T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-
CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

# DİSPEPTİK HASTALARDAN ÜRETİLEN HELİCOBACTER PYLORİ KÖKENLERİNDE KLARİTROMİSİN DİRENÇ NEDENİ YENİ MUTASYONLAR VE BUNLARIN FENOTİPİK DİRENCE ETKİLERİ

MERVE KUTLU

DANIŞMAN
PROF DR BEKİR S. KOCAZEYBEK

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ

İSTANBUL-2018

# İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... 1
İTHAF ..... 2
TEŞEKKÜR ..... 3
İÇİNDEKİLER ..... 4
TABLO LİSTESİ ..... 7
ŞEKİL VE GRAFİKLER ..... 8
SEMBOLLER / KISALTMALAR ..... 9
ÖZET ..... 10
ABSTRACT ..... 11
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 13
2. GENEL BİLGİLER ..... 15
2.1. " *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)" ..... 15
2.1.1. Tarihçe ..... 15
2.1.2. *H. pylori* mikrobiyolojisi ..... 16
2.1.3. Epidemiyolojisi: ..... 16
2.1.4. Virülans faktörleri ve patogenez ..... 17
2.1.5. *H. pylori* genomu ..... 20
2.2. Helicobacter pylori enfeksiyonu ..... 24
2.2.1. Akut Enfeksiyon ..... 24
2.2.2. Gastrit ..... 24
2.2.3. Gastrik ülser ..... 26
2.2.4. Duodenal ülser ..... 26

2.2.5. Gastrik karsinoma ..... 27
2.2.6. Mukoza İlişkili Lenfoid Doku (MALT) Lenfoma ..... 28
2.2.7. Gastroözofageal Reflü Hastalığı (G.Ö.R.H.) ..... 29
2.2.8. Fonksiyonel Dispepsi ..... 30
2.2.9. Ekstragastrointestinal hastalıklar ..... 30
2.2.10. *H. pylori* enfeksiyonunda tanı ..... 31
2.2.11. *H. pylori* enfeksiyonunda tedavi ..... 34
2.2.12. *H. pylori* enfeksiyonlarında antibiyotik dirençleri ..... 35
3. GEREÇ YÖNTEM ..... 38
3.1. Çalışma alanı ..... 38
3.2. Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri ..... 38
3.3. Çalışma Planı ..... 38
3.4. *H. pylori* Kültürü Aşaması ..... 39
3.4.1. *H. pylori* Kültürü İçin Kullanılan Besiyerleri ve Reaktifler ..... 39
3.4.2. *H. pylori* Kültürü ..... 41
3.4.3. *H. pylori* Kültüründen Ekstraksiyon İşlemi İçin Örnek Hazırlanması ..... 41
3.5. *H. pylori'*ye Dönük Moleküler Deney Aşamaları ..... 41
3.6. *H. pylori* kökenlerinde A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonlarının Real-time PCR ile Tespiti ..... 45
3.6.1. A2115G nokta mutasyonu için real-time PCR çalışması ..... 45
3.6.2. G2141A nokta mutasyonu için real-time PCR çalışması ..... 46
3.6.3. A2144T nokta mutasyonu real-time PCR çalışması ..... 47
3.7. İstatistiksel Analiz ..... 49
4. BULGULAR ..... 50
4.1. Demografik özellikler ..... 50
4.2. *H. pylori* kökenlerinde Klaritromisin MİK değerleri ..... 52

4.3. *H. pylori* ureC Gen Bölgesi ..... 54
4.4. *H. pylori* kökenlerinde saptanan nokta mutasyonları ve MİK değerleri..... 55
5. TARTIŞMA ..... 61
6. SONUÇ ..... 69
7. KAYNAKÇA..... 70

# TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada A2115G için kullanılan primer-prob'lar.
Tablo 2. A2115G Real-time PCR reaksiyonu için kullanılan miks hacimleri.
Tablo 3. A2115G için Real-time PCR protokolü.
Tablo 4. Çalışmada G2141A için kullanılan primer-prob'lar.
Tablo 5. G2141A Real-time PCR reaksiyonu için kullanılan miks hacimleri.
Tablo 6. G2141A için Real-time PCR protokolü.
Tablo 7. Çalışmada A2144T için kullanılan primer-prob'lar.
Tablo 8. A2144T Real-time PCR reaksiyonu için kullanılan miks hacimleri.
Tablo 9. A2144T için Real-time PCR protokolü.
Tablo 10. *H. pylori* kökenlerinin üretildiği hastaların demografik verileri,
Tablo 11. *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin MİK değerlerini ve direnç durumlarını gösteren tablo.
Tablo 12. *H. pylori* kökenlerinin direnç durumları ve nokta mutasyon dağılımını gösteren tablo.
Tablo 13. *H. pylori* kökenlerinde saptanan A2115G, A2144T ve G2141A mutasyonlarını gösteren tablo
Tablo 14a. G2141A mutasyonunun duyarlılık testlerine göre dağılımının değerlendirildiği tablo.
Tablo 14b. A2115G mutasyonunun duyarlılık testlerine göre dağılımının değerlendirildiği tablo.
Tablo 14c. A2144T mutasyonunun duyarlılık testlerine göre dağılımının değerlendirildiği tablo
Tablo 15. Nokta mutasyonları ile MİK değerini tahmin etmek için yapılan çoklu regresyon modeli.

# ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

Resim 1. *Helicobacter* agar besiyerinde üreyen *H. pylori* kolonileri (x100)

Grafik 1. Real-time PCR yöntemiyle erime eğrisi analizi ile *H. pylori ureC* gen bölgesine ait pozitif saptanan kökenlerin görüntüsü

# SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µm: Mikron

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

babA: Kan Grup Antijeni Bağlayan Adezin

cag: Sitotoksin İlişkili Gen

cag PAI: Sitotoksin İlişkili Gen Patojenite Adası

ELISA: "The Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay"

GÖRH: Gastro-Özefegal Reflü Hastalığı

HP-NAP: *H. pylori* Nötrofil-Aktive Edici Protein

Hpsa: *H. pylori* Stool Antigen Test

IACR: International Agency For Cancer Research

ICAM: İntrasellüler Adezyon Molekülü

İcea Geni: Epitele Temasla İndüklenen A Geni

LPS: Lipopolisakkarit

MALT: Mukoza İle İlişkili Lenfoid Doku

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

OiPa: Dış Enflamatuar Protein A

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PPI: Proton Pompası İnhibitörü

RNA: Ribonükleik Asit

SP-D: Sürfaktan Protein-D

TURHEP: Türkiye Helicobacter Pylori Prevalans Araştırması

ÜNT: Üre Nefes Testi

vacA: Vakuol Oluşturucu Sitotoksin A

Du: Duyarlı

Di: Dirençli

## ÖZET

*Helicobacter pylori*'nin tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı tüm dünyada ciddi bir direnç artışı gözlenmektedir. Bu çalışmada; *H. pylori* genomunun 23S rRNA bölgesinde, yeni tanımlanmış üç nokta mutasyonunun (A2115G, A2144T ve G2141A), Türkiye'de izole edilen *H. pylori* kökenlerindeki varlığını ve bu mutasyonların klaritromisin direnci üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık

Çalışmada, İ.Ü-Cerrahpaşa, "Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Gastroenteroloji Anabilim Dalı" ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı Poliklinikleri'ne dispeptik yakınmayla başvurmuş ve endoskopi endikasyonu alan 63 hastanın, antrum ve korpuslarından alınan biyopsi örneklerinden üretilmiş *H. pylori* kökenleri kulanılmıştır. Çeşitli biyokimyasal testlerle tanımlanan *H. pylori* kökenlerinin fenotipik klaritromisin dirençleri, E-test ile *H. pylori* DNA varlığı ise real-time PCR yöntemi tespit edilmiştir.

Toplam 63 *H. pylori* kökeninin 39 (% 61,9)'u klaritromisine karşı duyarlı, 24 (% 38,1) köken ise klaritromisine dirençli olarak saptanmıştır. Ayrıca 8 (% 12,7) kökende A2115G nokta mutasyonu, 9 (% 14,3) kökende A2144T mutasyonu, 11 (% 17,5) kökende ise G2141A mutasyonu saptanmıştır.

Sonuç olarak; 3 gen bölgesinin klaritromisin direncini arttırmak için birbirlerinden bağımsız rollerini saptamak için yaptığımız binary lojistik regresyon analizine göre, en sık gözlenen A2144T nokta mutasyonunun klaritromisin direncini 37,32 kat, A2115G nokta mutasyonunun 31,99 kat ve G2141A nokta mutasyonunun ise 28.44 kat indüklemiş olabileceği kanaatindeyiz. Bu 3 nokta mutasyonun varlığının Türkiye'de araştırılmasının *H. pylori* tedavisinde önemli bir sorun haline gelen klaritromisin direncinin saptanması açısından önem taşıdığını ve *H. pylori* izoltlarında daha sık görülen, A2143G, A2142G, A2142C gibi klasik nokta mutasyonlarının yanında A2115G, G2141A ve A2144T yeni alternatif nokta mutasyonlarının da taranmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.



**Anahtar Kelimeler:** *Helicobacter pylori*, A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonları, klaritromisin

**“Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.” Proje No: 20900**

# Abstract

A significant resistance increase is observed globally against antibiotics used in the treatment of *H. pylori* infections. We aimed to evaluate the presence of recently defined new point mutations (A2115G, A2144T and G2141A) in *H. pylori* genome 23S rRNA region for the *H. pylori* strains obtained in Turkey and also to evaluate the effects of these mutations for clarithromycin resistance of these strains.

*H. pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens of 63 patients with a dispeptic complaint admitted to the I.U-Cerrahpasa, Cerrahpaşa Medical Faculty, Department of Internal Medicine, Gastroenterology and General Surgery Department were used in this study. E-test was used for the detection of phenotypic clarithromycin resistance and RT-PCR method was used for the detection of point mutations.

Thirty-nine of 63 (%61.9) strains were susceptible to claritomycin and 24 (38.1%) of them were resistant against to clarithromycin. In addition, 8 (12,7%), 9 (14,3%) and 11 (17,5%) of *H. pylori* strains were detected to have A2115G, A2144T and G2141A point mutations, respectively.

As a result; we suggest that most frequent A2144T point mutation may induce 37.33 fold increase for the resistance to clarithromycin for the detection of independent roles of each point mutations in binary logistic regression analysis. In addition, A2115G and G2141A point mutations may also increase for the resistance to clarithromycin as 31.99 and 28.44 folds, respectively in this study. We suggest that to scan this new three point mutations is important for the determination of clarithromycin resistance which has become a major problem in *H. pylori* treatment in Turkey and We also suggest to scan the A2115G, G2141,A2144T and other alternative point mutations together with other commonly scanned A2143G, A2142G, and A2142C point mutations in *H. pylori* strains.



**Key Words:** *Helicobacter pylori,* A2115G, A2144T and G2141A, point mutations, clarithromycin

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Helicobacter pylori (H. pylori)*; midenin antrum ve kardiya bölgelerinde daha sık olmak üzere midenin bütün bölgelerinde bulunabilen, konağa ve dokulara tropizmi gösteren spiral şeklindeki bir gram negatif çomaktır. "*H. pylori*, mide mukozasındaki asemptomatik kolonizasyonun yanı sıra; gastroduodenal inflamasyon, gastrik ve duodenal ülser atrofik gastrit, gastrik adenokarsinom, mukoza ile ilişkili lenfomalar (MALT lenfomalar) ve gastroözefageal reflü hastalığı (GÖRH) gibi önemli gastroduodenal patolojilere yol açabilen önemli bir bakteriyel patojendir (1)."

*H. pylori*'nin eradikasyonu zordur ve genellikle iki haftalık, çoklu antibiyotik kullanımı önerilmektedir. Enfeksiyonun eradikasyonunda klaritromisin ve amoksisilin ya da metronidazol ile proton pompa inhibitörü veya ranitidin ile bizmut sitratın kombine kullanıldığı tedavi protokolü uygulanmaktadır (2,3). Klaritromisin uzun süredir *H. pylori* eradikasyonu için önerilen birinci basamak tedavi protokolü içinde sıklıkla yer almakla birlikte, günümüzde klaritromisine dirençli kökenler giderek artmakta ve eradikasyon tedavisinin başarı şansı azalmaktadır (4). "Dünya genelinde artış gösteren makrolid direnci yüzünden en sık kullanılan tedavi rejimi olan, proton pompa inhibitörü (PPI), klaritromisin ve amoksisilin kombinasyonu ile tedavi başarı oranları bir çok bölgede %80'in altına düşmüştür (4)."

Klaritromisin, bakteriostatik bir makrolid aantibiyotik olup, 23S ribozomal RNA (rRNA) molekülündeki V domaininin peptidil transferaz bölgesine bağlanır. *H. pylori*'de klaritromisin dirence neden olan ve en çok görülen 3 mutasyon, 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesindeki 2143 ve 2142 pozisyonlarında adeninle guaninin (A2143G ve A2142G), 2142 pozisyonunda ise adenininle sitozinin (A2142C) yer değiştirmesi sonucunda oluşmaktadır. 23S rRNA'da gelişen bu nokta mutasyonları sonucunda klaritromisin ribozomlara bağlanamamakta ve etkisini gösterememektedir. 23S rRNA'nın V domainindeki bu üç nokta mutasyonu (A2143G, A2142G, A2142C) klaritromisine dirençli olgularının yaklaşık olarak %90'dan fazlasından sorumludur. Bu mutasyonlar yapısal bir değişikliğe neden olarak, antibiyotiğin bağlanmasında bir azalışla birlikte klaritromisine karşı direnç gelişimine de neden olmaktadırlar (5-7).

Bir çok gastrointestinal sistem hastalıklarıyla (gastrik kanser, ülser, MALT lenfoma vegastrit) ilişkili olan *H.pylori* enfeksiyonunun erken döneminde ve en uygun antibiyotik kombinasyonu ile tedavi edilmesi gereklidir. *H. pylori* eradikasyonunda birinci basamak

tedavisinde kullanılan klaritromisin halen vazgeçilmez bir antibiyotik seçeneği olarak görülmekle birlikte bu antibiyotikteki direnç prevelansında ciddi artışlar büyük problem oluşturmktadır.Bu direncin nedeni olarak çalışmalarda sıklıkla gösterilen klasik nokta mutasyonları dışında Bu çalışmada, yeni tanımlanmış olan üç nokta mutasyonunun (A2115G, G2141A ve A2144T), üç nokta mutasyonunun ilk kez Türkiye'de izole edilen *H. pylori* kökenlerindeki varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca da çalışmaya alınan *H. pylori* kökenlerinin klaritromisin MİK değerlerinin tespit edilerek, bu yeni mutasyonların klaritromisin direnci ile ilişkililerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda *H. pylori*'nin klaritromisin kombinasyonlu antibakteriyal tedavi rejimlerine dönük yeni bakış açıları kazandıracağımızı düşünmekteyiz.

# 2. GENEL BİLGİLER

## *2.1. Helicobacter pylori (H. pylori):*

### 2.1.1. Tarihçe

19 yüzyılın sonu ve 20. Yüzyılın başlarında araştırmacılar hayvan midelerinde spiral şekilli mikroorganizmaların varlığını saptamışlardır. Bunun ardından aynı spiral bakteri, peptik ülser ve gastrik kanser saptanan kişilerin midesinde de gösterilmiştir. Bu bakterinin peptik ülser ve gastrik kanser etiyolojisinde rol aldığının düşünülmesi üzerine hastalar uzun bir dönem boyunca yüksek doz antibiyotik ve bizmut bileşenleri ile tedavi edilmiştir. İlerleyen zamanda ise bu bakterinin herhangi bir klinik bulgusu olmayan kişilerde de bulunabileceğinin saptanmasının ardından yeni tanı ve tedavi yaklaşımlarına gereksinim olduğu ortaya çıkmıştır. (10-11)

*H. pylori*'nin önceleri (1980'li yılların başına kadar) alınan besinlerden kaynaklanan kontaminasyon nedeniyle insan midesinde yerleştiği varsayılmaktaydı. İlk olarak Barry Marshall ve Warren insan mide biyopsilerinden *H. pylori*'yi izole etmeye çalışmışlar ve gerek kıvrımlı gerekse Gram negatif oldukları için *Campylobacter* türlerinin izolasyonu için kullanılan geleneksel yöntemleri uygulamışlardır. Genel olarak *Campylobacter* için yapılan kültürlerde 48 saatte üreme görüldüğü için, üreme olmayan petriler 3 gün sonunda atılmaktaydı ancak bir kültür petrisi Paskalya tatili yüzünden 2 gün daha fazla, 5 gün süresince inkübasyonda kalmıştı. "14.05.1982 tarihinde *H. pylori* olarak adlandırılan bu organizma ilk defa bu petrideki kolonilerden izole edilmiştir (12)." Daha sonra çok sayıda araştırıcı, insan mide mukusunda *H. pylori*'nin varlığını gösteren çalışmalarını bildirmişlerdir. (13-15)

İlk olarak *Campylobacter pyloridis* (Marshall, 1984), daha sonra *Campylobacter pylori*, (1987) ve iki yıl sonra da (1989) '*Helicobacter*' cinsinde *H. pylori* adını alarak taksonomideki son yerini almıştır (16). Warren ve Marshall bu buluşlarından dolayı tıp alanında NOBEL ödülünü (2005 yılında) kazanmışlardır (17). *H. pylori* "International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından Sınıf I karsinojen bir etken olarak tanımlanmıştır (18).

### 2.1.2. *Helicobacter pylori* mikrobiyolojisi

#### *2.1.2.1. Helicobacter pylori'*nin yapısı

Spiral şekilli mikroaerofilik Gram negatif bir çomak olan *H. pylori* sıvı besiyelerinde genellikle çubuk şekilli üremeler göstermektedir. Biyopsilerden izole edilen *H. pylori*, 2,5-5 µm uzunluğunda, 0,5-1 µm genişliğinde olup 6 unipolar kılıflı flagellaları vardır. Flagellanın ucunda ampül şeklinde *"terminal bulp"* vardır. Çift katlı membran yapısındaki kılıfları, onları *Campylobacter*'den ayırır (19). Ortam şartlarındaki besin yetersizliği, artan oksijen, alkalin pH, sıcaklık artışı ve antibiyotiklere maruz kalma ve uzun süreli kültürler, helikal formların kokoid formlara dönüşmesine neden olabilmektedir. Kokoid formların kültürü yapılamamaktadır. (20–22). Bunula birlikte, kokoid formlar polifosfat enerji kaynaklarına sahip oldukları için canlı olarak kabul edilmekte ve bulaş ile birlikte antimikrobiyal tedavi sonrası nükslerden de sorumlu oldukları düşünülmektedir (22).

### 2.1.3. Epidemiyolojisi:

Dünya nüfusunun yaklaşık olarak yarısının *H. pylori* ile enfekte olduğu düşünülmekte olup görülme prevalansı bölgelere göre farklılık göstermektedir (23). Gelişmekte olan ülkelerde %70-90 oranında görülürken, gelişmiş ülkelerde ise bu oran %25-50'yi geçmemektedir. Türkiye'de ise, etkenle temas yaşamın ilk yıllarında kazanılmakta ve bu oran 20'li yaşlarda toplumun %80'inine ulaşmaktadır (24). 18–24 yaş aralığındaki asemptomatik bireyleri içeren bir+ Türkiye çalışmasında (1992) bu oran %76,8 olarak bulunmuştur (25,26). *H. pylori* etkeninin neden olduğu gastrit gelişmekte olan ülkelerde sık olarak görülmekte olup, *H. pylori* ile enfekte olan hastaların çoğu asemptomatik olarak kalmaktadırlar (19, 27).

Genellikle çocukluk döneminde*"anneden bebeğe*" bulaş ile edinilen *H. pylori* enfeksiyonları enfeksiyonlarında, aynı anda birden fazla köken midede bulunabilmektedir. İnsan mide mukozası ve immun sistemine uyum sağlayan genotipler persistan kolonizasyon özelliği gösterebilirler (28). Yaşlı hastaların biyopsi örnekleri incelendiği zaman, batı toplumlarında %10.8, Meksika'da %65 ve Güney Amerika'da %23.8 oranında aynı anda birden fazla kökenin kolonize olduğu bildirilmiştir fakat bu duruma gerçekten bir miks enfeksiyonun mu yoksa mide ortamına uyum sağlamaya çalışan bir kökenin farklı genotipik özelliklere sahip mutantların mı neden olduğu hala kesin olarak anlaşılamamıştır (29).

*H. pylori* prevalansı, az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde %70-90 oranlarına ulaşmakta, hatta bazı yaş gruplarında ise neredeyse %100'lere kadar yükselmektedir (28–30). Gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağında *H. pylori* enfeksiyon insidansı yüksek olup gelişmiş ülkelerde ise yaşla birlikte artmaktadır. Sosyoekonomik durum enfeksiyon prevalansını etkilemekte olup bir çok gelişmiş ülkede bile değişik ırklar arasında farklılıklar görülmektedir. (31).

Türkiye'de, 2003 yılında yetişkinlerde geniş kapsamlı bir Türkiye *Helicobacter pylo*ri Prevalans Araştırması çalışması yapılmış ve C13 ure nefes testi ile *H. pylori* prevalansı 82.5% olarak saptanmıştır (32). En yüksek oran 30-39 (86%) yaş grubunda, en düşük oran ise 70 yaş üzeri kişileder (%77) saptanmıştır. Doğu Anadolu Bölgesi ise en yüksek prevalansın saptandığı bölge (%88) olup en düşük oran ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde saptanmıştır (79%) (32). Türkiye'de asemptomatik erişkinlerin *H. pylori* prevalansı 53-82% arasında değişmektedir (ELISA yöntemiyle anti-Hp IgG). İnvaziv yöntemlerle spesifik hasta gruplarında ise %41-96 arasında saptanmıştır (33).

### 2.1.4. Virülans faktörleri ve patogenez:

*H. pylori* bir çok gastroduodenal patolojide başlıca etken olarak değerlendirilmektedir (24,35). Bununla birlikte bu mide kolonizasyonu asemptomatik bir seyir izlemekte ve yaklaşık olarak asemptomatik bireylerin 30%'unda herhangi bir dönemde gastroduodenal patoloji oluşmaktadır. İnsanlarda yapılmış olan geniş epidemiyolojik çalışmalar tedavi sonuçları temel alınarak, yüzeyel gastritin nedenin *H. pylori* olduğu bulunmuştur (36)

Yapılan çok sayıdaki araştırmaların sonucunda bakteri ile midedeki doku hasarı ilişkilendirilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunda mide pH'ı oldukça yükselmekte (4,5'e kadar) ve diğer bakterilerle birlikte metabolitleri de artış göstermektedir. Bu metabolitlerden nitrat ve nitritler, çeşitli gıda veya ilaçlarla alınan amin ve amidlerle birleşerek karsinojen nitrozoaminlerin ve nitrik oksit radikalleri gibi N-nitrozo bileşiklerini oluşturmaları, doku hasarına neden olmaktadır. Kronik enflamasyonda aktörleri olan polimorfonükleer lökositler, lenfositler ve makrofajların oluşturduğu oksijen ve nitrik oksit radikalleri de mukozal hücrelerde neoplastik transformasyona neden olabilmektedir. Ayrıca, enfekte kişilerdeki mukozal askorbik asit oranı azalmakta, lipid peroksidasyonu artış göstermekte ve bütün bu değişimler karsinogeneze katkıda bulunmaktadır (37,38). *H. pylori* ile kolonize bireylerde ilk basamak olarak, kronik aktif gastrit

oluşmakta ve bu kişilerin %2-4'ünde, yıllar içerisinde mukozal hücrelerdeki hasarın oranına bağlı olarak adenokarsinoma kadar giden değişimler görülebilmekyedir. *H. pylori* bulunan bireylerde mide kanseri gelişme riski olmayanlara oranla 20 kat kadar artabilmektedir (37). Bu patolojik süreçte rol oynayan bakteri, konak ve çevreye ait faktörlerin önemli bir kısmı anlaşılmıştır (39,40).

#### *2.1.4.1. Hastaya ait faktörler*

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, hasta ait faktörlerin (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, genetik yatkınlık, eğitim düzeyi ve ailesel faktörler) *H. pylori* enfeksiyonlarının üzerine olan etkisi gösterilmiştir. Yine moleküler çalışmalar konak gastrik mukoza dokularında predispozan genetik materyal araştırılmıştır. Örneğin; mide biyopsi örneklerinde epitel yüzeyindeki sürfaktan protein-D (SP-D) 'nin varlığı gösterilmiştir (41,42). SP-D proteinleri bakteri LPS'lerine bağlanıp hareketlerini durdurup invazyonu azaltarak, ayrıca fagositozu da kolaylaştırmaktadırlar (43). "Yine MALT ile ilgili t(11;18) (q21;q21) spesifik kromozomal translokasyon *H. pylori* ilişkili MALT lenfomaya zemin hazırlamaktadır (43)."

#### *2.1.4.2.* **"Bakteriye ait faktörler:"**

*vac*A (vakuol oluşturucu sitotoksin), *cag*A (sitotoksinle ilişkili A geni), ve *iceA* genleri kökenlerin hepsinde bulunmaz ve bu nedenle bazı kökenler daha virulandır. Üreaz, flagella ve adhesinler ise bütün *H. pylori* kökenlerindede bulunurlar. Kolonizasyonu kolaylaştırarak patogeneze katkıda bulunurlar (30).

##### **2.1.4.2.1. "Flagellin"**

*H. pylori* spiral yapısı ve flagellalarıyla viskoz ortamda hareket edebilmektedirler. Flagella hareketi ortamın pH'ına bağlı olarak değişmekte ve ortamın pH'ı, 4,1'in altına düştüğü zaman bakterinin hareket etme özelliği kaybolmaktadır. Üre ve sodyum bikarbonat ise bunun tam aksine bakteri hareketini aktive ederek pozitif kemotaksis özelliği göstermektedirler. Flagella flaA, flaB ve flaE proteinlerinden oluşan flagellalarda, flaA proteini hareketten sorumludur olup, flagellası bulunmayan *H. pylori* mutantları ise virulan bulunmamışlardır (30).

