

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**FARKLI PRİMERLER VE DNA İZOLASYON YÖNTEMLERİ KULLANARAK
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE DIŞKI ÖRNEKLERİNDE
Helicobacter pylori VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE SONUÇLARIN
İMMÜNOKROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevil DİLEK KÖKÜM

ARALIK - 2010

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**FARKLI PRİMERLER VE DNA İZOLASYON YÖNTEMLERİ KULLANARAK
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE DIŞKI ÖRNEKLERİNDE
Helicobacter pylori VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE SONUÇLARIN
İMMÜNOKROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Sevil DİLEK KÖKÜM

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.11.2010

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 29.12.2010

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK

Jüri Üyesi : Doç. Dr. İlknur TOSUN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Figen CELEP

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN

ARALIK - 2010

TRABZON

ÖNSÖZ

“Farklı Primerler ve DNA İzolasyon Yöntemleri Kullanarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Dışkı Örneklerinde *Helicobacter pylori* Varlığının Araştırılması ve Sonuçların İmmünokromatografik Yöntemle Karşılaştırılması” adlı bu tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel desteğinin yanı sıra maddi ve manevi birçok konuda benden desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK’a, sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarım sırasında her türlü bilgi birikim ve deneyimini benimle paylaşan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Prof. Dr. Faruk AYDIN, Doç. Dr. Neşe KAKLIKAYA, Doç. Dr. İlknur TOSUN, Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU’na Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda bulunduğum sürede bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma, sonsuz sabır ve hoşgörülerinden dolayı sevgili annem Havva DİLEK’e, sevgili ablam Işıl DİLEK’e, sevgili eşim Ahmet Emre KÖKÜM’e ve bütün aileme teşekkürlerimi sunarım.

Sevil DİLEK KÖKÜM

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tarihçesi.....	3
2.2. <i>Helicobacter</i> 'lerin Sınıflandırılması.....	4
2.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Genel Özellikleri.....	6
2.3.1. Hücresel Morfolojisi.....	6
2.3.2. Koloni Morfolojisi.....	6
2.3.3. Biyokimyasal Özellikleri.....	6
2.3.4. Üreme Özellikleri.....	7
2.3.5. Virülans Faktörleri ve Patogenezi.....	7
2.3.5.1. Hareket ve Flagella	8
2.3.5.2. Üreaz	8
2.3.5.3. Adezinler	8
2.3.5.4. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz	9
2.3.5.5. Thioredoksin (CD59).....	9
2.3.5.6. <i>vacA</i> (Vacuolating cytotoxin A).....	9
2.3.5.7. <i>cagA</i> (Cytotoxin associated gene A).....	10
2.4. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Epidemiyolojisi.....	10
2.4.1. Prevalansı.....	10
2.4.2. Bulaşma Yolları.....	11
2.5. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin tanı yöntemleri.....	12
2.5.1. İnvaziv Tanı Yöntemleri.....	12
2.5.1.1. Hızlı Üreaz Testi.....	12
2.5.1.2. Histolojik Yöntemler.....	13
2.5.1.3. Kültür.....	13
2.5.2. Noninvaziv Tanı Yöntemleri.....	14

2.5.2.1. Seroloji.....	14
2.5.2.2. Üre Nefes Testi	14
2.5.2.3. Gaita Antijen Testi.....	14
2.5.3. Moleküler Yöntemler.....	15
3. MATERYAL VE METOD.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Gaita Örnekleri.....	18
3.1.2. Araç ve Gereçler.....	18
3.1.3. Kimyasallar.....	18
3.1.4. Solüsyonlar.....	19
3.1.4.1. Tris HCl (1 M) Hazırlanması.....	19
3.1.4.2. 5 M NaCl Hazırlanması.....	19
3.1.4.3. EDTA (0.5 M) Hazırlanması.....	19
3.1.4.4. SDS (%10) Hazırlanması.....	19
3.1.4.5. Lizis Tamponu Hazırlanması.....	19
3.1.4.6. 3 M Sodyum Asetat (pH 4.9) Hazırlanması.....	20
3.1.4.7. TE Hazırlanması.....	20
3.1.4.8. Kloroform: İzooamil Alkol (24:1) Hazırlanması.....	20
3.1.4.9. dNTP Miks Hazırlanması.....	20
3.1.4.10. Primer Miks Hazırlanması.....	21
3.1.4.11. TBE Hazırlanması.....	21
3.1.4.12. Yükleme Tamponunun Hazırlanması.....	21
3.1.4.13. Etidyum Bromide Solüsyonu Hazırlanması.....	21
3.2. Metod.....	21
3.2.1. <i>Helicobacter pylori</i> Gaita Antijen Testi (HpSA).....	21
3.2.2. Kontrollerin Hazırlanması.....	22
3.2.3. DNA İzolasyonu.....	22
3.2.3.1. İzolasyon Kiti Kullanarak DNA İzolasyonu.....	22
3.2.3.2. Fenol Kloroform Ekstraksiyonu Etanol Presipitasyonu Yöntemi İle DNA İzolasyonu.....	24
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	25
3.2.4.1. Konvansiyonel PCR.....	25
3.2.4.1.1. Master Miks Hazırlama.....	26
3.2.4.1.2. Amplifikasyon.....	28

3.2.4.1.2.1. <i>H. pylori</i> 'nin <i>ureA</i> Geninin Amplifikasyonu.....	28
3.2.4.1.2.2. <i>H. pylori</i> 'nin <i>ureC</i> Geninin Amplifikasyonu.....	29
3.2.4.1.2.3. <i>H. pylori</i> 'nin <i>vacA</i> Geninin Amplifikasyonu.....	30
3.2.4.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme.....	30
3.2.4.2. Real Time PCR.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1 Örnekler.....	33
4.2. <i>Helicobacter pylori</i> Gaita Antijen Testi.....	33
4.3. DNA İzolasyonu.....	34
4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	35
4.4.1. Konvansiyonel PCR.....	37
4.4.1.1. <i>H. pylori</i> 'nin <i>ureA</i> Geninin Amplifikasyonu.....	37
4.4.1.2. <i>H. pylori</i> 'nin <i>ureC(glmM)</i> Geninin Amplifikasyonu.....	40
4.4.1.3. <i>H. pylori</i> 'nin <i>vacA</i> Geninin Amplifikasyonu.....	41
4.4.2. Real Time PCR.....	41
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
7.ÖZET.....	52
8. SUMMARY.....	54
9. KAYNAKLAR.....	55

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: <i>Helicobacter</i> Türleri ve Konakları.....	5
Tablo 2: Lizis tamponu komponentleri.....	20
Tablo 3: Hedef bölgelerin amplifikasyonunda kullanılan özgöl primer dizileri.....	26
Tablo 4: Konvansiyonel PCR için master mix bileşenleri ve miktarları.....	27
Tablo 5: Real Time PCR’da kullanılan primerler ve prob sekansı.....	31
Tablo 6: Real time PCR için master mix bileşenleri ve miktarları.....	31
Tablo 7: Gaita antijen testi ile invaziv test sonuçlarının karşılaştırılması.....	33
Tablo 8: Örneklere ait <i>ureA</i> PCR, real time PCR, HpSA ve biyopsi materyal sonuçları...	36
Tablo 9: <i>ureA</i> PCR sonuçlarının gaita antijen testiyle karşılaştırılması.....	39
Tablo 10: <i>üreA</i> PCR sonuçlarının invaziv test sonuçlarıyla karşılaştırılması.....	39
Tablo 11: Ct değerleri.....	42
Tablo 12: Real Time PCR sonuçlarının gaita antijen testiyle karşılaştırılması.....	42
Tablo 13: Real Time PCR sonuçlarının invaziv test sonuçlarıyla karşılaştırılması.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: İzolasyon kiti kullanarak yapılan DNA izolasyonunda elde edilen ürünlerin %0.8'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.....	34
Şekil 2: Manuel DNA izolasyonunda elde edilen ürünlerin %0.8'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.....	35
Şekil 3: <i>H. pylori ureA</i> genine ait reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.....	38
Şekil 4: <i>H. pylori ureA</i> genine ait reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.....	38
Şekil 5: <i>H. pylori ureC</i> genine ait reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.....	40
Şekil 6: <i>H. pylori ureC</i> genine ait reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü.....	40
Şekil 7: Kontrollerin amplifikasyon eğrileri.....	41

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Helicobacter pylori, insan midesine kolonize olan spiral şekilli, Gram negatif, mikraerofilik bir mikroorganizmadır (1, 2). *H. pylori*, insanlarda kronik gastrite, gastroduodenal ülser, gastrik adenokarsinoma ve lenfomaya neden olabilen karsinogenik bir bakteri olarak değerlendirilmektedir (3-5).

Dünyada oldukça yaygın olan *H. pylori* enfeksiyonları, gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %70-90'ında, gelişmiş olan ülkelere nüfusun %40-50'sinde görülmektedir (6). Bu oranlar *H. pylori* enfeksiyonları ve komplikasyonlarının öncelikle gelişmekte olan ülkelerin sorunu olduğunu göstermektedir.

Önemli sağlık sorunlarına sebep olan bu bakterinin, güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlanması etkin tedavinin sağlanması açısından önemlidir. *H. pylori* enfeksiyonlarının tespiti için kullanılan yöntemler invaziv ve noninvaziv olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. İnvaziv yöntemler; endoskopi sonrası alınan biyopsi örneklerinde üreaz, kültür, histopatolojik inceleme ve moleküler yöntemlerle mikroorganizmanın saptanması temeline dayanmaktadır. İnvaziv yöntemlerin, biyopsi örneği gerektirmesi, bazen üreaz aktivitesine sahip başka bakterilerin yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmesi ve invaziv yöntemlerin hastalar üzerindeki zorlukları göz önüne alınarak, günümüzde serolojik inceleme, üre nefes testi (ÜNT), gaitada *H. pylori* antijeni arama, dışkı, tükürük ve dental plak gibi materyallerden moleküler yöntemlerle etkeni aramak gibi çeşitli noninvaziv yöntemler geliştirilmiştir (7-10).

Helicobacter pylori tanısında kesin olarak belirlenmiş altın standart bir test olmayışı nedeniyle günümüzde hala tanı ve tedavi başarısının izlenmesinde endoskopi gerektiren testler referans olarak kullanılmaktadır (11).

Helicobacter pylori gaita antijen testi noninvaziv olması, hızlı sonuç alınabilmesi, testin yapılışının kolaylığı ve maliyetinin düşük olması sebebiyle yaygın olarak kullanılan bir tanımlama yöntemidir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda, *H. pylori* gaita antijen testinde yalancı pozitifliklere ve negatifliklere rastlandığı rapor edilmektedir (12, 13).

