılık %70-95'tir(104). Bakterinin kültürde üretilmesiyle sadece kesin tanı konulmuş olmakla kalmayıp yanı sıra, izole edilen suşun; antibiyotik duyarlılığının belirlenmesine, moleküler tiplendirme yöntemleri ile virülansının araştırılmasına, relaps, reinfeksiyon veya mikst infeksiyon ayrimının yapılmasına olanak sağlanmış olur. Özellikle antibiyotik tedavisine yanıt alınamayanlarda ve antibiyotik direnci yüksek olan bölgelerde yaşayanlarda kültür mutlaka yapılmalıdır(31,67)

Histoloji: İnvaziv yöntemler içinde altın standart yöntemdir. Kültür yönteminden daha duyarlıdır. Duyarlılık %99'a ulaşabilmektedir(104). Mikroorganizmanın direkt olarak görülebilmesinin yanında dokuda oluşturduğu hasarın derecesi de incelenebilmektedir. Histolojik kesitler Giemsa veya Warthin-Starry boyaları ile boyanır. İmmünohistokimyasal incelemeler de son derece duyarlıdır. Ancak histopatolojik yöntemlerin az sayıda mikro organizmayı yakalayamama ve biyopsinin yanlış yerden alınmış olması nedeniyle yanlış negatif sonuç verme gibi dezavantajları vardır(31).

Üreaz Testi: *H. pylori*'nin ürettiği üreazı, üre içeren besiyeri ve pH duyarlı bir renk indikatörü yardımıyla belirlemeye dayanır. Basit olması ve hızlı sonuç vermesi (saatler içinde) nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Duyarlılığı %90-98'dir(104). Proton pompası inhibitörü kullanan hastalarda midede bakterilerin aşırı çoğalması söz konusu olabileceğinden

yalancı pozitif sonuç verebilir(31,104).

#### İnvaziv Olmayan Yöntemler:

Bu yöntemler bakterinin indirekt saptanması esasına dayanır.

Serolojik Testler: *H. pylori* ile kolonize olan kişilerin serumunda yüksek düzeyde ve stabil IgG ve daha az oranda IgA yanıtı saptanmaktadır(31). *H. pylori* infeksiyonunda serokonversiyon yaklaşık 22-33 gün sonra gelişmektedir(67). Serolojik tanıda ELISA, Western blot, kompleman fiksasyon ve immün floresan yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan ELISA yöntemidir. Serolojik yöntemler, invaziv olmama, hızlı sonuç verme, ucuz olma ve kantitatif olma gibi avantajlara sahiptir. Buna karşılık antibiyotik duyarlılığı ve hastada mevcut lezyon hakkında fikir vermemeleri, tedavi takibinde yetersiz olmaları, daha çok yetişkinler için hazırlandıklarından çocukların yanlış sonuçlar verebilmeleri gibi dezavantajlara sahiptirler(31,67,103). Duyarlılıklar %95'tir(104).

Üre Solunum Testleri: İnvaziv olmayan testler içinde altın standart olarak kabul edilen testlerdir(67). Testlerin esası oral yoldan alınan <sup>13</sup>C veya <sup>14</sup>C ile işaretli ürenin *H. pylori*'nin yaptığı üreaz ile parçalanması sonucu açığa çıkan CO<sub>2</sub>'in ekspiryum havasında saptanmasına dayanmaktadır(103). Hızlı ve kantitatif testler olmaları, tedaviden çabuk etkilenmeleri nedeniyle özellikle tedavi takibinde son derece etkili testlerdir. Bu amaçla tedavi kesildikten 4 hafta sonra uygulanması önerilmektedir(31,67). Bu testlerin dezavantajları arasında pahalı olmaları, radyoizotop kullanılması, lezyon ve patolojisi hakkında fikir vermemeleri, antibiyotik duyarlılığına ilişkin bilgi vermemeleri, mide ameliyatı geçiren kişilerde midenin hızlı boşalması nedeniyle yalancı negatif sonuç verebilmeleri sayılabilir. Bu testler üreaz pozitif başka mikroorganizmaların varlığında ve aklorhidride yalancı pozitif sonuç verebilmektedirler. Yakın zamanda antibiyotik, antiasit,

bizmut ve antisekretuvat ilaçlar kullananlarda yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir(67). Duyarlılıklarını %90-95 civarındadır(104).

### ***Helicobacter pylori* İnfeksiyonunda Tedavi:**

*H. pylori*'nin tedavisinde en önemli sorun tedavi endikasyonunun olup olmadığına karar vermektir. Bu konuda Avrupa'da ve Amerika'da oluşturulan *H. pylori* çalışma grupları, farklı yaklaşımlar, öneriler geliştirmiştir(103). Bu iki otorite arasındaki en belirgin farklılık; Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu'nun eradikasyon tedavisine başlamak için invaziv olmayan yöntemlerle infeksiyonun gösterilmesini yeterli kabul etmesi, buna karşılık Kuzey Amerika *H. pylori* Çalışma Grubu'nun mutlaka invaziv yöntemlerle tanı konmasını öneriyor olmasıdır(103).

Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu, eradikasyon tedavisi için endikasyonları şu şekilde tanımlamıştır(105):

- 1) Peptik ülser ister aktif olsun ister olmasın, *H. pylori* pozitif ise mutlaka tedavi edilmelidir.
- 2) Daha önce peptik ülser kanaması geçiren hastalar tedavi edilmelidir. *H. pylori* eradikasyonu kanama riskini düşürmektedir.
- 3) Düşük grade MALT lenfomasında eradikasyon tedavisi mutlaka yapılmalıdır. Lenfomanın tamamen iyileşmesini sağlayabilir.
- 4) Ciddi aktif kronik gastrit olgularında inflamasyonu gerilettiği için eradikasyon tedavisi önerilir.
- 5) Erken mide karsinomu vakaları mutlaka tedavi edilir. Ailesinde mide karsinomu öyküsü olanlara da tedavi önerilir.
- 6) Peptik ülser nedeniyle opere olan hastalarda nüksleri azalttıktan cerrahi sonrası eradikasyon tedavisi önerilir.
- 7) Non-steroid anti inflamatuvat ilaç (NSAID) kullananlarda, NSAID ve *H.*

*pylori* biribirlerinin zararlı etkilerini arttırmır. Bu nedenle NSAID kesildikten sonra eradikasyon tedavisi önerilir.

Bu durumlar dışında, non-ülser dispepsili hastalarda, mide kanserinden korunmada, uzun süre proton pompası inhibitörleri ile tedavi edilen gastroözefagial reflü durumunda ve intestinal sistem dışı hastalıklarda eradikasyon tedavisi verilip verilmemesi tartışmalıdır(105).

*H. pylori* eradikasyonunda çok sayıda ilaç in vitro etkili olmakla birlikte, hastaların tahammülsüzlüğü, bozuk ilaç dağılımı, bakteride antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi, kötü ilaç biyoyararlanımı gibi nedenlerle tedavide başarısızlıklara rastlanmaktadır. Bu gün için *H. pylori*'yi tek başına eradike edecek güvenilir bir antibiyotik yoktur. Bakteriye karşı en etkili antibiyotik olan klaritromisin bile tek başına kullanıldığında %50 eradikasyon sağlamaktadır(38).

Sayılan bu nedenlerden dolayı *H. pylori* infeksiyonunda antiülser ilaçlarla birlikte antibiyotik kombinasyonları kullanılmaktadır. En sık kullanılan tedavi şemaları ve eradikasyon oranları tablo-4'te özetlenmiştir.

Tablo-4: H. pylori eradikasyon tedavisi şemaları(106).

İlaçlar	Oral Dozlar	Süre (hafta)	Eradikasyon oranı (%)
Bizmut subsalisilat Metronidazol Tetrasiklin	4x302mg 4x250mg 4x500mg	1-2	86-90
Lansoprazol Klaritromisin Amoksisilin	2x30mg 2x500mg 2x1g	2	86-92
Metronidazol Omeprazol Klaritromisin	4x500mg 2x20mg 2x500mg	1	87-91
Amoksisilin Omeprazol Klaritromisin	2x1g 2x20mg 2x500mg	1	86-91
Metronidazol Omeprazol Amoksisilin	2x500mg 2x20mg 2x1g	1-2	77-83
Omeprazol Klaritromisin	1x40mg sabah 3x500mg	4 2	70-80
Ranitidin-bizmut substitrat Klaritromisin	2x400mg 3x500mg	4 2	82-86

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bakteriler:

Çalışmaya, gastrik yakınmalar nedeniyle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci ve İbn-i Sina Hastanelerine başvuran ve endoskopi ünitesinde endoskopik muayene yapılan hastalardan alınan gastrik biyopsi materyallerinden üretilen kırk iki bakteri alındı. 42 bakterinin hepsi farklı hastalardan izole edildi. Bakterilerin üç tanesi agar dilüsyon aşamasında kontrol plağında üremediginden, değerlendirme dışı bırakıldı ve çalışma otuz dokuz *H. pylori* suyu ile tamamlandı.