#### 2.1.4.2.2. “Adhezinler”

*H. pylori* mide epitel hücrelerine en az beş farklı adhezin ile tutunmaktadır ve flagella membranındaki Hpa A proteini ve dış membranındaki Hsp A önceki çalışmalarda belirlenmişti daha sonra ise dış membran yapısında bulunan 19 yeni lipoprotein tanımlanmıştır (45,46). Bunların fonksiyonlarıyla ilişkili bilgilerimiz sınırlı olup, bazılarının bakterinin tutunmasını kolaylaştıdıkları gösterilmiştir (47,48). Membran yapısında bulunan Lewis doku kan grubu antijenleri de *H. pylori*’nin mide epitel dokusuna tutunmasında önemli bir işlev göstermektedirler (43,49).

#### 2.1.4.2.3. “Süperoksit dismutaz ve katalaz”

Polimorf nüveli lökositlerin fagositozundan korunmayı sağlamakla birlikte katalaz enzimi ayrıca toksik $O_2$ radikallerinin etkisinden de korumaktadır. Bakteri, proteaz enzimi yardımıyla mukusu parçalayaeak kolonize olmakta ayrıca proteaz, lipaz ve fosfolipaz enzimlerini kullanarak mide  mukus ve epitelyumunda hasara neden olmaktadır (50).

#### 2.1.4.2.4. “Üreaz”

Sitoplazmik metalloenzim olan üreaz yaklaşık 540 kDa molekül ağırlığında hekzamerik bir molekül olup nikel iyonlarına gereksinimi vardır. Başlangıçtaki gastrik kolonizasyonda koruyucu olup yüksek asit içerikli ortamda bakteri yüksek düzeyde üreaz enzimi üreterek canlılığını devam ettirebilir. Bu enzim vasıtasıyla üre; amonyak ve karbondioksite parçalanarak midedeki lokal pH’ın yükselmesine neden olur. Çalışmalarda, amonyağın mide epitel hücrelerinde bazı yapısal ve fonksiyonel değişimlerden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Amonyak bakteriyel adezyonu da arttırma özelliği göstermekte ve komplemanının inaktif olmasına da neden olmaktadır. Üreaz, mononükleer hücreleri ve enflamatuar sitokin üretimini de kuvvetli bir şekilde indükte etmektedir (51).

#### 2.1.4.2.5.”Thioredoxin (CD–59)”

Thioredoxin enzimine sahip *H. pylori* kökenleri proteinleri disülfit bağlarından keserek denatüre ederler. *H. pylori* bu enzimi kullanarak musinleri ve konağın nonspesifik ve spesifik Ig’lerini (IgA, IgG ve IgM) denatüre etmekte ve immünyanıttan korunmaktadır (52,53).

### 2.1.5. *Helicobacter pylori* genomu

*H. pylori* genomu, adaptasyonunu kolaylaştırmak için son derece iyi korunmuş genlerindeki mutasyonlar vasıtasıyla, 2-3% oranına ulaşabilen genetik çeşitlilik gösterir. Etnik yapı ve coğrafi bölgeye göre genotipik değişimler oluşabileceği gibi, aynı konağın midesinin farklı bölgelerinde kolonize olan kökenler arasında da oluşabilir. Hatta aynı biyopsi örneğinden izole edilen koloniler arasında bile genetik farklılıklar bildirilmiştir (54,55).

1997 yılında Tomb ve ark.’larının ilk defa *H. pylori* 26695 kökeninin tüm genom dizisini çözümlemesi ile *H. pylori* biyolojisi, 1998 yılında ise Honcock ve ark.’larının *H. pylori* J99 kökeninin dizi analizini yapmasıyla birlikte de *H. pylori* bakterisinin çeşitliliği hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (56,57). Bunun ardından günümüze kadar *H. pylori* çeşitliliği ve genetik özellikleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (17,58,59). İlk genom dizi çözümlemesi yapılan Hp 26695 kökeni “1,667,867 bç (baz çifti)’lik halkasal bir kromozoma sahiptir. G+C kompozisyonu ile 5 farklı bölgeye ayrılır. 452-478 kb’lar arasında bulunan 1. bölge (%33 G+C) IS605 insersiyon dizisinin kopyası, 521 bç’lik tekrar bölgesi, *5SRNA* geni ve *virB4* geni içerir. *virB4* geni, *Agrobacterium tumefaciens*’de tDNA’nın transferinden sorumlu bir proteini kodlayan gendir. *H. pylori*’de IS605 ve IS606 olmak üzere 2 farklı IS elementi vardır. IS606, IS605 ile %50’den daha az benzerlik gösterir. IS605’te 5 tane tüm uzunluklu (full length), daha sonra bulunan IS606’da ise buna ek olarak 2 tane parçalı uzunluklu kopyalar bulunur. Her ikisi de farklı transkripsiyon ürünleri olan TnpA ve TnpB transpozonlarını kodlar. 539-579 kb’lar arasında bulunan 2. bölgede (%35 G+C) peptik ülserle ilişkili gen olan *cag PAI* bulunur. 1,049-1,071 kb’lar arasında bulunan 3. bölge, 1. bölgeye benzer şekilde IS605, 5SRNA ve 7 tekrar dizisi içerir. G+C içeriği %43 olan, 1,264-1,276 kb’lar arasında bulunan 4.bölge, RNA polimerazın alt birimi olan β ve β’ alt üniteleri kodlayan *rpoB* ve *rpoC* genlerinden oluşur. *fusA* geni de bu bölgededir. *fusA* geni, translasyon uzama faktörü olan EF-G faktörünü kodlar. Son olarak 5. bölge (%33 G+C) de 2 restriksiyon modifikasyon sistemi içermektedir. *H. pylori* DNA’sında benzerliği %97 den büyük olan 8 tekrar

ailesi yer alır. Bunlar gen duplikasyonlarının temsil edildiği bölgelerde veya kodlanan dizilerde bulunurlar (60).”

“Tomb ve ark. , Hp 26695 kökeni kromozomunun, 91%’ini oluşturan 1.590 açık okuma alanı (open reading frame=ORF) tanımlamışlardır. 26695 kökenindeki 9% oranındaki kodlanmayan bölge ise 3 sınıfa ayrılır. Kodlanmayan bölgenin 6%’sı intergenik dizi, 2.3%’ü kodlanmayan tekrarlar, 0.7%’si ise stabil RNA’dan oluşur. 1.590 ORF’den 1.091’inin diğer organizmalardaki karşılığı bulunmuştur ve tahmini biyolojik rolleri anlaşılmıştır. Geriye kalan 499 ORF’nin ise veritabanında bir karşılığı bulunamamıştır. Bunların da *H. pylori*’ye özgül olduğu düşünülmüştür (60-62).”

*“H. pylori*’deki öncül proteinlerin izoelektrik noktasına bakıldığında, proteinlerin 70%’inin, pI>7 (pI: Bir aminoasitin elektriksel olarak nötral olduğu pH) olduğu görülmektedir. Bu oran *H. influenza* ve *E. coli*’de %40’tır. *H. pylori* proteinlerinde *H. influenza* ve *E. coli* proteinlerinin 2 kat fazlası kadar temel aminoasitlerden bazik aminoasit olan arjinin ve lizin içerirler. Bunun nedeninin ise *H. pylori*’nin mide asiditesine adaptasyon sağlaması için gelişmiş olduğu düşünülmektedir (56).”

#### 2.1.5.1.1. *cag* (cytotoxin associated gene) patojenik ada (*cagPAI*) genleri

*H. pylori* ile enfekte olmuş bireylerin önemli bir kısmının asemptomatik olması bazı kökenlerin diğer kökenlere göre daha virülan olduğunu düşündürmektedir (37).

cagA proteini, *cagA* geni tarafından sentezlenir ve yüksek düzeyde immünolojiktir. Bu gen *H. pylori* kökenlerinin yaklaşık 70%’inde bulunmaktadır ve PAI varlığının bir göstergesidir. “40 kb büyüklüğünde ve 31’den fazla genden oluşan ORF (open reading frame) bölgesidir.” Bu gen adası virulans ve ortam adaptasyonuyla ilgili proteinleri ve Tip IV sekresyon sisteminde bulunan proteinleri kodlamaktadır. *cagPAI* taşıyanlar tip I olarak tanımlanırken ülser ve mide kanserleri ile ilişkilendirilirler. *cagPAI* taşımayalar ise tip II olarak adlandırılıp, non-ülser dispepsili malignitesi olmayan hastalardan izole edilmektedirler. “*cagA* geni yaklaşık 37kb’lık bir DNA segmenti olan cag PAI (cag patojenite adası)’nın sağ ucunda bulunur. cagPAI NCTC11638 kökeninde *“transposable element*” girişi ile ikiye bölünür. *cagPAI* gen içeriği ve düzenlenmesi bakımından kökenler arasında korunmuş bir özelliğe sahiptir (63).” cagPAI taşıyan kökenler (cagA+ kökenler), cagA proteinine karşı antikor oluşumunu indüklerler. cagA+ kökenlerle

enfekte gelişmiş batılı ülke hastalarında, büyük oranda yüksek bir enflamatuvar yanıt gözlenmekte ve bu hastalar çeşitli gastroduodenal patolojilerin gelişmesi için yüksek risk altında bulunmaktadırlar. Ancak Asya ülkelerinde cagA pozitif kökenler, daha çok gastrite neden olduğu, cagPAI'ya sahip olmayan olmayan kökenlerin ise daha az oranlarda peptik ülser ve gastrik kansere neden oldukları bildirilmiştir. Yani cagA pozitif kökenlerin, küçük bir kısmı da (~10%) tamamen fonksiyonel olmayan cagPAI'ya sahiptirler (60).

#### 2.1.5.1.2. *vacA* geni

*vacA* geni, vakolule edici sitotoksini üretir (64). Bütün kökenlerde bulunmakla birlikte, bu bunların 50%'si toksini üretebilmektedir (65). *vacA* geninin, amino ucu sinyal bölgesi (s) ve orta (m) bölgesinin nükleotid dizilerine bağlı olarak farklı allelik varyantları bulunmaktadır. s bölgesi *s1a, s2b, s1c* veya *s2* allellerinden, m bölgesi ise *m1, m2a, m2b* allellerinden birisini içermekte olup farklı s ve m allelleri, farklı kökenler arasındaki rekombinasyonla bir araya gelerek *s1/m1, s1/m2, s2/m2* ve *s2/m1* genotiplerini meydana getirmektedirler. *vacA s1/m1* içeren kökenlerin fazla miktarda sitotoksin ürettiği ve peptik ülsere neden oldukları gösterilmiştir. *s2/m2* içeren kökenlerin sitotoksini az ya da hiç üretmedikleri bilinmektedir (66).

*IL-1* geninin regülator bölgesindeki -511 ve/veya -31 bazlarında C/T tek nokta mutasyonunun aşırı IL-1 üretimine neden olarak enflamatuvar yanıt ve gastrik lezyonlarda artışa neden olduğu, ayrıca gastrik asit seviyesinin azalmasına neden olarak atrofik gastrit ve adenokarsinoma zemin oluşturabileceği bildirilmiştir." *H. pylori* enfeksiyonlarında kilo kaybı, görülen bazı hastalarda fundus bezlerinde mRNA ve salgılanan leptin seviyesinde azalma, buna karşılık plazma leptin seviyesinde ise artış tespit edilmiştir" (67,68).

Tip I kökenlerinde, vacA genellikle cagA ile birlikte üretilmektedir. Asya ülkelerindeki kökenlerin yaklaşık olarak 98%'inde vacA ve cagA birlikteliği vardır. Prevalansın en yüksek olarak bulunduğu yaş grubu 30-39 (%86) saptanır iken en düşük bulunduğu yaş grubu ise 70 yaş üzeridir (%77). s1/m1 kombinasyonu, s2 alellerine göre daha fazla toksin üretmektedir (66). *vacAs1/m1*-CagA pozitif kökenler, daha yüksek oranda peptik ülser ve gastrik adenokarsinom ile ilişkiliyken, s2/m2 allelleri nontoksijenik kökenlerde, s1/m2 ise malign olmayan hastalıklarla ilişkili kökenlerde tespit edilmişlerdir (67. Asya kaynaklı kökenler arasında ise *s1c* ve *m1* alleli

hem çocuklarda hem de yetişkinlerdeki duodenal ülserle ilişkili olarak bildirilmiştir vacA anyon transport kanalları içerisinde birikmektedir (68).

#### 2.1.5.1.3. *IceA* geni (epitel geniyle temas sonucu indüklenebilir gen)

*IceA*, gastrik epitelyumun hücreyle temas sonrası uyarılan tip II restriksiyon metilasyon (R/M) enzimlerini kodlayan *hpyI-R* genidir. Bazı kökenlerde *hpyI-R'*nin mutasyonu sonucu *ice-A2* gen alleli oluşmuştur. *ice- A2* de artan sıklıkla *iceAI*'nin yerini almaya başlamıştır (69). Ancak virülansa etkileri tam anlamıyla açıklanamamıştır. Amerika ve Hollanda gibi gelişmiş toplumlardaki kökenlerde *iceAI* varlığı, peptik ülser ve mide kanseri icin önemli bir risk faktörüyken, Doğu ve diğer Kolombiya gibi ülelerden izole edilen kökenlerde böyle bir ilişki tespit edilememiştir (70). Bazı çalışmalarda *iceA* genotipleriyle gastroduodenal patolojiler ilişkilendirilirken, bazı çalışmalarda da herhengi bir ilişki tespit edilememiştir (70–72).

Koehler ve arkadaşları (11) *iceAI* allelini mide kanserli ve MALT lenfomalı hastalardaki kökenlerde, gastritli hastalardakilere oranla 3.6 kat, *vacAsI* alleli de varsa 5.6 kat daha fazla bildirmişlerdir (11 *iceA2* geni ise gastritli veya non-ülser dispepsili hastalardaki kökenlerden daha sık olarak bildirilmiştir.*H. pylori* iceA1 ve iceA2'yi expresse etmekte ve mide epitel hücrelerine adheransla, *iceA* gen transkripsiyonunu uyarılmaktadır (11).

#### 2.1.5.1.4. *babA* ve *babB* genleri

*"babA* ve *babB* genleri *H. pylori* kökenlerinin gastrik epitelyum yüzeyindeki Lewis b kan grubu antijenlerine bağlanmasını sağlayan proteinleri kodlarlar." Bunlar sayesinde mide peristaltizmi ve asitten korunurlar. (73).

#### 2.1.5.1.5. hrgA geni

Asya orijinli gastrik kanserli hastalardan izole edilen kökenlerde *hrgA* geni daha yüksek oranda tespit edilmiştir (74).

#### 2.1.5.1.6. Diğer gen bölgeleri

*H. pylori* genomundaki en değişken bölgeyi oluşturan yeni bir ORF bölgesi mide kanserli hastalardan izole edilen kökenlerde gösterilmiştir (75,76). Kanserle ilişkili olduğu varsayılan genler (*JHP940* ve *JHP947*) ve gastrit ilişkili olduğu varsayılan ve 26695 kökeninde bulunan bir genler (*HP986*) bu bölgede bulunmaktadır. Fts membran proteini *fts* geni tarafından

kodlanmaktadır (57). Proteinlerin transportunda işlev gören proteolitik aktiviteye sahip bir proteindir. "Benzeri bir proteinin *E. coli'*de ekstrasellüler virülans faktörlerinin hücre dışına taşınmasında rol oynadığı gösterilmişti"r (77). *pldA* ve *pldC* genlerinin kodladığı PldA ve PldC proteinleri fosfolipaz aktivitesi sahip olup, mide mukusunun apikalinde bulunan fosfolipidden zengin tabakayı bozarak, bakterinin gastrik hücreler arası bağ dokuya ulaşmasını sağlarlar.

#### 2.1.5.1.7. "(HP-NAP( *H. pylori* Nötrofil-Aktive Edici Protein)"

*napA* geninin kodladığı 150 kDa büyüklüğündeki *H. pylori*-NAP proteini, nötrofillerin yüzeyinde bulunan CD11b ve CD18'in ekspresyonunu artırmak suretiyle nötrofillerin endotel hücreye bağlanmasında kolaylaştırıcı bir rol oynamaktadır (78,79, 80).

## *2.2. Helicobacter pylori* enfeksiyonu

### 2.2.1. Akut Enfeksiyon

*H. pylori* ile karşılaşma sonrası erken dönemde ortaya çıkmakta ve çoğunlukla asemptomatik seyretmektedir. Bazı hastalarda ağrı, şişkinlik gibi semptomlara neden olmaktadır. Bu belirtiler ortalama bir hafta sürmekte ve sıklıkla besin zehirlenmesi tablosuna benzetilmektedir. Gastrointestinal sisteme alınan bakteri çok uzun süre (yıllar) mide mukozasında varlığını sürdürmekte ve konağın serolojik yanıt oluşumuna yol açmaktadır (18,81,82).

### 2.2.2. Gastrit

Gastrit, mide mukozasının farklı bölgelerini etkileyebilen ve farklı derecelerde mukozal hasara neden olan enflamasyon oluşturmaktadır. Aslında, kronik gastrit tanımının tarihsel gelişimi iki aşamaya ayrılabilir: *H. pylori* izolasyonundan öncesi ve sonrası (83). Günümüzde gastrit olgularının çoğundan *H. pylori* enfeksiyonunun sorumlu olduğu artık kesindir (24,84).

*H. pylori* enfeksiyonu en sık olarak kronik gastrite neden olmaktadır. Gastrit için günümüzde Sydney Sınıflandırma Sistemi (1990) kullanılmakta olup, histopatolojik ve endoskopik olarak ikiye arılmıştır (85,86).

*H. pylori* mide dokusuna invaze olmadığı halde, kuvvetli bir enflamatuvar ve immün yanıtın oluşmasını sağlamaktadır. Poteazlar ve fosfolipazları ile glikoprotein-lipid komplekslerini

parçalamakta ayrıca vacA'sı ile epitelde hasar oluşturmaktadır. üstelik gastrik asit salgısını arttırmakta ve duodenumda bikarbonat üretiminin azalmasına neden olmaktadır (87)

*H. pylori*; çeşitli sitotoksinler ve üreaz gibi enzimlerle direkt veya otoimmun yanıt yoluyla indirekt olarak gastrik mukozada tahribata neden olmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonunun akut fazında, yoğun bakteri artışı ve gastrik enflamasyon oluşmakta ve midede yüksek düzeyde bir hipoklorhidri oluşmaktadır. Haftalar içirisinde, kronik faza geçilmekte ve enflamatuvar yanıt düşük düzeyde devam ederken, gastrik pH normal bir düzeye düşmektedir. Oluşan asemptomatik kronik enfeksiyon tablosu en sık karşılaşılan durumdur (24,81,82).

*H. pylori* ile kolonizasyon hemen hemen hem antrumda hem de korpusta mide mukozasının nötrofilik ve mononükleer hücrelerle infiltrasyonuna yol açar. Gastrit, akut veya kronik bir gastrit olarak sınıflandırılabilir ve midenin tüm kısımlarını veya sadece fundus, korpus veya antrumumu içerebilir. Kronik aktif gastrit, *H. pylori* kolonizasyonu ve diğer *H. pylori* ile ilişkili bozuklukların, özellikle de bu kronik inflamatuar süreçten (24) kaynaklanan, atrofik gastrit nedeniyle, mide kanseri riskinin artmasına neden olan predispozan bir durumdur (88).

*H. pylori* ile kolonizasyonun akut fazı, dolgunluk, mide bulantısı ve kusma gibi geçici olmayan spesifik dispeptik semptomlarla ve hem proksimal hem de distal mide mukozası veya pangastritin bazı önemli iltihaplanmasıyla ilişkili olabilir. Bu faz genellikle aylarca sürebilen hipoklorhidri ile ilişkilidir (24). Bu ilk kolonizasyonun spontan iyileşme ve gastritin kaybolması ile takip edilip edilemeyeceği veya bu durumun hangi oranda meydana geldiği net değildir. Küçük çocuklarda yapılan takip çalışmalarında bu yaş grubundaki bazı hastalarda enfeksiyonun kendiliğinden yok olabileceğini öne sürmüştür (89 – 91) . Bu durum, atrofik gastrit gelişimi gibi özel durumlar dışında yetişkinlerde görülmemiştir. Sonuç olarak, bazı kişiler *H. pylori* kolonizasyonuna eğilimlidirler, diğerleri ise kolonileşmeyi önleyebilir veya yerleşmiş enfeksiyonu temizleyebilir (24).

Aktif kronik gastrit iki şekilde görülebilmektedir:

a. *Antral Predominant Aktif Kronik Gastrit: H. pylori* genellikle asitin düşük olduğu antrumda yerleşmektedir. Mide asidinin yüksekliği yüzünden duodenal ülser de birlikte görülebilir (24,81,82,92).

*b. Korpus Predominant Aktif Kronik Gastrit:* Midede asit sekresyonunun azalması bakterinin korpus bölgesine daha kolay yerleşerek gastrit oluşturmasına neden olmaktadır. Enfeksiyon esnasında midede az miktarlarda asit salgılandığı durumlarda gastrik ülser oluşumu ile birlikte gelişebilmektedir. Midenin korpusundaki gastrit atrofiyle başlayan, intestinal metaplazi ve gastrik kansere kadar ilerleyebilen bir sürece neden olabilir (24,81,82,92).

### 2.2.3. Gastrik ülser

Bakteriyle enfekte olmuş kişilerin çoğunluğu asemptomatik olsa da, esas olarak kronik enflamasyon gelişir (93). Bununla birlikte, peptik ülser hastalığı ve gastrik karsinom, kronik olarak *H. pylori* ile enfekte olan bireylerin bir alt grubunda ortaya çıkar ve bu farklı yanıta hem bakteriye hem de konakçıya ait faktörleri katkıda bulunur (94). Dikkat çekici bir şekilde, *H. pylori* enfeksiyonu sırasında, kolonize olan deneklerin bir alt grubunda gastrik hiperklorhidri ve artan duodenal ülser riski ile ilişkili antral dominant gastrit gelişebilir. Kolonize edilmiş deneklerin başka bir alt kümesi, gastrik hipokloridya, gastrik atrofi, gastrik ülser ve artmış kardiya dışı mide kanseri riski ile ilişkili olan korpus gastriti geliştirebilir (95–97).

*H. pylori* ile peptik ülser kanaması (PUB) arasındaki ilişki kapsamlı olarak araştırılmıştır. Aslında, *H. pylori* enfeksiyonu peptik ülserin ana nedenidir ve eradikasyonun proton pompa inhibitörleri (PPI) yokluğunda ülser iyileşmesi için hayati önemi vardır (98). Ayrıca, etkili *H. pylori* eradikasyon ülser rekürrensi oranını azaltır ve bakteriyel eradikasyonun da peptik ülser kanama nüksünü önlediği düşünülmektedir (99). 2001 yılında, 2102 denek içeren 24 çalışmanın bir meta-analizinde *H. pylori* ile yok edilen hastalarda ülser iyileşme oranlarının persistan enfeksiyonu olan hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir (100). Peptik ülser kanaması ile ilgili olarak 2002 yılında yapılan bir meta-analizde ise *H. pylori* enfeksiyonunun kanama riskini artırdığı doğrulanmıştır (OR 1.79) (101).

Gastrik ülserde duodenal ülsere göre *H. pylori* kolonizasyonu daha azdır. Gastrik ülserlerin en önemli nedeni nonsteroid analjezik veya aspirin kullanımı en sık karşılaşılan nedenler olmakla birlikte *H. pylori* de sık karşılaşılan nedenlerdendir. (24,81,82,92,104,105).

### 2.2.4. Duodenal ülser

Duodenal ülserin nedenleri arasında, tedavi edilmeyen gastrit, fazla asit ve gastrin sekresyonu, mukozal direncin azalması, safra kesesi veya karaciğer yetersizliği, mide

boşalmasının hızlı meydana gelmesi, *H. pylori* enfeksiyonu, non-steroid anti-enflamatuvar ilaç kullanımı, stres ve fazla miktarda sigara kullanımı bulunmaktadır. *H. pylori* ile ilişkisinin gastrik ülsere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir (24,81,82,92).

Bir çok kohort çalışmasında, *H. pylori* enfeksiyonunun duodenal ülseri 3 ila 10 kat arttığı ayrıca duodenal ülserli hastaların % 95'inde *H. pylori* saptandığı ve tedavi sonrası duodenal veya gastrik ülser rekürrens oranlarında anlamlı derecede düşüş olduğu bildirilmiştir (81,106–108).

### 2.2.5. Gastrik karsinoma

*H. pylori* (1994) "International Agency for Research on Cancer-IARC" tarafından birinci sınıf karsinojen etken olarak kabul edilmiştir (109).

Mide kanseri dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur (110) ve son 50 yılda dünya genelinde gözlenen ölüm ve ölüm oranlarının azalmasına rağmen, dünyanın birçok yerinde kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen bir nedeni olarak yer almaktadır (111). Hastalığın erken evrelerinde semptomlar sıklıkla veya nonspesifik olduğu için mide kanseri genellikle ileri evrede teşhis edilir. Erken tanı için tarama programları geliştirmiş olan ülkelerdeki istisnalar mevcut olsa da çoğu hasta ileri evrelerde saptanmaktadır (112). Sonuç olarak, mide kanseri, genel olarak beş yıllık sağkalım oranının% 20'den az olduğu, kötü prognoz taşır (113).

Gastrik kanserlerin büyük bir çoğunluğu, yaygın olarak iki tipte, intestinal ve diffüz olarak sınıflandırılabilen adenokarsinomlardır (114); bu, Japon sınıflamasında, iyi diferansiye tip ve zayıf diferansiye tipine karşılık gelir (115,115). Genellikle kardiyak dağılım ile ilişkili ve kronik kardiyak inflamasyonu takiben midede gelişen diffüz tipin aksine, özellikle kardiyak, intestinal tip adenokarsinomların genellikle bir prekürsör lezyon dizisi ile öngörüldüğü düşünülmektedir (117). Mide kanserlerinin gelişiminde barsak tipi mide mukozasında kronik gastritle başlayan ilerleyici değişikliklerin sona erdiğini, bunu takiben multifokal atrofik gastrit ve intestinal metaplazinin geliştiği ileri sürmüştür. Bu model 1988 ve 1992'de güncellenmiştir (118,119). Aşağıdaki ardışık adımlar şu şekilde tanımlanmıştır: normal mide mukozası, yüzeysel gastrit (daha sonra tekrarlı nonatrofik gastrit, intestinal metaplazisi olmayan multifokal atrofik gastrit, tam (ince bağırsak) tipinde intestinal metaplazi, eksik (kolonik) tipte intestinal metaplazi, düşük dereceli displazi (düşük dereceli noninvazif neoplazi), yüksek dereceli displazi (yüksek dereceli noninvaziv neoplazi) ve invaziv karsinom (120).