Moleküler yöntemlerden, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) son yıllarda enfeksiyon hastalıklarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan oldukça özgül ve duyarlı bir yöntemdir. PCR yöntemi *H. pylori*'nin çeşitli klinik örneklerde gösterilmesi için kullanılmakla beraber gaita örneklerinde inhibitör maddelerin varlığından dolayı özgüllük ve

duyarlılığın düşük olabildiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (14-18). Kullanılan DNA izolasyon yöntemleri ve primerlerin, özgüllük ve duyarlılığı artırabildiği bilinmektedir.

Bu çalışmada hastalardan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na gönderilen ve antijen aranması esasına dayalı bir immünokromatografik yöntemle *H. pylori* açısından incelenen gaita örneklerinde, farklı primerler ve DNA izolasyon metodları kullanılarak, konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemleriyle *H. pylori* varlığının araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Helicobacter pylori*'nin Tarihçesi

Peptik ülser komplikasyonları, Ortaçağa ait tıbbî kayıtlarda söz edilmiş olmasına rağmen rapor edilmesi ilk kez 1586 yılında İtalyan doktor Donati M. tarafından gerçekleştirilmiştir. Duodenal ülser ise 1688 yılında Johannes von Muralt tarafından bir otopside tanımlanmıştır (19).

Alman bakteriyolog Bottcher G. ve arkadaşı Fransız Letulle M. (1875) gastrik yakınmalar ile bakterilerin ilişkili olduğunu ileri sürmüşler fakat kültür ortamında üretememişlerdir. Jaworski W. (1889) insanların mide yıkama suyu sedimentlerinde “*Vibrio regula*” adını verdiği spiral şekilli basillerin varlığını göstererek, bu bakterilerin gastrit etkeni olabileceğini bildirmiştir (20, 21).

İtalyan araştırmacı Bizzozero G. (22) 1893 yılında, köpeklerin midelerinde spiral şekilli bakterilerin bulunduğunu, ardından İtalyan patolojist Salomon H. (1896) köpek, kedi ve sıçanların midesinde benzer bulgular rapor etmiştir (23).

Steer H.W. ve Colin Jones D.G. (1975) gastrik ülserli hastaların gastrik mukozalarından alınan biyopsilerde spiral şekilli bakterilerin varlığını göstermişler ve bu bakterinin mukozal direnci kırarak ülsera neden olabileceğini belirtmişlerdir. Fakat kültür sonuçlarını yanlış yorumlamaları bu bakterilerin *Pseudomonas aeruginosa* olduğu yanlışlığına düşmelerine neden olmuştur. (24).

Warren R., 1979 yılında spiral bakterileri mide mukus tabakası altında saptamış ve bu bakterilerin gastrouodenal patoloji ile ilişkili olduğunu fark etmiştir. Mikroorganizma, *in vitro* şartlarda ilk defa Marshall B.J. ile Warren R. tarafından 1982 yılında üretilmiştir (1). Bu mikroorganizma, morfolojik olarak *Campylobacter*'e benzediğinden “*Campylobacter-like organism*” olarak tanımlanmış ve 1987’de *Campylobacter pylori* adını almıştır. 1989’da Goodwin S. C. ve arkadaşları, bakterinin yapısal ve enzimatik bazı özelliklerinden dolayı *Campylobacter* cinsinde olmadığını belirtmiş, helikal görünümü ve sık izole edildiği yerin adını birleştirerek, bakteriyi “*Helicobacter pylori*” olarak isimlendirmişlerdir (25).

2.2. *Helicobacter*'lerin Sınıflandırılması

Helicobacter cinsi içerisinde günümüzde onaylanmış 23 tür bulunmaktadır. *Helicobacter* cinsi bakteriler gastrik ve enterohepatik *Helicobacter*'ler olmak üzere iki büyük grup altında incelenebilirler. Mide mukozasında kolonize olan gastrik *Helicobacter*'ler arasında insanda enfeksiyon etkeni olan en önemli türler *H. pylori* ve *H. heilmanii*'dir. Barsak ve karaciğerde kolonize olan enterohepatik *Helicobacter*'ler arasında insan sağlığı bakımından en önemli olan türler *H. cinaedi* ve *H. fennelliae*'dir (26, 27). *Helicobacter* türleri ve konakları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: *Helicobacter* Türleri ve Konakları

TÜR	KONAK	DOKU
<i>H. pylori</i>	İnsan	Mide
<i>H. mustelae</i>	Dağ gelinciği	Mide
<i>H. cinaedi</i>	İnsan, hamster	GİS ^a
<i>H. canis</i>	İnsan, kedi, köpek	GİS
<i>H. felis</i>	Kedi, köpek	Mide
<i>H. fennelliae</i>	İnsan	GİS
<i>H. nemestrinae</i>	Makak maymunu	GİS
<i>H. muridarum</i>	Fare	GİS
<i>H. acinonychis</i>	Çita	Mide
<i>H. bilis</i>	Fare, köpek	GİS
<i>H. hepaticus</i>	Fare	Karaciğer
<i>H. pametentis</i>	Kuş, domuz	GİS
<i>H. pullorum</i>	İnsan, tavuk	GİS
<i>H. bizzozeronii</i>	İnsan, kedi, köpek	Mide
<i>H. heilmannii</i>	İnsan, kedi, köpek	Mide
<i>H. trogonum</i>	Rat	GİS
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	GİS
<i>H. rodentium</i>	Fare	GİS
<i>H. rappini</i>	Fare	GİS
<i>H. salomonis</i>	Köpek	Mide
<i>H. bovis</i>	Sığır	GİS
<i>H. suis</i>	Domuz	GİS

^aGİS: Gastrointestinal sistem

2.3. *Helicobacter pylori*'nin Genel Özellikleri

2.3.1. Hücresel Morfolojisi

H. pylori, kıvrık, spiral veya martı kanadı şeklinde görülebilen, mikroaerofilik, Gram negatif bir basildir. Bakterinin uzunluğu 2.5-5.0 µm olup, genişliği 0.5-1.0 µm arasında değişmektedir. Bakteri kendi etrafında 1-3 defa dönmüş gibi durur. *H. pylori*'nin unipolar 4-6 adet flagellası vardır. Her flagella yaklaşık 30 µm uzunluğunda ve 2.5 nm kalınlığındadır. Bakteri flagellası sayesinde hareketlidir. Optimal hareketlilik gastrik mukus gibi viskoz ortamda gözlenir. *H. pylori*'de, flagella kılıflıdır ve uç kısımlarında şişkinlik ve diskler vardır. Bu yapı, bakterinin gastrik mukus gibi yoğun ortamlarda tirbişon tarzı hareketi için gereklidir (20, 28).

H. pylori'nin kıvrımlı şekli mide biyopsi örneklerinden hazırlanan preperatlarda görünürken, kültürlerden hazırlanan preperatlarda kısa kıvrımlı tekli basiller şeklinde görülür. Uzamış kültürlerde sıklıkla kokoid formlar görülür (28, 29).

2.3.2. Koloni Morfolojisi

Helicobacter pylori kolonileri çeşitli maddelerle zenginleştirilmiş kanlı agarda 37°C'de ortalama 3-5 günde 1-2 mm çapında, yuvarlak koloniler oluşur. Bu koloniler konveks ve yarı saydam olarak görülür. Kanlı agarda kolonilerin etrafında hafif hemoliz oluşmaktadır ve koloniler etrafında hemoliz nedeniyle gri bir zon görülebilir (28).

2.3.3. Biyokimyasal Özellikleri

H. pylori tarafından kullanılan tek karbonhidrat glikozdur. Glikozu oksidatif ve fermentatif yollardan metabolize etmektedir. Bakterinin katalaz ve oksidaz reaksiyonları pozitifdir. Bakterinin en tipik biyokimyasal özelliği yüksek molekül ağırlıklı üreaz enzimi üretmesidir. Üreaz enzimi pH 4-10 arasında aktiftir. Bakteri bu enzim ile üreyi, amonyak ve karbondioksit'e dönüştürmektedir. Bu enzim gastrik asiti, alkali ortama dönüştürerek bakteriyi asit ortamında korumaktadır. İnsan mide mukusunu bozan proteaz enzimi ve fosfolipaz enzimleri de vardır. Hippurat hidrolizi ve nitrat reaksiyonu negatiftir (20, 28, 29).

2.3.4. Üreme Özellikleri

H. pylori mikroaerofilik bir bakteridir ve üreyebilmesi için %5 O₂, %75 N₂, %5-10 CO₂, %10 H₂ gazlarından oluşan ortamda inkübe edilmelidir. Ortamın pH'sı 6.9-8.0 arasında ve sıcaklığı 37°C olmalıdır (30).

Zengin besin ihtiyacı olan *H. pylori*'nin üremesi için hemin, serum, nişasta veya yumurta sarısı gibi çeşitli zenginleştirici maddeler içeren besiyerlerine ihtiyaç vardır (26). Bu nedenle Brain Heart Infusion agar, Brucella agar, Colombia agar, Skirrow agar gibi zenginleştirilmiş besiyerleri kullanılmaktadır. Besiyerinden toksik maddelerin uzaklaştırılması için besiyerine kömür ilavesi yapılması üremeyi kolaylaştırır. Diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek için besiyere antibiyotik ilavesi yapılmalıdır. Gram pozitif mikroorganizmalar için Vankomisin veya Teikoplanin, Gram negatif basiller için Polimiksin, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Kolistin veya Sefsulodin, mantarlar için Amfoterisin B veya Nistatin ilave edilmelidir (31).

Uygun besiyerine ekilen örnekler 3-7 gün içerisinde ürer. Kanlı besiyerinde 0.5-1.0 mm çapında düzgün kenarlı, pigmentsiz koloniler yapar. Kültürde üreyen kolonilerden yapılan Gram boyama ile mikroskopik morfolojik özellikleri, oksidaz, katalaz ve üreaz aktiviteleri dikkate alınarak değerlendirme yapılır (32).

2.3.5. Virülans Faktörleri ve Patogenezi

H. pylori midenin asidik ortamında yaşayabilmesi mümkün değildir. En iyi yaşayabildiği ortam mide mukozasıdır. Mide mukozasının aside geçirgenliği yoktur ve mide asidine karşı tampon görevi yaparak bakteriyi asidin zararlı etkisinden korur. Mide pH'sı 1.0-2.0 iken, mukus altında pH 7.4 civarındadır. Dolayısıyla bakteri mukus altında asidik ortamın etkisinden korunarak yaşamını sürdürür (33).