Endoskopi Ünitesinde alınan gastrik biyopsi örnekleri, steril serum fizyolojik içinde Gastroenteroloji Kliniği *H. pylori* Laboratuvarı'na ulaştırıldı. Örnekler en geç dört saat içinde işleme alındı. Bakterinin mukus tabakasından serbestleşmesini sağlamak için, örnekler içinde 0,5-1 ml kadar steril serum fizyolojik bulunan steril cam havanda ezildi. Ardından steril öze ile % 7 at kanlı beyin-kalp agar içeren plaklara ekim yapıldı.

Beyin-kalp agar şu şekilde hazırlandı: Üretici firmanın önerisi doğrultusunda 26 gram tartılan toz halindeki Beyin-kalp agar (Merck, Almanya) 500ml distile suda eritildikten sonra 1,5 atmosfer basınçta, 121°C'de, 15 dakika otoklavda steril edildi. 45-50 °C'ye kadar soğutulan agar içeresine gram pozitif mikroorganizmalar ve mantarların üremesini önlemek amacıyla önceden hazırlanan 5mg/L konsantrasyonda Amfoterisin B ve 10mg/L konsantrasyonda Vankomisin çözeltilerinden birer ml eklendi. İyice karıştırılan agara, 35ml steril defibrine at kanı eklerek 9cm çaplı petri kutularına uygun miktarlarda dağıtıldı. Böylece hazırlanan besi yerleri önce 37°C etüvde 24 saat bekletilerek sterilite kontrolleri yapıldı. Sonrasında plaklar, kurumalarını önlemek amacıyla plastik torbalara konularak buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

Ekim yapılan plaklar anaerob kavanozlarda 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. *H. pylori*'nin ihtiyaç duyduğu atmosfer ortamını (%5O<sub>2</sub>, %10CO<sub>2</sub>, %85N<sub>2</sub>) sağlamak amacıyla kavanoza CampyGen® CN25 (Oxoid Ltd İngiltere) Gas Generating Kit, nem oranını artırmak amacıyla da ıslak mendil kondu.

İnkübasyon sonrası üremelerin değerlendirilmesinde: Saydam, konveks, 0,5-1 mm çapında, çiğ tanesine benzer koloniler incelemeye alındı;

- 1) Serum fizyolojik ile lam üzerinde süspanse edilen koloniler kuruyup alevde tespit edildikten sonra gram boyası ile boyandı.
- 2) Oksidaz testi uygulandı: Taze kültürden platin öze ile alınan koloni kurutma kağıdı üzerine yayıldı. Üzerine %1'lik tetramethyl para-phenylenediamine dihydrochloride solüsyonu damlatıldı. Koloni etrafında pembe-mor renk oluşması halinde test pozitif kabul edildi.
- 3) Katalaz testi uygulandı: Platin öze ile alınan koloni lam üzerine bir çizgi halinde yayıldı. Üzerine bir-iki damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatıldı. Gaz kabarcıkları oluşması halinde test pozitif kabul edildi.
- 4) Üreaz testi uygulandı: Steril öze ile alınan koloni, 95ml üre broth base (Oxoid, İngiltere) ve %40 ürea SR (Oxoid, İngiltere) içeren besiyerine ekildi. İki saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Kırmızı-pembe renk oluşması halinde test pozitif kabul edildi.

Bu incelemeler sonunda; gram boyası ile boyanan preparatlarda gram negatif, spiral, S veya martı kanadı şeklinde görünüme sahip olan ve üreaz, katalaz ve oksidaz testlerinin her üçü de pozitif olan bakteriler *H. pylori* olarak kabul edildi. Yapılan tüm testlerde, *H. pylori* ATCC 11637 standart suşu, kontrol olarak kullanıldı.

Bu şekilde *H. pylori* olarak belirlenen bakterilerden, daha iyi, bol ve güçlü üremeyi sağlamak amacıyla, yukarıda hazırlanmış anlatılan %7 at kanlı

beyin-kalp agara ikincil pasajlar yapıldı ve yine yukarıda tarif edilen atmosfer ve nem koşullarında 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda bakteriler taze olarak çalışmaya alındı.

### **Antibiyotikler:**

Duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere, *H. pylori* infeksiyonu tedavisinde en sık kullanılan rejimlerde yer alan amoksisin (Mustafa Nevzat®), metronidazol (Eczacıbaşı®) ve klaritromisin (Deva®) seçildi. Antibiyotikler, üretici firmalardan, potensleri belirlenmiş olarak, toz halinde ve transport sırasında soğuk zincire uygun koşullarda ışıktan korunarak elde edildiler.

### **Antibiyotik Duyarlılık Testleri:**

Çalışmada, antibiyotik duyarlılık tespiti için standart yöntem olarak kullanılan Agar Dilüsyon Yöntemi ile, son yıllarda antibiyotik duyarlığını tespit etmede giderek daha çok bakteride uygulanan ve kantitatif sonuç verebilen bir yöntem olan E-test Yöntemi, aynı suşlar üzerinde ve aynı antibiyotikler kullanılarak uygulandı. Böylelikle E-test yönteminin, *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlığını belirlemedeki doğruluğunun, geçerliliğinin, güvenirliğinin ve tutarlığının tespit edilmesi hedeflendi.

**Agar Dilüsyon Yöntemi:** Çalışmada agar dilüsyon yöntemi, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği (ESCMID) bünyesinde çalışmalarını sürdürden Avrupa Antimikroiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST)'nin 2000 yılında yayınladığı "Agar Dilüsyon Yöntemi ile Minimal İnhibitör Konsantrasyon Tayini" başlıklı dökümanı doğrultusunda yapıldı(107). Buna göre aşağıdaki prosedürler izlendi:

**Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanışı:** Üretici firmalardan elde edilen antibiyotik tozları aşağıdaki formül kullanılarak çözüldü ve 1280µg/ml

konsantrasyonda antibiyotik solüsyonları hazırlandı.

Ağırlık(mg)= [Hacim (ml) x Konsantrasyon ( $\mu$ g/ml)] / Potens ( $\mu$ g/mg)

Çözücü sıvı olarak; amoksisilin için 0,1M pH:6.0 fosfat tampon, metronidazol için distile su, klaritromisin için metanol kullanıldı. 1280 $\mu$ g/ml konsantrasyonda hazırlanan antibiyotik solüsyonları daha sonra steril vidalı kapaklı tüplere dağıtıldı. Üzerleri etiketlenen tüpler -20°C'de saklandı. Çalışma günlerinde birer tane tüp derin dondurucudan çıkarıldı. Kullanıldıkten sonra tekrar dondurulmayıp imha edildi.

Besi Yeri: *H. pylori* için antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere tanımlanmış standart bir besi yeri yoktur(108). Çalışmamızda, antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan standart besi yeri olan Mueller-Hinton Agar seçilmiş, *H. pylori* için karşılaştırmalı çalışmaların gösterdiği şekilde %10 at kanı ilavesi yapılmıştır(108).

Mueller-Hinton agar şu şekilde hazırlandı: Üretici firmanın önerisi doğrultusunda, 17 gram tartılan toz halindeki Mueller-Hinton agar (Merck, Almanya) 500ml distile suda eritildikten sonra 1,5 atmosfer basınçta, 121°C'de, 15 dakika otoklavda steril edildi. 45-50 °C'ye kadar soğutulan agar içeresine gram pozitif mikroorganizmalar ve mantarların üremesini önlemek amacıyla önceden hazırlanan 5mg/L konsantrasyonda amfoterisin B ve 10mg/L konsantrasyonda vankomisin çözeltilerinden birer ml kondu. İyice karıştırılan agara, 50ml steril defibrine at kanı eklendi.