Çeşitli çalışmalar, *H. pylori* virülans faktörlerinin mide mukozası inflamasyonunda ve dolayısıyla mide kanserinin gelişiminde önemini ortaya koymaktadır. Bunların başında, tip IV sekresyon sistemini kodlayan bir genetik lokus olan cag patojenisite adası (cagPAI) vardır (38,98). CagA pozitif kökenler ile enfeksiyon, mide mukozasının yüksek dereceli enflamasyonu ile ilişkilendirilmiştir (122–127).

Mide karsinojenezi, etiyolojik ajanın (özellikle *H. pylori*), konak özellikleri ve dış ortamla etkileşimini içermektedir (128). *H. pylori* ile ilgili olarak, birçok virülans geninin klinik sonuçları belirlediği bildirilmiştir; Potansiyel önem taşıyanlar arasında, özellikle mide kanseri ile ilgili olarak, daha önce tarif edilen sitotoksinle ilişkili *genA* (cagA), sitotoksin ilişkili *genT* (cagT), vakumda sitotoksin geni (*vacA*), duodenal- ülser teşvik edici gen (*dupA*) ve dış inflamatuar protein geni (*oipA*). Konakçının duyarlılığına ilişkin olarak, normal popülasyonun içinde önemli bir oranda bulunan çok çeşitli gen polimorfizmleri çevresel maruziyetin etkisini modifiye edebilir. Bu gen-çevresel etkileşimler dünya çapında gözlemlenen mide kanseri insidansındaki yüksek varyasyonu açıklayabilir (111).

Hastalığın gelişimi ile ilgili konakçı faktörler, konakçının *H. pylori* gibi çevresel karsinojenlere karşı savunmasını uyarabilen genetik yatkınlığı (veya direnci) veya kazanılmış etkileri gösterebilir. Ev sahibi genetik polimorfizmler (örneğin *IL-1*'de) ve bakteriyel virülans faktörleri arasındaki ilişki, özellikle cagA pozitif, *vacA s1m1* ve *oipA* pozitif kökenleri olan enfeksiyonlarda kanserin gelişiminde önemli bir role sahip gibi görünmektedir.

### 2.2.6. Mukoza İlişkili Lenfoid Doku (MALT) Lenfoma

Primer gastrik lenfoma (PGL) nadir bir tümör olup primer mide neoplazmlarının <% 5'ini oluşturur (129). PGL'nin % 50'sinden fazlasını temsil eden mukoza ilişkili lenfoid dokudan (MALT) türetilen non-Hodgkin tipi lenfomadır (130,131). Isaacson ve Wright tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır (132) ve morfolojik olarak heterojen küçük B hücrelerinden oluşan bir ekstranodal lenfomadır (36). Histolojik olarak MALT lenfomaları, mide bezlerinin invazyonu ve kısmi tahribatı ile lenfositik infiltrat ve kriptleri, yaygın olarak lamina propriaya infiltre eden ve reaktif foliküller etrafında büyüyen tümör hücrelerinin agregatları ile karakterizedir (133). Lenfoid doku genellikle midede bulunmaz ve *H. pylori* enfeksiyonuna bağlı değişimin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (134). *H. pylori* enfeksiyonu gastrik MALT lenfomalarının yaklaşık %80'i ile ilişkilidir (135). Malt lenfoma ile bakterileri ilişkilendiren ilk çalışma Wotherspoon ve ark. (1991)

(136) çalıştıkları gastrik MALT lenfoma olgularının hemen hemen hepsinde bakteri varlığını gözlemlemekle kalmamış, aynı zamanda enfeksiyonun mide mukozasında MALT birikimi ile sonuçlandığını da göstermiştir. Bu sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır (137–139). Ek olarak, *H. felis* ile enfekte edilen sıçan ve fareleri kullanan deneysel çalışmalar da bu bulguları desteklemiştir (13,49,140).

2002 yılında, toplam 780 hastanın dahil edildiği 24 çalışmanın gözden geçirilmesi ile *H. pylori* tedavisi sonrası tam lenfoma regresyonunun bulunduğunu, hastaların %35-%100'ünde eradikasyon sağlandığı ve hastalık evresine bağlı olarak tam iyileşmenin sağlandığı gösterilmiştir (137). Diğer çalışmalarda ise *H. pylori* eradikasyonu ile MALT lenfoma tanılı hastaların % 60-% 80'inde tam remisyon (141) ve % 64'üne kadar oranda 10 yıllık kalıcı remisyon sağlandığı bildirilmiştir (142). Bu çalışmaların sonucunda tüm evredeki gastrik MALT lenfoma hastalarına *H. pylori* eradikasyonu yapılması konusunda bir konsensua varılmıştır. Bu uygulama oldukça basit ve önleyici bir strateji olarak günümüzde de kullanılmaktadır (138,143).

Son zamanlarda, MALT lenfomanın moleküler temelinin anlaşılmasında ilerleme kaydedilmiş ve üç spesifik majör kromozomal translokasyon bildirilmiştir.”T (11; 18) (q21; q21) / (API2-MALT1)” mide MALT lenfomalarının “% 25-30'unda” bulunur ve ilerlemiş ve yanıt vermeyen lenfomalarla ilişkilidir (123). Aksine, bu translokasyon için negatif olan MALT lenfomaları, genellikle kromozomal 3, 12 ve 18 trizomisi de dahil olmak üzere geniş bir yelpazede kromozom anormallikleri göstermektedir (145,146). Başka bir translokasyon” t (1; 14) (p22; q32)” 'dir ve BCL10 genini ve “t (14; 18) (q32)” aşırı mutasyonu ve inaktive edici mutasyonları sayesinde tümöre artan bir otonom büyüme kapasitesi sağlar. Bu genetik anormalliklerin NF-κB sinyal yolunun aktive edilmesinin aracılık ettiği ortak bir patojenik mekanizmayı paylaştığını ve bazı MALT lenfoma vakalarında anormal BCL10 ekspresyonu ile gösterildiği gibi ek onkojenik sonuçlar sağlayabildiği gösterilmiştir (147).

### 2.2.7. Gastroözofageal Reflü Hastalığı (GÖRH)

Son yüzyılda ve özellikle son üç dekadda gastro-özofageal reflü hastalığı, Barrett özofagusu, özofagus adenokarsinomu, *H. pylori* prevalansında azalmaya rağmen artmıştır (148,149). *H. pylori* enfeksiyonunun, alt özofagus sfinkteri (AÖS) basıncında azalmaya, alt özofagus sfinkterinin geçici olarak gevşemesine, hipergastrinaemiye ve gastrik boşalmada gecikmeye neden olarak GÖRH gelişimi için kolaylaştırıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir (150).

Cag+ kökenler ve "Barrett özofagusu ve özofageal adenokarsinoma" arasında invers bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca duodenal ülserli olup *H. pylori* eradikasyon tedavisi görmüş hastalarda gastro-özofageal reflü oranı iki kat artmıştır (24,81,92).

*H. pylori* enfeksiyonu ve GÖRH ilişkisine bakıldığında; GÖRH'e karşı koruyucu bir rolünün olmadığı, ya da *H. pylori* enfeksiyonunun daha önce var olan reflü hastalığını indükleyebileceği de ileri sürülmüştür (148,151). Öte yandan, asit sekresyonunda bir azalmaya yol açtığı ve ürettiği gastrit tipi nedeniyle asit nötralizasyonu sağladığı için GÖRH'den koruyucu olduğu ileri sürülmüştür. Eradikasyon tedavilerinin uygulanması ile *H. pylori* prevalansında bir azalma meydana gelmiştir; Bununla birlikte, GÖRH sıklığı ve komplikasyonları artmıştır. Bu sonuç, *H. pylori*'nin GÖRH'den koruyucu olabileceği görüşünü desteklemektedir (152).

### 2.2.8. Fonksiyonel Dispepsi

Fonksiyonel dispepside; bulantı, kusma, anoreksi, şişkinlik, dolgunluk, sıkıntı, yanma, çabuk doyma, geğirme, reflü (yanma, rejitasyon) ve ülser (epigastrik ağrı) benzeri semptomlar görülmektedir. Fonksiyonel dispepsi ve *H. pylori* arasındaki ilişkiye bakıldığında; *H. pylori* prevalansı düşük olan ülkelerde, fonksiyonel dispepsili hastalarla yapılan çalışmalarda *H. pylori* prevalansı kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek oranlarda bulunmuştur.

### 2.2.9. Gastrointestinal sistem dışı hastalıklar

*"*Demir eksikliği anemisi, idiopatik trombositopenik purpura (İTP), kardiyovasküler hastalıklar (iskemik kalp hastalığı), nörolojik hastalıklar (felç, parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı), obezite, deri hastalıkları gibi hastalıklar da H. pylori ile ilişkilendirilmiştir." Sebebi bilinmeyen demir eksikliği anemisi ve İTP tanılı hastalarda, *H. pylori* eradikasyonu ile olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (153).

Nedeni bilinmeyen demir eksikliği anemili olgularda *H. pylori* tedavisinin başarılı sonuçlar verdiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (155–157). Avrupa *H. pylori* çalışma grubu da nedeni açıklanamayan demir eksikliği anemisinde *H. pylori* eradikasyonunu önermektedir (158).

*H. pylori'nin* iskemik kalp hastalığında bir rolünün olabileceğinin gösterildiği araştırmalar bulunmaktadır (132,137,138). Akut koroner kalp hastalıklarında anti-*H. pylori* IgG antikorlarının artış gösterdiği bildirilmiştir (139). Ayrıca anti-*H. pylori* IgG pozitifliği ile yüksek trigliserid

seviyeleri arasında bir korelasyonun bulunabileceği de bildirilmiştir (162). *H. pylori* tedavisinin iskemik kalp hastalığı insidansında bir azalma oluşturabileceği düşünülmektedir (163).

Ayrıca, Cag A (+) *H. pylori* kökenlerinin iskemik felç riskini artırdığı da bildirilmiştir (164,165) *H. pylori* (+) idiyopatik parkinsonizmde *H. pylori* tedavisi hastaların L-dopa tedavisine yanıtı iyileştirmektedir (166). *H. pylori*'nin mide dışı diğer hastalıklarla ilişkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmakta olup tartışmalar devam etmektedir.

### 2.2.10. *H. pylori* enfeksiyonunda tanı

Tanı testleri genel olarak invaziv ve non-invaziv testler olarak ikiye ayrılmaktadır. Doğru tanı için tek test yeterli değildir. Kullanılacak testin uygulanabilirliği,duyarlılık ve özgüllüğü, fiyatı testlerin seçimi için önemli kritelerdir. Tanı için hangi yöntemin kullanılacağı ise klinik hedefe, laboratuvarın alt yapısına, maliyete ve uzmanın deneyimine göre değişmektedir. (8,171)

*H. pylori* enfeksiyonlarının tedavi ve tanı kriterleri için yayınlanan Maastrich V uzlaşı raporunda; enfeksiyonun sporadik olarak örüldüğü ülkelerde ilk olarak hastaların endoskopide ön tanılarının konularak alınan biyopsi örneğinin laboratuvar tanısının yapılması önerilmiştir (167). Noninvaziv testler ise ikinci derecede tanı kriterleri olarak önerilmektedir. Enfeksiyonun endemik olduğu ülkelerde özel hasta grupları dışında tanıda endoskopi, önerilmemekte, klinik bulgulara dayanan tanının noninvaziv testlerle desteklenmesi tavsiye edilmektedir (167).

Biyopsi bazlı invaziv testlerle tanı şikayeti olan bütün hastalar için önerilmekte ve endoskopik değerlendirme sonucunda tanı için hangi yontemin daha uygun olacağını belirlenmektedir (8,34).

*H. pylori* enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısında; dışkı antijen testleri, C13 veya C14 izotoplarının araştırıldığı üre nefes testleri (ÜNT) ve çeşitli vücut sıvılarında *H. pylori* antijenlerine karşı antikorların arandığı serolojik testleri de içeren noninvaziv yöntemler ve biyopsi örneklerinin histolojik incelemesi, hızlı üreaz testleri, kültür ve nükleik asit amplifikasyon testlerini içeren invaziv yöntemler kullanılmaktadır (168-170).

#### *2.2.10.1. İnvaziv tanı yöntemleri*

##### 2.2.10.1.1. Hızlı üreaz testi

Mide biyopsi örneklerinde üreaz enzimi araştırılır ve bu testlerin duyarlılığı midedeki bakteri yoğunluğu ile ilişkilidir (172). Üreaz ortamdaki üreyi amonyak ve bikarbonata parçalayarak pH düzeyini yükseltir. pH indikatörü kullanılarak ortamın renginin değişmesine göre test değerlendirilir (173). "CLO test", "HUT test" ve "Hp fast" ticari kitlerdir ve üreaz testi 15 dakikada hızlı bir şekilde sonuç vermektedir (174) .

##### 2.2.10.1.2. Histopatolojik inceleme

Altın standart yöntemlerdendir (175,176). Hmatoksilen-eozin boyama ile *H. pylori* preparatı inceleyen patoloğun tecrübesine göre tespit edilebilir. (51,177). Gastroduodenal patolojinin derecelendirilmesi ve premalign değişikliklerin saptanmasını da sağlayabilir. Monoklonal veya poliklonal floresan anti-*H. pylori* antikorları ile immunohistokimyasal boyama da yapılabilir (178).

##### 2.2.10.1.3. Kültür

Altın standart yöntemlerdendir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri ve tiplendirme için uygundur (179–181). *H. pylori* uzun bir inkübasyon süresine ihtiyaç göstermektedir (3-10 gün). Bbiyopsi için örnekler, en sık bulunduğu antrum bölgesinden alınır.Tedaviyle midedeki dağılımını değişebileceği için fundustan da örnek alınabilir. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2018 v 8,1 ile klaritromisin için minimal inhibisyon konsantrasyon oranı "(MİK) $\leq$0.25 mg/L ise duyarlı, >0,5 mg/L" ise dirençli olarak belirlenmiştir (182,183).

##### 2.2.10.1.4. Moleküler tanı yöntemleri

###### 2.2.10.1.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Bu yöntem, biyopsi, dental plak, dışkı gibi klinik örnekler için kullanılmaktadır (182,184). Tedavi sonrası nükslerinin tespitinde ve onları re-enfeksiyondan ayırmak için, ayrıca bakteri sayısının çok az olduğu dental plak, dışkı gibi örnekler için kullanılmaktadır. Mutasyonlarla

birlikte *cagA, vacA, iceA* gibi virulans faktörlerinin de saptanabilmesi ayrıca canlı bakterilere ihtiyaç duyulmaması gibi avantajları bulunmaktadır (28,71).

#### 2.2.10.1.4.2. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

"Real-time" PCR, TaqMan yöntemi bakteri miktarını saptamaktadır. (188) "Real-time PCR"ın ile 23S rRNA'nın peptidiltransferaz bölgesinde oluşan nokta mutasyonlarının neden olduğu klaritromisin direnci kısa sürede saptanmaktadır (189).

### *2.2.10.2.* Non invaziv tanı yöntemleri

#### 2.2.10.2.1. "Üre nefes testi (ÜNT)"

Atın standart yöntemlerdendir. *H. pylori*,ağızdan alınan C13 veya C14 işaretli üreyi, üreaz enzimi ile parçalar. Meydana gelen işaretli $CO_2$'in tespit edilir. Tedavi izleminde de kullanılmakta olup *H. heilmannii* varsa yalancı pozitiflik gösterebilir. Antibiyotikler, bizmut tuzları, $H_2$ reseptör blokerleri veya proton pompa inhibitörlerinin yalancı megatifliğe neden olabilirler (168,190)

#### 2.2.10.2.2. Seroloji

##### *2.2.10.2.2.1. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)"*

Serum, tükürük ve idrardaki IgG ve IgA antikorlarını saptayacak tanısal testler mevcuttur (191). *H. pylori*etedavisi ile IgG ve IgA düzeyleri düşer. Düşük seviyelerde IgG düzeyleri ise tedaviden sonra aylarca tespit edilebilir. Aktif ve geçirilmiş *H. pylori* enfeksiyonlarını net olarak ayırt edemezler. Çok sayıda kişinin tarandığı epidemiyolojik çalışmalar için uygundurlar (14,192).

#### 2.2.10.2.3. Dışkı örneklerinde kullanılan tanı yöntemleri

##### 2.2.10.2.3.1. Dışkı Kültürü

*H. pylori*'nin dışkıdan izole edilmesi oldukça zordur (179,193). Çeşitli flora bakterilerinin ve yüksek oranda safra asitlerinin dışkıda bulunması dışkıdan izolasyonunu güçleştirmektedir . (193).

##### 2.2.10.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri

ELISA temelli testlerdir (64,194). Tedavi öncesi tanıda dışkı antijen testleri ya da ÜNT önerilmektedir. Tedavi sonrası izlemde ise ÜNT yerine kullanılabilir (2). Tedavi sonrası 4 hafta

içerisinde kronik enfeksiyon tespitinde de duyarlılığı ve spesifikliği yüksektir (169,170). Poliklonal ve monoklonal antijen testleri bulunmaktadır.

#### *2.2.10.2.3.3. · Dışkı PCR*

Bakteri sayısının az olduğu klinik örneklerden *H. pylori* nükleik asitlerinin saptanması için kullanılan testler olup farklı genomik bölgelere spesifik PCR testleri tanımlanmıştır (14,57,197).

#### *2.2.10.2.3.4. Dışkı Real Time PCR*

Dışkı örnekleri için ve ayrıca klaritromisin direncinin tespitinde Real-time PCR tekniği kullanılabilir (188).

### 2.2.10.2.4. İdrar antikor testleri

İmmunokromatagrafi ve ELISA temelli iki tip EIA testi bulunmaktadır. Bu immunotestlerin tarama için uygun olup olmadığı tartışılmakta olup büyük populasyonlardaki epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (198,199).

### 2.2.11. *H. pylori* enfeksiyonunda tedavi

*H. pylori* dünyadaki en yaygın enfeksiyon etkeni olup uygun ve etkili olmayan tedavi sonucunda *H. pylori* direnc kazanmakta ve dirençli *H. pylori* kökenleri toplumda yayılmaktadır (173).

*H. pylori*'nin mutlaka eradike edilmesi gereken durumlar "Avrupa *Helicobacter* Çalışma Grubu"(Eropean *Helicobacter pylori* Study Group) (EHPSG)'nun 2005 yılı uzlaşı raporunda belirtilmiştir (171,200). *H. pylori* eradikasyonunda günümüzde çeşitli ilaçların çoğunun kombine edildiği çok sayıda tedavi protokolleri kullanılabilmektedir (200).

Standart üçlü tedavi protokolü: "[proton pompa inhibitörü (PPI) 2x1 + amoksisilin (veya metronidazol) 2x1 + klaritromisin 2x1]" şeklindedir.

2000'li yıllardan önce %95'in üzerinde eradikasyon oranı sağlarken günümüzde bu oran antibiyotik direnci nedeniyle %80'lerin altına (%50-79) düşmüştür (201–203). Klaritromisin ve metronidazol direncinin yüksek olduğu toplumlarda standart üçlü tedavinin ilk seçenek olarak kullanılmaması önerilmektedir (3). Bu toplumlar için bizmut + PPI + iki antibiyotik (tetrasiklin + metronidazol) veya PPI + üç antibiyotik (amoksisilin, metronidazol, klaritromisin) içeren dörtlü eradikasyon protokolleri önerilmiştir (190,204). Üç antibiyotik içeren rejimlerde farklı uygulama

şekilleri mevcuttur. Bu tedavi protokolleri antibiyotiklerin kullanım zamanına göre isimlendirilmişlerdir:

A. **Ardışık Tedavi Protokolü:** Standart doz PPI tedavisine ilaveten ilk hafta amoksisilin, ikinci hafta diğer iki antibiyotik (metronidazol, klaitromisin) kullanılır.
B. **Konkomitan Tedavi Protokolü:** Standart doz PPI tedavisi ile birlikte üç antibiyotik (amoksisilin, metronidazol, klaritromisin) de aynı zaman diliminde kullanılır.
C. **Hibrid Tedavi Protokolü:** Standart doz PPI tedavisi ile birlikte ilk hafta amoksisilin, ikinci hafta amoksisiline ilaveten diğer iki antibiyotik (metronidazol, klaitromisin) kullanılır.

### 2.2.12. *H. pylori* enfeksiyonunda antibiyotik direnci

*"H. pylori,* glikopeptidlere, cefsulidine, polimiksinlere, nalidiksik aside, trimetoprime, sulfonomidlere, nistatine, amfoterisin B'ye, sikloheksimide doğal olarak dirençlidir (205)." "Doğal *H. pylori* kökenleri ise sefsulidin dışı beta laktamlara, fosfomisine, makrolidlere, aminoglikozidlere, tetrasikline, kloramfenikole, rifampisine, fluorokinolonlara, 5-nitroimidazollere ise duyarlıdır (198)." Bşlangıçta % 80-90 olan tedavi başarısı günümüzde % 70-80'lere, hatta bazı ülkelerde % 60 düzeyine kadar inmiştir (206).

*H. pylori*'de nadir görülen amoksisilin direncinde *pbp- 1a* geninde, penisilinin hücre içersinei alınmasını engelleyen bir mutasyon bulunmaktadır (207). Makrolidler, 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesindeki ribozomlara bağlanırlar. *H. pylori* direnci en sık olarak 2 nükleotiddeki nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. 2142 (A2142G ve A2142C) ve 2143 (A2143G) nükleotidlerindeki bu mutasyonlar sonucunda makrolidlerin bağlanması engellenmektedir (208). Tetrasiklinler, ribozomun 30 S alt birimine bağlanarak protein sentezini engellerler ve tetrasiklin direncinde ilaç atım proteinleri, ilacın yeterli konsantrasyona ulaşmasını engelleyerek de önemli bir rol oynamaktadırlar (209). "Florokinolonlar *gyrA* geni tarafından kodlanan DNA giraz enziminin A subünitesini inhibe ederek etki ederler. Kinolon dirençli *H. pylori*'lerde bu gende mutasyonlar saptanmıştır (210)." "Nitroimidazol grubu antibiyotikler bakteriyel DNA ile etkileşime girerek etkilerini gösterirler. Bu etkileşim için rdxA önemli bir proteindir. Bu proteindeki mutasyonlar bu ilaçları etkisiz kılabilir (211)." "Ayrıca ilaç atım proteinlerinin de nitroimidazol direncinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Rifampin *rpoB* geni

ile kodlanan DNA bağımlı RNA polimerazın B subünitesini inhibe ederek etki gösterir. *M. tuberculosis* ve *E.coli*'de de olduğu gibi *H. pylori*'de de bu bölgedeki mutasyonlar rifampin direncinden sorumludurlar (212)." "Tedaviye yanıtı belirlemede hastaya ait özellikler de çok önemlidir. Sitokrom P450 2C19 (CYP2C19) PPI'ları metabolize eden enzimdir. Bu gendeki polimorfizm, PPI metabolizmasını değiştirerek tedaviye yanıtı değiştirebilir (213)." "Üç farklı CYP2C19 genotipi tanımlanmıştır; hızlı metabolize eden, orta hızlı metabolize eden ve yavaş metabolize eden. PPI'ları hızlı metabolize eden grupta standart üçlü tedavi ile eradikasyon oranları düşüktür . Batı toplumlarında hızlı metabolize eden genotip daha sık görülürken, Asya'da yavaş metabolize eden genotip daha yaygındır (213, 214)."

Sigara içmenin asit sekresyonunu arttırdığı bilinmekte olup tedaviyi etkiler (215). Avrupa ülkelerinde metronidazol direnci %20-40, klaritromisin direnci %2–15 oranlarındadır (216). Türkiye çalışmalarında ise direnci %27'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir (217). Metronidazol direnci, kadınlarda jinekolojik enfeksiyonlarda tinidazol grubu antibiyotiklerin sıklıkla kullanılmasından dolayı daha sık olarak gözlenmektedir. *H. pylori* enfeksiyonlarında çoklu ilaç direnci az karşılasılan bir durum olup, yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda çalışmalarda bildirilmeye başlanmıştır (4,216,218).

#### *2.2.12.1.* Klaritromisin direnci

Klaritromisin, makrolid grubuna dahil bir antibiyotiktir. Klaritromisin gastrik difüzyonunun iyi olması ve asit baskılayıcı tedaviler ile sinerjizm göstermesi nedeni ile *H. pyloriye* karşı tek başına kullanıldığında en etkili ilaç olarak bilinmektedir. Dezavantajları ise birçok ülkede hızla artan direnç gelişimi ve yüksek maliyetidir (170,219,220). Makrolidler bakteri ribozomuna bağlanarak etkilerini gösterirler. Klaritromisinin etkisi, 50S ribozomal RNA'ya bağlanıp protein sentezini inhibe etmesiyle ortaya çıkmaktadır (221).

23S rRNA'nın V bölgesindeki nokta mutasyonlar klaritromisin ve peptidil transferaz koluna olan afinitenin bozulmasına neden olmakta ve klaritromisinin 23S ribozomal RNA etkileşiminin inhibe edilmesi sonucunda klaritromisin direnci oluşmaktadır (222,223). A2142G nokta mutasyonu A2143G nokta mutasyonuna kıyasla 1 ile 8 kat klaritromisin MIC düzeylerine sahiptir (28,197,224).

İspanyada yapılan bir çalışmada A2143G nokta mutasyonu için MIC değeri: 4-8 µ/ml, A2142G nokta mutasyonu için 16-64µg/ml ve A2142C nokta mutasyonu için 8-64µg/ml olarak

bulunmuştur (225). Bununla birlikte A2143G nokta mutasyonu düşük makrolid MIC değerlerine karşın A2142G nokta mutasyonuna kıyasla A2143G mutasyonu olan kökenlerde tedavi başarısızlığı oldukça önemli bir sorundur. Francavilla ve ark. yaptıkları bir çalışmada bir haftalık klaritromisin bazlı *H. pylori* eradikasyonu tedavisi ile A2143G nokta mutasyonu olan çocuklarda eradikasyon başarısı 50% iken mutasyon olmayanlarda ise 89% olarak bulunmuştur (222). Bununla birlikte son zamanlarda bazı farklı klaritromisin direncine neden olan mutasyonlar bildirilmektedir. Son zamanlarda A2115G, G2141A, T2717C nokta mutasyonları son yıllarda tanımlanmış ve direnç ile olan ilişkisi tam olarak tanımlanmamıştır (215 ,226).