H. pylori ile enfekte bireylerin tümünde gastrik enflamasyon görülür ancak kolonizasyon görülen kişilerin çoğu asemptomatiktir. Kolonizasyon olan bireylerin çok az bir kısmında klinik bulguya rastlanmaktadır. *H. pylori* ile enfekte kişilerin tümünde klinik tabloya rastlanmaması, *H. pylori* enfeksiyonlarının patogeneğinde, bakterinin virülans faktörlerinin yanı sıra; konak ve çevreye ait faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. Konakta oluşan immün yanıt genelde konağın lehinedir, fakat ileri seviyede oluşan enflamasyon dengenin konak aleyhine bozulmasına sebep olabilir. Bu

durum peptik ülser, duodenal ülser, midenin adenokarsinomu gibi mide hastalıklarına yol açabilmektedir (34).

2.3.5.1. Hareket ve Flagella

H. pylori, spiral şekilli 4-6 adet kılıfla çevrili unipolar flagellaya sahip bir bakteridir. Mikroorganizmanın sahip olduğu spiral şekil ve flagellaları mide mukus tabakasının viskoz ortamında rahatlıkla hareket edebilmesini sağlar. *H. pylori*'nin yüksek hareket kabiliyeti sayesinde asidik olan lümeninden mide mukus tabakası ile mideyi örten yüzey epiteli arasında kalan hafif alkali ortama geçiş yapabilmektedir. Mikroorganizmanın en önemli virülans faktörü, hareketi olarak kabul edilir. Yapılan çalışmalar en virülan suşların, en hareketli suşlar olduğunu ve flagellası olmayan mutant suşların, nonvirülan olduğunu göstermiştir. Flagellar hareket pH bağımlıdır, pH: 4.1'in altında hareket durur. Üre ve sodyum bikarbonat hareketi uyararak pozitif kemotaksis özelliği gösterir (20, 35, 36).

2.3.5.2. Üreaz

H. pylori'nin üreaz enzimi, gastrik mukozal kolonizasyonda önemli rolü olan bir enzimdir. Mikroorganizmanın bütün proteinlerinin %6'sından fazlasını oluşturan üreaz enziminin kofaktörü nikeldir. Bakterinin, midenin asidik ortamında yaşayabilmesi için gerekli bir enzimdir. Üreaz enzimi mide hücrelerinden salınan üreyi amonyak ve karbondioksit parçalar. Açığa çıkan amonyak, midede lokal pH'yı artırır ve nötral bir ortam oluşturur. Bu sayede bakteri, midenin asidik ortamının olumsuz etkilerinden korunmuş olur. Yapılan çalışmalar amonyağın epitel hücrelerinde toksik etkili olduğunu ve epitel hasara neden olduğunu göstermiştir. Amonyak, gastrik epitel hücreleri arasındaki bütünlüğü bozar ve *H. pylori*'nin sitotoksinlerinin etkisini artırır. Ürenin parçalanmasıyla oluşan amonyak amonyuma dönüşür, oluşan amonyum, lökositleri ve monositleri aktive ederek mide epitel dokusunda, hasarla sonuçlanan lokal immün yanıtın oluşmasına neden olur (26, 29).

2.3.5.3. Adezinler

Adezin proteinleri bakterinin dış membranında bulunur ve mide epitel hücrelerine bağlanmada rol oynarlar. Bakterinin, midenin peristaltik hareketinden etkilenmesini engelleyerek midede kolonize olmasını sağlar. Adezin proteinlerinin her biri konak hücre

yüzeyindeki farklı moleküller için spesifiktir. *H. pylori*'nin en iyi tanımlanmış adezini BabA proteinidir. BabA proteini, mide epitel hücreleri yüzeyinde bulunan Lewis^b kan grubu antijenlerine bağlanır. *babA* geninin iki alleli vardır; BabA1 ve BabA2 (37). *H. pylori*'nin mide epitel hücrelerine bağlanmak için sahip olduğu diğer adezinler; kamçı membranında bulunan HpaA ve dış membranda bulunan HspA'dır (38).

2.3.5.4. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz

H. pylori'nin gastrik mukozada hayatta kalabilmesi için, antioksidan savunma mekanizmasında görevli katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerine sahiptir. Bu enzimler, bakteriyi, konağın aktive olmuş nötrofilleri tarafından salınan hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine karşı korumaktadır. Bu enzimler sayesinde *H. pylori* çok hücreli lökositler tarafından öldürülmeye karşı direnç oluşturmaktadır (20, 26).

2.3.5.5. Thioredoksin (CD59)

H. pylori suşları proteinlerin disülfid bağlarını keserek denatüre edebilen Thioredoxin (CD59) enzimine sahiptir. Bu enzim ile mukus tabakasındaki musinleri ve konak tarafından sekrete edilen nonspesifik ve spesifik IgA, IgG ve IgM gibi immunoglobulinleri denatüre ederek vücut savunmasından korunurlar (39).

2.3.5.6. *vacA* (Vacuolating cytotoxin A)

H. pylori'nin virülans faktörlerinden biri olan vakuolize edici sitotoksin (VacA), insan ve diğer memeli hayvanların epitel hücrelerinde asidik vakuolizasyona sebep olmaktadır (40). *vacA* geni tarafından kodlanmaktadır. Gende, vakuolizasyonun aktivitesi ile ilgili olan bir sinyal (s) bölgesi ve yüksek toksisite ile ilişkili olan proteinin kodlandığı bir orta (m) bölge bulunmaktadır. *vacA* geninin 4 farklı (s1a, s1b, s1c ve s2) sinyal dizisi alleli bulunmaktadır. s1 tipini bulunduran suşlar aktif *vacA* toksinini oluşturabilmektedir. Bu toksini salgılayan *H. pylori* suşlarıyla enfekte kişilerde gastritten daha sık olarak peptik ülser ve gastrik kanser görüldüğü bildirilmiştir (41). Genin orta bölgesindeki farklılıklara göre 3 alleli (m1a, m1b ve m2) bulunmaktadır. m1 alleli, m2 allele göre daha yüksek toksin seviyesi ve ağır epitel hasarı oluşturma potansiyeline sahiptir (42).

Epitel hücrelerinin hücre membranında por oluşturan vacA proteini, anyonların ve ürenin porlardan dışarı çıkmasına olanak sağlar. Hücre dışına çıkan üre *H. pylori* hücresi içine alınıp üreaz enzimi aktivitesi ile amonyak ve karbondioksit parçalanarak bazik ortam oluşturulur. Bu sayede *H. pylori* midenin asidik ortamından korunmuş olur (43).

VacA, epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları bozar ve besin maddelerinin mide mukoza tabakasını geçerek *H. pylori*'ye ulaşmasını sağlar. Yapılan in vitro çalışmalar; vacA proteininin immun yanıtı baskıladığını, antijen sunumunu engellediğini, mitokondri membranında oluşturduğu porlar aracılığıyla mitokondriden sitokrom C salınımına neden olarak apoptozisi indüklediğini göstermiştir (44).

2.3.5.7. *cagA* (Cytotoxin associated gene A)

VacA üreten suşların hemen hemen hepsinde *cagA* sitotoksini kodlayan *cagA* geni bulunur. CagA proteini epitelde tirozin fosforilasyonunu uyarak enflamatuvar cevabı başlatan tirozin kinazı aktive eder (45). VacA'ya yardımcı olduğu düşünülen *cagA* sitotoksini, *cagA* patolojik gen adası için bir göstergedir (36). *H. pylori*'nin *cagA* genini taşıyan suşlar tip1 suş olarak adlandırılmaktadır. Tip I suşlar *cagA* ve *vacA* eksprese etmekte ve hücrelerde vakuolizasyona neden olmaktadır. Tip1 suşları, sıklıkla peptik ülser ve mide karsinomu gibi ciddi gastroduodenal hastalığı olan kişilerden izole edilmektedir. *H. pylori*'nin *cagA* geni içermeyen tip 2 suşlarında *vacA* geni olsa da vakuolizasyon yapmadıkları belirlenmiştir (46).

2.4. *Helicobacter Pylori*'nin Epidemiyolojisi

2.4.1. Prevalansı

H. pylori enfeksiyonları dünyada sık karşılaşılan hastalıklardandır. Kadın ve erkeklerde enfeksiyon riski eşittir. *H. pylori* enfeksiyonunun ne zaman ve nasıl edinildiği kesin olarak bilinmemekle birlikte enfeksiyonun çocukluk çağında edinildiği düşünülmektedir (33).

Enfeksiyonların çoğu asemptomatiktir. Gastrointestinal hastalıkların ortaya çıkması kişinin immunitesine, çevresel faktörlere ve bakteriyel virulansa bağlıdır. Enfeksiyon yıllarca, bazen yaşam boyu devam eder. *H. pylori* duodenal ülserli hastaların %95'inde, mide ülserli hastaların %70-80'inde, nonülser dispepsili hastaların %50'sinde, gastrik kanserli ve gastrik lenfomalı hastaların %90'ında saptanmıştır (47, 48, 49).

H. pylori prevalansı, gelişmiş ülkelerde düşük bulunurken geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde yüksektir. Gelişmiş ülkelerde yetişkinlerin çoğu, gelişmekte olan ülkelerde ise toplumun %90'ından fazlası bu bakteri ile enfektidir (49).

Enfeksiyon genellikle çocukluk çağında edinildiğinden sosyoekonomik durum önemlidir. Evde yaşayan birey sayısının fazlalığı, kötü hijyen şartları prevalansı yükseltir. Genel olarak, gelişmiş ülkelerde tüm toplumda çocuklarda *H. pylori* prevalansı %10 iken, düşük sosyoekonomik gruplarda bu oran %30-40'lara yükselmektedir (49).

Ülkemizde *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı yüksektir. Doğu batı bölgeleri arasındaki sosyoekonomik koşulların farklı olmasından dolayı prevalansları farklılık göstermektedir. Doğu illerinde batı illerine oranla enfeksiyon oranı yüksektir. Türkiye'nin doğu illerini kapsayan bir çalışmada çocukluk çağında *H. pylori* seroprevalansı %64,4 bulunmuştur (50).

Ülkemizde yıllar içerisinde değişen şartlarla, eğitim düzeyinin yükselmesiyle, düzelen sosyoekonomik koşullarla prevalans oranları düşüş göstermektedir. 1990 yılında çocukluk çağındaki seroprevalans oranı %78,5 iken, 2000 yılında %66,3, 2003 yılında ise bu oran %49,5 olarak bulunmuştur (51, 52).