Bu arada test edilecek en yüksek konsantrasyonun, 20 katı fazla olacak şekilde steril tüplerde antibiyotik solüsyonları hazırlandı ve uygun dilüuentlerle çift kat sulandırımları yapıldı. Dilüent olarak amoksisilin için 0,1M pH:6.0 fosfat tampon, klaritromisin için 0,1M pH:6.5 fosfat tampon ve metronidazol için distile su kullanıldı. Böylece her üç antibiyotik için 2,5-5-10-20-40-80-160-320  $\mu$ g/ml konsantrasyonda antibiyotik içeren

tüpler hazırlanmış oldu. Daha sonra 50ml'lik mezurla ölçülerek her bir tüpe yukarıda hazırlanışı anlatılan at kanlı Mueller-Hinton agardan 19'ar ml eklendi. Bu şekilde antibiyotik solüsyonları 20 kat sulandırıldı ve 0,125-0,250-0,5-1-2-4-8-16 µg/ml konsantrasyonlarında antibiyotik içeren agar, önceden hazırlanan ve etiketlenen 9cm çaplı petri kutularına döküldü. Sonuçta, her bir antibiyotik için 0,125-16 µg/ml konsantrasyonlarında antibiyotik içeren, yaklaşık 3 mm kalınlığında plaklar elde edilmiş oldu. Bir plak ise, üreme kontrol plağı olarak antibiyotik konulmadan hazırlandı. Hazırlanan plaklar aynı gün kullanıldı.

Daha sonra, %7 at kanlı beyin-kalp agardaki 2-3 günlük taze *H. pylori* kolonilerinden steril öze ile alınıp 1 ml beyin-kalp infüzyonda (Oxoid, İngiltere) süspansıon seviyesi edildi ve vortekslenerek homojenize edildi. Bu şekilde McFarland 3 bulanıklığı ile uyumlu, dolayısıyla  $1 \times 10^9$  CFU/ml mikroorganizma içeren bakteri süspansyonları hazırlandı. Bu süspansyonlardaki bakterilerin canlılığını değerlendirmek için direkt mikroskopik inceleme ve gram boyaması yapıldı. Birer damla alınıp lam lamel arasına konarak direkt mikroskopide x40 büyütme ile incelenen bakteri süspansyonlarından, hareketini kaybetmiş ve kümeleşmiş olanlara, gram boyamada ise bakterilerin %25'ten daha fazlası kokoid şeke dönüşen süspansyonlara rastlanmadığından bütün süspansyonlar çalışmaya alındı. Canlılık açısından uygun olduğu tespit edilen süspansyonlardan, standart özeler ile  $1\mu\text{L}$  ( $10^6$  CFU/ml) alınarak antibiyotikli plaklara ekildi. Ekim en düşük konsantrasyondan başlanarak en yüksek konsantrasyona doğru yapıldı. En son olarak, antibiyotiksiz kontrol plağına ekildi. Her bir çalışmada *H. pylori* ATCC 11637 standart suşu, kalite kontrolü olarak kullanıldı. Ekim yapılan plaklar anaerob kavanozlarda  $37^\circ\text{C}$ 'de 72 saat inkübe edildi. *H. pylori*'nin ihtiyaç duyduğu atmosfer ortamını (%5O<sub>2</sub>,

%10CO<sub>2</sub>, %85N<sub>2</sub>) sağlamak amacıyla kavanozlara CampyGen® CN25 (Oxoid Ltd-İngiltere) Gas Generating Kit, nem oranını artırmak amacıyla da ıslak kağıt mendil kondu. İnkübasyon sonucunda, gözle görülür üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak kabul edildi. Antibiyotik içermeyen kontrol plağında üremeyen 3 bakteri değerlendirmeye dışı bırakıldı.

E-test Yöntemi: E-test disk difüzyon yöntemi ile agar difüzyon yönteminin bir bileşkesidir. Uygulama yöntemi disk difüzyona benzer ancak agar dilüsyondaki gibi kantitatif sonuçlar elde edilebilir. E-test, üzerine konduğu agara, içerdiği eksponansiyel antibiyotik konsantrasyonunun, hızlı, düzenli ve stabil olarak difüze olmasını sağlayan plastik bir çubuktan ibarettir(108,109,110). Çubukların üzerinde içerdiği eksponansiyel antibiyotik konsantrasyonunu gösteren bir çizelge bulunur. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zonunun, E-test çubuğu kestiği noktada çizelge üzerinde yazan konsantrasyon değeri, MİK değerini gösterir. Çalışmamızda amoksisilin, klaritromisin, metronidazol E-test çubukları (AB Biodisk, Solona-İsveç) kullanıldı.

E-test yöntemi agar dilüsyon yöntemi ile eşzamanlı olarak şu şekilde uygulandı: Agar dilüsyon için hazırllanmış olan %10 at kanlı Mueller-Hinton agar, antibiyotik solüsyonları eklenmeksizin 9cm'lik petri kutularına döküldü. Yine agar dilüsyon için hazırlanan ve canlılık kontrolü yapılmış olan, McFarland 3 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonlarından steril eküvyonla örnek alındı. Eküvyon tüp kenarına bastırılarak eküvyondaki süspansiyonun fazlasının tüpte kalması sağlandıktan sonra %10 at kanlı Mueller-Hinton agara sürülerek ekim yapıldı. Bu şekilde plakta nokta başına 10<sup>6</sup> bakteri gelecek şekilde inokülasyon yapılmış oldu. Her bir bakteri süspansiyonu üç ayrı plaga ekildi. Ekimin ardından plakların

kuruması için 5-10 dakika beklandı. Bu süre sonunda, özel uygulayıcı alet yardımıyla her plağa farklı antibiyotik içeren bir E-test çubuğu yerleştirildi. Her bir çalışmada *H. pylori* ATCC 11637 standart suşu, kalite kontrolü olarak kullanıldı. Plaklar anaerob kavanozlarda 37°C'de 72 saat inkübe edildi. *H. pylori*'nin ihtiyaç duyduğu atmosfer ortamını (%5O<sub>2</sub>, %10CO<sub>2</sub>, %85N<sub>2</sub>) sağlamak amacıyla kavanozlara CampyGen® CN25 (Oxoid Ltd-İngiltere) Gas Generating Kit, nem oranını artırmak amacıyla da ıslak kağıt mendil kondu. İnkübasyon sonucunda, oluşan elips şeklindeki inhibisyon zonunun E-test çubuğu ile kesiştiği noktaya karşılık gelen antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi. Duyarlılık zonu içinde az sayıda da olsa üreyen bakteri kolonileri gram boyama, oksidaz, katalaz ve üreaz testleri ile *H. pylori* olarak belirlendiklerinde zon dikkate alınmayıp dirençli kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışma sonucunda, 39 *H. pylori* suşunda amoksisilin, klaritromisin ve metronidazolün MİK değerleri hem agar dilüsyon hem de E-test yöntemi ile belirlenmiş oldu.

*H. pylori* suşlarının pek çok antibiyotik için duyarlılık/dirençlilik sınır değeri kesin olarak belirlenmiş değildir(111). Bununla birlikte metronidazol için 8 µg/ml' nin üzerindeki MİK değerlerinin, klaritromisin için ise 1 µg/ml' nin üzerindeki MİK değerlerinin direnci gösterdiği kabul edilmektedir(108,109,110,112,113,114). Bizim çalışmamızda da bu değerler kabul edildi. Ancak kesin bir uzlaşı olmaması nedeniyle 39 suş için tespit edilen MİK değerlerinin tamamının bir tablo halinde verilmesi uygun görüldü (tablo-6).

39 suşun hiç birinde ne E-test yöntemi ile, ne de agar dilüsyon yöntemi ile amoksisiline direnç saptanmadı.

39 suşun 8 tanesi E-test yöntemi ile klaritromisine dirençli ( $MIK > 1\mu g/ml$ ) saptanırken, bu 8 suştan iki tanesi agar dilüsyon yönteminde duyarlı ( $MIK \leq 1\mu g/ml$ ) olarak saptandı.

39 suşun 16 tanesi E-test yöntemi ile metronidazole dirençli ( $MIK > 8\mu g/ml$ ) saptanırken, bu 16 suşun bir tanesi agar dilüsyon yönteminde duyarlı ( $MIK \leq 8\mu g/ml$ ) olarak saptandı.