A2115G, G2141A, G2172T, T2182C, T2190C, C2195T, A2223G, G2224A, G2245T, G2254T, T2289C ve C2611A nokta mutasyonları son yıllardaki araştırmslarda tespit edilmiş olup klaritromisin direnci ile ilişkilidirler (227–230). Yapılan bir çalışmada Phe-Arg-β-naftilamid isimli efflüks pompa inhibitörünün azalmış MIC antibiyotik konsantrasyonlarına neden olduğu gösterilmiştir (231). PPI'ler efflüks pompa inhibitörleri ile benzer yapısal özelliklere sahip olduklarından *H. pylori* efflüks pompa inhibisyonunu kısıtlayabilmekte ve bakterinin antibiyotiklere daha duyarlı olmasına neden olmaktadırlar (232,233). Japonyada yapılan bir çalışmada 15 farklı klaritromisin dirençli *H. pylori* kökeninde 23S rRNA nokta mutasyonu aynı zamanda efflux pompa direnci ile birlikte bulunmuştur (231).

Gelişmiş ülkelerde, klaritromisine dirençli *H. pylori* kökenlerinin %10 civarında olduuğu bildirilmiştir(180). Gelişmekte olan ülkelerde ise bu oran daha yüksek olup 25-50% arasında değişmektedir (19,234). Budirençi Amerika ve Avrupa'da %5-15 arasında değişmektedir (185,235). Türkiye'de ise, son yıllarda %50 veya daha yüksek olduğu bildirilen çalışmalar bulunmaktadır. en  civarında ve oldukça yüksek oranlarda olduğu bildirilmiştir (25,217,236,237).

# 3. GEREÇ YÖNTEM

## *2.3.* Çalışma alanı

Deneysel bir çalışma olarak planlanan tez projemiz; İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi (BAP) tarafından desteklenen "Helicobacter pylori izolatlarında antimikrobiyal dirençten sorumlıu mutasyonların dağılımı: moleküler temelli bir sürveyas çalışması" başlıklı proje kapsamında, Haziran 2014-Haziran 2017 tarihleri arasında "Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç hastalıklar Anabilim Dalı Gastroentoloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesi ve İstanbul Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesi'ne" başvuran başvuran dispeptik şikayetleri ve endoskopi endikasyonu olan hastaların mide antrum ve korpus biyopsi örneklerinden üretilen 63 *H. pylori* kökeni ile yürütüldü

**Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri**

Çalışmaya ilgili kurumlara çeşitli gastrointestinal sistem şikayetleri ile başvuran hastalar arasından; 18 yaş ve üzeri, daha önce mide operasyonu geçirmemiş, *H. pylori* eradikasyon tedavisi almamış ve son 2 hafta içerisinde herhangi bir antibiyotik ya da antisekretuvar ilaç, bizmut tuzları veya sükralfat kullanmamış ayrıca, kanama ve pıhtılaşma bozuklukları hikayesi olmayan hastalar dahil edilmiştir.

Çalışma protokolü, "İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'da "A-15 karar No ile onaylanmış ve tüm hastalar çalışmaya onam vermişlerdir.

## *2.4.* Çalışma Planı

Çalışma planımız aşağıdaki algoritma doğrultusunda yürütülmüştür.

1. "İ.Ü-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (CTF), Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı" laboratuvarı bünyesinde; biyopsi örneklerinden yapılan kültür sonucunda üreyen *H. pylori* kökenlerinden stoklanarak saklanan bakterilerden 9 köken tekrar ekim yapılarak çoğaltıdı, klaritromisin MİK değerleri saptandı ve daha önce çoğaltılıp MİK değerleri belirlenmiş 54 kökenle birlikte çalışmaya dahil edildi.
2. Kültürde üreyen ve MİK değerleri berlirlenen 63 *H. pylori* kökeni (İÜC CTF Tıbbi Mikrobiyoloji ABD) PCR çalışmaları için ekstraksiyonları hazırlanmak üzere Beykent

Üniversitesi Tıp Takültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (BÜTFTAD) laboratuvarlarına götürüldü.

3. Ekstraksyonları yapılan (BÜTFTAD) 63 *H.pylori* kökeni RT- PCR metoduyla *H .pylori* DNA'ları araştırılarak doğrulandı.
4. 63 *H. pylori* kökeninde real-time PCR yöntemi ile klaritromisin direnç nedeni A2115G, G2141A, A2144T yeni nokta mutasyonları hizmet alımı ile özel bir laboratuvarda şahsımın (MK) ve ikincil gönüllü danışmanım (MD) katılımıyla saptandı ve sonuçlar danışmanımla (BK) irdelenip ve yorumlandı.

## *2.5. H. pylori* Kültürü Aşaması

### 2.5.1. *H. pylori* Kültürü İçin Kullanılan Besiyerleri ve Reaktifler

#### *2.5.1.1. Helicobacter Agar Besiyeri*

Agarlar petrv ilere dökülmüş kullanıma hazır biçimde Salubris A.Ş.'den temin edildi. *Helicobacter* Agar (Salubris, Türkiye) ürün içeriği şöyledir:

**a. Brain Heart Infusion Agar ( Lab M, UK)**

1 Litre İçin Kullanılan Dehidre Miktarı… ..... 49 g

1 Litre İçin Kullanılan Dehidre İçeriği:

Agar No.2…..... 12 g

Brain heart infüzyon solid..... 17,5 g

Triptoz..... 10 g

Glukoz..... 2 g

Sodyum klorid…..... 5 g

Disodyum hidrojen fosfat… .....2,5 g

pH: 7,4±0,2

**b. *H. pylori* Selective Supplement (Oxoid, UK)**

1 Litre içerisinde kullanılan supplement miktarı… .....2 şişe

1 şişe içeriği

Vankomisin… ..... 5 mg

Trimetoprim ..... 2.5 mg

Sefsulodin… .....2.5 mg

Amfoterisin B.....2.5 mg

**c.** % 6- 6,5 at kanı

***2.5.1.2. Üre Agar Besiyeri***

Üre agar…..... 24 g

Üre baz ..... 50 ml

Distile su… .....950 ml

24 g üre agar (HiMedia, Çin) 950 ml distile suda eritilerek pH= 6.8'e ayarlandı. Agar solüsyonu, soğuyunca, steril şartlarda 50 ml üre baz (HiMedia, Çin) ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 4-5 ml miktarında tüplere dağıtıldı. Tüpler eğri pozisyonda bırakılarak katılaşmaları sağlandı. Üre agar besiyerindeki pembe renk değişikliği pozitif olarak değerlendirildi.

***2.5.1.3. Oksidaz Deneyi***

Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür..... 0,1 g

Distile su. .....10 ml

Oksidaz deneyi için, tetrametil-para-fenilen-diamin-dihidroklorid (%1) (Fluka, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanıldı. Fltre kağıdlarının üzerlerine solüsyon damlatdı ve sonra, koloniler öze ile kağıdına yayıldı. 15 sn içerisinde mavi-siyah renk oluşması pozitif olarak değerlendirildi. Test değerlendirilirken *P. aeruginosa* pozitif kontrol (mavi-siyah renk), *E.coli* ise negatif kontrol (renk değişmez) olarak kullanıldı

#### *2.5.1.4. Katalaz Deneyi*

Kültürde üreyen kolonilerden bir tanesi dikkatli bir şekilde alınarak temiz bir preparat üzerine transfer edildi. Üzerine bir damla % 3'lük $H_2O_2$ (Merck, Almanya) damlatıldı. Hidrojen peroksid damlatıldıktan hemen sonra baloncuk oluşumu varsa deney pozitif olarak değerlendirildi.

### 2.5.2. *H. pylori* Kültürü

-80º de stoklanarak saklanan *H. pylori* kökenlerinin *Helicobacter* agar besiyerine ayrı ayrı ekimleri yapıldı. Besiyerleri % 5 $CO_2$'li etüvde (Sanyo, Panasonic, USA) mikroaerofilik ortamda, 37 $^0$C'de minimum 5-7 gün inkübe edildi. Bu süre zarfında besiyerinde üreyen bakterilerin koloni morfolojileri incelenerek şüpheli kolonilerden Gram boyama, üreaz, oksidaz ve katalaz deneyleri yapıldı. *Helicobacter* agar besiyerinde üreyen şeffaf su damlası şeklindeki kolonilerden hazırlanan preparatların Gram boyamasında kıvrımlı Gram negatif çomaklar şüpheli *H. pylori* olarak değerlendirildi. Bu kolonilerden yapılan üreaz, oksidaz ve katalaz deneyleri pozitif sonuç veren bakteriler *H. pylori* olarak tanımlandı.

3.4.3. *H. pylori* Klaritromisin Duyarlılık Testi

*H. pylori* kültüründe üreyen kökenlere E-test yöntemi ile klaritromisin duyarlılık testi yapıldı. *H. pylori* kökenleri %10 at kanı ilave edilmiş Mueller-Hinton agar besiyerinde 3 McFarland yoğunluğunda ekim yapılarak, klaritromisin E-test stripi (BioMerieux, Marci L'étoile Fransa) petriye yerleştirildi ve 35 ± 2°C/ mikroaerofilik ortamda 72 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre sonuçlar değerlendirildi. Çalışmamızda *H. pylori* ATCC 43504 kökeni standart kontrol olarak kullanıldı (238)".

### 2.5.3. *H. pylori* Kültüründen Ekstraksiyon İşlemi İçin Örnek Hazırlanması

Kültürde üreyen *H. pylori* kökenlerinden PCR deneyleri için kullanılmak üzere ependorflarda 1000 µl DNaz RNaz içermeyen su ile süspansiyon hale getirilerek deneyler yapılıncaya kadar -20 $^0$C'de saklandı.

## *2.6. H. pylori'*ye Dönük Moleküler Deney Aşamaları

*H. pylori* kökenlerinden DNA ekstraksiyonu yapıldı, RT- PCR metoduyla *ureC* gen bölgesi ve G2141A, A2144T ve A2115G nokta mutasyonları araştırıldı.

### 3.5.1 *H. pylori* DNA ekstraksyonu

*H. pylori* bakteri DNA'sının ekstraksiyonu için; taze pasajlardan alınan bakteriler 0,5 McFarland'a göre ayarlandı. Ekstraksiyon High-Pure PCR Template preparation kit (Roche Diagnostics-GmBH, Mannheim – Almanya) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapılarak 100 µl DNA elde edildi.

1. Kuru ısı bloğu açıldı ve 70 C'a getirildi.
2. Kitin içindeki Proteinaz K, 4.5 ml distile su kullanılarak çözüldü.
3. Kitin içinde bulunan inhibitör removal tamponu, 20 ml saf etanol kullanılarak çözüldü ve karıştırıldı.
4. Kitin içinde bulunan yıkama tamponu, 80 ml saf etanol kullanılarak karıştırıldı.
5. Ekstraksiyon kitinin içinde bulunan elution tamponu, iki ependorf tüpüne konularak 70 C'deki kuru ısı bloğuna yerleştirildi.
6. 200 µl bakteri çözeltisi ependorflara alındı ve üzerlerine 200 µl Doku eritmr tamponu ve 40 µl proteinaz K eklendi.
7. 55oC'da 1 saat inkübe edildi.
8. 200 ul lysis binding buffer ilave edildi.
9. Ependorflar vortekslenerek kuru ısı bloğunda 70oC'da 10 dakika inkübe edildi.
10. 70oC'da inkübasyon sonrası 100 ul isoproponol ilave edildi.
11. Ependorflar vortekslenerek tüm solüsyon High pure filtre ihtiva eden kolonlara aktarıldı.
12. 1 dakika 8000xg'de santrifüj edilerek kolonun altındaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü takıldı.
13. 500 ul inhibitör removal buffer ilave edildi.
14. 1 dakika 8000xg'de santrifüj edilerek kolonun altındaki toplama tüp atıldı ve yeni toplama tüpü takıldı.
15. 500 µl yıkama tamponu ilave edildi.
16. 1 dakika 8000xg'de santrifüj edilerek kolonun altındaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü takıldı.
17. 500 ul yıkama tamponu eklendi.
18. 1 dakika 8000xg'de santrifüj edilerek kolonun altındaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü takıldı.
19. 1 dakika 13000xg'de santrifüj edilerek kolonun altındaki toplama tüpü atıldı ve kolon ml'lik ependorf tüplerin içine konuldu.
20. Kuru ısı bloğunda 70oC'da bekletilen elüsyon buffer'dan 100 ul ilave edildi.
21. 1 dakika 8000 xg'de santrifüjden sonra DNA elde edildi. Elüe edilmiş DNA -15/-25oC'de saklandı.

**“DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi**

DNA örneklerinin miktarı ve saflık derecesi, UV spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında okuma değerleri alınarak tespit edildi. 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbsiyon değerleri (A260)solüsyon içerisindeki DNA ve RNA miktarlarını ve 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbsiyon değerleri (A280) ise protein miktarlarını göstermektedir. DNA ve RNA örneklerinin saflık derecesi 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oranın *(A260 / A280)* hesaplanmasıyla tespit edildi (239). Elde edilen nükleik asitlerin, 1 ul’si kullanılarak Epoch spektrofotometrede (BioTek Instruments, Inc., Vermont, ABD) okumalar yapıldı (239).”

### 3.5.2 *H. pylori ureC* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

“Ekstraksiyonu yapılan örneklerde, *H. pylori* DNA’sını araştırmak amacıyla *H. pylori* - QLS 1.0 *H. pylori* DNA saptama Kiti (Fluorion, Türkiye) kullanılarak real-time PCR yöntemi uygulandı. *H. pylori* genomunun ureC geninin 156 bp’lik bölümüreal-time PCR cihazında (FDS, Fluorion, Türkiye) çoğaltıldı. PCR ürünü, floresan bir boya olan SYBR-green aracılığıyla reaksiyon sırasında görüntülendi. Çoğalan DNA’nın hedef bölge olduğu, erime eğrisi analizi yoluyla kesinleştirildi (171).”

Kit içeriği aşağıdaki gibidir:

$dH_2O$

SYBR PCR Mix

Deteksiyon Mix 1

Pozitif Kontrol

$MgCl_2$

Her bir örnek için reaksiyon Tablo 3-2’ deki oranlarda hazırlandı.

*Tablo 3-2: H. pylori ureC gen bölgesinin tespiti için kullanılan real-time PCR reaksiyonu hacimleri*

| | |
|---|---|
| SYBR PCR Mix | 12,5 µl |
| Deteksiyon Mix 1 | 1 µl |
| $MgCl_2$ | 3 µl |
| Örnek DNA | 10 µl |
| Toplam Hacim | 26,5 µl |

Pozitif kontrol olarak, kit içeriğinde bulunan pozitif kontrol kullanılırken, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. Amplifikasyon için örnekler real-time PCR cihazına yerleştirilerek *H. pylori* - QLS.tmo programı seçildi. Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

| | | | |
|---|---|---|---|
| İlk denatürasyon | 95°C | 13:30 dk. | |
| Denatürasyon | 95°C | 00:30 dk. | 50 döngü |
| Primer bağlanma ve sentez | 54°C | 00:45 dk. | |
| Uzama | 72°C | 00:30 dk | (Real-time veri toplama) |
| | 60°C | 01:00 dk | 65 döngü (+0,5 $^0$C/döngü) |
| | 60°C | 00:15 dk | (Erime eğrisi analizi) |

*H. pylori* - QLS.tmo programı sona erdiğinde yazılımın otomatik olarak çizdiği eşik eğrisini kesen örnekler pozitif, bu çizginin altında kalan örnekler ise negatif olarak değerlendirildi. Real-time analiz ekranında primer dimerleri yüzünden artış gösteren ve eşik çizgisini kesen örneklerin yanlış pozitif olarak değerlendirilmemeleri için erime eğrisi (melt curve) analizi yapıldı. *H. pylori* genomuna özgü çoğaltılan bölge erime eğrisi analizinde 75 $^0$C'de (±2 $^0$C) erime piki verdi. 75 $^0$C'de pik vermeyen örnekler eşik çizgisini geçseler de negatif olarak değerlendirildi.

## *2.7. H. pylori* kökenlerinde A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonlarının Real-time PCR ile Tespiti

### 2.7.1. A2115G nokta mutasyonu için real-time PCR çalışması

*H. pylori* DNA'ları A2115G nokta mutasyonu için Tablo 1'de belirtilen Primer – Probe'larla (Integrated DNA tech. USA) ve LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics Mannheim, Almanya) kiti ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda real-time PCR metodu ile LightCycler 480 II (Roche Diagnostics Mannheim, Almanya) cihazında çalışıldı.

***Tablo 1. Çalışmada A2115G için kullanılan primer-prob'lar.***

| primer/probe Adı | Oligonukleotid dizisi (5'-3') | **Kaynak** |
|---|---|---|
| 23SA2115G-2115F | 5'-GCTGTCTCAACCAGAGATTCAGT-3' | 204 |
| 23SA2115G-2115R | 5'-CTTGCCGCGGGTAGGA-3' | 204 |
| VIC | 5'-AAGACGGAAAGACC-3' sokak-tipi DNA | 204 |
| FAM | 5'-AGGTGAGAATTCC-3' mutasyona uğramış DNA için | 204 |

Total hacim 20 ul olacak şekilde Real-time PCR protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirildi;

1. Tablo 2'deki deki oranlarda 15 ul miks hazırlandı.
2. Üzerine 5 ul template DNA eklendi.
3. LightCycler 480 sisteminde tablo xx'deki gibi real-time PCR protokolü ile çalışma gerçekleştirildi.
4. Sonuçlar LightCycler 480 1.5.1.62 software'inde Endpoint genotyping analizi üzerinden değerlendirildi.

***Tablo 2. A2115G Real-time PCR reaksiyonu için kullanılan miks hacimleri.***

| | |
|---|---|
| LC480 Probe master karışım | 10 ul |
| RNAaz/DNAaz bulunmayan steril su | 3 ul |
| Primer – Probe karışım | 2 ul |
| Toplam | 15 ul |

*Tablo 3. A2115G için Real-time PCR metodu.*

| Fazlar | | Siklus sayıları | Zaman | Sıcaklık | Okuma |
|---|---|---|---|---|---|
| **Enzim Aktivasyonu** | | 1 | 10 dk. | 95ºC | - |
| **Çoğaltma** | **Denatürasyon** | 45 | 15 sn. | 95ºC | - |
| | **Veri toplama** | | 30 sn. | 60ºC | - |
| | **Uzama** | | 15 sn. | 72ºC | Tekli |

### 2.7.2. G2141A nokta mutasyonu için real-time PCR çalışması

Elde edilen DNA'lardan G2141A nokta mutasyonunun tespiti için Tablo 4'te belirtilen Primer ve Probe'lar (Integrated DNA tech. ABD) ve LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak RT-PCR çalışması LightCycler 480 II (Roche Diagnostics Mannheim, Almanya) sistemi kullanılarak çalışıldı.

**Tablo 4. Çalışmada G2141A nokta mutasyon tespiti için kullanılan primer-prob'lar.**

| Primer/Probe Adı | Oligonukleotid dizisi (5'-3') | Kaynak |
|---|---|---|
| 23SG2141A-2144F | 5'-TCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAA-3' | (240) |
| 23SG2141A-2144R | 5'-AGTGCTAAGTTGTAGTAAAGGTCCAC-3' | (240) |
| VIC | 5'-CAAGACGGAAAGACC-3' sokak-tipi DNA | (240) |
| FAM | 5'-CAAGACGAAAAGACC-3' mutasyona uğramış DNA için | (240) |

Total hacim 20 ul olacak şekilde Real-time PCR protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirildi;

1. Tablo 5'deki oranlarda 15 ul miks hazırlandı.
2. Üzerine 5 ul template DNA eklendi.
3. LightCycler 480 sisteminde tablo 6'daki gibi real-time PCR protokolü ile çalışma gerçekleştirildi.
4. Sonuçlar LightCycler 480 1.5.1.62 software'inde Endpoint genotyping analizi üzerinden değerlendirildi.

**Tablo 5. G2141A nokta mutasyonu için Real-time PCR reaksiyonu için kullanılan miks hacimleri**

| Komponent | Miktar |
|---|---|
| LC480 Probe master karışım | 10 ul |
| RNAaz/DNAaz bulunmayan steril su | 3 ul |
| Primer – Probe karışım | 2 ul |
| Total | 15 ul |

**Tablo 6. G2141A nokta mutasyonu için Real-time PCR protokolü**

| Fazlar | | Siklus sayıları | Zaman | Sıcaklık | Okuma |
|---|---|---|---|---|---|
| **Enzim Aktivasyonu** | | 1 | 10 dak | 95ºC | - |
| **Çoğaltma** | **Denatürasyon** | 45 | 15 sn | 95ºC | - |
| | **Veri toplama** | | 30 sn | 60ºC | - |
| | **Uzama** | | 15 sn | 72ºC | Tekli |

### 2.7.3. A2144T nokta mutasyonunun tespiti için real-time PCR çalışması

Elde edilen DNA'lardan A2144T mutasyonunun tespiti için Tablo 7'de belirtilen Primer – Probe'lar (Integrated DNA tech. USA) ve LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak RT-PCR çalışması LightCycler 480 II (Roche Diagnostics Mannheim, Almanya) sisteminde çalışıldı.

**Tablo 7. A2144T mutasyonunun tespiti için kullanılan primer-prob'lar.**

| Primer/Probe Adı | Oligonukleotid dizisi (5'-3') | Kaynak |
|---|---|---|
| 23SA2144T-2144F | 5'-TCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAA-3' | (240) |
| 23SA2144T-2144R | 5'-AGTGCTAAGTTGTAGTAAAGGTCCAC-3' | (240) |
| VIC | 5'-AGACGGAAAGACCC-3' sokak-tipi DNA için | (240) |
| FAM | 5'-AAGACGGAATGACCC-3' mutasyona uğramış DNA için | (240) |

Total hacim 20 µl olacak şekilde Real-time PCR protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirildi;

1. Tablo 8'deki oranlarda 15 ul miks hazırlandı.
2. Üzerine 5 µl template DNA eklendi.
3. LightCycler 480 sisteminde Tablo 9'daki gibi real-time PCR protokolü ile çalışma gerçekleştirildi.
4. Sonuçlar LightCycler 480 1.5.1.62 software'inde Endpoint genotyping analizi üzerinden değerlendirildi.

**Tablo 8. A2144T nokta mutasyonunun tespiti için Real-time PCR reaksiyonu için kullanılan miks hacimleri.**

| Komponent | Miktar |
|---|---|
| LC480 Probe master karışım | 10 µl |
| RNAaz/DNAaz bulunmayan steril su | 3 µl |
| Primer – Probe karışım | 2 µl |
| Total | 15 µl |

**Tablo 9. A2144T nokta mutasyonu için Real-time PCR protokolü**

| Fazlar | | Siklus sayıları | Zaman | Sıcaklık | Okuma |
|---|---|---|---|---|---|
| **Enzim Aktivasyonu** | | 1 | 10 dak | 95°C | - |
| **Çoğaltma** | **Denatürasyon** | 45 | 15 sn | 95°C | - |
| | **Veri toplama** | | 30 sn | 60°C | - |
| | **Uzama** | | 15 sn | 72°C | Tekli |

### *2.8.* İstatistiksel Analiz

Analizde, SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, ABD) programı kullanıldı. Kategorik değişkenler frekans ve oran değerleri ile (n,%) ifade edildi (Tablo 11,12). Medyan MİK değerlerinin saptanmasında, MİK değerlerinin saptandığı nokta mutasyonlu köken sayıları tek sayı ise (n+1)/2'de yer alan MİK değeri kullanılırken, köken sayıları çift sayı ise küçükten büyüğe doğru MİK değerlerinin sıralaması yapılarak ortadaki iki MİK değerinin toplamı ikiye bölünerek medyan MİK değeri hesaplandı (Tablo 13). Kategorik değişkenler arası ilişkiler, Fisher Exact test sonuçlarına göre elde edildi. Sonuçlar Benjamini-Hochberg düzeltmeli p değerleri ile ifade edildi. Bir risk etkenine sahip olanların, olmayanlara göre kaç kat daha fazla riske neden olduğunu göstermek için odds ratio değerleri (>1) kullanıldı (Tablo 14 a,b,c). Açıklayıcı değişkenlerle sebep ve sonuç ilişkisini belirleme bağlamında, 3 gen bölgesinin klaritromisin direncini arttırmada birbirlerinden bağımsız olarak rollerini saptamak için binary lojistik regresyon (multivaryet lojistik regresyon) Enter metodu kullanıldı (Tablo 15). Değişkenler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

# 3. BULGULAR

Çalışmadaki hastalardan endoskopi eşliğinde alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneklerinden üretilerek stoklanan *H. pylori* kökenlerinin kültürü sonucunda *Helicobacter* agar besiyerinde üreyen *H. pylori* şüpheli kolonilerden hazırlanan preparatlarda Gram boyama ile görülen Gram-negatif çomaklar ile birlikte kolonilerden yapılan üreaz, oksidaz ve katalaz deneyleri sonucunda pozitif saptanan 63 *H. pylori* kökeni çalışmaya alındı.



***Resim 1. Helicobacter agar besiyerinde üreyen H. pylori kolonileri (x100).***

## 3.1. Demografik ve bakteriyel fenotipik özellikler

Hastalara ait demografik veriler, *H. pylori* kültürü, üreaz, oksidaz ve katalaz testi bulguları şöyledir: Çalışmaya dahil edilen 63 hastadan oluşan grubumuzun %52,3'ü (33/63) kadın ve %47,7'si (30/63) erkekti. Yaş aralıkları 20-70 olup yaş ortalamaları 47,079±12,27 idi. Hastalara ait *H. pylori* kültür sonuçları, üreaz, oksidaz ve katalaz deney sonuçları %100'ünde (63/63) pozitifti. *H. pylori* kökenlerinin üretildiği hastaların demografik verileri ve *H. pylori* kültürü, üreaz, oksidaz ve katalaz test sonuçları Tablo 10'de gösterilmiştir.