2.4.2. Bulaşma Yolları

H. pylori'nin doğal kaynağı henüz bilinmemektedir. *H. pylori* için doğal hayvan kaynağı olduğuna dair kanıtlar bulunamamıştır. Bu yüzden *H. pylori*'nin doğal kaynağının insan olduğu düşünülmektedir. Enfekte kişilerin diğer aile fertlerinde *H. pylori* enfeksiyonuna yakalanma oranının yüksek olması insandan insana bulaşmanın mümkün olduğunu göstermektedir. Bulaşmanın fekal-oral, oral-oral yolla olduğu düşünülmektedir (45). *H. pylori*'nin dışkı, dental plak ve tükürükten izole edilmesi bu yollarla bulaşmayı desteklemektedir (53).

Hijyen koşullarının düşük olduğu kalabalık ailelerde veya kalabalık yaşam yerlerinde enfekte bireyden duyarlı bireye *H. pylori*'nin fekal-oral yolla direkt veya dışkı ile kontamine su ve sebze yoluyla dolaylı bulaş olabilir (54). Queralt ve Araujo yaptıkları bir çalışmada *H. pylori*'nin suda canlılığını sürdürebildiğini göstermişlerdir (55). Bu nedenle içme sularının kontamine olması halinde bulaşmanın olabileceği düşünülmektedir.

Ağız boşluğu enfeksiyon için rezervuar olmasından dolayı, yakın temas, öpüşme ve kadınların yiyecekleri çocuklarına vermeden önce kendilerinin çiğnemesi bulaşa neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada endoskopi işleminden sonra düzenli olarak özel bir çözelti

ile steril edilen endoskoplardan günün sonunda alınan örneklerden *H. pylori* tespit edilmiştir. Bu araştırmada endoskopi işlemi sırasında enfekte hastalardan diğer hastalara bulaşın olabileceği sonucuna varılmıştır (56).

2.5. *Helicobacter pylori*'nin Tanı Yöntemleri

H. pylori'nin tanısında birçok yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan testlerin hepsinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları olması nedeniyle genelde aynı anda birden fazla yöntem kullanılmaktadır Tanı için kullanılan testler, invaziv ve noninvaziv olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. İnvaziv yöntemler; endoskopi sonrası alınan biyopsi örneklerinde üreaz, kültür, histopatolojik inceleme ve moleküler yöntemlerle mikroorganizmanın saptanması temeline dayanmaktadır. Noninvaziv testler ise, *H. pylori*'yi dolaylı olarak, biyolojik özellikleri aracılığıyla, immun sistem yanıtı ile ya da antijen saptama yöntemleriyle gösteren testlerdir. Moleküler yöntemlerle mikroorganizmanın saptanması invaziv ve noninvaziv olarak elde edilen örneklerle yapılabilmektedir. (7, 9, 10, 53, 57).

2.5.1. İnvaziv Tanı Yöntemleri

2.5.1.1. Hızlı Üreaz Testi

H. pylori'nin kuvvetli üreaz aktivitesinden yararlanılarak yapılan bir testtir. Endoskopi sırasında alınan mide biyopsi örneği, içinde pH indikatörü bulunan üre jeli veya sıvı besiyerine konur. Mide biyopsi örneğinde *H. pylori* varlığında, bakteri üreaz aktivitesiyle ortamdaki üreyi parçalar, amonyak ve karbondioksit oluşur. Oluşan amonyak pH'ı yükseltir ve bunun sonucunda besiyerindeki pH indikatörü renk değiştirir. Hızlı üreaz testi için, Christensen besiyeri, Stuart üreaz testi solüsyonu veya %10 üre ve %1 Fenol kırmızısı içeren solüsyon kullanılmaktadır.

Testin duyarlılığını %85-95, özgüllüğünü %90-95 olarak bildiren yayınlar vardır (26, 53). Bakteri yoğunluğunun az olduğu örneklerde yalancı negatif sonuç alınabilmektedir, dolayısıyla antral örneklerde testin duyarlılığı daha yüksektir. Üreaz testi maliyetinin düşük olması, kolay uygulanabilmesi, hızlı sonuç vermesi ve duyarlılığının yüksek olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (33).

2.5.1.2. Histolojik Yöntemler

Mide biyopsi örneğinin, çeşitli boyama yöntemleriyle boyanıp *H. pylori* varlığının gösterilmesi esasına dayalı bir yöntemdir. Bu yöntem ile bakteri varlığının saptanmasının yanı sıra *H. pylori* enfeksiyonlarının neden olduğu doku hasarı ve prekarsinojen değişimler de saptanabilmektedir (20, 33, 53). Kesitler Hematoksilen Eozin boyama yöntemi ile boyandığında *H. pylori* tespit edilmesine rağmen bakteri sayısının az olduğu durumlarda yalancı negatif sonuçlar verebilmektedir. Az sayıdaki bakteriyi tespit etmekte daha duyarlı olan modifiye Giemsa ve Warthin-Starry boyama yöntemleri kullanılabilir. Warthin-Starry boyama tekniğinin uygulanmasının zor olması ve maliyetinin yüksek olması sebebiyle genellikle modifiye Giemsa boyama tekniği tercih edilmektedir. Monoklonal ve poliklonal floresan antikor kullanılan immunokimyasal boyama yöntemlerinin duyarlılıkları ve özgüllükleri yüksektir ayrıca histolojik boyama yöntemleri arasında altın standart olarak kabul edilir (20, 33). Histolojik incelemenin duyarlılığı %90-95; özgüllüğü ise %95-99'dur. Histolojik yöntemin duyarlılığını; biyopsinin doğru yerden alınması, incelemeyi yapan mikrobiyologun veya patoloğun tecrübesi ve kullanılan boyama yöntemi etkiler (57).

2.5.1.3. Kültür

H. pylori enfeksiyonunun tanısında en özgül yöntem olan kültür yöntemi tanıda altın standart olarak kabul edilmektedir (32). Kültür yönteminin, izole edilen suşa antibiyotik duyarlılık testinin yapılabilmesi ve izole edilen suşun tiplendirilmesine olanak sağlaması gibi avantajları vardır (26).

Mikroaerofilik özellikteki bu bakteri dış ortam şartlarından etkilenecek besiyerlerinde üretilmeyen kokoid formlara dönüşebilmesi sebebiyle, alınan mide biyopsi örneğinin uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılması ve ekiminin yapılması gerekmektedir. Kısa sürede taşınacak örnekler için serum fizyolojik yeterli iken 4 saatten uzun sürede laboratuvara ulaştırılacak örneklerin Stuart's besiyeri, Brain Heart Infusion Broth veya Brucella buyyon içinde taşınması gerekmektedir (20, 31).

Kültür yönteminin özgüllüğü; %100 ancak duyarlılığı; örneğin büyüklüğüne, sayısına, taşınma şartlarına, kullanılan besiyerine, inkübasyon şartlarına ve laboratuvarında çalışan personelin tecrübesine göre %65-95 arasında değişkenlik göstermektedir (31, 58).

2.5.2. Noninvaziv Tanı Yöntemleri

2.5.2.1. Seroloji

H. pylori enfeksiyonu konakta lokal ve sistemik immün yanıtı neden olmaktadır. Serumda spesifik IgG ve IgA, midede salgısal IgM ve IgA düzeyinin artışına neden olur. Serolojik yöntemlerle, tükürük, serum, idrar, gastrik sıvılarda *H. pylori*'ye karşı oluşmuş antikorlar tespit edilmektedir. Bu amaçla, hemaglutinasyon, aglutinasyon, komplemen fiksasyon, indirekt immunofluoresans ve enzim linked immunoabsorbent assay (ELISA) gibi yöntemler kullanılmaktadır. En çok tercih edilen yöntem, antikor düzeyini kantitatif olarak belirleyen ELISA'dır. Serolojik yöntemler, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda ve tedavinin izlenmesinde tercih edilmektedir (20, 59, 60).

2.5.2.2. Üre Nefes Testi

Üre nefes testi, *H. pylori*'nin üreaz aktivitesi ile üreyi parçalayarak amonyak ve karbondioksit'e çevirmesi esasına dayalıdır. Hastaya karbon izotopu ile işaretlenmiş üre oral yoldan verilir. Midede *H. pylori* varlığında, üreaz üreyi amonyak ve işaretli CO₂'e parçalar. Oluşan işaretli CO₂ kanla akciğere taşınır ve soluma sonucu ortama salınır. Dışarı verilen havadaki işaretli CO₂'in özel aletler yardımıyla ölçülmesiyle tanı konur (20, 61, 62).

Hastaya verilen üre ¹⁴C (radyoaktif) veya ¹³C (radyoaktif olmayan) izotopuyla işaretlenebilir. ¹⁴C izotopu sintilasyon sayacı ile, ¹³C izotopu ise kütle spektrometresi ile tespit edilir. ¹³C üre'nin kullanıldığı üre nefes testleri çocuklarda ve hamilelerde bile güvenle kullanılabilen bir yöntemdir. Proton pompa inhibitörü ve antibiyotik kullanımı yalancı negatif sonuçlara neden olabileceğinden bu hastalarda güvenilir olmadığı bildirilmiştir (26, 63). Üre nefes testi %90-95 duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir yöntemdir. Bu testin, güvenilir ve hızlı sonuç vermesi, biyopsi gerektirmemesi gibi avantajları olmasına karşın pahalı donanım gerektiren bir yöntemdir (61).

2.5.2.3. Gaita Antijen Testi

Gaita antijen testi *H. pylori* spesifik antijenlerini gaitadan tespitine dayalı immunolojik testlerdir. Pahalı cihazlar ve uzman personel gerektirmeyen, hızlı ve güvenilir sonuç veren bir

yöntemdir. Aktif *H. pylori* enfeksiyonunun tespitinde ve tedavi sonrası eradikasyonun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (64).

Gaitada *H. pylori* antijenlerini tespit amacı ile ticari olarak geliştirilmiş poliklonal ve monoklonal antikor testleri vardır. Poliklonal antikor testinin özgüllüğü yüksektir fakat duyarlılığı değişkendir. Özellikle bakteri yoğunluğunun az olduğu örneklerde duyarlılığı düşük bulunmuştur. Poliklonal antikor testine alternatif olarak geliştirilen monoklonal antikor testinin tanısal değeri, poliklonal antikor testinden daha yüksektir (64, 65).