39 suşun 3 tanesi her iki test yöntemiyle de, klaritromisin ve metronidazolün ikisine birden dirençli olarak saptandı.

39 hastanın demografik özellikleri şöyle idi:

Hastaların yaşları 18-77 yaş arasında değişmekteydi (ortalama 41,4). Agar dilüsyon yöntemi ile, metronidazole dirençli olduğu saptanan suşların izole edildiği 15 hastanın yaş ortalaması 51,8; klaritromisine dirençli olduğu saptanan 6 hastanın yaş ortalaması ise 52,6 olarak tespit edildi.

39 hastanın 18'i kadın, 21'i erkekti. Antimikrobiyal duyarlılık tespitinde standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemi esas alındığında; izole edilen 39 suş içinde;

metronidazole dirençlilik oranı:  $15/39 = \%38,46$ ;

klaritromisine dirençlilik oranı:  $6/39 = \%15,38$ ;

klaritromisin+metronidazole dirençlilik oranı:  $3/39 = \%7,69$ ' dur.

Metronidazole dirençli 15 suşun 7'si erkek hastalardan, 8'i ise kadın hastalardan izole edilmiştir.

Klaritromisine dirençli 6 suşun 3'ü erkek hastalardan, 3'ü ise kadın hastalardan izole edilmiştir.

39 suşun MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri, E-test ve agar dilüsyon yöntemleri ile ayrı ayrı şu şekilde hesaplanmıştır: MİK değerleri Microsoft Excell-97 programı yardımıyla küçükten büyüğe doğru sıralanmış, 19. sıradaki suşun MİK değeri MİK<sub>50</sub>, 35. sıradaki suşun MİK değeri ise MİK<sub>90</sub> olarak belirlenmiştir. Sonuçlar tablo-5'te görülmektedir.

**Tablo 5:** *H. pylori* suşlarının MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri:

	Agar Dilüsyon		E-test	
	MİK <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MİK <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MİK <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MİK <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
amoksisilin	<0,125	<0,125	0,12	0.047
klaritromisin	0,25	2	0.38	3
metronidazol	4	>16	6	32

**Tablo 6:** 39 *H. pylori* suçu için, amoksisilin, klaritromisin ve metronidazolin E-test ve agar dilüsyon yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri (MİK değerleri µg/ml cinsinden verilmiştir).

Sıra No	AMOKSİSİLİN		KLARİTROMİSİN		METRONİDAZOL	
	Agar dil.	E-test	Agar dil.	E-test	Agar dil.	E-test
1	<0,125	0,023	0,50	0,75	>16	32
2	<0,125	0,047	0,25	0,25	4	6
3	<0,125	0,094	0,25	0,25	4	6
4	<0,125	0,023	0,50	0,50	>16	32
5	<0,125	0,012	<0,125	0,047	2	3
6	<0,125	0,012	0,25	0,25	2	2
7	<0,125	0,023	0,50	0,75	>16	24
8	<0,125	0,012	2	3	>16	48
9	<0,125	0,012	0,50	0,50	>16	24
10	<0,125	0,006	2	4	>16	32
11	<0,125	0,047	0,25	0,380	2	2
12	<0,125	0,006	<0,125	0,094	>16	24
13	<0,125	0,008	<0,125	0,064	1	1
14	<0,125	0,023	0,50	0,75	2	3
15	<0,125	0,006	0,25	0,50	4	6
16	<0,125	0,008	<0,125	0,380	2	2
17	<0,125	0,012	<0,125	0,25	2	3
18	<0,125	0,012	0,50	0,75	>16	24
19	<0,125	0,023	2	3	>16	48
20	<0,125	0,016	0,25	0,380	4	4
21	<0,125	0,008	0,5	0,50	8	12
22	<0,125	0,008	2	3	4	4
23	<0,125	0,023	0,5	0,75	>16	32
24	<0,125	0,006	1	1,5	2	2
25	<0,125	0,016	0,25	0,380	4	4
26	<0,125	0,008	2	3	8	4
27	<0,125	0,006	<0,125	0,064	2	3
28	<0,125	0,008	<0,125	0,094	2	2
29	<0,125	0,064	1	1,5	8	6
30	<0,125	0,047	<0,125	0,125	>16	48
31	<0,125	0,047	0,50	0,75	>16	48
32	<0,125	0,008	0,25	0,380	2	3
33	<0,125	0,064	0,50	0,50	>16	32
34	<0,125	0,023	0,25	0,25	4	6
35	<0,125	0,016	2	2	2	3
36	<0,125	0,032	0,5	0,75	>16	24
37	<0,125	0,016	0,25	0,380	16	12
38	<0,125	0,012	<0,125	0,125	4	4
39	<0,125	0,064	0,25	0,25	2	4

## TARTIŞMA

*Helicobacter pylori* infeksiyonu insanlar arasında en yaygın görülen kronik bakteriyel infeksiyondur. Dünya nüfusunun %60'ının bu bakteri ile kolonize olduğu hesaplanmaktadır(1,2,66). Yaygınlığının yanında etiyolojisinde rol oynadığı hastalıkların ciddiyeti düşünüldüğünde, *H. pylori*'nin bir halk sağlığı sorunu olduğu söylenebilir. Örneğin *H. pylori*'nin etiyolojik faktör olduğu hastalıklardan peptik ülser hastalığı, tüm dünyada önemli bir morbidite nedeniyken, distal yerleşimli gastrik adenokarsinom, dünya genelinde en çok ölüme neden olan kanser türleri arasında ikinci sırada gelmektedir(103).

*H. pylori*'ye karşı tek başına etkili olabilen bir antibiyotik yoktur(38). Bu nedenle tedavide kombiné antibiyotik kullanımı gerekmektedir(tablo:4). Ancak diğer tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi *H. pylori*'de de antibiyotiklere karşı gelişen direnç, tedavi sorunlarına neden olmaktadır. *H. pylori* infeksiyonunun tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılık ırktan ırka, ülkeden ülkeye önemli değişiklikler göstermektedir. Örneğin metronidazole direnç oranı gelişmiş ülkelerde %25 civarında iken az gelişmiş ülkelerde %90'lara kadar ulaşabilmektedir(1,103,108,112,114,115).

Metronidazol *H. pylori*'ye karşı son derece etkili bir antibiyotiktir. Diğer pek çok antimikroiyal ajanın tersine düşük pH değerlerinde aktivitesini koruyabilmesi, mideye sekrete olduğundan mukus tabakasında yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmesi, metronidazolün yüksek etkinliğinden sorumludur(115). Metronidazoldeki nitro grubunun, hidroksilamin'e indirgenmesi ile oluşan aktif bileşikler, bakteri DNA'sını parçalayarak bakteri hücresinin ölümüne neden olmaktadır(116). Bakterilerde görülen direncin nitro grubundaki indirgemenin yetersizliğine

bağlı olduğu düşünülmektedir(116). Bakterinin metronidazole dirençli olması, eradikasyon tedavisinin başarısını %90'lardan %50'ye indirdiği gibi, metronidazolle aynı rejimde yer alan, birlikte kullanılan diğer antibiyotiğe karşı da direnç gelişmesine neden olmaktadır(115). Nitekim yapılan çalışmalarda klaritromisine dirençli bulunan suşların çoğunun metronidazole de dirençli olduğu saptanmıştır(114,115,117,118,119).

*H. pylori*'de klaritromisin direnci de son yıllarda giderek artmaktadır. *H. pylori*'ye karşı düşük MİK değerine sahip olması ve bu değerin düşük pH'da çok az etkilenmesi, gastrik mukoza hücrelerine iyi difüze olarak birikmesi nedeniyle klaritromisin, *H. pylori*'ye karşı in vitro en etkili antibiyotiktir(116). Klaritromisin bakteri ribozomlarında 23sRNA'ya bağlanarak protein sentezini engellemektedir(120). Ancak 23sRNA'da meydana gelen mutasyonlar sonucunda *H. pylori* suşları klaritromisine direnç kazanmışlardır(117,120). Klaritromisine karşı direnç oranı ülkeler ve bölgeler arasında %3-15 arasında değişmekle birlikte özellikle Peru'da %50'ye varan direnç oranları bildirilmektedir (114,117,120,121,122,123,124,125,126).