**Tablo 10. *H. pylori* kökenlerinin üretildiği hastaların demografik verileri ve *H. pylori* kültür, üreaz, oksidaz ve katalaz test sonuçları.**

| Hasta No | Cinsiyet | Yaş | *H. pylori* kültürü | Üreaz | Oksidaz | Katalaz |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | K | 40 | + | + | + | + |
| 2 | K | 47 | + | + | + | + |
| 3 | K | 45 | + | + | + | + |
| 4 | E | 20 | + | + | + | + |
| 5 | E | 53 | + | + | + | + |
| 6 | K | 36 | + | + | + | + |
| 7 | K | 42 | + | + | + | + |
| 8 | E | 65 | + | + | + | + |
| 9 | E | 29 | + | + | + | + |
| 10 | K | 50 | + | + | + | + |
| 11 | E | 38 | + | + | + | + |
| 12 | E | 48 | + | + | + | + |
| 13 | K | 54 | + | + | + | + |
| 14 | K | 57 | + | + | + | + |
| 15 | K | 61 | + | + | + | + |
| 16 | K | 43 | + | + | + | + |
| 17 | K | 45 | + | + | + | + |
| 18 | K | 51 | + | + | + | + |
| 19 | E | 65 | + | + | + | + |
| 20 | K | 61 | + | + | + | + |
| 21 | E | 37 | + | + | + | + |
| 22 | K | 39 | + | + | + | + |
| 23 | E | 38 | + | + | + | + |
| 24 | K | 20 | + | + | + | + |
| 25 | E | 29 | + | + | + | + |
| 26 | E | 50 | + | + | + | + |
| 27 | E | 25 | + | + | + | + |
| 28 | E | 54 | + | + | + | + |
| 29 | E | 28 | + | + | + | + |
| 30 | K | 36 | + | + | + | + |
| 31 | K | 52 | + | + | + | + |
| 32 | K | 48 | + | + | + | + |
| 33 | E | 58 | + | + | + | + |
| 34 | E | 42 | + | + | + | + |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 35 | E | 23 | + | + | + | + |
| 36 | E | 57 | + | + | + | + |
| 37 | K | 61 | + | + | + | + |
| 38 | E | 37 | + | + | + | + |
| 39 | K | 50 | + | + | + | + |
| 40 | E | 67 | + | + | + | + |
| 41 | K | 56 | + | + | + | + |
| 42 | E | 54 | + | + | + | + |
| 43 | K | 41 | + | + | + | + |
| 44 | E | 42 | + | + | + | + |
| 45 | K | 61 | + | + | + | + |
| 46 | K | 67 | + | + | + | + |
| 47 | K | 32 | + | + | + | + |
| 48 | E | 52 | + | + | + | + |
| 49 | E | 29 | + | + | + | + |
| 50 | E | 46 | + | + | + | + |
| 51 | E | 58 | + | + | + | + |
| 52 | K | 45 | + | + | + | + |
| 53 | K | 49 | + | + | + | + |
| 54 | E | 67 | + | + | + | + |
| 55 | K | 70 | + | + | + | + |
| 56 | E | 42 | + | + | + | + |
| 57 | K | 40 | + | + | + | + |
| 58 | K | 46 | + | + | + | + |
| 59 | E | 54 | + | + | + | + |
| 60 | E | 58 | + | + | + | + |
| 61 | K | 43 | + | + | + | + |
| 62 | K | 55 | + | + | + | + |
| 63 | E | 58 | + | + | + | + |

### 3.2. *H. pylori* kökenlerinde Klaritromisin MİK değerleri

*H. pylori* kültürü, üreaz, oksidaz ve katalaz test sonuçlarına göre *H. pylori* olduğu doğrulanan kökenlerin klaritromisin MİK değerleri, E-test yöntemi ile saptandı. 39/63 (% 61,9) köken klaritromisine duyarlı (≤ 0,25 mg/L), 24/63 (% 38,1) köken klaritromisine dirençli (> 0,5 mg/L) olarak saptandı. *H. pylori* kökenlerinde saptanan klaritromisin MİK değerleri **Tablo 11**'de gösterilmiştir.

**Tablo 11. *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin MİK değerleri ve direnç durumları**

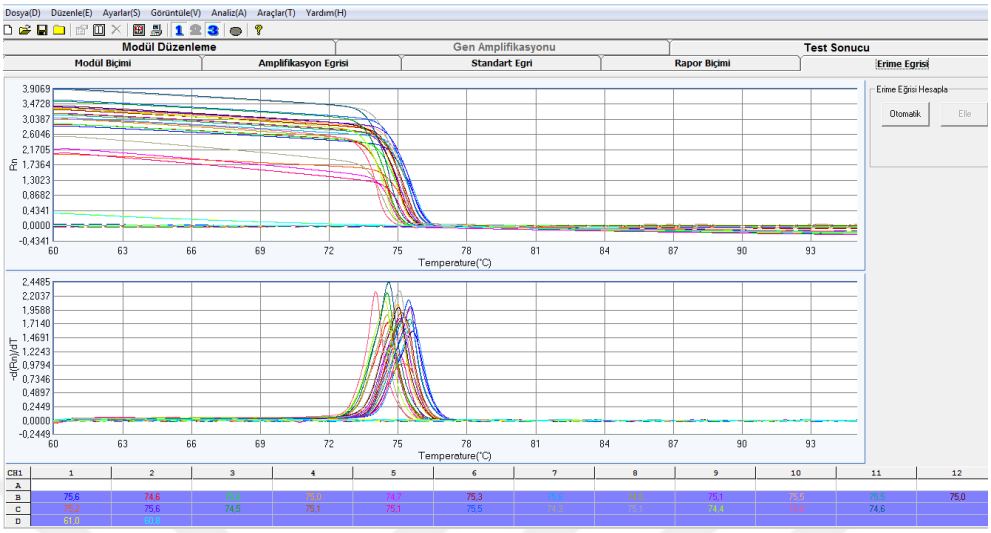
| Örnek No. | MİK (mg/L) | Direnç Durumu |
|---|---|---|
| 1 | >256 | Di |
| 2 | >256 | Di |
| 3 | 0,032 | Du |
| 4 | >256 | Di |
| 5 | >256 | Di |
| 6 | 0,016 | Du |
| 7 | 0,016 | Du |
| 8 | 0,016 | Du |
| 9 | 0,016 | Du |
| 10 | 0,016 | Du |
| 11 | 0,016 | Du |
| 12 | 0,016 | Du |
| 13 | 16 | Di |
| 14 | 0.016 | Du |
| 15 | 0,016 | Du |
| 16 | 0,25 | Du |
| 17 | 0,75 | Di |
| 18 | 0,016 | Du |
| 19 | 0,016 | Di |
| 20 | 0,016 | Du |
| 21 | >256 | Di |
| 22 | >256 | Di |
| 23 | 0,016 | Du |
| 24 | 0,016 | Du |
| 25 | 0,016 | Du |
| 26 | 1,3 | Di |
| 27 | 1,3 | Di |
| 28 | 0,75 | Di |
| 29 | 0,016 | Du |
| 30 | >256 | Di |
| 31 | 0,016 | Du |
| 32 | 0,016 | Du |
| 33 | 0,016 | Du |
| 34 | 0.016 | Du |
| 35 | 0,016 | Du |
| 36 | 0,016 | Du |

| | | |
|---|---|---|
| 37 | 0,016 | Du |
| 38 | 0,016 | Du |
| 39 | 0,016 | Du |
| 40 | 0,016 | Du |
| 41 | 0,016 | Du |
| 42 | 1,5 | Di |
| 43 | 0,75 | Di |
| 44 | 0.016 | Du |
| 45 | 0,016 | Du |
| 46 | 0,016 | Du |
| 47 | 0,75 | Di |
| 48 | 0,75 | Dİ |
| 49 | 0,75 | Di |
| 50 | 0,75 | Di |
| 51 | 1,5 | Di |
| 52 | 0.016 | Du |
| 53 | 0,016 | Du |
| 54 | 3 | Di |
| 55 | 0,75 | Di |
| 56 | 0,016 | Du |
| 57 | 1 | Di |
| 58 | 0,016 | Du |
| 59 | 0,016 | Du |
| 60 | 0,016 | Du |
| 61 | >256 | Di |
| 62 | >256 | Di |
| 63 | 0,016 | Du |

**MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyonu (mg/L),
**Di:** Dirençli köken, **Du:** Duyarlı köken

### 3.3. *H. pylori ureC* Gen Bölgesi

Kültürde üreyen kolonilerden *H. pylori* DNA varlığını tespit edebilmek için RT-time PCR metoduyla *H. pylori ureC* geni araştırıldı ve 63/63'ünde (% 100) deneyler pozitif saptandı.




***Grafik 1.*** **Real-time PCR yöntemiyle erime eğrisi analizi ile *H. pylori ureC* gen bölgesine ait pozitif saptanan kökenlerin görüntüsü.**

## 3.4. *H. pylori* kökenlerinde saptanan A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonları

*H. pylori ureC* geni saptanarak *H. pylori* DNA varlığı doğrulanan *H. pylori* kökenlerinde A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonları araştırıldı. Real-time PCR yöntemi ile 8 (% 12,7) kökende A2115G nokta mutasyonu saptanırken, 55 (% 87,3) kökende A2115G nokta mutasyonu saptanmadı. A2144T nokta mutasyonu 9 (% 14,3) kökende saptanırken, 54 (% 85,7) kökende saptanmadı. G2141A nokta mutasyonu 11 (% 17,5) kökende saptanırken, 52 (% 87,5) kökende saptanmadı. Çalışmaya alınan *H. pylori* kökenlerinde A2115G/A2144T/G2141A açısından çoklu nokta mutasyonları saptanmadı. *H. pylori* kökenlerinde saptanan A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonları Tablo 12'de gösterilmiştir.

**Tablo 12. *H. pylori* kökenlerinin klaritromisine direnç durumları ve A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyon durumları**

| Örnek No. | Direnç Durumu | A2115G | A2144T | G2141A |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Di | + | - | - |
| 2 | Dİ | - | + | - |
| 3 | Du | - | - | - |
| 4 | Dİ | - | - | + |
| 5 | Di | - | - | - |
| 6 | Du | + | - | - |
| 7 | Du | - | - | - |
| 8 | Du | - | - | - |
| 9 | Du | - | - | - |
| 10 | Du | - | - | + |
| 11 | Du | - | - | - |
| 12 | Du | - | - | - |
| 13 | Di | + | - | - |
| 14 | Du | - | - | - |
| 15 | Du | - | - | - |
| 16 | Du | - | + | - |
| 17 | Di | - | - | + |
| 18 | Du | - | + | - |
| 19 | Du | - | - | - |
| 20 | Du | - | - | - |
| 21 | Di | - | - | + |
| 22 | Di | - | + | - |
| 23 | Du | - | - | - |
| 24 | Du | - | | - |
| 25 | Du | - | - | - |
| 26 | Di | + | | - |
| 27 | Di | - | + | - |
| 28 | Di | - | - | + |
| 29 | Du | - | - | - |
| 30 | Di | - | - | + |
| 31 | Du | - | - | - |
| 32 | Du | - | - | - |
| 33 | Du | - | - | - |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 34 | Du | - | - | - |
| 35 | Du | + | - | - |
| 36 | Du | - | - | - |
| 37 | Du | - | - | - |
| 38 | Du | - | - | - |
| 39 | Du | - | - | - |
| 40 | Du | - | - | - |
| 41 | Du | - | - | + |
| 42 | Di | - | - | - |
| 43 | Di | - | - | + |
| 44 | Du | - | - | - |
| 45 | Du | - | - | - |
| 46 | Du | - | - | - |
| 47 | Di | - | + | - |
| 48 | Di | - | - | - |
| 49 | Di | - | + | - |
| 50 | Di | + | - | - |
| 51 | Di | - | - | + |
| 52 | Du | - | - | - |
| 53 | Du | - | - | - |
| 54 | Di | - | + | - |
| 55 | Di | + | - | - |
| 56 | Du | - | - | - |
| 57 | Di | - | - | + |
| 58 | Du | - | - | - |
| 59 | Du | - | - | - |
| 60 | Du | - | - | - |
| 61 | Dİ | + | - | - |
| 62 | Di | - | + | - |
| 63 | Du | - | - | + |

Di Dirençli kökenler / Du Duyarlı kökenler (+ )Mutasyon pozitif / (– ) Mutasyon negatif

Klaritromisine karşı fenotipik olarak dirençli *H. pylori* kökenlerinde, farklı nokta mutasyonlarına göre klaritromisinin medyan MİK değerleri ve en yüksek ve en düşük MİK aralıkları, Tablo 13'te gösterilmiştir.

**Tablo 13**. 21 fenotipik olarak klaritromisine dirençli *H. pylori* kökeninde, farklı nokta mutasyonlarıyla ilişkili medyan MİK değerleri.

| 1. Nokta Mutasyonu (n) | 2. MİK değeri (mg/L) Medyan (Aralık) |
|---|---|
| 3. A2115G (6) | 4. 1.4 (0.75->256) |
| 5. A2144T (7) | 6. 3 (0.75->256) |
| 7. G2141A (8) | 8. 1.25 (0.75->256) |

Çalışmaya alınan *H. pylori* kökenlerinde saptanan A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonlarının varlığı ile klaritromisine duyarlılık sonuçları değerlendirildiğinde; A2115G nokta mutasyonu saptanan 8 *H. pylori* kökeninden 6 (% 75) köken klaritromisine dirençli, 2 (% 25) köken klaritromisine duyarlı olarak saptanırken, A2115G nokta mutasyonu saptanmayan 55 *H. pylori* kökeninden 18 (% 32,7) köken klaritromisine dirençli, 37 (% 67,3) köken ise klaritromisine duyarlı olarak saptandı. A2115G nokta mutasyonunu taşıyan *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin direnci istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gözlenmiştir [OR: 6,167 (1,130-33,639), p=0,045] (Tablo 14a).

A2144T nokta mutasyonu saptanan 9 *H. pylori* kökeninden 7 (% 77,8) köken klaritromisine dirençli, 2 (% 22,2) köken, klaritromisine duyarlı olarak saptanırken, A2144T nokta mutasyonu saptanmayan 54 *H. pylori* kökeninden 17 (% 31,5) köken klaritromisine dirençli, 37 (% 68,5) köken ise klaritromisine duyarlı olarak saptandı. A2144T nokta mutasyonunu taşıyan *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin direnci istatiksel olarak yüksek bulunmuştur [OR:7,618 (1,430-40,592), p=0,012] (Tablo 14b).

G2141A nokta mutasyonu saptanan 11 *H. pylori* kökeninden 8 (% 72,7) köken klaritromisine dirençli, 3 (% 27,3) köken klaritromisine duyarlı olarak saptanırken, G2141A nokta mutasyonu saptanmayan 52 *H. pylori* kökeninden 16 (% 30,8) köken klaritromisine dirençli, 36 (% 69,2) köken ise duyarlı olarak saptandı. G2141A nokta mutasyonunu taşıyan *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin direnci istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur [OR:6 (1,405-25,623), p=0,015] (Tablo 14c)

**Tablo 14a. *H. pylori* kökenlerinde A2115G nokta mutasyonunun klaritromisin direnci ile ilişkisi**

| A2115G mutasyon durumu | | Klarit..Du | Klarit. Di | Toplam | p | | 95% C.I. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | OR | Lower | Upper |
| A2115G | A2115G (-) kökenler | 37 (%67,3) | 18 (%32,7 | 55 | | | | |
| | A2115G (+) kökenler | 2 (%25,0) | 6 (%75,0) | 8 | 0.045 | 6,167 | 1,130 | 33,639 |

**Tablo 14b. *H. pylori* kökenlerinde A2144T nokta mutasyonunun klaritromisin direnci ile ilişkisi**

| A2144T mutasyon durumu | | Klarit..Du | Klarit. Di | Toplam | p | | 95% C.I. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | OR | Lower | Upper |
| A2144T | A2144T (-) kökenler | 37 (%68.5) | 17 (%31.5) | 54 | | | | |
| | A2144T (+) kökenler | 2 (%22.2) | 7 (%77.8) | 9 | 0.012 | 7,618 | 1,430 | 40,592 |

**Tablo 14c. *H. pylori* kökenlerinde G2141A nokta mutasyonunun klaritromisin direnci ile ilişkisi**

| G2141A mutasyon durumu | | Klarit..Du | Klarit. Di | Toplam | p | | 95% C.I. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | OR | Lower | Upper |
| G2141A | G2141A (-) kökenler | 36 (%69,2) | 16 (%30,8) | 52 | | | | |
| | G2141A (+) kökenler | 3 (%27.3) | 8 (%72.7) | 11 | 0.015 | 6,000 | 1,405 | 25,623 |

Klarit..Du: Klaritromisine duyarlı; Klarit. Di:Klaritromisine dirençli; C.I.Confidence Interval (Güvenlik aralığı)

*H. pylori* kökenlerinde A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonu varlığının klaritromisine direnci tahmin etmedeki gücünü değerlendirmek için Binary lojistik regresyon analizi yapıldı ve analizin Doğruluk tahmin oranı %84,1 olarak saptandı. A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonlarından herhangi birinin pozitifliğinin *H. pylori* kökenlerinin klaritromisine dirençli olduğunu tahmin etme gücü % 87,5 olarak saptanırken, klaritromisine duyarlı olduğunu tahmin etme gücü % 82,1 olarak saptandı (p<0,001 ). *H. pylori* kökenlerinde A2115G nokta mutasyonu varlığının klaritromisine direnci 31,99 kat daha artırma gücü olduğu saptanırken (OR:31.99, 4,373-234,168, C.I.:%95) (p=0.001), A2144T nokta mutasyonu varlığının klaritromisine direnci 37,33 kat daha artırma gücünde olduğu (OR:37.33, 5,221-266,955, C.I.:%95) (p=0.001), ve G2141A nokta mutasyon varlığının ise klaritromisine direnci 28.44 kat daha artırma gücü olduğu saptandı (OR:28.44, 4,806-168.322, C.I.:%95) (p=0.001) (Tablo 15).

**Tablo 15. *H. pylori* kökenlerinde A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonları ile klaritromisin direnç risk analizi**

| | B[a] | S.E.[b] | Df[c] | P | OR[d] | 95% C.I.for EXP(B)[e] | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Lower | Upper |
| A2115G(1) | -3,466 | 1,016 | 1 | 0,001 | 31,99 | 4,373 | 234,168 |
| A2144T(1) | -3,620 | 1,004 | 1 | 0,001 | 37,332 | 5,221 | 266,955 |
| G2141A(1) | -3,348 | 0,907 | 1 | 0,001 | 28,443 | 4,806 | 168,322 |
| Constant | 8,066 | 1,796 | 1 | 0,001 | | | |

[a] B, beta regression coefficient (beta regresyon katsayısı), [b] SE, standard error (standart hata), [c] d.f., degree of freedom (özgürlük derecesi), [d] OR, odds ratio (olasılık oranı), [e] CI, confidence interval (güven aralığı).

# 4. TARTIŞMA

*H. pylori,* insan mide mukozasına kolonize olarak çeşitli gastrointestinal hastalık ve patolojilerine neden olan (212, 214) ayrıca, ITP, refrakter demir eksikliği anemisi, B12 vitamini eksikliği, ve ateroskleroz gibi çeşitli ekstragastrointestinal hastalıkları ile ilişkisi göstermiş bir patojendir (215–217). Dünya nüfusunun yaklaşık olarak %50'sini enfekte etmiş olduğu varsayılarak Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) Şubat 2016'da yayımlanan ve insan sağlığı için en büyük tehdit oluşturan ayrıca çeşitli antibiyotiklere karşı da dirençli olan 16 bakteriden oluşan listesinde yer alan *H. pylori,* yüksek riskli bir bakteri olarak sınıflandırılmıştır (213). Bu nedenle etkin *H. pylori* eradikasyonu için özellikle Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde lokal *H. pylori* kökenlerinin antibiyotik direnç modellerini bilmek çok önemlidir.

Dünya genelinde *H. pylori* enfeksiyonlarının oldukça yaygın olmasının yanısıra, bu bakterinin eradikasyonu da, mide kanseri-*H. pylori* patogenez ilişkisi temelinde ayrıca önem kazanmaktadır. Bundan dolayı EHPSG (Eurpoean helicobacter pylori study group/ avrupa helicobacter pylori çalışma grubu) (EHPSG) gibi uluslararası kuruluşlar *H. pylori* enfeksiyonunu önlemek için tanı ve tedavi gibi çeşitli alanlarda uluslararası klavuzlar oluşturmaktadır. Ancak *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisi antimikrobiyal ilaç direncindeki hızlı artış nedeniyle giderek zorlaşmaktadır.

Çeşitli antibiyotiklere k arşı dirençli *H. pylori* kökenlerindeki artışa bağlı olarak, ampirik üçlü tedaviler ile artık yüksek kür oranları elde edilememektedir. Günümüzde yeni klavuz önerileri ampirik üçlü eradikasyon tedavi seçimlerini, bölgesel antibiyotik direnci prevalansına ve daha önce aynı sınıfta bir antibiyotik kullanılmasına bağlı olarak sınırlandırmaktadır (212,218). *H. pylori* kökenlerinin makrolidlere, nitroimidazole ve florokinolonlara karşı direnç oranlarının hızla artmış olmasına rağmen, amoksisilin, tetrasiklin ve rifabutin halen etkili olarak görünmektedir (188,241,242). Rifabutin ile klinik çalışmalar devam etmekle birlikte, güvenilir bir yüksek kür oranına sahip tedavi rejimi henüz oluşturulmamıştır (243). Doksisiklinin ise genel olarak etkisiz olup diğer tetrasiklin gruplarının ise sınırlı üretimleri nedeniyle uygulanmaları oldukça zordur (182). *H. pylori* kökenlerindeki, metronidazol direnci birçok ülkede artış göstermekte olup (3,4,262) Avrupa ve ABD'de %20 ile %40 arasında, ülkemizde farklı bölgelerdeki oranı ise %35,5 ile 45,5 arasındadır ().  Metronidazol direncinin, Orta Doğu ülkelerinden İran'da % 61,6, İsrail'de %38,2, Suudi Arabistan'da %100 ve Kuveyt'te %70 oranında saptandığı bildirilmiştir (259).

Tetrasiklin direncinin ise İspanya'da %0,7, İngiltere'de %0,5 ve Hong Kong'da %0,5 civarında olduğu ve hatta birçok ülkede bulunmadığı bildirilirken (185,228,263), ülkemizde ise bu oran %0 ile %9,1 arasında değişmektedir (273, 299). Florokinolon direnci ise sadece sınırlı sayıdaki çalışmalarda (251) bildirilmiştir. Levofloksasin direnç oranlarının Çin ve İtalya'da sırasıyla %34.5 ve %22.1 olduğu, ülkemiz de ise, bu oranın %18,2 ile %29,5 arasında olduğu bildirilmiştir (228, 273, 299)

Klaritromisine dirençli *H. pylori* kökenlerinin prevalansı da artmakta olup, gelişmekte olan ülkelerdeki prevalans, gelişmiş ülkelere oranla daha yüksektir (240). Standart klaritromisin bazlı üçlü tedavi, yakın zamana kadar dünyada önerilen tedavi olmuştur, ancak klaritromisin direncindeki bu yüksek orandaki artış, Maastricht-IV ve Maastricht-V kılavuzlarına göre bu tedavinin reçete edilmeden önce test edilmesi gerektiğini göstermektedir (145,212,244). Bundan dolayı, *H. pylori* eradikasyonunda en çok kullanılan antibiyotik olan klaritromisine karşı gerçek direnç prevalans oranlarının bilinmesinin, optimal antimikrobiyal tedavi için ayrıca önemi bulunmaktadır.

Günümüzde birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede, *H. pylori* kökenlerinin klaritromisine karşı artan oranda direnç geliştirmelerinin nedeninin makrolid türü antibiyotiklerin yoğun kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (242). Bu görüşü destekleyecek şekilde, 1990'ların başlarında *H. pylori*'nin eradikasyon oranının %80'lerin çok üstünde olduğu bildirilmiştir (223–225). Günümüzde klaritromisin veya metronidazol direncinin, birinci basamak anti- *H. pylori* tedavisinin başarı şansını belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (271). Hatta, bazı ülkelerde *H. pylori* enfeksiyonlarının eradikasyon oranı %60 seviyelerine kadar gerilemiştir (223, 224, 299 ) ve bu sebeple yüksek klaritromisine karşı yüksek direnç oranlarına sahip bölgelerde tedaviden önce mutlaka antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılmasının gerekliliği, en son Maastricht V önerilerinde ayrıntılı olarak tartışılmıştır (212,215). Bu raporda , *H. pylori*'nin mevcut eradikasyon rejimlerinde yer alan antibiyotiklerden özellikle klaritromisine karşı bir direnç göstermesinin terapötik sonucu olumsuz olarak etkileyebileceği bilindiği için tedaviye karar verilmeden önce bölgesel direnç oranlarının kriter olarak alınması önerilmiştir. Klaritromisin direncinin %15'in altında olduğu bölgelerde *H. pylori* eradikasyonunda PPI+Amoksisilin+Klaritromisin veya PPI+Metronidazol+Klaritromisin ilk seçenek olarak önerilirken, klaritromisin direncinin %15'in üzerinde olduğu bölgelerde ise *H. pylori*

eradikasyonunda ilk tercih, bizmutlu dörtlü tedavidir. Bizmutlu dörtlü tedavide ise Bizmut+Amoksisilin+Tetrasiklin+Metronidazol veya Bizmut+PPI+Amoksisilin+Tetrasiklin seçenekleri uygulanabilir (300). Bu raporda, *H. pylori*'nin eradikasyon sorununun çözümü için tedaviye karar vermeden önce klaritromisin direncinin varlığı ve direnç oranının bilinmesinin oldukça önemli olduğu belirtilmiştir.