Paimela ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada histoloji ve hızlı üreaz testi ile tanı almış 50 hastaya tedavi verilmiş ve tedaviden 4 hafta sonra monoklonal ve poliklonal HpSA testlerinin tanısal değerlerini üre nefes testiyle karşılaştırarak incelemişlerdir. Duyarlılık ve özgüllük değerleri, monoklonal HpSA testi için %94,0 ve %100 bulunurken, poliklonal HpSA testinde ise %88 ve %97.0 olarak hesaplandığı bildirilmiştir (66).

Gaita antijen testinde, proton pompa inhibitörü ya da bizmut preparatları, *H. pylori*'yi baskılayabileceğinden, yanlış negatif sonuçlara, *H. heilmannii*, *H. pullorum*, *H. mustelae* ve *H. fenneliea* gibi diğer *Helicobacter* türleriyle çarpaz reaksiyon gelişmesi yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (12, 13, 65, 67).

Eradikasyondan sonra *H. pylori* antijenlerinin feces ile atılması ve ayrıca ölü bakterilerin dejenere kalıntılarının eliminasyonunun uzun sürmesi sebebiyle yalancı pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Bazı çalışmalarda 4 hafta sürenin yeterli olduğu bildirilmesine karşın bu sürenin yetersiz olduğunu bildiren yayınlar da vardır (60, 64, 68, 69, 70).

Costa ve ark (71) yaptıkları çalışmada, HpSA testinin tedavi izlemedeki başarısını invaziv yöntemlerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. HpSA testinin duyarlılık ve özgüllüğü tedavi bitiminden 1 ay sonra %92 ve %83, tedaviden 3 ay sonra ise %96 ve %97 olarak bildirmişlerdir.

2.5.3. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, *H. pylori*'nin tanısı, spesifik virülans faktörlerinin belirlenmesi, antibiyotik direncine neden olan mutasyonların belirlenmesi, kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler bakteri DNA'sının saptanmasına yönelik olduğundan canlı bakteriye gereksinim duymaz. Test sonuçları bakterinin canlılığı hakkında bilgi vermez. Bu nedenle, bu yöntemlerin eradikasyon tedavisinin takibinde kullanılmaları önerilmemektedir (68, 70).

Moleküler tekniklerle *H. pylori* suşlarına ait spesifik nükleik asit dizilerinin saptanmasında biyopsi örnekleri, mide sıvısı, tükürük ve diş plakları, dışkı gibi klinik örnekler kullanılabilir (26, 57, 63).

Moleküler yöntemlerin başarısı; DNA izolasyonunda kullanılan yöntem, hedef gen bölgelerine ve bu bölgeleri tanıyan primerlerin seçimine, izolasyonun yapıldığı klinik örneğe ve uygulama şartlarına göre değişkenlik göstermektedir (57).

Bakteri DNA'sının izolasyonu için üç farklı yöntem kullanılmaktadır. Fenol-kloroform yöntemi, kaynatma yöntemi ve ticari DNA izolasyon kitleri. Fenol-kloroform yöntemi oldukça kaliteli DNA eldesini sağlayan bir yöntemdir. Fakat işlemin çok basamaklı bir işlem olması kontaminasyon riskini artırmaktadır. Aynı zamanda kullanılan fenol ve Proteinaz K'nın tam olarak uzaklaştırılamaması yöntemin başarısını düşürmektedir. Kültürde üretilen suşlardan kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu oldukça uygun ve ekonomik bir yöntemdir. DNA izolasyon kitleri standardize edilmiş olduklarından inhibitör maddelerin yoğun olduğu örneklerde diğer yöntemlere göre daha iyi sonuç vermektedir (8, 57, 63).

Gaitada bulunan safra tuzları, bilirubin ve kompleks polisakkaritler gibi PCR inhibitörleri, PCR yöntemini inhibe etmekte ve yalancı negatif sonuçlara sebep olmaktadır (10, 15, 72). Bu nedenle inhibitörlerinin uzaklaştırılması PCR başarısı açısından büyük öneme sahiptir. Gaitadan inhibitörlerin uzaklaştırılması için, filtrasyon yöntemi, immünmanyetik ayırma ve biyokimyasal saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır (73-80).

Filtrasyon yönteminde, mikrocon 100, polipropilen membran kullanılmaktadır. Polipropilen membran kullanılarak yapılan bir çalışmada, bu yöntemle polisakkaritlerin %80'den fazlasının ortamdan uzaklaştırıldığı ve testin duyarlılığının artarak %95,6 olduğu bildirilmiştir (16). İnhibitörlerin uzaklaştırılması amacı ile filtre olarak microcon 100 kullanılan bir çalışmada duyarlılık %94, özgüllük %100 olarak bulunmuştur (74).

İmmünmanyetik ayırma yönteminde ise, *H. pylori* yüzey antijenlerine karşı antikorlarla kaplı manyetik boncuklar kullanılır. Dışkıdaki *H. pylori* basil ve kok formları bu boncuklara yapışır, örnekteki inhibitörler yıkamayla uzaklaştırılır (75). Yapılan çalışmalarda özgüllüğü %100, duyarlılığı ise %31-61 arasında değişmektedir. Duyarlılığın düşük olması PCR inhibitörlerinin bakteri hücre yüzeyine nonspesifik bağlarla bağlanabilmesi sebebiyle inhibitörlerin ortamdan tam olarak uzaklaştırılamamasına bağlıdır (14, 76).

Cetyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) fekal DNA'dan polisakkaritleri uzaklaştırmak için kullanılmaktadır (77, 78). Bu yöntemle polisakkaritler uzaklaştırmakta fakat DNA'ya zarar vermektedir. CTAB ile muamele edilmiş DNA ile yapılan PCR

testlerinde farklı gen bölgeleri hedef alan primerlerin sonuçları uyumlu değildir. Kullanılan primere göre duyarlılığı %25-90 arasında değişmektedir (8, 79, 80).

Gaita antijen testinde olduğu gibi tedavi sonrası erken dönemde gaitadan *H. pylori* DNA'sının tespitinde de yalancı pozitif sonuçlar alınabilmektedir (15, 70). Makristathis ve ark. (70) yaptıkları çalışmada, tedavi sonrası gaitadan *H. pylori*'nin PCR yöntemiyle tespitinin tanısal değerini üre nefes testini standart alarak değerlendirmişlerdir. Tedavi sonrası PCR'ın özgüllüğünü 4, 6, 8 ve 12. haftalarda sırasıyla % 68.8, %75.0, %87.5 ve %100 olarak bulmuşlardır. Tedavi bitiminden sonra 1 aylık sürenin yeterli olmadığını, bu sürenin uzatılmasının testin özgüllüğünü artırdığını bildirmişlerdir

Hedef bölgeler çalışma amacına göre belirlenmelidir. Örneğin 16S rRNA diğer *Helicobacter*'lerde ve bazı Gram negatif bakterilerde ortak dizilere sahip olduğu için bu bölgeleri hedef alan primerlerle yüksek duyarlılıkta ancak düşük özgüllükte sonuçlar alınmaktadır. *ureC* ve *ureA* genleri *H. pylori* için son derece spesifik olup, nükleik asit amplifikasyon teknikleri direkt tanı için kullanılacaksa bu genlere ait spesifik dizilerin hedef olarak alınması tanıya yüksek özgüllük kazandıracaktır (81, 82, 83).

H. pylori ile yapılan moleküler düzeyli çalışmalarda konvansiyonel PCR, reverse transcriptase PCR, nested-seminested-PCR, real time PCR, multipleks PCR, Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) gibi amplifikasyon ve restriksiyon bazlı fingerprinting yöntemleri ile DNA dizi analizi ve DNA mikroarray yöntemi gibi teknikler kullanılmıştır. Ayrıca reamplifikasyon, nested PCR yöntemleri dışında *H. pylori* saptanmasında testin duyarlılığını arttırmaktadır (57, 59).

Amplifikasyon yöntemleri ile *H. pylori*'nin 16S rRNA geni, *cagA*, *vacA* ve allelleri, *cagE* ve alleli, *iceA* ve allelleri, *babA* ve *babB*, *ureA*, *ureB* ve *ureC(glmM)*, RNA polimerase subunitlerini kodlayan *rpoB* ve *rpoO*, *H. pylori* 0638 geni gibi spesifik ve virulansla ilgili olduğu düşünülen genlerin varlığı araştırılmıştır (57, 83).

Moleküler tanı yöntemleri yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip, hızlı ve güvenilir testler olarak yorumlanmıştır. Ancak bu yöntemler, sonuçları etkileyecek olan örnek seçimi, DNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler, amplifikasyon için seçilen gen bölgeleri ile primer dizilerinin tam olarak standardize edilememiş olması nedeni ile rutin tanıdan çok araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır (57, 83).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Gaita Örnekleri

Bu çalışmada Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na Mayıs 2009 ile Ağustos 2009 tarihleri arasında *H. pylori* gaita antijen testi için gelen gaita örnekleri çalışma için kullanılmıştır. Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'nda *H. pylori* gaita antijen testi (VEGAL FARMACEUTICA, Madrid, İspanya) sonucuna göre pozitif ve negatif olarak yorumlanan gaita örneklerinden yaklaşık 50 mg alınarak 1 ml fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) içinde süspanse edildi ve çalışma yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi. Bu örneklerin alındığı hastalara ait gaita antijen testi sonuçları ve varsa aynı hastalara ait biyopsi örneklerinden laboratuvarda yapılan hızlı üreaz testi, kültür ve mikroskopik inceleme sonuçlarına ait bilgilerden ulaşılabilenler not edildi.

3.1.2. Araç ve Gereçler

1.5 ml'lik santrifüj tüpleri ve 0.2 ml'lik PCR tüpleri (greiner bio-one), otomatik pipetler (Lab-mate), pipet ucu, vorteks (Heidolph, Almanya), santrifüj (Sigma), elektroforez tankı (Owl), digital güç kaynağı (EC-105), jel dökme tepsisi ve tarak, 250 ml erlenmayer, 50 ml mezür, etüv (Dedeoğlu), otoklav (Kermanlar), buz makinesi (Scotsman), thermal cycler (TC 512, Techne), real time thermal cycler (Rotorgene 6000, Corbett Research), hasas terazi (Sartorius Laboratory), mikrodalga fırın (Beko), jel dökümantasyon sistemi (VersaDoc, Bio-rad), UV ilüminatör (Vilber lourmat), -20°C (Uğur) ve -80°C (Thermo) derin dondurucular, deiyonize su cihazı (Barnstead), distile su cihazı (GFL).