*H. pylori* tedavisinde kullanılan tek beta-laktam antibiyotik olan amoksisilin bakteri hücre duvarı sentezini engelleyerek etki gösterir. Çok yakın zamana kadar, oldukça düşük MİK değerlerinde etkili olabilen amoksisiline karşı direnç gelişmediği bilinmekteydi(120). Ancak son zamanlarda, “direnç gelişmez” denilen amoksisiline direnç kazanmış suşlar izole edildiği, hatta bu suşların oranının endişe verici sayılarla ulaştığı görülmektedir(125,127).

Ülkemizde *H. pylori*'de antibiyotik duyarlığını belirlemeye yönelik yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda; metronidazole direnç %48-81, klaritromisine direnç %0-7 olarak saptanmıştır(128,129,130). Bizim

çalışmamızda metronidazol direnci %38,46 ve klaritromisin direnci %15,38 olarak belirlenmiştir. Her üç çalışmada da amoksisiline karşı direnç saptanmamıştır. Çalışmalardan bir tanesinde(130) metronidazol duyarlılığı agar dilüsyon yöntemi ile araştırılırken, klaritromisin ve amoksisilin duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Diğer üç çalışmada antibiyotik duyarlılıklarını disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmalarda metronidazol direnci bizim çalışmamızdaki oranlardan belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni, diğer çalışmalarda disk difüzyon yönteminin kullanılması olabilir. Zira uzun süren ve olumsuz koşullarda (yüksek nem ve C0<sub>2</sub> oranı vb) gerçekleşen inkübasyon sürecinde, disklerin içерdiği antibiyotiklerin stabilitesinin bozulduğu ileri sürülmektedir(110). Ancak bu durum, agar dilüsyon yöntemi ile yapılan çalışmada(130) metronidazole direnç oranının %81 olmasını açıklayamamaktadır. Çalışmada kullanılan besiyerinin farklı ve daha zengin olması veya çalışmalara konu olan bakteri sayılarının tesadüflere izin verecek kadar sınırlı sayıda olması, direnç oranlarındaki bu farklılığı açıklayabilir. Klaritromisine karşı direnç oranının her üç çalışmada da bizim çalışmamızdakine göre daha düşük bulunmasının nedeni, diğer çalışmaların yapıldığı tarihlerde klaritromisin preparatlarının ülkemizde henüz çok kısa bir süredir kullanılıyor olması olabilir. Geçen zaman içinde çeşitli klinik endikasyonlar nedeniyle artan klaritromisin kullanımının, *H. pylori*'de bu ilaca karşı direnç oranının artmasından sorumlu olduğu görülmektedir. Eğilim böyle devam ettiği takdirde yakın gelecekte klaritromisin direnç oranının daha da artacağı ve ciddi tedavi sorunlarına neden olacağı öngörlülebilir. Dünyada amoksisiline karşı dirençli suşlar bildirilmeye başlamıştır(125,127). Henüz ülkemizde rastlanmamış olması sevindirici olmakla birlikte, yakın zamanda amoksisiline karşı dirençli

suşların izole edilmesi mümkündür. Uygunuz antibiyotik kullanımının önüne geçilmekçe direnç oranlarındaki artış kaçınılmazdır.

Tüm bu verilerden çıkan sonuç; etkin tedavi rejimini belirlemek, antibiyotik direncinin önüne geçmek, gereksiz ve fazla antibiyotik kullanımının getireceği ekonomik yükü azaltmak, bölgesel veya ulusal düzeyde direnç durumunu takip etmek ve böylece uygun empirik tedavi rejimini belirleyebilmek için, *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılığının bilinmesinin gerekli olduğunu.

Ancak *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılığını belirlemede, özellikle standardizasyonla ilgili ciddi sorunlar vardır. Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılacak besiyeri, inokule edilecek bakteri miktarı, inkübasyon süresi ve antibiyotiklerin duyarlılık-dirençlilik sınırının ne olması gerektiği henüz kesinleşmiş değildir(108,109,110,111,131). Kullanılacak besi yeri bakterinin iyi üremesini sağlamalıdır. Böylelikle üreme olmaması durumunda, üremeyi engelleyen şeyin besi yerinin olumsuz koşulları değil ortamdaki test edilen antibiyotik konsantrasyonu olduğu bilinebilir(108). Yine inkübasyon süresinin ve inokülüm miktarının ideal olmaması durumunda, özellikle metronidazol ve amoksisinin için yanlış MİK değerleri bulunabilmektedir. Örneğin inkübasyon süresinin uzaması ve inokülüm miktarının artırılması ile MİK değerleri yükselmektedir(108,133). Uygun besi yeri, inokülüm miktarı ve inkübasyon süresini belirlemek üzere yapılmış karşılaştırmalı çalışmalar vardır(108,132,133,134). Çalışmamızda, tüm bunlar dikkate alınarak; besi yeri, %10 at kanlı Mueller-Hinton agar; inokülüm miktarı,  $1 \times 10^9$ CFU/ml (McFarland 3); inkübasyon süresi, 72 saat olarak çalışılmıştır.

*H. pylori* gibi üremek için uzun süreye ve özel ortamlara ihtiyaç duyan bakterilerin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde sorunlar

yaşanmaktadır. Bu sorunların başında, uzun süren inkübasyon süresinde ve olumsuz üreme koşullarında (yüksek nem oranı vb.) antibiyotiğin stabilitesinin bozulması gelmektedir. Disk difüzyon yöntemi, bu nedenlerden dolayı *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir(110,133). Bu sorunu aşmak için, kolay uygulanabilir ve kantitatif bir yöntem olan E-test yöntemi son yıllarda giderek daha çok kullanılmaktadır.

E-test yöntemi, kolay uygulanabilir olması, fazla emek gerektirmemesi, uygulanmasının disk difüzyon yöntemine benzer olması nedeniyle laboratuvar çalışmalarına kolay adapte edilebilmesi, kantitatif sonuç alınabilmesi, inokülüm miktarı ve inkübasyon süresinden etkilenmemesi gibi nedenlerle, pek çok araştırmacı tarafından zor üreyen bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde ideal yöntem olarak kabul edilmektedir(108,109,110,132,133,134).

Çalışmamızın amacı, *H. pylori* antibiyotik duyarlılığının tespitinde E-test yönteminin etkinliğinin belirlenmesidir. Bu amaçla E-test yöntemi, antibiyotik duyarlığını belirlemeye standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

Bilindiği gibi, gerek kliniklerde tanı koymak gerekse toplumda tarama yapmak amacıyla kullanılan laboratuar testlerinin geçerliliğini, doğruluğunu, güvenirliğini ve tutarlığını test etmek için yapılan araştırmalara metodolojik araştırmalar denmektedir(135). Bu çalışma da bir metodolojik çalışma olarak planlanmış ve E-test yönteminin *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlığını belirlemektedeki geçerlilik ve doğruluğu belirlenmeye çalışılmıştır. E-test yönteminin geçerlilik ve doğruluğunu gösteren parametreler (duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif prediktif değerler), çalışma sonuçları doğrultusunda aşağıdaki gibi bulunmuştur:

Her iki yöntemle de amoksisiline dirençli suş saptanmadığından, bu dört parametre klaritromisin ve metronidazol duyarlılık sonuçları veri alınarak hesaplanmıştır.

#### KLARİTROMİSİN

#### AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ

		Dirençli	Duyarlı	Toplam
E-TEST YÖNTEMİ	Dirençli	6	2	8
	Duyarlı	-	31	31
	Toplam	6	33	39

$$\text{Duyarlılık (sensitivite)} = 6/6 = \%100$$

$$\text{Seçicilik (spesifite)} = 31/33 = \%93,9$$

$$\text{Pozitif prediktif değer} = 6/8 = \%75$$

$$\text{Negatif prediktif değer} = 31/31 = \%100$$

#### METRONİDAZOL

#### AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ

		Dirençli	Duyarlı	Toplam
E-TEST YÖNTEMİ	Dirençli	15	1	16
	Duyarlı	-	23	23
	Toplam	15	24	39

$$\text{Duyarlılık (sensitivite)} = 15/15 = \%100$$

$$\text{Seçicilik (spesifite)} = 23/24 = \%95,80$$

$$\text{Pozitif Prediktif Değer} = 15/16 = \%93,75$$

$$\text{Negatif Prediktif Değer} = 23/23 = \%100$$

Bu sonuçları kısaca özetlemek gerekirse, metronidazol için 1 adet,

klaritromisin için 2 adet suş, standart yöntemle duyarlı olarak tespit edildikleri halde E-test yöntemi ile dirençli olarak tespit edilmişlerdir. Standart yönteme göre dirençli olduğu saptandığı halde E-test yönteminde duyarlı saptanan suş olmamıştır. Klinik uygulamada sorun yaratıcı dirençli *H. pylori* suşları olduğundan, antibiyotik duyarlılık testlerinin duyarlı olan suşları belirlemekten çok dirençli olanları ortaya koyması bir başka ifadeyle dirençli olanları atlamaması istenir. Bir testin bu yeteneğini ifade eden parametreler, “duyarlılık (sensitivite)” ve “negatif prediktif değer”dir(136). Çalışmamızda duyarlılığı ve negatif prediktif değeri %100 olarak bulunan E-test yönteminin, dirençli suşları yakalama açısından son derece başarılı olduğu görülmektedir.