*H. pylori* tedavisinde başarı oranlarının düşmesi nedeniyle tedavide veya kılavuz önerilerinde yapılan birçok değişikliğe rağmen, bu önerilere uyulmadan yapılan antimikrobiyal tedaviler sonucunda, direnç oranları zamanla daha da artış göstermeye başlamıştır. Horiki ve ark. (253) klaritromisin direncinin, Japonya'da 1996'da %1.8'den, 2008'de %27.1'e, önemli oranda artmış olduğunu göstermişlerdir. Klaritromisin direncinin, günümüz Japonya'sında %50'ye yaklaşmış olasına rağmen, 2017'nin başlarında dahi klaritromisin içeren üçlü tedavi ilk seçenek olarak uygulanmaya devam edilmiştir (238,239). Benzer şekilde ABD'de de, klaritromisin direnç oranları 1993'te %6,1'den 2002'de %12,9'a yükselmiştir (227,261). Avrupa'da da klaritromisin direnç oranı, 1998'de %9 iken, 2008'de %17,6'ya yükselmiş ve dirençteki bu artış yıllar içerisinde devam etmiştir (145,223,269). Yunanistan'da ise tedavi başarısızlığı olan hastalarda klaritromisin direnç oranının 2013 yılında % 31 olduğu bildirilirken (245), Bulgaristan'da ise 2010 yılında Boyanova ve ark. (227) tarafından yapılan bir çalışmada ise klaritromisin direnç oranı % 20.8 olarak tespit edilmiştir. 2008-2009 yılları arasında, 18 Avrupa ülkesinde yapılan 32 merkezli bir çalışmada ise, *H. pylori* kökenlerindeki klaritromisin direnç oranlarının sırasıyla Güney Avrupa, Orta Avrupa ve Kuzey Avrupa'da %21.5, %18.7 ve % 7.7 olduğu bildirilmiştir (242). Ülkemizde de *H. pylori* kökenlerindeki klaritromisin direnç oranlarında, yıllara göre bir artış gözlenirken, bu oranlar, coğrafi bölge farklılıkları ve farklı popülasyon yoğunlukları nedeniyle değişiklik göstermektedir. 2003 yılında % 16,5 oranında bildirilen klaritromisin direnci 2007 yılında % 50'lere kadar yükselmiştir (300). Farklı toplumlardaki farklı klaritromisin direnç oranlarının, *H. pylori* enfeksiyonlarının prevalans farklılıklarından, antibiyotik kullanımının yaygınlığından veya direncin saptanmasında farklı yöntemlerin kullanılmasından dolayı olabileceğini düşünülmektedir.

Bu çalışmada, E-test yöntemiyle tespit edilen MİK değerlerine göre; 63 *H. pylori* kökeninden 24/63 (% 38,1) kökenin, klaritromisine dirençli (> 0,5 mg/L) olduğu saptanmıştır. Türkiye'nin kuzeybatısında E-test yöntemi ile saptanan klaritromisin direnç oranları, Özbey ve ark. (301) tarafından % 41,9, Çalışkan ve ark. (273) tarafından % 36,7 olarak, Orta Anadolu'da

ise, Kalem ve ark (274) tarafından %28.5 olarak bildirilmiştir. Akdeniz Bölgesinde ise, klaritromisin direnç oranları, Çağdaş ve ark (276) tarafından %18.1 ve Yula ve ark. (275) tarafından % 8.8 olarak bildirilmiştir (192). Çalışmamızın sonuçları, ülkemizden bildirilen diğer çalışmalardan Kuzeybatı Bölgesi( Marmara ) kaynaklı iki çalışma ile uyumlu bulunurken, diğer bölgelerdeki çalışma sonuçları ile farklı bulunmuştur. Özellikle bu çalışmanın yapıldığı türkiyenin kuzeybatı bölgesinden 2015 yılında Çalışkan ve ark. Tarafındn bildirilen çalışma sonuçlarına göre son 3 yıl içerisinde klaritromisin direncinde hafif bir artış gözlenmiştir ve bu durum direnç ile ilgili yeni araştırmaların yapılması gerekliliğini düşündürmüştür. Aynı zamanda, bölgelerde arasında görülen klaritromisin direnç oranları arasındaki farklılıklar, tedavi rejimlerini daha iyi yönlendirmek için her bir coğrafi bölgedeki direnç oranlarını ayrı ayrı inceleme ihtiyacını da vurgulamaktadır.

Klaritromisin direncinin saptanmasında kültür bazlı yöntemler altın standart olmakla birlikte, *H. pylori*'yi kültürde üretmenin ve direnç testlerini yapabilmek için canlılığını devam ettirebilmenin oldukça zor ve maliyetli olması da önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Aynı zamanda zaman alıcı ve sonuçların oldukça düşük tekrarlanabilirliği nedeniyle, klaritromisin direncinin saptanmasında yeni yöntemlere de ihtiyaç duyulmuştur. Yeni moleküler yöntemleri içeren araştırmalardan elde edilen verilerle de klatitromisine direncinin saptanmasında hem doğru sonuçları elde emek ve yeni mutasyonları saptayabilmek mümkün hale gelmiştir. Patojen mikroorganizmalardaki, antimikrobiyal direncin gelişmesi, periyodik araştırmalar gerektiren ve sürekli değişim gösteren bir süreçtir. Klaritromisin direnci, genellikle *H. pylori*'nin 23S rRNA gen bölgesindeki nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (162). Klaritromisine karşı direnç gelişiminde, 23S rRNA geninin peptidil transferaz döngüsündeki 2142 (A2142G ve A2142C) ve 2143 (A2143G) iki nükleotid pozisyonunda üç nokta mutasyonu meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar konformasyonel bir değişiklik oluşturarak antibiyotiğin etkisini göstereceği bölgeye bağlanmasında bir azalmaya neden olmaktadırlar (145). Bunun sonucunda da, A2142G, A2142C ve A2143G mutasyonlarına sahip olan kökenler, daha yüksek antibiyotik konsantrasyonlarını tolere edebilirler (172,283,284).

Her nokta mutasyonunun prevalansı, coğrafi bölgelere göre değişmektedir. 1999 yılında yapılan bir çalışmada, klaritromisin tedavisi sonrasında % 11,4 oranında sekonder klaritromisin direnci saptanmış, ayrıca klaritromisine dirençli kökenlerin hepsinin A2142G ve A2143G

mutasyonlarına sahip oldukları bildirilmiştir (290). İtalya'da yapılan başka bir çalışmada ise total % 26,7 oranında klaritromisin direnci bildirilirken, direnç saptanan kökenlerde A2143G mutasyonu % 56,4, A2142G mutasyonu % 22,6, A2142C mutasyonu % 12,9 ve çift mutasyon ise % 8,1 olarak saptanmıştır (293). 2009 yılında De Francesco ve ark. (199) tarafından *H. pylori* kökenlerinin % 45,5'inde klaritromisin direnci ile ilişkili bir mutasyon saptarken, bu mutasyonların %70,9'unun A2143G mutasyonu, %19,3'ünün A2142G mutasyonu ve % 9,8'inin ise A2142C mutasyonu olduğu bildirilmiştir.

Klaritromisin direncinden sorumlu nokta mutasyonları ile ilişkili, ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda; 2012 yılında Sezgin ve ark. (280) tarafından *H. pylori* kökenlerinin % 10,8'inde A2143G mutasyonu saptanırken, % 29,7'sinde A2144G mutasyonu tespit edilmiş, Yula ve akr. (275) tarafından ise A2143G mutasyonu oranı % 6.6 olarak bildirilmiştir. Ayrıca ülkemizde 2014 yılında *H. pylori* kökenlerinin % 36,7'sinde A2143G ve A2144G mutasyonları saptanırken, fenotipik olarak klaritromisine dirençli kökenlerin hepsinde A2143G ve A2144G mutasyonlarının bulunduğu bildirilmiştir. 2012 yılında, Türkiye'de yapılan bir çalışmada, fenotipik olarak klaritromisine dirençli *H. pylori* kökenlerinde % 64,7 oranında A2144G ve % 35,3 oranında A2143G mutasyonlarının saptandığı bildirilmiştir (192,273,276,280). Bu yüksek klaritromisin direnç oranları, Türkiye'de klaritromisin direncine neden olabilecek olan farklı nokta mutasyonlarının da araştırılmasının gerektiğini düşündürmüştür.

Özellikle, tüm *H. pylori* antibiyotik direnç fenotiplerinin "klasik" nokta mutasyonları ile tam olarak tanımlanamaması da farklı nokta mutasyonların araştırılmasını bir zorunluluk haline getirmiştir. 23S rRNA geninde, A2142G, A2142C ve A2143G mutasyonlarını içermeyen dirençli *H. pylori* kökenlerinin varlığı *H. pylori*'de klaritromisin direnci için farklı mekanizmaların da bulunabileceğini düşündürmektedir. Daha önceki çalışmalarda tanımlanan A2143G veya A2142G nokta mutasyonları yüksek MİK değerleri ile ilişkilendirilirken (258,289), benzer MİK değerlerinin A2058G, A2059G, A2116G, A2115G, G2141A, G1939A, C2147G, T2182C gibi farklı mutasyonlarla da oluşabileceği gösterilmiştir.

Versalovic ve ark. (290-29) klaritromisine dirençli *H. pylori* kökenleri ile yaptıkları bir çalışmada; fenotipik dirençli 12 kökenin 10'nunda A2059G nokta mutasyonu, ikisinde ise sadece A2058G nokta mutasyonunun bulunduğunu bildirilmişlerdir. 1997 yılında Hulten ve ark. (291) gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* saptanan hastalardan izole edilen kökenlerin klaritromisin

ile tadavi öncesi ve tedavi sonrası MIK değerleri ve mutasyon durumlarını araştırmışlar ve kökenlerin hç birisinde klaritromisin ile tedavi öncesinde fenotipik ve genotipik olarak direnç saptamamışlardır. Bununla beraber, klaritromisin içeren 14 günlük tedavi sonrasında *H. pylori* kökenlerinin klaritromisin MİK değerlerinde bir artışa paralel olarak A2143G, A2144G, A2116G ve A2142G mutasyonlarını da saptamışlardır. Van Doorn ve ark. (290) 2001 yılında 6 farklı ülkeden toplam 299 hasta gastrik biyopsi örneklerinden izole ettikleri *H. pylori* kökenlerinde saptanan nokta mutasyonlarının (23S rRNA üzerindeki; A2115G, G2141A, A2142G, A2142C, A2142T, A2143G ve A2143C olmak üzere toplam 7 nokta mutasyon) makrolid duyarlılığı üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Fenotipik olarak kökenlerin % 43,5'inde klaritromisin direnci ve klaritromisin dirençli kökenlerin % 97,7'sinde nokta mutasyonu saptamışlardır. En yüksek mutasyon oranları ise % 45,2 ile A2143G ve % 33,3 ile A2142G nokta mutasyonları olarak bildirilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada A2115G, G2141A, A2142T ve A2143C nokta mutasyonları gösterilememiştir (290).

Garrido ve ark.'nın (205) 2007 yılında İspanya'dan % 20 oranında primer klaritromisin direnci bildirmişler ve *H. pylori* kökenlerin % 30'unda A2142G nokta mutasyonu, % 10'unda A2143G nokta mutasyonu ve % 60'ında da G1939A/T1942C/A2142G/C2147G çoklu mutasyon saptanmıştır. 2002 yılında Kore'de yapılan bir çalışmada, klaritromisine dirençli kökenlerin % 66,6'sında A2143G nokta mutasyonu, %33,4'ünde ise T2182C nokta mutasyonunun bulunduğu bildirilmiştir (292). 2010 yılında İspanya'da Agudo ve ark. (258) ise, fenotipik olarak %35,6 oranında klaritromisin direnci saptadıkları *H. pylori* kökenlerinde, % 88,1 oranında nokta mutasyon saptarlarken, bu mutasyonların % 85,3'ünün A2143G, %8,8'inin A2142G ve % 5,9'unun T2182C nokta mutasyonları olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda klaritromisin direnci ile ilişki en sık rastlanan mutasyonlar dışında olan, daha önce ülkemizde araştırılmayan ve bu çalışma ile ilk kez araştırılan; A2115G, G2141A, ve A2144T mutasyonlarının klaritromisine dirençle ilişkisini saptamak amacıyla 63 *H. pylori* kökeni çalışmaya alındı ve 8/63 (% 12,7) kökende A2115G mutasyonu, 9/63 (% 14,3) kökende A2144T mutasyonu, 11/63 (% 17,5) kökende G2141A mutasyonu saptandı. Klaritromisine karşı fenotipik olarak dirençli *H. pylori* kökenlerinde, A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonlarına göre klaritromisinin medyan MİK değerleri tespit edilmiştir. A2144T için tespit edilen klaritromisinin medyan MİK değeri (3 mg/L), diğer nokta mutasyonlarına göre (A2115G:1.4 mg/L, G2141A:1.25

mg/L) daha yüksek olarak tespit edilirken, her üç nokta mutasyonun da, klaritromisin medyan MİK değerini anlamlı olarak yükseltecek bir etkiye sahip olmadıkları sonucuna varılmıştır. A2115G mutasyonu saptanan 8 *H. pylori* kökeninden 6/8 (% 75) köken klaritromisine dirençli, 2/8 (% 25) köken klaritromisine duyarlı olarak saptanırken, A2115G mutasyonunu taşıyan *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin direnci istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak gözlenmiştir [OR: 6,167 (1,130-33,639), p=0,045]. A2144T mutasyonu saptanan 9 *H. pylori* kökeninden 7/9 (% 77,8) köken klaritromisine dirençli, 2/9 (% 22,2) köken klaritromisine duyarlı olarak saptanırken, A2144T mutasyonunu taşıyan *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin direnci istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gözlenmiştir [OR:7,618 (1,430-40,592), p=0,012]. G2141A mutasyonu saptanan 11 *H. pylori* kökeninden 8/11 (% 72,7) köken klaritromisine dirençli, 3/11 (% 27,3) köken klaritromisine duyarlı olarak saptanırken, G2141A mutasyonunu taşıyan *H. pylori* kökenlerinde klaritromisin direnci istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gözlenmiştir [OR:6 (1,405-25,623), p=0,015]. 3 gen bölgesinin klaritromisin direncini arttırmak için birbirlerinden bağımsız rollerini saptamak için yaptığımız binary lojistik regresyon analizine göre; G2141A nokta mutasyonu varlığının klaritromisine direnci 28.44 kat daha artırma gücü olduğu saptanırken (OR:28.44, 4,806-168.322, C.I.:%95) (p=0.0001), A2115G nokta mutasyonu varlığının klaritromisine direnci 31,99 kat daha (OR:31.99, 4,373-234,168, C.I.:%95) (p=0.001) ve A2144T nokta mutasyonu varlığının ise klaritromisine direnci 37,332 kat daha artırma gücü olduğu saptandı (OR:37.332, 5,221-266,935, C.I.:%95) (p=0.0001).

Çalışmamızda *H. pylori* kökenlerinde araştırdığımız nokta mutasyonlarının saptandığı tek araştırma olan ve bilinenin aksine, üç ortak mutasyonunun bulunmadığı fakat yeni mutasyonların bildirildiği De Francesco ve ark.'nın (292) 2014 yılında İtalya'da yaptıkları çalışmada ; 82 *H. pylori* kökeninde 6 nokta mutasyonunun (A2143G, A2142G, A2142C A2115G, G2141A ve A2144T) varlığının fenotipik direnç üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 82 *H. pylori* kökeninin 42'si (% 51,2) fenotipik olarak klaritromisine dirençli iken, daha önceki benzer çalışmalarda da gösterildiği üzere dirençle ilişkisi en yüksek düzeyde olan A2143G, A2142G ve A2142C nokta mutasyonlarından en az birinin varlığı ile % 54,7 oranında mutasyon saptanmıştır. Araştırmacılar 19 kökende ise en sık rastlanan bu 3 nokta mutasyonun (A2143G, A2142G ve A2142C) olmadığını ancak fenotipik olarak direnç bulunduğunu vurgulayarak, bizim çalışmamızda yer alan A2115G, G2141A ve A2144T nokta mutasyonlarının herhangi birini 14 (% 73,6) kökende saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada A2115G, G2141A ve A2144T nokta

mutasyonları saptanan kökenlerin, sırasıyla % 57,1, % 100 ve% 100'ünün fenotipik olarak klaritromisine dirençli olduğu bildirilirken, A2115G mutasyonu saptanan kökenlerin % 42,1'inin ise fenotipik olarak klaritromisine duyarlı olduğu bildirilmiştir. de Franceska ve ark. (292) klaritromisine karşı fenotipik olarak dirençli olan *H. pylori* kökenlerinde, yeni nokta mutasyonları (A2115G, G2141A ve A2144T) ve klasik nokta mutasyonlarının (A2143G, A2142G), klaritromisinin MİK değerleri üzerine olan etkisini incelemişler ve klaritromisine dirençli *H. pylori* kökenlerinde, bu nokta mutasyonlarının klaritromisinin medyan MİK değerleri üzerine çok belirgin bir artışa neden olmadığını saptamışlardır. Daha önceki çalışmalarda, yüksek klaritromisin MİK değerleri A2143G veya A2142G nokta mutasyonlarıyla ilişkilendirilmişti, fakat de Franceska ve ark.(292) bu çalışmalarında, tek bir nokta mutasyonunun yüksek MİK değerlerine neden olmadığı ve fenotipik klaritromisin direncinin spesifik bir nokta mutasyonundan ziyade, çoğul ve sinerjik genetik mekanizmalara bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği sonucuna varmışlardır.Van Doorn ve ark. (290) 2001 çalışmasında ise A2115G, G2141A nokta mutasyonları araştırılmış ancak klaritromisine dirençli kökenlerin % 45,2'sinde A2143G ve % 33,3'ünde A2142G mutasyonlarının saptandığı bildirilirken, A2115G, G2141A mutasyonu saptamamışlardır. Araştırmacıların bu mutasyonları saptayamamalarının nedeninin 2001 yılında makrolid direncinin günümüzdeki seviyede olmamasına bağlı olarak bazı mutasyonların henüz oluşmamış olması olabileceği gibi, aynı zamanda mutasyonları saptamada kullanılan yöntem ile ilişkili de olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ile İtalya'dan bildirilen oranlar uyumlu görünmekle birlikte, bölgesel direnç faklılıkları da göz önünde alındığında ülkemizde klaritromisin direncinde her 3 mutasyonun da yüksek düzeyde risk (A2115G için OR:31.99, A2144T için OR:37.33, G2141A için OR:28.44) taşıdığı, özellikle de A2144T nokta mutasyonu en sık olarak saptanırken (% 17,5), bu mutasyonun varlığının klaritromisin direncini 37.33 kat artırma gücü oldukça dikkat çekici olarak gözlenmiştir. Ancak çalışmamızda A2115G, A2144T ve G2141A mutasyonlarının, klaritromisine duyarlı kökenlerde de sırasıyla % 25, % 22,2 ve % 17,5 oranlarında saptanmış olması, bu mutasyonların varlıklarının direnci arttırma riskinin olabileceği düşüncesinin yanında, aynı zamanda bu mutasyonların sessiz kalabileceğini yada bizim çalışmamızda araştırmadığımız bilinen yada bilinmeyen diğer mutasyonlar (A2142G, A2142C, A2143G, A2058G, A2059G, A2116G, G1939A, C2147G, T2182C gibi) veya mekanizmalarla ilişkili olabileceğini de düşündürmüştür.

# 5. SONUÇ

*Helicobacter pylori'*nin klaritromisine karşı geliştirdiği dirençle ilgili bilinen nokta mutasyonları dışında uluslararası düzeyde tek ülkemizde ise hiç çalışması yapılmamış 23S rRNA bölgesindeki üç farklı A2115G, A2144T ve G2141A nokta mutasyonlarının klaritromisin direnciyle ilişkisinin değerlendirildiği çalışmamızda; istatistiki olarak elde edien yüksek OR ve medyan MİK değerleri göz önüne alındığında özellikle en sık olarak gözlenen A2144T mutasyonunun klaritromisin direncini 37,33 kat, A2115G mutasyonunu 31,99 kat ve G2141A mutasyonunu ise 28,44 kat artırma gücüne sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu farklı 3 mutasyonun varlığının araştırılmasının, hem dünyada hem de ülkemizde *H. pylori* tedavisinde temel sorun teşkil eden klaritromisine karşı direncin saptanması açısından oldukça önem taşıdığını ve klaritromisin direncinin saptanmasında başarı şansı düşük *H.pylori* kültürü ve ilişkili fenotipik direnç test yöntemlerinin dışında özellikle A2143G, A2142G, A2142C mutasyonlarının yanında A2115G, A2144T ve G2141A mutasyonlarının da moleküler yöntemlerle taranmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz. Ancak artan klaritromisin direnci ile ilişkli başka mutasyon bölgelerinin de varlığının ve birlikteliklerinin, veya farklı mekanizmaların da bir rolünün olabileceği unutulmamalıdır. Bu bağlamda geniş örneklem sayıları ile mutasyonların birlikteliklerini de değerlendirebilmek için, bilinen tüm mutasyon bölgelerinin araştırıldığı, ayrıca yeni ve henüz bilinmeyen mutasyonların da saptanabileceği yöntemlerle farklı bölgelerden kapsamlı araştırmaların yapılmasının gerekliliğini düşünmekteyiz.

# 6. KAYNAKÇA


1. Cardenas VM, Mulla ZD, Ortiz M, Graham DY. Iron deficiency and Helicobacter pylori infection in the United States. Am J Epidemiol. 2006 Jan;163(2):127–34.

2. Suzuki H, Nishizawa T, Hibi T. Helicobacter pylori eradication therapy. Future Microbiol. 2010 Apr;5(4):639–48.

3. Rimbara E, Fischbach LA, Graham DY. Optimal therapy for Helicobacter pylori infections. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011 Feb;8(2):79–88.

4. De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, et al. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. J Gastrointestin Liver Dis. 2010Dec;19(4):409–14.

5. DeCross AJ, Marshall BJ. The role of Helicobacter pylori in acid-peptic disease. Am J Med Sci. 1993 Dec;306(6):381–92.

6. Goodwin CS, Marshall BJ, Blackbourn SJ, Warren JR, Phillips M. Colloidal bismuth subcitrate (DE-NOL) and tinidazole healed duodenal ulceration with a low relapse rate due to elimination of Campylobacter pylori. J Chemother. 1989 Jul;1(4 Suppl):838–9.

7. Marshall B. Helicobacter pylori--a Nobel pursuit? Vol. 22, Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie. Canada; 2008. p. 895–6.

8. Topçu AW, Söyletir G DM. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. In İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. p. 1643–7.

9. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. Helicobacter pylori. Clin Microbiol Rev. 1997 Oct;10(4):720–41.

10. Sorberg M, Nilsson M, Hanberger H, Nilsson LE. Morphologic conversion of Helicobacter pylori from bacillary to coccoid form. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996 Mar;15(3):216–9.

11. Benaissa M, Babin P, Quellard N, Pezennec L, Cenatiempo Y, Fauchere JL. Changes in Helicobacter pylori ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. Infect Immun. 1996 Jun;64(6):2331–5.

12. Brenciaglia MI, Fornara AM, Scaltrito MM, Dubini F. Helicobacter pylori: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. Int J Antimicrob Agents. 2000 Feb;13(4):237–41.

13. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. 2002 Oct;347(15):1175–86.

14. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449–90.

*15.* Kocazeybek B, Tokman HB. Prevalence of Primary Antimicrobial Resistance of *H. pylori* in Turkey: A Systematic Review. Helicobacter. 2016 Aug;21(4):251–60.

16. Tedavi T. Çocuklarda H . pylori Enfeksiyonunda Seroloji ,. 2007;33(2):81–5.

17. Blaser MJ, Berg DE. Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest. 2001;107(7):767–73.

18. Alarcón T, Martínez MJ, Urruzuno P, Cilleruelo ML, Madruga D, Sebastian M, et al. Prevalence of CagA and vacA Antibodies in Children with Helicobacter pylori-Associated Peptic Ulcer Compared to Prevalence in Pediatric Patients with Active or Nonactive Chronic Gastritis. Vol. 7, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2000. p. 842–4.

19. Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B, Su W, Pan Z, Garcia C, et al. Differences in genotypes of Helicobacter pylori from different human populations. J Bacteriol. 2000 Jun;182(11):3210–8.

20. Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree FF, Olckers A, Botha SJ, et al. Evaluation of a novel heminested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of Helicobacter pylori in saliva and dental plaque. J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):205–9.

21. Kikuchi S, Dore MP. Epidemiology of Helicobacter pylori Infection. Helicobacter. 2005;10 Suppl 1:1–4.

22. Kadayifci A, Buyukhatipoglu H, Cemil Savas M, Simsek I. Eradication of Helicobacter pylori with triple therapy: an epidemiologic analysis of trends in Turkey over 10 years. Clin

Ther. 2006 Nov;28(11):1960–6.

23. Versalovic J. Helicobacter pylori. Pathology and diagnostic strategies. Am J Clin Pathol. 2003 Mar;119(3):403–12.

24. Ciacci C, Mazzacca G. The history of Helicobacter pylori: a reflection on the relationship between the medical community and industry. Dig Liver Dis. 2006 Oct;38(10):778–80.

25. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clin Microbiol Rev. 2006 Jul;19(3):449–90.

26. Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. Immunologic Basis for the Pathogenesis of Pterygium. Am J Ophthalmol. 2018 Mar 20;98(2):225–8.

27. Ghose C, Perez-Perez GI, van Doorn LJ, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ. High frequency of gastric colonization with multiple Helicobacter pylori strains in Venezuelan subjects. J Clin Microbiol. 2005 Jun;43(6):2635–41.

28. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S, et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis. Vol. 64, Gut. BMA House, Tavistock Square, London, WC1H 9JR; 2015. p. 1353–67.

29. Talebi Bezmin Abadi A, Perez-Perez G. Role of dupA in virulence of Helicobacter pylori. World J Gastroenterol. 2016 Dec;22(46):10118–23.

30. Erzin Y, Koksal V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006;**11(6):**574-80

31. Mueller A, O'rourke J, Chu P, Chu A, Dixon MF, Bouley DM, et al. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Am J Pathol. 2005 Sep;167(3):797–812.

32. Lin Y-F, Chen C-Y, Tsai M-H, Wu M-S, Wang Y-C, Chuang EY, et al. Duodenal ulcer-related antigens from Helicobacter pylori: immunoproteome and protein microarray approaches. Mol Cell Proteomics [Internet]. 2007;6(6):1018–26. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17317659

33. Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, Driessen A, Debongnie J-C, Burette A, et al. Identification of non-Helicobacter pylori spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. J Clin Microbiol. 2005 May;43(5):2256–60.

34. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature. 1997 Aug;388(6642):539–47.