3.1.3. Kimyasallar

ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit (Epicentre, ABD), *H. pylori* BLISTER TEST (VEGAL FARMACEUTICA, Madrid, İspanya), Fenol (Amresco, ABD), Kloroform,

Isoamyl alkol, Sodium dodecyl sulfate (SDS), NaCl (Merck, Almanya), Etil alkol, Borik asit (Riedel-de Haen, Almanya), Agaroza, Sodyum asetat, Ethidium bromide, Tris HCl, EDTA, Proteinase K (Sigma, ABD), Bovine serum albumin (Fisher, ABD), Amplifikasyon seti dNTP seti (Roche, Almanya, Fermentas, ABD), Primerler (Invitrogen, ABD), Real time PCR master mix (Fermentas, ABD), prob (Roche, Almanya).

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. Tris HCL (1M) Hazırlanması

80 ml distile su üzerine 15,7 gr Tris HCl eklendi ve çözündükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

3.1.4.2. 5 M NaCl Hazırlanması

29.2 gr NaCl 100 ml distile suda çözündürüldü.

3.1.4.3. EDTA (0.5 M) Hazırlanması

80 ml distile su üzerine 29,2 gr EDTA eklendi ve çözündükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

3.1.4.4. SDS (%10) Hazırlanması

10 gr sodyum lauryl sulphate distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.4.5. Lizis Tamponu Hazırlanması

Lizis tamponu Tablo 2'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2: Lizis tamponu komponentleri

Stok Solüsyonlar		Final Konsantrasyon	Miktar (ml)
Tris HCl (pH 8.0)	1 M	10 mM	1
NaCl	5 M	150 mM	3
EDTA (Ph 8.0)	0.5 M	1 mM	0.2
SDS	%10	%0.2	2
Proteinase K	10 mg/ml	350 µg/ml	3.5
Distile su			90.3

Hazırlanan lizis tamponu kullanılıncaya kadar ve iki çalışma arasında +4°C’de muhafaza edildi.

3.1.4.6. 3 M Sodyum Asetat (pH 4.9) Hazırlanması

24.6 gr sodyum asetat 50 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı. Glasiyel asetik asit eklenerek pH 4,9-5,2 olarak ayarlandı. Hacim 100 ml’ye tamamlandı.

3.1.4.7. TE Hazırlanması

Son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1 ml, EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 200 µl alınarak 98,8 ml distile suya eklendi.

3.1.4.8. Kloroform:İzoamil Alkol (24:1) Hazırlanması

24 ml kloroform ile 1 ml izoamil alkol karıştırılarak elde edildi. Karışım, sıkı kapanan koyu renkli cam şişede oda ısısında saklandı.

3.1.4.9. dNTP Mix Hazırlanması

1.5 ml’lik santifüj tüplerine 100 mM’lık dTTP, dATP, dGTP, dCTP den 20’şer µl koyuldu ve üzerine 720 µl steril distile su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir vorteksenerek 2.5 mM konsantrasyonunda dNTP karışımı elde edildi. Hazırlanan karışım. 200’er µl olarak yeni, steril, DNase-free santrifüj tüplerine bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

3.1.4.10. Primer Mix Hazırlanması

Liyofilize haldeki primerler 100 pmol/μl olacak şekilde steril distile suyla sulandırılarak stok çözeltiler elde edilmiştir. Her bir primer çifti için, 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine, stok çözeltilerden 20'şer μl koyuldu ve üzerine 360 μl steril distile su eklenerek son konsantrasyonu 5 pmol/μl olan (her biri) primer miks hazırlandı. Kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.11. TBE Hazırlanması

121.10 gr tris base, 61.83 gr borik asit, 5.84 gr EDTA'ya distile su eklendi ve çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.4.12. Yükleme Tamponunun Hazırlanması

30 ml gliserol, 250 mg bromphenol blue ve 250 mg xylene cyanol distile su içinde 100 ml'ye tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine birer ml olarak dağıtıldı ve kullanılncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1.4.13. Etidyum Bromide Solüsyonu Hazırlanması

Etidyum bromür 10 mg/ml olacak şekilde distile su içerisinde çözüldü ve oda ısısında ışıktan korunarak saklandı.

3.2. Metod

3.2.1. *Helicobacter pylori* Gaita Antijen Testi (HpSA)

H.pylori Blister Test (VEGAL FARMACEUTICA, Madrid, İspanya) kullanarak gaita örneklerinde *H. pylori* varlığı immunokromatografik yöntemle araştırıldı. Gaitanın 3 farklı alanına kitin toplama probu batırıldı ve 1 ml örnek seyreltici bulunan tüpün içerisine bırakıldı ve ağzı sıkıca kapandı. Tüp içerisindeki örnek seyreltici ile gaita örneğinin karışması için çalkalandı ve 15 saniye vortekslendi. Tüpün ucu kırılarak, kitin stribine 4 damla damlatıldı. Sonuçlar 10 dakika bekletildikten sonra yorumlandı. Sonuç penceresinde sadece bir bant görülmesi negatif, çift bandın görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2. Kontrollerin Hazırlanması

Gaita antijen testi ve biyopsi örneğinde üreaz, kültür ve mikroskopisi negatif olan bir hastaya ait gaita örneği negatif kontrol olarak kullanıldı. Bu örnekten aynı zamanda PBS içinde gaita süspansiyonu hazırlandı ve santrifüj tüplerine her tüpte 900 µl olacak şekilde bölündü. McFarland 4 bulanıklığındaki *H. pylori* SS1 süspansiyonundan PBS içinde 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 olacak şekilde sulandırılmalar yapıldı. Bu sulandırılmalardan gaita süspansiyon tüplerine 100'er µl aktarıldı. Böylece gaita süspansiyonu içinde 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 bakteri/ml olan pozitif kontrol süspansiyonları hazırlanmış oldu.

3.2.3. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada gaitadan DNA izolasyonu amacı ile ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit (Epicentre) ve fenol-kloroform ekstraksiyonu etanol presipitasyonu yöntemi kullanıldı.

3.2.3.1. İzolasyon Kiti Kullanarak DNA İzolasyonu

Gaita örneklerinden DNA elde edilmesi amacıyla ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit kullanıldı.

ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit içeriği:

Fecal DNA Extraction Buffer

Proteinase K (50 mg/ml)

Fecal Lysis Buffer

Protein Precipitation Reagent.

Inhibitor Removal Resin

Spin kolonları

DNA Precipitation Solution

Pellet Wash Solution

TE Buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA)

Gaita örneklerinden DNA izolasyonu, kit içeriğinde üretici firma tarafından belirtilen yönteme göre yapıldı.

Pellet Wash Solution Hazırlanması:

Pellet Wash Solution tüpüne 22.5 ml %100'lük alkol eklendi ve iyice çalkalandı

Spin Kolonlarının Hazırlanması:

- Inhibitor Removal Resin kutusu iyice çalkalandı.
- Boş kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi ve kolonlara 450 µl Inhibitor Removal Resin eklendi.

- 2000 g'de 1 dakika santrifuj edildi.
- Kolonlara tekrar 450 µl İnhibitör Removal Resin eklendi.
- 2000 g'de 2 dakika santrifuj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar 1.5 ml'lik santrifuj tüplerine yerleştirildi.

DNA İzolasyonu

- 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri hazırlandı ve üzerlerine örnek numaraları yazıldı.
- Santrifüj tüplerine PBS içinde süspanse edilmiş gaita örneklerinden 100'er µl koyuldu.

- 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımları atıldı.
- Pelletlerin üzerine 250 µl Fecal DNA Extraction Buffer eklendi ve 10 saniye vortekslendi.

- Üzerine 2 µl Proteinaz K eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
- Sıcaklığı 37°C olan su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her bir tüpe 50 µl Fecal Lysis Buffer eklendi ve 10 saniye vortekslendi.

- 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra tüpler 1000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatanın üzerindeki katmana dokunmadan 180 µl süpernatant steril ependorfa aktarıldı.

- Üzerine 60 µl Protein Precipitation Solüsyonu eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
- Tüpler alt üst edilerek iyice karışması sağlandı.
- Tüpler 8 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Bekleme süresinin sonunda tüpler maksimum hızda 4°C'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatanın üzerindeki katmana dokunmadan 150 µl süpernatant Inhibitor Removal Resin paketlenmiş spin kolonların üzerine pipetlendi.

- Kolonların yerleştirildiği santrifüj tüpleri 2000 g'de 4°C'de 2 dakika santrifüj edildi ve kolonlar atıldı.

- Santrifüj tüplerinin içindeki sıvıya 6 µl DNA Precipitation Solution eklendi ve kısaca vortekslendi.

- Tüpler oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyon süresinin sonunda tüpler maksimum hızda 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi.

- Pellete dokunmadan tüplerdeki süpernatant kısımları pipetle alınarak atıldı.

- Pelletin üzerine 500 µl Pellet Wash Solution eklendi.

- Tüpler maksimum hızda 4°C'de 3 dakika santrifüj edildi.

- Pellete dokunmadan tüplerdeki süpernatant kısımları pipetle alınarak atıldı.

- Tüp içindeki DNA 65°C'de kurutuldu.

- DNA 300 µl TE içinde çözüldü.

- Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.3.2. Fenol Kloroform Ekstraksiyonu Etanol Presipitasyonu Yöntemi İle DNA İzolasyonu

Fenol kloroform ekstraksiyonu etanol presipitasyonu yöntemi ile DNA izolasyonu Monterio ve ark. (84) tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi.

- 15 ml'lik santrifüj tüpleri hazırlandı ve üzerlerine örnek numaraları yazıldı.

- 15 ml'lik santrifüj tüplerinin içine PBS içinde çözülmüş gaita örneklerinden 200'er µl koyuldu ve üzerine 5 ml PBS eklendi ve bir dakika vortekslendi.

- Tüpler 4000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.

- Pellet üzerine 5 ml PBS eklendi ve bir dakika vortekslendi.

- Tüpler 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı.

- Bu işlem toplam 3 kez tekrarlandı.

- Tüplerdeki pelletlerin üzerine 1 ml lizis tamponu pipetlendi ve iyice vortekslendi.

- Tüpler 56°C'de bir gece inkübe edildi.

- İnkübasyon süresinin sonunda tüpler 4000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant kısmı 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

- Üzerine 1 ml 4°C'de muhafaza edilen tamponlu fenol eklendi.