Öte yandan bir testin duyarlılığının yüksek olması, aslında duyarlı olan suşları da dirençli olarak göstermesine neden olur. Tersine, testin “seçicilik (spesifite)” ve “pozitif prediktif değeri” yükseldikçe aslında dirençli olanları duyarlı olarak gösterme şansı artar. Çalışmamızda, standart yöntemle duyarlı olduğu tespit edilen 3 suş, E-test yöntemi dirençli olarak göstermiştir. Bu da gerek olmadığı halde 3 hastada tedavi rejiminin değiştirilmesine yol açabilir. Ancak tedaviden beklenen başarıyı değiştirmediginden böylesi bir yanılma, dirençli olanları yakalamak uğruna kabul edilebilirdir. Nitekim E-test'in seçicilik, (gerçekten duyarlı olanların ne kadarının duyarlı olarak saptandığı) ve pozitif prediktif değeri (yani duyarlı olarak saptananların gerçekte ne kadarının duyarlı olduğu) %95'e ulaşmaktadır.

Bütün bu sonuçlar; kolay uygulanabilirliği, fazla emek gerektirmemesi, uygulanmasının disk difüzyon yöntemine benzer olması nedeniyle laboratuvar çalışmalarına kolay adapte edilebilmesi, kantitatif sonuç alınabilmesi, inokülüm miktarı ve inkübasyon süresinden

etkilenmemesi gibi genel özelliklerinin yanı sıra, E-test yönteminin *Helicobacter pylori* antibiyotik duyarlığının belirlenmesi özelinde son derece doğru, güvenilir ve geçerli bir yöntem olduğunu göstermektedir.

E-test'in kullanımını sınırlayan tek özelliği pahalı olmasıdır. Ancak yanlış seçildiği için başarısız olan ve direnç gelişimine de yol açan tedavi rejimlerinin getireceği ekonomik yük dikkate alındığında E-test yönteminin sağlayacağı kazancın daha avantajlı olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak; her antibiyotik için olmasa bile, en azından sık kullanılan ve direnç gelişiminin söz konusu olduğu antibiyotiklere bölgesel veya ulusal düzeyde duyarlığının takibi için, E-test yöntemi doğru, güvenilir ve geçerli bir yöntem olarak mutlaka uygulanmalıdır.

## ÖZET

Bu çalışmada yeni ve kantitatif bir yöntem olan E-test yönteminin *H.pylori* antimikrobiyal duyarlığının belirlenmesinde etkinliği, geçerliliği ve güvenilirliği araştırılmıştır.

Bunun için, gastrik yakınmaları nedeniyle endoskopik inceleme yapılan hastalardan alınan biyopsi materyallerinden izole edilen 39 *H.pylori* suşu kullanılmıştır. Bu suşların E-test yöntemi ile tespit edilen amoksisilin, klaritromisin ve metronidazole karşı duyarlılıklarını, standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemi karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda besi yeri, %10 at kanlı Mueller-Hinton agar; inokülüm miktarı,  $1 \times 10^9$ CFU/ml (McFarland 3); inkübasyon süresi, 72 saat olarak çalışılmış, metronidazol direnci %38,46 ( $>8\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ve klaritromisin direnci %15,38 ( $>1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) olarak belirlenmiştir. Amoksisiline karşı direnç saptanmamıştır.

Metronidazol için 1 adet, klaritromisin için 2 adet suş, agar dilüsyonla duyarlı olarak tespit edildikleri halde E-test yöntemi ile dirençli olarak tespit edilmişlerdir. Standart yönteme göre dirençli olduğu saptandığı halde E-test yönteminde duyarlı saptanan suş olmamıştır. Çalışma sonucunda E-test yönteminin *H. pylori* antimikrobiyal duyarlığını tespit etmedeki duyarlılığı (sensitivite) %100; seçiciliği (spesifite) %93,9-95; pozitif prediktif değeri %75-93,75 ve negatif prediktif değeri %100 olarak bulunmuştur.

Bütün bu sonuçlar; kolay uygulanabilir olması, kantitatif sonuç alınabilmesi, inokülüm miktarı ve inkübasyon süresinden etkilenmemesi gibi genel özelliklerinin yanı sıra, E-test yönteminin *Helicobacter pylori* antibiyotik duyarlığının belirlenmesi özelinde son derece doğru, güvenilir ve geçerli bir yöntem olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Farthing MJG. *Helicobacter pylori* infection: an overview. *Bri Med Bull* 1998;54:1-6
2. Buck GE. *Campylobacter pylori* and gastrointestinal disease. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:1-12
3. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth edition, Philadelphia-New York: Lippincott-Raven, 1997:321-363.
4. King EO: Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J Infect Dis* 1957;101:119-128. (özet)
5. Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler JP et all. Acute enteritis due to related vibrio: First positive stool cultures. *J Infect Dis* 1972;125:390-392. (özet)
6. Bokkenheuser VD, Richardson ND, Breyner JH et all: Detection of enteric campylobacteriosis in children. *J Clin Microbiol* 1979;9:227-232. (özet)
7. Dooley CP, Background and historical considerations of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 1993;22:1-5.
8. Bingöl R. *Helicobacter pylori* mikrobiyolojisi. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 1999 özet kitabı, sayfa 51-56.
9. Freedberg AS, Barron LE: The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am J Dig Dis* 1990;7:443-445 (özet)
10. Warren JR, Marshall BJ: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-1275.
11. Hopkins JR, Morris G. *Helicobacter pylori*: The missing link in

- perspective. *The American Journal of Medicine* 1994; 97:265-277.
12. Vandamme P, De Ley J:Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:451-455.
  13. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, et all: Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: Emendation of genetic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:88-103.
  14. Thompson LM III, Smibert RM, Johnson JL et al: Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:190-200.
  15. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T et al: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:397-405.
  16. Archer JR, Romero S, Ritchie AE et al: Characterization of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988;26:101-105.
  17. Romero S, Archer J, Hamacher ME et al: Case report of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988;26:142-143.
  18. Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Paster BJ, Dewhirst FE, Tompkins LS: An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in Humans. *J Infect Dis* 1993;168:379-385.
  19. Mc Nulty CAM, Dent JC, Curry A, Uff JS, Ford GA, Gear MWL, Wilkinson SP: New spiral bacterium in gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1989;42:585-591. (özet)
  20. Heilmann KL, Borchard F: Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and

- ultrastructural findings. 1991;Gut 32:137-140.
21. Dubois A, Tarnawski A, Newell DG et al: Gastric injury and invasion of parietal cells by spiral bacteria in rhesus monkeys. Gastroenterol 1991;100:884-889.
  22. Fennell CL, Totten PA, Quinn TC et al: Characterization of *Campylobacter*-like organisms isolated from homosexual men. J Infect Dis 1984;149:58-66.
  23. Gebhart CJ, Fennell CL, Murtaugh MP, Stamm WE: *Campylobacter cinaedi* is normal intestinal flora in hamsters. J Clin Microbiol 1989;27:1692-1694. (özet)
  24. Totten PA, Fennell CL, Tenover FC et al: *Campylobacter cinaedi* and *Campylobacter fennelliae*: Two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. J Infect Dis 1985;151:131-139.
  25. Cimolai N, Gill MJ, Jones A et al: “*Campylobacter cinaedi*” bacteremia: Case report and laboratory findings. J Clin Microbiol 1984;20:985-987. (özet)
  26. Ng VL, Hadley WK, Fennel CL et al: Successive bacteremias with “*Campylobacter cinaedi*” and “*Campylobacter fennelliae*” in a bisexual man. J Clin Microbiol 1987;25:2008-2009. (özet)
  27. Decker CF, Martin GL, Barham WB, Paparelllo SF: Bacteremia due to “*Campylobacter cinaedi*” in a patient infected with HIV. Clin Infect Dis 1992;15:178-179. (özet)
  28. Vandamme P, Falsen E, Pot B et al: Identification of *Campylobacter cinaedi* isolated from blood and feces of children and adult females. J Clin Microbiol 1990;28:1016-1020. (özet)
  29. Orlicek SL, Welch DF, Kuhls T: Septicemia and meningitis caused