35. Santos A, Queiroz DMM, Menard A, Marais A, Rocha GA, Oliveira CA, et al. New pathogenicity marker found in the plasticity region of the Helicobacter pylori genome. J Clin Microbiol. 2003 Apr;41(4):1651–5.

36. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, et al. Quasispecies development of Helicobacter pylori observed in paired isolates obtained years apart from the same host. J Infect Dis. 2000 Jan;181(1):273–82.

37. Blaser MJ. The versatility of Helicobacter pylori in the adaptation to the human stomach. J Physiol Pharmacol. 1997 Sep;48(3):307—314.

38. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec;93(25):14648–53.

39. Erzin Y. Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Tuncer M, Kocazeybek B. Analysis of serum antibody profile against H pylori VacA and CagA antigens in Turkish patients with duodenal ulcer.

40. Koehler CI, Mues MB, Dienes HP, Kriegsmann J, Schirmacher P, Odenthal M. Helicobacter pylori genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. Mol Pathol. 2003 Feb;56(1):36–42.

41. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. Analyses of the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori. Mol Microbiol. 1998 Apr;28(1):37–53.

42. Syam AF, Rani AA, Abdullah M, Manan C, Makmun D, Simadibrata M, et al. Accuracy of Helicobacter pylori stool antigen for the detection of Helicobacter pylori infection in dyspeptic patients. World J Gastroenterol. 2005;11(3):386–8.

43. Cover TL. The vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori. Mol Microbiol. 1996 Apr;20(2):241–6.

44. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori. Gastroenterology. 1998 Jul;115(1):58–66.

45. Kuo S-H, Chen L-T, Lin C-W, Yeh K-H, Shun C-T, Tzeng Y-S, et al. Expressions of the CagA protein and CagA-signaling molecules predict Helicobacter pylori dependence of early-stage gastric DLBCL. Blood. 2017 Jan;129(2):188–98.

46. Eghbali Z, Mojtahedi A, Moien Ansar M, Fakhrieh Asl S, Aminian K. Detection of 23SrRNA Mutations Strongly Related to Clarithromycin Resistance in Helicobacter pylori Strains Isolated From Patients in the North of Iran. Jundishapur J Microbiol. 2016 Feb;9(2):e29694.

47. Godoy APO, Ribeiro ML, Benvengo YHB, Vitiello L, Miranda M de CB, Mendonca S, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in Helicobacter pylori clinical isolates. BMC Gastroenterol. 2003;3:1–6.

48. D. Nishiya T. Shimoyama SFTYMTAM. Evaluation of the Clinical Relevance of the iceA1 Gene in Patients with Helicobacter pylori Infection in Japan. Scand J Gastroenterol. 2000;35(1):36–9.

49. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol. 1999 Jul;37(7):2274–9.

50. Peek RMJ, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a Helicobacter pylori gene, iceA, that is associated with clinical outcome. Proc Assoc Am Physicians. 1998;110(6):531–44.

51. Shi Y, Liu L, Zhang T, Shen L, Liu L, Zhang J, et al. The involvement of Helicobacter

pylori thioredoxin-1 in gastric carcinogenesis. J Med Microbiol. 2013 Aug;62(Pt 8):1226–34.

52. Windle HJ, Fox A, Ni Eidhin D, Kelleher D. The thioredoxin system of Helicobacter pylori. J Biol Chem. 2000 Feb;275(7):5081–9.

53. Bugaytsova JA, Bjornham O, Chernov YA, Gideonsson P, Henriksson S, Mendez M, et al. Helicobacter pylori Adapts to Chronic Infection and Gastric Disease via pH-Responsive BabA-Mediated Adherence. Cell Host Microbe. 2017 Mar;21(3):376–89.

54. Tanaka M, Shimoyama T, Sawaya M, Igarashi T, Yamai K, Fukuda S. Evaluation of the clinical relevance of hrgA gene in patients with Helicobacter pylori infection. Hepatogastroenterology. 2012;59(113):304–6.

55. Shan W, Kung H-F, Ge R. Comparison of Iron-Binding Ability Between Thr70-NapA and Ser70-NapA of Helicobacter pylori. Helicobacter. 2016 Jun;21(3):192–200.

56. Fernandez de Larrea-Baz N, Perez-Gomez B, Michel A, Romero B, Lope V, Pawlita M, et al. Helicobacter pylori serological biomarkers of gastric cancer risk in the MCC-Spain case-control Study. Cancer Epidemiol. 2017 Sep;50(Pt A):76–84.

57. Tsuruta O, Yokoyama H, Fujii S. A new crystal lattice structure of Helicobacter pylori neutrophil-activating protein (HP-NAP). Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012 Feb;68(Pt 2):134–40.

58. Tünger Ö. Helicobacter pylori İnfeksiyonları. İnfeksiyon Derg (Turkish J Infect. 2008;2(22):107–15.

59. Şimşek Pİ, Ömer U, Binicier B. Helicobacter pylori Helicobacter pylori. 2011;13–26.

60. Li H, Yang T, Liao T, Debowski AW, Nilsson H-O, Fulurija A, et al. The redefinition of Helicobacter pylori lipopolysaccharide O-antigen and core-oligosaccharide domains. PLoS Pathog. 2017 Mar;13(3):e1006280.

61. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. 1996 Oct;20(10):1161–81.

62. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. J Gastroenterol Hepatol. 2011;26(SUPPL. 1):31–4.

63. Stolte M, Meining A. The Updated Sydney System: Classification and Grading of Gastritis as the Basis of Diagnosis and Treatment. Can J Gastroenterol. 2001;15:591–8.

64. Kılıcarslan H, Kalyon S, Yenice N. Etiopathogenesis of Peptic Ulser. Med J Okmeydanı Train Res Hosp. 2013;27(2):65–9.

65. Bornschein J, Malfertheiner P. Gastric carcinogenesis. Langenbeck's Arch Surg [Internet]. 2011 Aug;396(6):729–42. Available from: https://doi.org/10.1007/s00423-011-0810-y

66. Granström M, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. Vol. 35, Journal of Clinical Microbiology. 1997. p. 468–70.

67. Malaty HM, Graham DY, Wattigney WA, Srinivasan SR, Osato M, Berenson GS. Natural history of Helicobacter pylori infection in childhood : 12-year follow-up cohort study in a biracial community. Clin Infect Dis. 1999;28(June):279–82.

68. Pérez-pérez GI, Sack RB, Reid R, Santosham M, Croll J, Blaser MJ, et al. Transient and Persistent Helicobacter pylori Colonization in Native American Children Transient and Persistent Helicobacter pylori Colonization in Native American Children. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2401–7.

69. Owen RJ. Helicobacter. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Wiley Periodicals, Inc.; 2010.

70. Warren JR. Gastric Pathology Associated With. 2000;29(3):705–51.

71. Kate V, Ananthakrishnan N, Tovey FI, Ananthakrishnan N, Kate V. Is Helicobacter pylori Infection the Primary Cause of Duodenal Ulceration or a Secondary Factor ? A Review of the Evidence 1 . It Is the Primary Cause of Ulceration. 2013;2013.

72. El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, et al. Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion. Gastroenterology. 1997 Jul;113(1):15–24.

73. el-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE. Helicobacter

pylori infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. Gastroenterology. 1995 Sep;109(3):681–91.

74. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. J Physiol Pharmacol. 2009 Sep;60(3):3–21.

75. Siao D, Somsouk M. Helicobacter pylori: evidence-based review with a focus on immigrant populations. J Gen Intern Med. 2014 Mar;29(3):520–8.

76. den Hollander WJ, Sostres C, Kuipers EJ, Lanas A. Helicobacter pylori and Nonmalignant Diseases. Helicobacter. 2013;18(S1):24–7.

77. Leodolter A, Kulig M, Brasch H, Meyer-Sabellek W, Willich SN, Malfertheiner P. A meta-analysis comparing eradication, healing and relapse rates in patients with Helicobacter pylori-associated gastric or duodenal ulcer. Aliment Pharmacol Ther. 2001 Dec;15(12):1949–58.

78. Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. Lancet (London, England). 2002 Jan;359(9300):14–22.

79. Wallace JL. How do NSAIDs cause ulcer disease? Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2000 Feb;14(1):147–59.

80. Drini M. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Vol. 40, Australian Prescriber. 2017. p. 91–3.

81. Yoon H, Lee DH, Jang ES, Kim J, Shin CM, Park YS, et al. Optimal initiation of Helicobacter pylori eradication in patients with peptic ulcer bleeding. Vol. 21, World Journal of Gastroenterology : WJG. 2015. p. 2497–503.

82. Ford AC, Gurusamy KS, Delaney B, Forman D, Moayyedi P. Eradication therapy for peptic ulcer disease in Helicobacter pylori-positive people. Cochrane database Syst Rev. 2016 Apr;4:CD003840.

83. Kusters JG, Gerrits MM, Strijp JAGVAN. Coccoid Forms of Helicobacter pylori Are the Morphologic Manifestation of Cell Death. 1997;65(9):3672–9.

84. Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, et al. Evaluation of two enzyme immunoassays for detecting Helicobacter pylori in stool specimens of dyspeptic patients after eradication therapy. J Med Microbiol. 2005 Sep;54(Pt 9):863–6.

85. Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP. The prevalence of Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. Aliment Pharmacol Ther. 1995;9 Suppl 2:59–69.

86. IARC. Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. Iarc Monogr Eval Carcinog Risks To Humans. 1994;61:121–62.

87. Malfertheiner P, Bornschein J, Selgrad M. Role of Helicobacter pylori infection in gastric cancer pathogenesis: A chance for prevention. J Dig Dis. 2010;11(1):2–11.

88. Nardone G, Rocco A, Malfertheiner P. Review article: Helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions. Aliment Pharmacol Ther. 2004;20(3):261–70.

89. Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer. Lancet (London, England). 2003 Jul;362(9380):305–15.

90. Bowles MJ, Benjamin IS. ABC of the upper gastrointestinal tract: Cancer of the stomach and pancreas. BMJ. 2001 Dec;323(7326):1413–6.

91. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. Vol. 3, Journal of Gastrointestinal Oncology. 2012. p. 251–61.

92. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31–49.

93. Sugiyama T, Asaka M. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. Med Electron Microsc. 2004;37(3):149–57.

94. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. Lancet (London, England). 1975 Jul;2(7924):58–60.

95. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res. 1988 Jul;48(13):3554–60.

96. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First

American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer Res. 1992 Dec;52(24):6735–40.

97. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. J Dig Dis. 2012 Jan;13(1):2–9.

98. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by Helicobacter pylori virulence factors. Cancer Res. 2008 Jan;68(2):379–87.

99. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. Vol. 40, Gut. 1997. p. 297–301.

100. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. 1995 May;55(10):2111–5.

101. Wang S-K, Zhu H-F, He B-S, Zhang Z-Y, Chen Z-T, Wang Z-Z, et al. CagA+ H pylori infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. Vol. 13, World Journal of Gastroenterology : WJG. 2007. p. 2923–31.

102. Roesler BM. Is there any relationship between Helicobacter pylori dupA gene and the development of early and advanced gastric cancer in Brazilian patients ? 2013;(January).

103. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status. J Natl Cancer Inst. 1995 Dec;87(23):1777–80.

104. Roesler B, Botelho S, Robilotta JM. Virulence Factors of Helicobacter pylori and Their Relationship with the Development of Early and Advanced Distal Intestinal Type Gastric Adenocarcinoma. Grastritis and Gastric Cancer. 2011;296.

105. Kabir S. Effect of Helicobacter pylori eradication on incidence of gastric cancer in human and animal models: underlying biochemical and molecular events. Helicobacter. 2009 Jun;14(3):159–71.

106. Gisbert JP, Calvet X. Review article: common misconceptions in the management of Helicobacter pylori-associated gastric MALT-lymphoma. Aliment Pharmacol Ther. 2011

Nov;34(9):1047–62.

107. Jonkers D, Gisbertz I, de Bruine A, Bot F, Arends JW, Stobberingh E, et al. Helicobacter pylori and non-Helicobacter pylori bacterial flora in gastric mucosal and tumour specimens of patients with primary gastric lymphoma. Eur J Clin Invest. 1997 Nov;27(11):885–92.

108. Dogusoy G, Karayel FA, Gocener S, Goksel S. Histopathologic features and expression of Bcl-2 and p53 proteins in primary gastric lymphomas. Pathol Oncol Res. 1999;5(1):36–40.

109. Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. Cancer. 1983 Oct;52(8):1410–6.

110. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. Cancer Lett. 2014 Apr;345(2):196–202.

111. Asenjo LM, Gisbert JP. [Prevalence of Helicobacter pylori infection in gastric MALT lymphoma: a systematic review]. Rev Esp Enferm Dig. 2007 Jul;99(7):398–404.

112. Genta RM, Hamner HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in Helicobacter pylori infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. Hum Pathol. 1993 Jun;24(6):577–83.

113. Isaacson PG. Gastrointestinal lymphoma. Hum Pathol. 1994 Oct;25(10):1020–9.

114. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet (London, England). 1991 Nov;338(8776):1175–6.

115. Eidt S, Stolte M, Fischer R. Helicobacter pylori gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. Vol. 47, Journal of Clinical Pathology. 1994. p. 436–9.

116. Nakamura S, Matsumoto T. Helicobacter pylori and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Recent progress in pathogenesis and management. Vol. 19, World Journal of Gastroenterology : WJG. 2013. p. 8181–7.

117. Nakamura S, Aoyagi K, Furuse M, Suekane H, Matsumoto T, Yao T, et al. B-cell monoclonality precedes the development of gastric MALT lymphoma in Helicobacter pylori-associated chronic gastritis. Am J Pathol. 1998 May;152(5):1271–9.

118. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with Helicobacter felis. A mouse model of Helicobacter pylori-induced gastric lymphoma. Vol. 147, The American Journal of Pathology. 1995. p. 217–22.

119. Ferrero RL, Avé P, Radcliff FJ, Labigne A, Huerre MR. Outbred mice with long-term Helicobacter felis infection develop both gastric lymphoid tissue and glandular hyperplastic lesions. J Pathol. 2000 Jul;191(3):333—340.

120. Zullo A, Hassan C, Cristofari F, Andriani A, De Francesco V, Ierardi E, et al. Effects of Helicobacter pylori eradication on early stage gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Clin Gastroenterol Hepatol. 2010 Feb;8(2):105–10.

121. Wundisch T, Dieckhoff P, Greene B, Thiede C, Wilhelm C, Stolte M, et al. Second cancers and residual disease in patients treated for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma by Helicobacter pylori eradication and followed for 10 years. Gastroenterology. 2012 Oct;143(4):934–6.

122. Ruskone-Fourmestraux A, Fischbach W, Aleman BMP, Boot H, Du MQ, Megraud F, et al. EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. Gut. 2011 Jun;60(6):747–58.

123. Liu H, Ye H, RuskoneFourmestraux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, et al. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. Gastroenterology. 2002;122(5):1286–94.

124. Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, et al. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 1997 Oct;8(10):979–85.

125. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, et al. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. Cancer Res. 1997 Sep;57(18):3944–8.

126. Isaacson PG, Du M-Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. Vol. 4, Nature

reviews. Cancer. England; 2004. p. 644–53.

127. Vicari J, Falk GW, Richter JE. Helicobacter pylori and acid peptic disorders of the esophagus: is it conceivable? Am J Gastroenterol. 1997 Jul;92(7):1097–102.

128. Peek RM. Helicobacter pylori and Gastroesophageal Reflux Disease. Curr Treat Options Gastroenterol. 2004 Feb;7(1):59–70.

129. Mungan Z, Pinarbasi Simsek B. Gastroesophageal reflux disease and the relationship with Helicobacter pylori. Turkish J Gastroenterol. 2017;28(1):61–7.

130. Labenz J, Malfertheiner P. Helicobacter pylori in gastro-oesophageal reflux disease: causal agent, independent or protective factor? Vol. 41, Gut. 1997. p. 277–80.

131. Raghunath A, Hungin APS, Wooff D, Childs S. Prevalence of Helicobacter pylori in patients with gastro-oesophageal reflux disease: systematic review. BMJ. 2003 Apr;326(7392):737.

132. Tan H-J, Goh K-L. Extragastrointestinal manifestations of Helicobacter pylori infection: facts or myth? A critical review. J Dig Dis. 2012 Jul;13(7):342–9.

133. Perez Roldan F, Castellanos Monedero JJ, Gonzalez Carro P, Villafanez Garcia MC, Roncero Garcia-Escribano O, Legaz Huidobro ML, et al. [Effect of Helicobacter pylori eradication on iron deficiency anemia of unknown origin]. Gastroenterol Hepatol. 2008 Apr;31(4):213–6.

134. Annibale B, Marignani M, Monarca B, Antonelli G, Marcheggiano A, Martino G, et al. Reversal of iron deficiency anemia after Helicobacter pylori eradication in patients with asymptomatic gastritis. Ann Intern Med. 1999 Nov;131(9):668–72.

135. Monzón H, Forné M, Esteve M, Rosinach M, Loras C, Espinós JC, et al. Helicobacter pylori infection as a cause of iron deficiency anaemia of unknown origin. Vol. 19, World Journal of Gastroenterology : WJG. 2013. p. 4166–71.

136. Andersen LP, Fox JG, States U, Lee A, Dore MP. European Helicobacter Study Group: Abstracts of the XXIVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Helicobacter. 2012;17:67–120.

137. Kaklıkkaya İ, Kaklıkkaya N, Çubukçu K, Sönmez B, Kocazeybek B,: Koroner arter hastalığı ve Helicobacter pylori. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi. 2001;9:142-144

138. Jamkhande PG, Gattani SG, Farhat SA. Helicobacter pylori and cardiovascular complications: a mechanism based review on role of Helicobacter pylori in cardiovascular diseases. Vol. 5, Integrative Medicine Research. 2016. p. 244–9.

139. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, Molineaux N, et al. Association of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. Vol. 311, BMJ : British Medical Journal. 1995. p. 711–4.

140. Laurila A, Bloigu A, Nayha S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P. Association of Helicobacter pylori infection with elevated serum lipids. Atherosclerosis. 1999 Jan;142(1):207–10.

141. Tamer GS, Tengiz I, Ercan E, Duman C, Alioglu E, Turk UO. Helicobacter pylori seropositivity in patients with acute coronary syndromes. Dig Dis Sci. 2009;54(6):1253–6.

142. De Bastiani R, Gabrielli M, Ubaldi E, Benedetto E, Sanna G, Cottone C, et al. High prevalence of Cag-A positive *H. pylori* strains in ischemic stroke: a primary care multicenter study. Helicobacter. 2008 Aug;13(4):274–7.

143. Gabrielli M, Pola P, Gasbarrini A. Helicobacter pylori, CagA-positive strains, and ischemic stroke. Vol. 33, Stroke. United States; 2002. p. 1453–4.

144. Hashim H. Eradication of Helicobacter pylori Infection Improves Levodopa Action, Clinical Symptoms and Quality of Life in Patients with Parkinson's Disease. Vol. 9. 2014.

145. Malfertheiner P, Megraud F, Morain CAO, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, et al. Management of Helicobacter pylori infection d the Maastricht IV / Florence Consensus Report. 2012;

146. Lu B, Li M. Helicobacter pylori eradication for preventing gastric cancer. World J Gastroenterol. 2014;20(19):5660–5.

147. Choi YJ, Kim N, Lim J, Jo SY, Shin CM, Lee HS, et al. Accuracy of diagnostic tests for

Helicobacter pylori in patients with peptic ulcer bleeding. Helicobacter. 2012 Apr;17(2):77–85.

148. Adu-Aryee NA, Aabakken L, Dedey F, Nsaful J, Kudzi W. Comparison of endoscopic based diagnosis with Helicobacter urease test for Helicobacter pylori infection. BMC Res Notes. 2016 Aug;9(1):421.

149. Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Bosshard G, Cazzaniga G, Pedrinis E, et al. Molecular analysis of the progression from Helicobacter pylori-associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of the stomach. N Engl J Med. 1998 Mar;338(12):804–10.

150. Martin A. [Molecular analysis of the progression of Helicobacter pylori-associated chronic gastritis toward mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma]. Gastroenterol Clin Biol. 1998 Oct;22(10):843–4.

151. Kalach N, Gosset P, Dehecq E, Decoster A, Spyckerelle C, Papadopolos S, et al. Usefulness of Gastric Biopsy-Based Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Helicobacter pylori Infection in Children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2015 Sep;61(3):307–12.

152. Ginestet F, Guibourg B, Doucet L, Thereaux J, Robaszkiewicz M, Marcorelles P, et al. Upfront immunohistochemistry improves specificity of Helicobacter pylori diagnosis. A French pathology laboratory point of view. Helicobacter. 2017 Oct;22(5).

153. Costa S, Soares J-B, Goncalves R. Efficacy and tolerability of culture-guided treatment for Helicobacter pylori infection. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017 Sep;

154. Tanaka K, Fujiya M, Sakatani A, Fujibayashi S, Nomura Y, Ueno N, et al. Second-line therapy for Helicobacter pylori eradication causing antibiotic-associated hemorrhagic colitis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017 Aug;16(1):54.

155. Graham DY. Illusions regarding Helicobacter pylori clinical trials and treatment guidelines. Gut. 2017 Sep;

156. Klesiewicz K, Nowak P, Karczewska E, Skiba I, Wojtas- I, Sito E, et al. PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance

to clarithromycin in Helicobacter pylori strains *. 2014;61(2).

157. Pereyra LD V, Gorordo Ipina RC, Berruezo FA, Amieva CA, Garcia ME, Bottiglieri MT. [Antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori strains isolated from gastric lesions]. Rev Argent Microbiol. 2017 Apr;49(2):153–7.

158. Moon D-I, Shin E-H, Oh H-G, Oh J-S, Hong S, Chung Y, et al. Usefulness of a Helicobacter pylori stool antigen test for diagnosing *H. pylori* infected C57BL/6 mice. Lab Anim Res. 2013 Mar;29(1):27–32.

159. Megraud F, Benejat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. Molecular Approaches to Identify Helicobacter pylori Antimicrobial Resistance. Gastroenterol Clin North Am. 2015 Sep;44(3):577–96.

160. Fontenete S, Leite M, Cappoen D, Santos R, Ginneken C Van, Figueiredo C, et al. Fluorescence In Vivo Hybridization (FIVH) for Detection of Helicobacter pylori Infection in a C57BL/6 Mouse Model. PLoS One. 2016;11(2):e0148353.

161. Noguchi K, Kato K, Moriya T, Suzuki T, Saito M, Kikuchi T, et al. Analysis of cell damage in Helicobacter pylori-associated gastritis. Pathol Int. 2002 Feb;52(2):110–8.

162. Monno R, Giorgio F, Carmine P, Soleo L, Cinquepalmi V, Ierardi E. Helicobacter pylori clarithromycin resistance detected by Etest and TaqMan real-time polymerase chain reaction: a comparative study. APMIS. 2012 Sep;120(9):712–7.

163. Zullo A, De Francesco V, Bellesia A, Vassallo R, D'Angelo A, Scaccianoce G, et al. Bismuth-based quadruple therapy following *H. pylori* eradication failures: a multicenter study in clinical practice. J Gastrointestin Liver Dis. 2017 Sep;26(3):225–9.

164. Bielanski W, Konturek SJ. New approach to 13C-urea breath test: capsule-based modification with low-dose of 13C-urea in the diagnosis of Helicobacter pylori infection. J Physiol Pharmacol. 1996 Sep;47(3):545–53.

165. Rahman S-HZ, Azam M-G, Rahman M-A, Arfin M-S, Alam M-M, Bhuiyan T-M, et al. Non-invasive diagnosis of H pylori infection: evaluation of serological tests with and without current infection marker CIM. World J Gastroenterol. 2008 Feb;14(8):1231–6.

166. Bessede E, Arantes V, Megraud F, Coelho LG. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2017 Sep;22 Suppl 1.

167. Fernández-de-las-Peñas C, Hernández-Barrera V, Carrasco-Garrido P, Alonso-Blanco C, Palacios-Ceña D, Jiménez-Sánchez S, et al. Population-based study of migraine in Spanish adults: relation to socio-demographic factors, lifestyle and co-morbidity with other conditions. Vol. 11, The Journal of Headache and Pain. Milan; 2010. p. 97–104.

168. Korkmaz H, Findik D, Ugurluoglu C, Terzi Y. Reliability of stool antigen tests: investigation of the diagnostic value of a new immunochromatographic Helicobacter pylori approach in dyspeptic patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(2):657–60.

169. Kocazeybek B, Memişoğlu R, Memişoğlu N, et al. Helicobacter pylori infeksiyonlarının tanısında dışkıda antijen saptama ve tedavi sonrası Helicobacter pylori eradikasyonunun takibindeki rolü: İnfeksiyon Derg 2002

170. Hansson LE, Nyren O, Hsing AW, Bergstrom R, Josefsson S, Chow WH, et al. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. N Engl J Med. 1996 Jul;335(4):242–9.

171. Furuta T, Soya Y, Sugimoto M, Shirai N, Nakamura A, Kodaira C, et al. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of Helicobacter pylori strains to clarithromycin. J Gastroenterol Hepatol. 2007 Nov;22(11):1810–5.

172. Beckman E, Saracino I, Fiorini G, Clark C, Slepnev V, Patel D, et al. A Novel Stool PCR Test for Helicobacter pylori May Predict Clarithromycin Resistance and Eradication of Infection at a High Rate. J Clin Microbiol. 2017 Aug;55(8):2400–5.

173. Demiray Gurbuz E, Gonen C, Bekmen N, Dolek D, Soyturk M, Sagol O, et al. The diagnostic accuracy of urine IgG antibody tests for the detection of Helicobacter pylori infection in Turkish dyspeptic patients. Turk J Gastroenterol. 2012;23(6):753–8.

174. Okuda M, Mabe K, Lin Y, Chaochen W, Taniguchi Y, Kato M, et al. Rapid urine antibody test for Helicobacter pylori infection in adolescents. Pediatr Int. 2017 Jul;59(7):798–802.

175. Almeida N, Donato MM, Romaozinho JM, Luxo C, Cardoso O, Cipriano MA, et al. Beyond Maastricht IV: are standard empiric triple therapies for Helicobacter pylori still useful in a South-European country? BMC Gastroenterol. 2015 Feb;15:23.

176. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut. 2007;56(6):772–81.