- Tüpler 100 kez altüst edilerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

- Tüp içindeki sıvının üst fazı, yeni 2 ml'lik santrifuj tüpüne pipetlendi.
- Bu tüplerin üzerine 1 ml kloroform: Isoamyl alcohol (24:1) ekstrakte edildi.
- Tüpler 50 kez alt üst edildi ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Tüp içindeki sıvının üst fazı 2 ml'lik santrifuj tüpüne pipetlendi.
- Bu tüplerin üzerine 100 µl 3 M Sodyum asetat (pH 4.9) ilave edildi ve tüpler birkaç kez alt üst edildi.
- Aynı tüpler üzerine 1 ml -20°C'de muhafaza edilen %100 Etanol ilave edildi ve tüpler 11 kez alt üst edildi.
- Tüpler -20°C'de 2 saat bekletildi.
- Daha sonra 11.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
- Tüplerdeki pelletin üzerine 500 µl -20°C'de muhafaza edilen %70 Etanol ilave edildi.
- Tüpler 12.500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Pellete dokunmadan tüplerdeki süpernatant kısımları pipetle alınarak atıldı.
- Tüp içindeki DNA 65°C'de kurutuldu.
- DNA 100 µl TE içinde çözüldü.
- Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmamızda *H. pylori* varlığını polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit etmek amacıyla 54 hastanın gaita örneğinden ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit (Epicentre) ve fenol-kloroform ekstraksiyonu etanol presipitasyonu yöntemi ile izole edilen DNA'lar kullanıldı.

Hedef bölgelerinin amplifikasyonunda real time PCR ve konvansiyonel PCR yöntemleri kullanıldı.

3.2.4.1. Konvansiyonel PCR

Çalışmamızda *H. pylori* virülans genleri olan *ureA*, *ureC* ve *vacA* hedef bölgelerinin konvansiyonel amplifikasyonu için daha önce en çok refere edilen primerler kullanıldı (Tablo 3). Çalışma koşulları ve malzemelerin kullanılması sürecinde DNAaz kontaminasyonu ve önceki çalışmalardan kaynaklanan ürünler tarafından oluşabilecek kontaminasyonlara karşı genel laboratuvar önlemleri kullanıldı. Her çalışma en az iki kez tekrarlandı.

Amplifikasyon prosedürleri, DNA izolasyon ve amplifikasyon süreçlerinin değerlendirilebilmesi için negatif kontrol ve pozitif kontrol sulandırımı ile optimize edilmeye çalışıldı.

Tablo 3: Hedef bölgelerin amplifikasyonunda kullanılan özgül primer dizileri

Hedef Bölge	Primer Adı	Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü (bp) ^a	Referans
<i>UreA</i>	HPU1-F	5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3'	411	15, 16, 72, 85
	HPU2-R	5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'		
<i>UreC</i>	glmM1-F	5'-AAGCTTTTAGGGGT TTAGGGGTTT-3'	294	86
	glmM2-R	5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'		
<i>VacA</i>	VA1-F	5'-ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC-3'	s1: 259	41, 87
S1/s2	VA1-R	5'-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C-3'	s2: 286	

^a bp, baz çifti

3.2.4.1.1 Master Mix Hazırlanması

Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4: Konvansiyonel PCR için master mix bileşenleri ve miktarları

Komponent	Stok konsantrasyonu	Miktar (1X) µl
Buffer	10X	5
dNTP mix	2.5 mM	4
MgCl ₂	25 mM	4
Primer mix	5 pmol/µl	5
Tag polimeraz	5 U/µl	0.20
BSA	10 mg/ml	0.50
Distile su		21.30
Kalıp DNA		10
Toplam hacim		50

Master mix hazırlamak için öncelikle bir kutu içerisine buz koyuldu Tablo 4’de sunulan kimyasallar -20°C’deki dondurucudan çıkartıldı. Taq polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkartıldı. Termostabil enzim olarak FastStart Taq DNA polimeraz (Roche Diagnostics), GoTaq DNA polimeraz (Promega) ve Hot Start Taq DNA polimeraz (Fermentas) enzimleri kullanıldı. Buz üzerinde çözünen kimyasallar vortekslendi. 1.5 ml’lik santrifuj tüpünde, her bir örnek için son hacim 40 µl olacak şekilde Tablo 4’de belirtilen sıraya ve miktara göre karıştırıldı.

Buz üzerinde hazırlanan master mix 30 saniye vortekslendikten sonra quick spin yapıldı ve 0.2 ml’lik PCR tüplerine 40’ar µl olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve numaralarına göre izole edilen DNA’lardan her bir tüpe 10’ar µl yüklendi. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak da *H. pylori* SS1 suşundan izole edilen DNA örneğinden 10 µl eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi.

3.2.4.1.2. Amplifikasyon

3.2.4.1.2.1. *H. pylori ureA* Geninin Amplifikasyonu

ureA geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 411 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan HPU1 ve HPU2 primerleri kullanıldı (Tablo 3). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 54 örnek *ureA* geni varlığı bakımından değerlendirildi. İlk amplifikasyon için PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

		Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
1	1 siklus	94 (ilk denatürasyon)	12
2	35 siklus	95 (denatürasyon)	1
		45 (bağlanma)	1
		72 (uzama)	1
3	1 siklus	72 (son uzama)	8
4		4 (bekleme)	∞

Reamplifikasyon için Tablo 4’de verilen oranlara göre hazırlanan master mix 0.2 ml’lik PCR tüplerine 40’ar µl olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve ilk amplifikasyondan elde edilen ürünler numaralarına göre her bir tüpe 10’er µl yüklendi. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak da *H. pylori* SS1 suşundan izole edilen DNA örneğinden 10 µl eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

		Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
1	1 siklus	94 (ilk denatürasyon)	8
2	30 siklus	95 (denatürasyon)	1
		45 (bağlanma)	1
		72 (uzama)	1
3	1 siklus	72 (son uzama)	5
4		4 (bekleme)	∞

3.2.4.1.2.2. *H. pylori ureC (glmM)* Geninin Amplifikasyonu

ureC geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 294 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan glmM1 ve glmM2 primerleri kullanıldı (Tablo 3). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 54 örnek *ureC* geni varlığı bakımından değerlendirildi. İlk amplifikasyon için PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

		Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
1	1 siklus	94 (ilk denatürasyon)	12
2	35 siklus	95 (denatürasyon)	1
		55(bağlanma)	1
		72 (uzama)	1
3	1 siklus	72 (son uzama)	8
4		4 (bekleme)	∞

Reamplifikasyon için Tablo 4’de verilen oranlara göre hazırlanan master mix 0.2 ml’lik PCR tüplerine 40’ar µl olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve ilk amplifikasyondan elde edilen ürünler numaralarına göre her bir tüpe 10’er µl yüklendi. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak da *H. pylori* SS1 suşundan izole edilen DNA örneğinden 10 µl eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

		Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
1	1 siklus	94 (ilk denatürasyon)	8
2	35 siklus	95 (denatürasyon)	1
		55(bağlanma)	1
		72 (uzama)	1
3	1 siklus	72 (son uzama)	5
4		4 (bekleme)	∞

3.2.4.1.2.3. *H. pylori vacA* Geninin Amplifikasyonu

vacA geninin varlığını PCR ile göstermek amacı ile bu gene ait 259 bp (s1) veya 286 bp (s2) uzunluğundaki gen bölgesini hedef alan VA1F ve VA1R primerleri kullanıldı (Tablo 3). DNA elde edilen toplam 54 örnek *vacA* geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

		Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
1	1 siklus	95 (ilk denatürasyon)	4
2	35 siklus	95 (denatürasyon)	1
		52 (bağlanma)	1
		72 (uzama)	1
3	1 siklus	72 (son uzama)	10
4		4 (bekleme)	∞

3.2.4.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Amplifiye edilen ürünlerin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı. Elektroforez için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 1 gr agaroz 50 ml TBE tamponu ile karıştırılmış ve mikrodalga fırın içerisinde partikülleri tamamen eriyinceye kadar ısıtılmıştır. İçinde erimiş agaroz bulunan erlen, 55°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra içine son kontrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve dağılması için çalkalandı. Geniş kuyucuk oluşturan tarak, düz bir zemindeki tepsi üzerine oturtuldu ve jel tepsiye döküldü ve katılaşması için oda ısısına bırakıldı. Katılaşan agarozdan tarak çıkarıldı, tepsi ile birlikte elektroforez tankının içine yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. DNA'yı ağırlaştırarak kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen DNA'nın yaklaşık konumunu belirlemek için yükleme tamponu kullanıldı. On mikrolitre PCR ürünü 3 µl yükleme tamponuna karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. İlk on

dakika 80 voltta yürütüldükten sonra volt 100 çıkarılıp 30 dakika daha yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV ilüminatörde jel incelendi.

3.2.4.2. Real Time PCR

ureA gen sekansı (GenBank accession no; M60398.1) çıkarıldı ve Universal Probe Design (Roche) sitesi kullanılarak (88) primerler dizayn edildi, primerler ve FAM işaretli prob sipariş edildi. Aşağıdaki 60 baz uzunluğundaki *ureA*'ya ait gen bölgesi real-time amplifikasyon için kullanıldı. Kullanılan primerler ve prob Tablo 5'te sunulmuştur.

tttgatggcgatgcggataggttagtggtggataatttagggaatatcgatggggataagcttttaggggtgtt

Tablo 5: Real time PCR'da kullanılan primerler ve prob sekansı

Primer	Sekans
Forward primer	5'-GATGGCGATGCGGATAG-3'
Reverse primer	5'-ATCCCCATGCACGATATTCC-3'
Probe	5'-TGGTGGAT-3' #138, cat.no.04694228001

Tablo 6: Real time PCR için master mix bileşenleri ve miktarları

Komponent	Stok kons.	Miktar (1X) µl
Master mix (Fermentas maxima)	2X	12.50
Primer mix	5 pmol/µl	1
Universal probe	10 mM	0.25
Distile su		6.25
Kalıp DNA		5
Toplam		25

Real time master mixi, her bir örnek için son hacim 20 µl olacak şekilde Tablo 6'da belirtilen sıraya ve miktara göre hazırlandı. Buz üzerinde hazırlanan master mix 30 saniye vortekslendikten sonra quick spin yapıldı ve 0.2 ml'lik PCR tüplerine 20'şer µl olarak bölündü. Her bir tüpe 5 µl kalıp DNA eklenerek real time termal döngü cihazına (Rotorgene 6000) yerleştirildi

Real time termal döngü cihazında 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyondan sonra 45 siklus olarak 95°C'de 20 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye amplifikasyon gerçekleştirilirken her 60°C'deki döngüde ışıma ölçtürüldü. Süreç sonunda ışımlar analiz edilerek pozitiflikler değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Örnekler

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na Mayıs 2009 ile Ağustos 2009 tarihleri arasında *H. pylori* gaita antijen testi için gelen 54 gaita örneği çalışma için kullanıldı.