- by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. J Clin Microbiol 1993;31:569-571.
30. Kiehlbauch JA, Tauxe RV, Baker CN, Wachsmuth IK: *Helicobacter cinaedi* associated bacteremia and cellulitis in immunocomprised patients. Ann Intern Med 1994;121:90-93. (özet)
  31. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and Related Organisms. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin RE, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> ed. New York:Churchill Livingstone; 2000;2285-2293.
  32. Owen JR. Helicobacter-species classification and identification. Br Med Bull. 1998; 54:17-30.
  33. Mobley HL. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. Gastroenterology. 1997;113:S21-28.
  34. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1992;37:123-127. (özet)
  35. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. Infect Immun 1996;64:2445-2448. (özet)
  36. Erdem B. *Campylobacter* ve *Helicobacter*. Ustaçelebi Ş. (editör) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 1999;531-541.
  37. Bode G, Mauch F and Maltferthener P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiol Infect 1993; 111:483-490. (özet)
  38. Örmeci N. *Helicobacter pylori* infeksiyonlarında klinik tablo ve tedavi. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 3-8 Ekim 1999 Kongre özet kitabı. Sayfa:56-62

39. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262:1892-1895
40. Cave DR, Vargas M. Effect of a *Campylobacter pylori* protein on acid secretion by parietal cells. *Lancet*. 1989;2;187-189
41. Smoot DT. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology* 1997;113:S31-34
42. Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995;59:451-480.
43. Eaton KA, Krakowka S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect immun* 1994;62;3604-3607. (özet)
44. Ferrero RL, Cussac V, Courcoux P, Labigne A. Construction of isogenic urease negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J Bacteriol* 1992; 174:4212-4217. (özet)
45. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997;388:539-547
46. Langenberg W, Rauws EAJ, Widjojokusumo A, et al: Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 1986;24:414-417.
47. Shames B, Krajden S, Fuksa M, et al: Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J Clin Microbiol*. 1989;27:2849-2850.
48. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM et al: *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells associated with cagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 1994;47:61-66.

49. Crabtree JE, Xiang Z, Lindley IJD et al: Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995;48:967-969.
50. Köksal F. *Helicobacter pylori* infeksiyonlarında patogenez ve bağışık cevap. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 3-8 Ekim 1999 Kongre özet kitabı. Sayfa:46-50
51. Go MF. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori* associated disease? *Gastroenterology*. 1997;113:S15-20.
52. Cave DR. Epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection: How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology*. 1997; 113:S9-14.
53. The report of the Digestive Health Initiative: International update conference on *Helicobacter pylori* *Gastroenterology*. 1997; 113:S4-8.
54. Özden A. *Helicobacter pylori* Epidemiyolojisi. Özden A (editör) İşte *Helicobacter pylori* Gastrit, Peptik Ülser 2. Baskı. Türk Gastroenteroloji Derneği Yayıncılık 1998, Sayfa:18-26.
55. Mitchell HM, Li YY, Hu PJ, Liu Q, Chen M, Du GG, Wang ZJ, Lee A, Hazell SL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China:identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J Infect Dis* 1992; 166:149-153.
56. Garnstrom M, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J Clin Microbiol* 1997; 35:468-470.
57. Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL. Prevalance of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic people. New

- Engl J Med 1989; 321:1562-1566.
- 58. Beşışık F. *Helicobacter pylori* İnfeksiyonu:epidemiyoloji ve patogenez. Flora 1996; 3:160-166.
  - 59. Özden A, Samur M, Dönderici Ö ve ark. *Helicobacter pylori* infeksiyonunun ülkemizde seroepidemiyolojisi. Gastroenteroloji 1992; 3:664-668.
  - 60. Beşışık F, Erdem L, Sezer R. Sağlıklı asemptomatik populasyonda *Helicobacter pylori* seroprevalansı. İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu Dergisi 1994.
  - 61. Parsonnet J, Blaser MJ, Perez-Perez GI, et al. Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. Gastroenterology 1992; 102:41-46.
  - 62. Banatvala N, Mayo K, Megraud F, et al. The cohort effect and *Helicobacter pylori* J Infect Dis. 1993; 168:219-221
  - 63. Mendall MA, Googin PM, Molineux N, et al. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. Lancet 1992; 339:896.
  - 64. Göral V, Doppl W, Klör HU, ve ark. Sağlıklı kişilerde *Helicobacter pylori* sıklığı. T Klin Gastroenterhepatol 1995; 6:26-28.
  - 65. Doğan ÜB, Tunçer C, Dursun A, Kandilci U. Türkiye'de *H. pylori*'nin yaş gruplarına göre dağılımı. Gastroenteroloji 1996;7 (1 ek):49.
  - 66. Cover TL. Commentary: *Helicobacter pylori* transmission, host factors and bacterial factors. Gastroenterology 1997; 113:S29-30.
  - 67. Kılıç S. *Helicobacter pylori* tanı, epidemiyoloji ve korunma. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 3-8 Ekim 1999 Kongre özet kitabı. Sayfa:63-68.

68. Özden A, Şahin F, Özenci H ve ark. İnsan mide mukoza biyopsi örneği ve dental plak örneğinde *Helicobacter pylori* araştırılması. XI. Ulusal Türk Gastroenteroloji Kongresi 6-9 Kasım 1994 Antalya Kongre Özeti Kitabı Sayfa:215.
69. Dolar EM, Ateş KB, Karahan M ve ark. Dental plak: *Helicobacter pylori* için yeni bir rezervuar mı? Gastroenteroloji 1992; 3:660-663.
70. Axon AT. Is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? Aliment Pharmacol Ther 1995; 9:585-588. (özet)
71. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human feaces. Lancet 1992; 14:340.
72. Andersen AP, Elliott DA, Lawson M, Barland P, Hatcher VB, Puszkin EG. Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. J Clin Microbiol 1997; 35:2918-2922.
73. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, et al. Water source as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Lancet 1991;22:1503-06.
74. Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. Med J Aust 1985;142:436-439. (özet)
75. McColl KEL, Murray LS, El-Omar E, et al. U.K. MRC trial of *H. pylori* eradication therapy for non-ulcer dyspepsia. Gastroenterology. 1998; 114:222.
76. Talley NJ, Janssens J, Lauritsen K, et all. Long-term follow up of patients with non-ulcer dyspepsia after *Helicobacter pylori* eradication. A randomized double-blind placebo-controlled trial. Gastroenterology 1998; 114:305.

77. Namura A, Stemmerman GN, Choyou PH et al. *Helicobacter pylori* infection increasing the risk for duodenal and gastric ulceration. Ann Intern Med. 1994; 120:977-981.
78. Caarick J, Lee A, Hazell S, et al. Campylobacter pylori, duodenal ulcer and gastric metaplasia: Possible role of functional heterotrophic tissue in ulcerogenesis. Gut 1989;30:790-797.
79. Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, et al. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. Lancet 1988;2:1437-1445.
80. Coghlan JG, Gilligan D, Humphreys H, et al. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers-a 12 month follow-up study. Lancet. 1987;2:1109-1111.
81. Graham DY, Lew GM, Klein PD, et al. Effect of tretment of *Helicobacter pylori* infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer: A randomized controlled study. Ann Intern Med. 1992;116:705-708.
82. Hentschel E, Brandstatter G, Dragoisics B, et al. Effect of ranitidin and amoxicillin plus metronidazole on the eradication therapy of *H.pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. N Engl J Med. 1993;328:308-312.
83. Sandıkçı MÜ, Doran F, Köksal F ve ark. *Helicobacter pylori* eradikasyonundan sonra duodenal ülser rekürrensi. 10. Türk Gastroenteroloji Kongresi 1993. Kongre özet kitabı. Sayfa:69.
84. Sipponen P. *Helicobacter pylori* and chronic gastritis: an increased risk of peptic ulcer? A review. Scand J Gastroenterol 1991;26:6-10.
85. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. Am J Gastroent. 1994; 89:S116-118.