177. Ching CK, Chan YK, Ng WC. The combination of omeprazole, amoxycillin, and clarithromycin eradicates Helicobacter pylori in 95% of patients---7 days of therapy is as good as 10 days. Hong Kong Med J = Xianggang yi xue za zhi. 1998 Mar;4(1):7–10.

178. Basyigit S, Kefeli A, Sapmaz F, Doğan Ö, Yeniova A. Birinci basamak Helicobacter pylori eradikasyon tedavisinde levofloksasin içeren hibrid tedavi protokolünün etkinlik ve güvenilirliğinin değerlendirilmes. Akad Gastroenteroloji Derg. 2017;15:97–101.

179. Wong WM, Gu Q, Wang WH, Fung FM-Y, Berg DE, Lai KC, et al. Effects of Primary Metronidazole and Clarithromycin Resistance to Helicobacter pylori on Omeprazole, Metronidazole, and Clarithromycin Triple-Therapy Regimen in a Region with High Rates of Metronidazole Resistance. Clin Infect Dis. 2003;37(7):882–9.

180. Bjorkman DJ, Steenblik M. Best Practice Recommendations for Diagnosis and Management of Helicobacter pylori-Synthesizing the Guidelines. Curr Treat Options Gastroenterol. 2017 Sep;

181. Kienesberger S, Cox LM, Livanos A, Zhang X-S, Chung J, Perez-Perez GI, et al. Gastric Helicobacter pylori Infection Affects Local and Distant Microbial Populations and Host Responses. Cell Rep. 2016 Feb;14(6):1395–407.

182. Ozturk O, Doganay L, Colak Y, Yilmaz Enc F, Ulasoglu C, Ozdil K, et al. Therapeutic success with bismuth-containing sequential and quadruple regimens in Helicobacter pylori eradication. Arab J Gastroenterol. 2017 Jun;18(2):62–7.

183. Gerrits MM, Schuijffel D, van Zwet AA, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Kusters JG. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Jul;46(7):2229–33.

184. Moder KA, Layer F, König W, König B. Rapid screening of clarithromycin resistance in Helicobacter pylori by pyrosequencing. J Med Microbiol. 2007;56(10):1370–6.

185. Jeng YW, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY, Kwon DH. Tetracycline-resistant clinical Helicobacter pylori isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2):578–83.

186. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit J-C, Soussy C-J. Single and Double Mutations in gyrA but Not in gyrB Are Associated with Low- and High-Level Fluoroquinolone Resistance in Helicobacter pylori. Vol. 47, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. p. 3942–4.

187. Hoffman PS, Goodwin A, Johnsen J, Magee K, Veldhuyzen van Zanten SJ. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of Helicobacter pylori: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. J Bacteriol. 1996 Aug;178(16):4822–9.

188. Heep M, Beck D, Bayerdörffer E, Lehn N. Rifampin and Rifabutin Resistance Mechanism inHelicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(6):1497–9.

189. Padol S, Yuan Y, Thabane M, Padol IT, Hunt RH. The effect of CYP2C19 polymorphisms on *H. pylori* eradication rate in dual and triple first-line PPI therapies: a meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2006 Jul;101(7):1467–75.

190. SUZUKI T, MATSUO K, SAWAKI A, WAKAI K, HIROSE K, ITO H, et al. Influence of smoking and CYP2C19 genotypes on *H. pylori* eradication success. Vol. 135, Epidemiology and Infection. Cambridge, UK; 2007. p. 171–6.

191. Megraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut. 2004 Sep;53(9):1374–84.

192. Baglan PH, Bozdayi G, Ozkan M, Ahmed K, Bozdayi AM, Ozden A. Clarithromycin resistance prevalence and Icea gene status in Helicobacter Pylori clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. J Microbiol. 2006 Aug;44(4):409–16.

193. Weerasekara D, Dissanayake D, Athukorala G, Weerasekera MM, Lankan S, Diseases I.

Antibiotic resistance in Helicobacter pylori : Recent insights. 2014;2–8.

194. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O, et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in Helicobacter pylori strains over a 15 year period in Italy. J Antimicrob Chemother. 2007 Apr;59(4):783–5.

195. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, et al. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in Helicobacter pylori. J Clin Microbiol. 2009 Nov;47(11):3600–7.

196. Taylor DE. Pathophysiology of antibiotic resistance : Clarithromycin. 2000;14(10).

197. Ierardi E, Giorgio F, Iannone A, Losurdo G, Principi M, Barone M, et al. Noninvasive molecular analysis of Helicobacter pylori: Is it time for tailored first-line therapy? Vol. 23, World journal of gastroenterology. United States; 2017. p. 2453–8.

198. Francavilla R, Lionetti E, Castellaneta S, Margiotta M, Piscitelli D, Lorenzo L, et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of Helicobacter pylori. J Pediatr. 2010 Aug;157(2):228–32.

199. De Francesco V, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F, Perna F, Hassan C, et al. The A2143G point mutation of clarithromycin resistance affects Helicobacter pylori eradication. Vol. 43, Journal of clinical gastroenterology. United States; 2009. p. 386.

200. Vega AE, Alarcon T, Domingo D, Martinez MJ, Lopez-Brea M. [Detection of resistance to clarithromycin in clinical isolates of Helicobacter pylori from children and adults]. Rev Esp Quimioter. 2003 Mar;16(1):53–7.

201. Wang G, Wilson TJ, Jiang Q, Taylor DE. Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Mar;45(3):727–33.

202. Zhen-hua Z, De-qiang H, Yong X, Lin-lin L, Nong-hua L. Characterization of 23S rRNA gene mutation in primary and secondary clarithromycin-resistant Helicobacter pylori strains from East China. 2013;2013(1):5–9.

203. Hansomburana P, Anantapanpong S, Sirinthornpunya S, Chuengyong K, Rojborwonwittaya J. Prevalence of single nucleotide mutation in clarithromycin resistant gene of Helicobacter

pylori: a 32-months prospective study by using hybridization real time polymerase chain reaction. J Med Assoc Thai. 2012 Mar;95 Suppl 3:S28-35.

204. Burucoa C, Landron C, Garnier M, Fauchère J-L. T2182C mutation is not associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2):868; author reply 868-870.

205. Garrido L, Toledo H. Novel genotypes in Helicobacter pylori involving domain V of the 23S rRNA gene. Helicobacter. 2007 Oct;12(5):505–9.

206. Hirata K, Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Muraoka H, Saito Y, et al. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. J Gastroenterol Hepatol. 2010 May;25 Suppl 1:S75-9.

207. Zhang Z, Liu Z-Q, Zheng P-Y, Tang F-A, Yang P-C. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of Helicobacter pylori. World J Gastroenterol. 2010 Mar;16(10):1279–84.

208. Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J. Helicobacter pylori and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. Helicobacter. 2016 Oct;21(5):349–63.

209. Kim MS, Kim N, Kim SE, Jo HJ, Shin CM, Lee SH, et al. Long-term follow-up Helicobacter pylori reinfection rate and its associated factors in Korea. Helicobacter. 2013 Apr;18(2):135–42.

210. Mitui M, Patel A, Leos NK, Doern CD, Park JY. Novel Helicobacter pylori Sequencing Test Identifies High Rate of Clarithromycin Resistance. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014;59(1):6–9.

211. Akguc M, Karatayli E, Celik E, Koyuncu D, Celik I, Karatayli SC, et al. [Production of a recombinant CagA protein for the detection of Helicobacter pylori CagA antibodies]. Mikrobiyol Bul. 2014 Jul;48(3):402–12.

212. Malfertheiner P, Megraud F, Morain CAO, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of Helicobacter pylori infection — the Maastricht V / Florence Consensus Report. 2017;6–30.

213. Knols BG, Smallegange RC, Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics. Lancet Infect Dis. 2016;9(9):535–6.

214. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet (London, England). 1984 Jun;1(8390):1311–5.

215. Kocazeybek, Yuksel, Celik D, et al. Relationship between aneurysm and microorganism: Is Helicobacter pylori a primer agent or has an affinity to the tissue?African Journal of Microbiology Research 2013;7(17):1723-1728

216. Banic M, Franceschi F, Babic Z, Gasbarrini A. Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2012 Sep;17 Suppl 1:49–55.

217. Chen B-F, Xu X, Deng Y, Ma S-C, Tang L-Q, Zhang S-B, et al. Relationship between Helicobacter pylori infection and serum interleukin-18 in patients with carotid atherosclerosis. Helicobacter. 2013 Apr;18(2):124–8.

218. Alba C, Blanco A, Alarcón T. Antibiotic resistance in Helicobacter pylori. Curr Opin Infect Dis. 2017;30(5):489–97.

219. Vale FF, Vitor JMB. Transmission pathway of Helicobacter pylori: does food play a role in rural and urban areas? Int J Food Microbiol. 2010 Mar;138(1–2):1–12.

220. Zullo A, Hassan C, Lorenzetti R, Winn S, Morini S. A clinical practice viewpoint: to culture or not to culture Helicobacter pylori? Dig Liver Dis. 2003 May;35(5):357–61.

221. de Boer WA, Tytgat GN. Regular review: treatment of Helicobacter pylori infection. BMJ. 2000 Jan;320(7226):31–4.

222. Calvet X, Gene E, Sanfeliu I. [Therapeutic strategies in Helicobacter pylori infection]. Vol. 116, Medicina clinica. Spain; 2001. p. 239.

223. Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in Helicobacter pylori. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001 Nov;20(11):820–3.

224. Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of Helicobacter pylori

infections. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2008 Jun;5(6):321–31.

225. Gisbert JP, Pajares JM. Helicobacter pylori “rescue” therapy after failure of two eradication treatments. Helicobacter. 2005 Oct;10(5):363–72.

226. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, et al. Helicobacter pylori in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. J Gastrointestin Liver Dis. 2011 Sep;20(3):299–304.

227. Boyanova L, Mitov I. Geographic map and evolution of primary Helicobacter pylori resistance to antibacterial agents. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 Jan;8(1):59–70.

228. Fujisawa T, Kumagai T, Akamatsu T, Kiyosawa K, Matsunaga Y, Sörberg M, et al. Changes in seroepidemiological pattern of Helicobacter pylori and hepatitis A virus over the last 20 years in Japan. Helicobacter [Internet]. 2012 Apr;20(4):1500–4. Available from: http://europepmc.org/abstract/MED/19621607

229. Bastos J, Peleteiro B, Barros R, Alves L, Severo M, de Fatima Pina M, et al. Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of Helicobacter pylori infection in Portuguese adults. Helicobacter. 2013 Dec;18(6):413–22.

230. Fujimoto Y, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H, Sawayama Y, Hayashi J. Intrafamilial transmission of Helicobacter pylori among the population of endemic areas in Japan. Helicobacter. 2007 Apr;12(2):170–6.

231. Ford AC, Axon ATR. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications. Helicobacter. 2010 Sep;15 Suppl 1:1–6.

232. Cars O, Molstad S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. Vol. 357, Lancet (London, England). England; 2001. p. 1851–3.

233. Perez-Perez GI, Bhat N, Gaensbauer J, Fraser A, Taylor DN, Kuipers EJ, et al. Country-specific constancy by age in cagA+ proportion of Helicobacter pylori infections. Int J cancer. 1997 Jul;72(3):453–6.

234. Bernstein CN, McKeown I, Embil JM, Blanchard JF, Dawood M, Kabani A, et al. Seroprevalence of Helicobacter pylori, incidence of gastric cancer, and peptic ulcer-

associated hospitalizations in a Canadian Indian population. Dig Dis Sci. 1999 Apr;44(4):668–74.

235. Chen Y, Blaser MJ. Association between gastric Helicobacter pylori colonization and glycated hemoglobin levels. J Infect Dis. 2012 Apr;205(8):1195–202.

236. Cao Q, Didelot X, Wu Z, Li Z, He L, Li Y, et al. Progressive genomic convergence of two Helicobacter pylori strains during mixed infection of a patient with chronic gastritis. Gut. 2015;64(4):554–61.

237. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection. Am J Gastroenterol. 2017 Feb;112(2):212–39.

238. Shiotani A, Lu H, Dore MP, Graham DY. Treating Helicobacter pylori effectively while minimizing misuse of antibiotics. Cleve Clin J Med. 2017 Apr;84(4):310–8.

239. Graham DY, Dore MP. Helicobacter pylori therapy: a paradigm shift. Expert Rev Anti Infect Ther. 2016 Jun;14(6):577–85.

240. Hu C-T, Wu C-C, Lin C-Y, Cheng C-C, Su S-C, Tseng Y-H, et al. Resistance rate to antibiotics of Helicobacter pylori isolates in eastern Taiwan. J Gastroenterol Hepatol. 2007 May;22(5):720–3.

241. Graham DY, Fischbach L. Helicobacter pylori treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut. 2010 Aug;59(8):1143–53.

242. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, et al. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut. 2013 Jan;62(1):34–42.

243. Larsen AL, Ragnhildstveit E, Moayeri B, Eliassen L, Melby KK. Resistance rates of metronidazole and other antibacterials in Helicobacter pylori from previously untreated patients in Norway. Apmis. 2013;121(4):353–8.

244. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, et al. Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut. 2012 May;61(5):646–64.

245. Georgopoulos SD, Xirouchakis E, Martinez-Gonzalez B, Sgouras DN, Spiliadi C, Mentis AF, et al. Clinical evaluation of a ten-day regimen with esomeprazole, metronidazole, amoxicillin, and clarithromycin for the eradication of Helicobacter pylori in a high clarithromycin resistance area. Helicobacter. 2013 Dec;18(6):459–67.

246. Wueppenhorst N, Stueger H-P, Kist M, Glocker E-O. High secondary resistance to quinolones in German Helicobacter pylori clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2013 Jul;68(7):1562–6.

247. Miftahussurur M, Yamaoka Y. Appropriate first-line regimens to combat Helicobacter pylori antibiotic resistance: an Asian perspective. Molecules. 2015 Apr;20(4):6068–92.

248. Perez Aldana L, Kato M, Nakagawa S, Kawarasaki M, Nagasako T, Mizushima T, et al. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary Helicobacter pylori resistance. Helicobacter. 2002 Oct;7(5):306–9.

249. Tveit AH, Bruce MG, Bruden DL, Morris J, Reasonover A, Hurlburt DA, et al. Alaska Sentinel Surveillance Study of Helicobacter pylori Isolates from Alaska Native Persons from 2000 to 2008. Vol. 49, Journal of Clinical Microbiology. 1752 N St., N.W., Washington, DC; 2011. p. 3638–43.

250. McMahon BJ, Hennessy TW, Bensler JM, Bruden DL, Parkinson AJ, Morris JM, et al. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for Helicobacter pylori infections. Ann Intern Med. 2003 Sep;139(6):463–9.

251. Carothers JJ, Bruce MG, Hennessy TW, Bensler M, Morris JM, Reasonover AL, et al. The relationship between previous fluoroquinolone use and levofloxacin resistance in Helicobacter pylori infection. Clin Infect Dis. 2007 Jan;44(2):e5-8.

252. McNulty CAM, Lasseter G, Shaw I, Nichols T, D'Arcy S, Lawson AJ, et al. Is Helicobacter pylori antibiotic resistance surveillance needed and how can it be delivered? Aliment Pharmacol Ther. 2012 May;35(10):1221–30.

253. Horiki N, Omata F, Uemura M, Suzuki S, Ishii N, Iizuka Y, et al. Annual change of primary resistance to clarithromycin among Helicobacter pylori isolates from 1996 through 2008 in Japan. Helicobacter. 2009 Oct;14(5):86–90.

254. Okamura T, Suga T, Nagaya T, Arakura N, Matsumoto T, Nakayama Y, et al. Antimicrobial resistance and characteristics of eradication therapy of Helicobacter pylori in Japan: a multi-generational comparison. Helicobacter. 2014 Jun;19(3):214–20.

255. Zhang Y-X, Zhou L-Y, Song Z-Q, Zhang J-Z, He L-H, Ding Y. Primary antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains isolated from patients with dyspeptic symptoms in Beijing: A prospective serial study. Vol. 21, World Journal of Gastroenterology : WJG. 2015. p. 2786–92.

256. Tsay F-W, Wu D-C, Kao S-S, Tsai T-J, Lai K-H, Cheng J-S, et al. Reverse sequential therapy achieves a similar eradication rate as standard sequential therapy for Helicobacter pylori eradication: a randomized controlled trial. Helicobacter. 2015 Feb;20(1):71–7.

257. Kim SY, Lee SW, Choe JW, Jung SW, Hyun JJ, Jung YK, et al. Helicobacter pylori eradication rates of concomitant and sequential therapies in Korea. Helicobacter. 2017 Sep;

258. Agudo S, Perez-Perez G, Alarcon T, Lopez-Brea M. High prevalence of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. J Clin Microbiol. 2010 Oct;48(10):3703–7.

259. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, et al. Helicobacter pylori in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. J Gastrointestin Liver Dis 2011;20:299–304.

260. Fujisawa T, Kumagai T, Akamatsu T, Kiyosawa K, Matsunaga Y. Changes in seroepidemiological pattern of Helicobacter pylori and hepatitis A virus over the last 20 years in Japan. Am J Gastroenterol. 1999 Aug;94(8):2094–9.

261. Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, Wreiber K, Nyhlin H, Bolling-Sternevald E, et al. Antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori strains in a random adult Swedish population. Helicobacter. 2006 Aug;11(4):224–30.

262. Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, et al. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among Helicobacter pylori-infected persons, United States. Emerg Infect Dis. 2004 Jun;10(6):1088–94.

263. Kim JJ, Reddy R, Lee M, Kim JG, El-Zaatari FA, Osato MS, et al. Analysis of

metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of Helicobacter pylori isolates from Korea. J Antimicrob Chemother. 2001 Apr;47(4):459–61.

264. Boyanova L, Nikolov R, Gergova G, Evstatiev I, Lazarova E, Kamburov V, et al. Two-decade trends in primary Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Bulgaria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010 Aug;67(4):319–26.

265. Aboderin OA, Abdu AR, Odetoyin B 'Wumi, Okeke IN, Lawal OO, Ndububa DA, et al. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria. Afr Health Sci. 2007 Sep;7(3):143–7.

266. Kupcinskas L, Rasmussen L, Jonaitis L, Kiudelis G, Jørgensen M, Urbonaviciene N, et al. Evolution of Helicobacter pylori susceptibility to antibiotics during a 10-year period in Lithuania. Apmis. 2013;121(5):431–6.

267. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between Helicobacter pylori strains. Intern Med. 2008;47(12):1077–83.

268. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 Nov;7(11):629–41.

269. Malfertheiner P, Bazzoli F, Delchier J-C, Celinski K, Giguere M, Riviere M, et al. Helicobacter pylori eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. Lancet (London, England). 2011 Mar;377(9769):905–13.

270. Egan BJ, Katicic M, O'Connor HJ, O'Morain CA. Treatment of Helicobacter pylori. Drugs of Today. 1997;33:59–66 ST–Treatment of Helicobacter pylori.

271. Megraud F. Transmission of Helicobacter pylori: faecal-oral versus oral-oral route. Aliment Pharmacol Ther. 1995;9 Suppl 2:85–91.

272. Ozaydin N, Turkyilmaz SA, Cali S. Prevalence and risk factors of Helicobacter pylori in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the (1)(3)C-Urea breath test. BMC Public Health. 2013 Dec;13:1215.

273. Caliskan R, Tokman HB, Erzin Y, Saribas S, Yuksel P, Bolek BK, et al. Antimicrobial resistance of Helicobacter pylori strains to five antibiotics, including levofloxacin, in Northwestern Turkey. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(3):278–84.

274. Kalem F, Ozdemir M, Basaranoglu M, Toy H BB. Helicobacter pylori isolates recovered from antral gastric biopsies of patients with dyspeptic symptoms: Antimicrobial resistance of metronidazole, clarithromycin and amoxicillin. Anatol J Clin Investig. 2012;6:37–40.

275. Yula E, Nagiyev T, Kaya OA, Inci M, Celik MM, Koksal F. Detection of primary clarithromycin resistance of Helicobacter pylori and association between cagA (+) status and clinical outcome. Folia Microbiol (Praha). 2013 Mar;58(2):141–6.

276. Cagdas U, Otag F, Tezcan S, Sezgin O, Aslan G, Emekdas G. [Detection of Helicobacter pylori and antimicrobial resistance in gastric biopsy specimens]. Mikrobiyol Bul. 2012 Jul;46(3):398–409.

277. Bakir Ozbey S, Ozakin C, Keskin M. [Antibiotic resistance rates of Helicobacter pylori isolates and the comparison of E-test and fluorescent in situ hybridization methods for the detection of clarithromycin resistant strains]. Mikrobiyol Bul [Internet]. 2009 Apr;43(2):227—234. Available from: http://europepmc.org/abstract/MED/19621607

278. Boyanova L, Davidkov L, Gergova G, Kandilarov N, Evstatiev I, Panteleeva E, et al. Helicobacter pylori susceptibility to fosfomycin, rifampin, and 5 usual antibiotics for *H. pylori* eradication. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Jul;79(3):358–61.

279. Hartzen SH, Andersen LP, Bremmelgaard A, Colding H, Arpi M, Kristiansen J, et al. Antimicrobial susceptibility testing of 230 Helicobacter pylori strains: importance of medium, inoculum, and incubation time. Vol. 41, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997. p. 2634–9.

280. Sezgin O, Aslan G, Altintas E, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G. Detection of point mutations on 23S rRNA of Helicobacter pylori and resistance to clarithromycin with PCR-RFLP in gastric biopsy specimens in Mersin, Turkey. Turk J Gastroenterol. 2008 Sep;19(3):163–7.

281. Raymond J, Burucoa C, Pietrini O, Bergeret M, Decoster A, Wann A, et al. Clarithromycin

Resistance in Helicobacter pylori Strains Isolated from French Children : Prevalence of the Different Mutations and Coexistence of Clones Harboring Two Different Mutations in the Same Biopsy. 2007;157–63.

282. Álvarez A, Moncayo JI, Santacruz JJ, Santacoloma M, Corredor LF, Reinosa E. Antimicrobial Susceptibility and Mutations Involved in Clarithromycin Resistance in Helicobacter pylori Isolates from Patients in the Western Central Region of Colombia . Vol. 53, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009. p. 4022–4.

283. Khashei R, Dara M, Bazargani A, Bagheri Lankarani K, Taghavi A, Moeini M, et al. High rate of A2142G point mutation associated with clarithromycin resistance among Iranian Helicobacter pylori clinical isolates. APMIS. 2016 Sep;124(9):787–93.

284. Abdollahi H, Savari M. Detection of A2142C , A2142G , and A2143G Mutations in 23s rRNA Gene Conferring Resistance to Clarithromycin among Helicobacter pylori Isolates in Kerman , Iran. 2011;36(2):104–10.

285. Midolo PD, Bell JM, Lambert JR, Turnidge JD, Grayson ML. Antimicrobial resistance testing of Helicobacter pylori: a comparison of Etest and disk diffusion methods. Pathology. 1997 Nov;29(4):411–4.

286. Megraud F. Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics. Aliment Pharmacol Ther. 1997 Apr;11 Suppl 1:43–53.

287. Glupczynski Y, Labbé M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori. Vol. 29, Journal of Clinical Microbiology. 1991. p. 2072–5.

288. van Doorn L-J, Henskens Y, Nouhan N, Verschuuren A, Vreede R, Herbink P, et al. The Efficacy of Laboratory Diagnosis of Helicobacter pylori Infections in Gastric Biopsy Specimens Is Related to Bacterial Density and vacA, cagA, and iceA Genotypes. Vol. 38, Journal of Clinical Microbiology. 2000. p. 13–7.

289. Francesco V De, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F, Perna F, Hassan C, et al. Phenotypic and genotypic Helicobacter pylori clarithromycin resistance and therapeutic outcome : benefits and limits. 2010;(December 2009):327–32.

290. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, et al. Accurate prediction of macrolide resistance in Helicobacter pylori by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. Antimicrob Agents Chemother. 2001 May;45(5):1500–4.

291. Hulten K, Gibreel A, Skold O, Engstrand L. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Nov;41(11):2550–3.

292. Francesco V De, Zullo A, Giorgio F, Saracino I, Zaccaro C, Hassan C, et al. Change of point mutations in Helicobacter pylori rRNA associated with clarithromycin resistance in Italy. 2017;(2014):453–7.

293. Francesco VDE, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Valle ND, Burattini O, et al. Primary clarithromycin resistance in Italy assessed on Helicobacter pylori DNA sequences by TaqMan real-time polymerase chain reaction. 2006;(November 2005):429–35.

294. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H, Megraud F. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Dec;41(12):2724–8.

295. Slinger R, Yan L, Chan F, Forward K, Cooper-Lesins G, Best L, et al. Pyrosequencing assay to rapidly detect clarithromycin resistance mutations in Canadian Helicobacter pylori isolates. Can J Gastroenterol. 2009 Sep;23(9):609–12.

296. Xuan S-H, Wu L-P, Zhou Y-G, Xiao M-B. Detection of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori in clinical specimens by molecular methods: A review. J Glob Antimicrob Resist. 2016 Mar;4:35–41.

297. Momynaliev KT, Selezneva O V, Kozlova AA, Vereshchagin VA, Il'ina EN, Govorun VM. [A2144G is the main mutation in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori associated with clarithromycin resistance]. Genetika. 2005 Oct;41(10):1338–44.

298. Yilmaz O, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence in situ hybridization method in diagnosis of H pylori infection and determination of clarithromycin resistance in

H pylori eradication therapy. World J Gastroenterol. 2007 Feb;13(5):671–5.

299. Ali O. Bizmut Tuzları, Helicobacter pylori Eradikasyonunda Birinci Seçenek Olarak Yeniden Gündemde Guncel Gastroenteroloji 2016;20:03

300. Cirak MY, Engin D, Unal S, et al. Monitoring of Helicobacter pylori resistance to clarithromycin by real-time PCR assay in gastric biopsy specimens over a 4-year period in Turkey. Helicobacter 12 (4) 449. XXth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation Istanbul, Turkey, September 20-22, 2007.

301. Bakir Ozbey S, Ozakin C, Keskin M. Antibiotic resistance rates of Helicobacter pylori isolates and the comparison of E –test and fluorescent in-situ hybridization methods for the detection of clarithromycin resistant strains. Mikrobiyol Bul 2009;43:227–34