86. Sandıkçı MÜ. Peptik ülser hastalığında *Helicobacter pylori* nin rolü. Özden A (editör) İşte *Helicobacter pylori*:Gastrit, Peptik Ülser 2. Baskı. Türk Gastroenteroloji Derneği Yayıncı 1998, Sayfa:60-69.
87. Kuipers EJ, Uyterlinde AM, Pena AS, et al. Long-term sequale to *Helicobacter pylori* gastritis. Lancet. 1995; 345:1525-1528.
88. The Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet. 1993; 341:1359-1362.
89. Craanen ME, Dekker W, Blok P et al. Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*:An endoscopic biyoptic study of the gastric antrum. Gut. 1992;33:16-20.
90. Hansson EL, Engstrand L, Nyren O, et al. *Helicobacter pylori* Infection: Independent risk indicatör of gastric adenocarcinoma. Gastroenterology 1993; 105:1098-1103.
91. Komoto K, Haruma K, Kamada T, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric neoplasia: Correlations with histological gastritis and tumor histology. The American J Gastroenterology. 1998;93(3):1271-1276.
92. Hansson EL, Engstrand L, Nyren O, et al. Prevalance of *Helicobacter pylori* infection in subtypes of gastric cancer. Gastroenterology. 1995; 109:885-888.
93. Personnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med. 1991; 325:1127-1131.
94. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR and Isaacson PG. *Helicobacter pylori* associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 1991; 338:1175-1176.

95. The report of the Digestive Health Initiative, International update conference on *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1997; 113:S4-8
96. Blecker U, Mickeithan WT, Hart J, et al. Resolution of *Helicobacter pylori* associated gastric lymphoproliferative disease in a child. *Gastroenterology*. 1995;109:973-977.
97. Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet*. 1995; 345:1591-1594.
98. Calvert R, Randerson J, Evans P, et al. Genetic abnormalities during transition from *Helicobacter pylori* associated gastritis to low grade MALToma. *Lancet*. 1995;345:26-27.
99. International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC, 1994.
100. Labenz J, Blum AL, Bayerdörffer E, et al. Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology*. 1997; 112:1442-1447.
101. Vicari JJ, Peek RM, Falk GW, et al. The seroprevalance of cagA pozitive *Helicobacter pylori* strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 1998;115:50-57.
102. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:720-741.
103. Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *Infectious Disease Practice for Clinicians*. 1999;23:97-107.
104. Friedman LS, Peterson WL. Peptic ulcer and Related Disorders. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Casper DL, Hauser SL, Longo DL eds. *Harrison's Principles of*

Internal Medicine. 14<sup>th</sup> ed. The Mc Graw-Hill Companies; 1998;1599-1616.

105. Lee J, O'Morain C. Who Should Be Treated for *H. pylori* Infection? A review of Concensus Conferences and Guidelines. *Gastroenterology* 1997;113:99-106.
106. Willis J. Gastrointestinal Diseases. In:Carey CF, Lee HH, Woeltje KF, eds. The Washington Manual of Medical Therapeutics. 29<sup>th</sup> ed. New-York Lippincott-Raven Publishers; 1998;302-328.
107. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Agar Dilution. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Discussion Document. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol 6 Number 5 May 2000.
108. Hartzen SH, Andersen LP, Bremmelgaard A et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: Importance of Medium, Inoculum and Incubation Time. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41:2634-2639.
109. Piccolomini R, Bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. Comparative Evaluation of the E-test, Agar Dilution and Broth Microdilution for Testing Susceptibilities of *Helicobacter pylori* Strains to 20 Antimicrobial Agents. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1842-1846.
110. Glupczynski Y, Labbe M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E-test for Quantitative Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol*. 1991;29:2072-2075.
111. Glupczynski Y. Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing. In Lee A, Megraud F (eds),

*Helicobacter pylori*:Techniques for Clinical Diagnosis and Basic Research. London;WB Saunders Company; 1996;17-28.

112. European Study Group on Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*. Results of a Multicentre European Survey in 1991 of Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1992;11:777-781.
113. Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ et al. Regional Differences in Metronidazole Resistance and Increasing Clarithromycin Resistance Among *Helicobacter pylori* Isolates from Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000;44:2214-2216.
114. Megraud F, Lehn N, Lindt T et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. Antimicrob Agents Chemother, 1999;43(11):2747-2752. (özet)
115. Wolle K, Nilius M, Leodolter A et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* Resistance to Several Antimicrobial Agents in a Region of Germany. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1998;17:519-521.
116. Dişibeyaz S, Altıparmak E. *Helicobacter pylori* infeksiyonu tedavisinde antibiyotiklere direnç. Güncel Gastroenteroloji. 2000;4(1):22-29.
117. Rozynek E, Dzierzanowska D, Cedro D et al. Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* in Poland. APUA Newsletter 16(2):1:4-5 (özet)
118. Boyanova L, Stancheva I, Spassova Z et al. Primary and combined resistance to four antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* in Sofia, Bulgaria. J. Med. Microbiol. 2000;49(5):415-418. (özet)
119. Noach LA, Langenberg WL, Bertola MA et al. Impact of

- metronidazole resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 1994;26:321-327.
120. Megraud F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998;115:1278-1282.
  121. Osato MS, Reddy R, Graham DY. Metronidazol and clarithromycin resistance amongst *Helicobacter pylori* isolates from a large metropolitan hospital in the United States. Int. J. Antimicrob. Agents 1999;12(4):341-347. (özet)
  122. Mendonca S. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and furazolidone in Brazil. Helicobacter 2000;5(2):79-83. (özet)
  123. Franzin L et al. Clarithromycin and amoxicillin susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from adult patients with gastric or duodenal ulcer in Italy. Curr Microbiol 2000;40(2):96-100. (özet)
  124. Iovene MR et al. Prevalence of antimicrobial resistance in eighty clinical isolates of *H. pylori*. Chemotherapy 1999;45(1):8-14 (özet)
  125. Realdi G et al. Pretreatment antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. Results of three randomized controlled studies. Helicobacter 1999;4(2):106-112. (özet)
  126. Zwet AA, Boer WA et al. Prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in the Netherlands. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996;15:861-864.
  127. Zwet AA et al. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. The Lancet. 1998;352:1595.
  128. Palabıyikoğlu M, Şahin F, Çetinkaya H, Özden A. Disk difüzyonyöntemi ile *Helicobacter pylori* klinik izolatlarında amoksisiline ve klaritromisine karşı primer dirençliliğin araştırılması.

Gastroenteroloji 1996;7(1ek):4.

129. Büke Ç, Aydin A, Günşar F, Ersöz G, Saydam C, Günhan C. *Helicobacter pylori*'nin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılığı. Gastroenteroloji 1996;7(1ek):55
130. Şahin F, Özden A, Ünver E ve ark. Agar dilüsyon yöntemi ile *Helicobacter pylori* için metronidazol dirençlilik testi ve disk difüzyon yöntemi ile amoksisilin ve klaritromisinin *H. pylori*'ye etkisi. Gastroenteroloji. 1994;5(2):203-206.
131. Henriksen TH, Brorson Ö, Schøyen R, Thorosen T. Risks related to lack of standardization tests to detect in vitro metronidazol rezistance in *Helicobacter pylori*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996;15:484-488.
132. Chaves S, Gadanho M, Tenreiro R, Cabrita J. Assessment of metronidazol susceptibility in *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37:1628-1631.
133. Henriksen TH, Brorson Ö, Schøyen R, Thorosen T, Lia A. A simple method for determinig metronidazol resistance of *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35:1424-1426.
134. Hirschi AM, Hirschi MM, Rotter ML. Comparison of three methods for the determination of the sensitivity of *Helicobacter pylori* to metronidazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1993;32:45-49.
135. Akdur R. Sağlık Bilimlerinde Araştırma ve Tez Yapma Rehberi. Ankara-1996. sayfa:44-48.