Geriye dönük olarak örnekler incelendiğinde çalışmaya dahil edilen 54 hastanın 27'sine aynı dönemde hastanemizde endoskopi yapılmış ve bunlardan alınan biyopsi örneklerinin de laboratuvarımıza gönderilmiş olduğu görüldü. Laboratuvarımızda mikrobiyolojik yöntemlerle (hızlı üreaz testi, mikroskopi, kültür) *H. pylori* açısından incelenen mide biyopsi örneklerinin 14'ü pozitif (en az birinde pozitif), 13'ü negatif olarak belirlenmiştir.

4.2. *Helicobacter pylori* Gaita Antijen Testi

H. pylori gaita antijen testi ile 54 örnekten 43'ü (%79,63) pozitif, 11'i (%20,37) negatif olarak belirlendi.

Mide biyopsi örneğinin mikrobiyolojik incelemesinde *H. pylori* negatif olarak belirlenen 13 hastanın 6'sının HpSA testi sonucu negatif, 7'sinin pozitif olarak saptanmıştır. İnvaziv testlerle pozitif olarak belirlenen 14 hastanın tamamında pozitif olarak bulunmuştur. Mikrobiyolojik inceleme sonuçlarını standart olarak kabul ettiğimizde HpSA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %46.15 olarak hesaplandı.

Tablo 7: *H. pylori* gaita antijen testi ile invaziv test sonuçlarının karşılaştırılması

	HpSA (-)	HpSA (+)	TOPLAM
İnvaziv Testler (-)	6	7	13
İnvaziv Testler (+)	0	14	14
TOPLAM	6	21	27

H. pylori tanısında altın standart kabul edilen mide biyopsi örneğinden yapılan kültür sonucu pozitif olan 11 hastadan alınan gaita örneklerinin hepsinde gaita PCR sonucu pozitif olarak bulundu. Kültür sonucu negatif olan 16 hastanın 6'sının HpSA testi sonucu negatif, 10'unun sonucu pozitif olarak bulundu. Kültür sonucunu standart olarak kabul ettiğimizde HpSA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %37.50 olarak hesaplandı.

4.3. DNA İzolasyonu

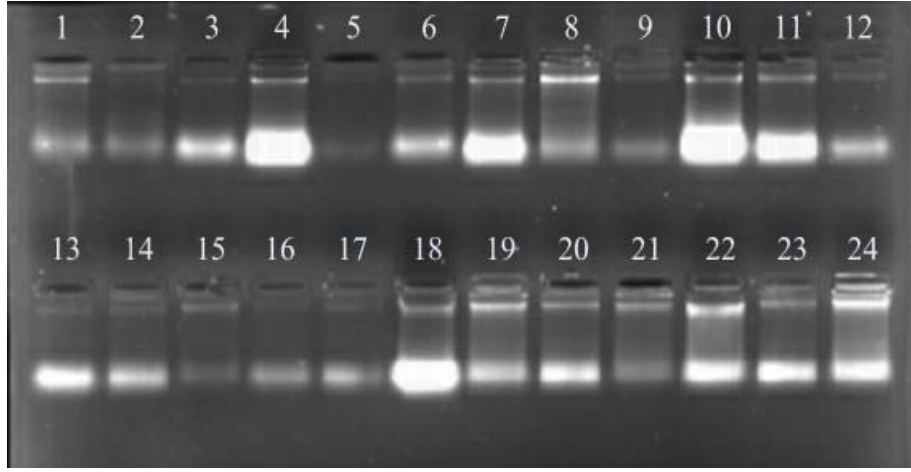
ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit (Epicentre) kullanılarak DNA izolasyonu protokole uygun gerçekleştirildi. %0.8 agaroz (w/v) içeren jelde yürütüldü. DNA varlığı UV ilüminatörde görülmeyişi (Şekil 1). Hazırlanan pozitif kontrol sulandırımından jelde görülememesine karşın PCR için yeterli olabilecek miktarda DNA izole edilebilmiş olma olasılığı göz önünde bulundurularak amplifikasyona çalışıldı. PCR ürünü elde edilemeyince yöntem terk edildi.



Şekil 1: İzolasyon kiti kullanarak yapılan DNA izolasyonunda elde edilen ürünlerin %0.8'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü: Rakamlar: Örnekler

Fenol-kloroform ekstraksiyonu etanol presipitasyonu yöntemi ile DNA izolasyonu, Monteiro ve ark. (84) tarafından rapor edilen yöntem ile gerçekleştirildi. Bu yöntem ile DNA izole edilmekle birlikte PCR sonrası hiçbir primerle ürün elde edilemedi. Sorunun PCR inhibitörleri olduğu düşünülerek yöntem modifiye edildi. Örnekler PCR inhibitörlerinin eliminasyonu amacıyla, 15 ml'lik santrifüj tüplerinde en az üç kez 5'er ml PBS ile yıkandı. Parçalama işlemini kolaylaştırmak ve DNA miktarını daha da artırmak için Proteinaz K miktarı 350 µg/ml çıkartıldı. Bu değişikliklerle hem izole edilen DNA miktarı artırıldı hem de PCR inhibitörlerinin miktarının azaltıldığı varsayıldı (Şekil 2). Bazı örneklerde DNA

miktarlarının fazla olduğu görüldükten sonra bu örnekler 10 kat sulandırıldı. Böylece inhibitörlerin de sulandırıldığı DNA süspansiyonları PCR işlemlerinde kullanıldı.



Şekil 2: Manuel izole edilen DNA örneklerinin % 0.8'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü, Rakamlar: Örnekler

4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çalışmamızda *H. pylori* varlığını polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit etmek amacıyla 54 hastanın gaita örneğinden ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit (Epicentre) ve fenol-kloroform ekstraksiyonu etanol presipitasyonu yöntemi ile izole edilen DNA'lar kullanıldı.

Hedef bölgelerinin amplifikasyonunda real time PCR ve konvansiyonel PCR yöntemleri kullanıldı. Çalışmamıza dahil edilen hastalardan eşzamanlı olarak alınan biyopsi materyallerine ait sonuçlar ile gaita örneklerinden yapılan *Helicobacter pylori* gaita antijen testi (HpSA), *ureA* konvansiyonel PCR ve real time PCR sonuçları Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 8: Örneklere ait *ureA* PCR, real time PCR, HpSA ve biyopsi materyal sonuçları

NO	HpSA ^a	ÜREAZ	KÜLTÜR	MİKROSKOPİ	RT PCR ^b	<i>ureA</i> PCR
1	+	- ^d	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	-	-	+	+	+
9	+	-	-	-	+	+
10	+	-	-	+	+	-
11	+	-	+	+	+	+
12	+	-	+	+	+	+
13	-	-	-	-	+	-
14	+	-	-	-	+	+
15	+	-	-	-	+	-
16	+	-	+	+	+	+
17	+	-	-	-	+	+
18	+	-	+	+	+	+
19	+	-	+	+	+	+
20	+	-	-	-	+	+
21	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	+	+
23	+	-	-	-	+	-
24	-	-	-	-	-	+
25	+	-	-	+	-	+
26	+	-	+	+	+	+
27	+	G ^e	G	G	+	+
28	+	G	G	G	-	+
29	-	G	G	G	-	+
30	+	G	G	G	+	+
31	-	-	-	-	-	-
32	+	G	G	G	-	+
33	+	G	G	G	+	+
34	-	G	G	G	-	-
35	-	G	G	G	-	+
36	+	G	G	G	-	+
37	+	G	G	G	+	+
38	+	G	G	G	+	-
39	+	G	G	G	-	+
40	+	G	G	G	+	+
41	+	G	G	G	+	+
42	+	G	G	G	+	+
43	+	G	G	G	-	-
44	+	G	G	G	+	+
45	+	G	G	G	+	+
46	+	G	G	G	-	+
47	+	G	G	G	+	+
48	+	G	G	G	+	+
49	+	G	G	G	-	+
50	+	G	G	G	+	+
51	-	G	G	G	-	+
52	+	G	G	G	+	+
53	-	G	G	G	-	+
54	+	G	G	G	-	-

^aHpSA; *H. pylori* gaita antijen testi, ^bRT: PCR: Real Time PCR, ^c+: Pozitif, ^d -: Negatif, ^eG: Gerçekleştirilemedi

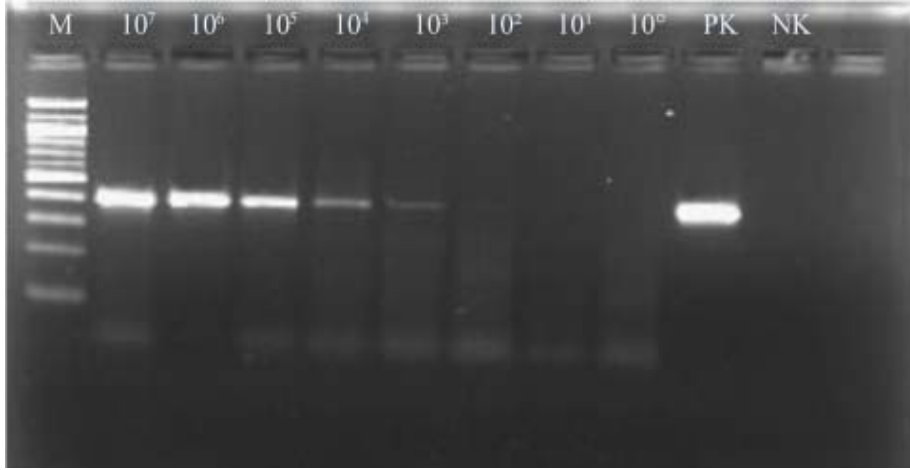
4.4.1. Konvansiyonel PCR

Çalışmamızda *H. pylori* virülans genleri olan *ureA*, *ureC* ve *vacA* hedef bölgelerinin konvansiyonel amplifikasyonu için Tablo 3’de sunulan primerler kullanıldı. Kullanılan izolasyon yöntemleriyle primerlerin duyarlılıklarını belirlemek için ml’inde 10^7 - 10^0 *H. pylori* içeren gaita örneklerinden izole edilen DNA’lar öncelikle test edildi. Başarılı sonuç elde edilen primerler ile örnekler tarandı.

Konvansiyonel PCR’da 3 farklı enzim ile *H. pylori* SSI suşundan izole edilen DNA kullanılarak master miks komponent konsantrasyonları ve enzim tercihleri belirlendi. En iyi çalışan enzim olarak FastStart Taq polimeraz (Roche) belirlendi. Diğer enzimler kültürden izole edilmiş *H. pylori* DNA’sı kullanıldığında çalışmaktayken; gaita izolatlarında kötü performansa sahip oldukları görüldü.

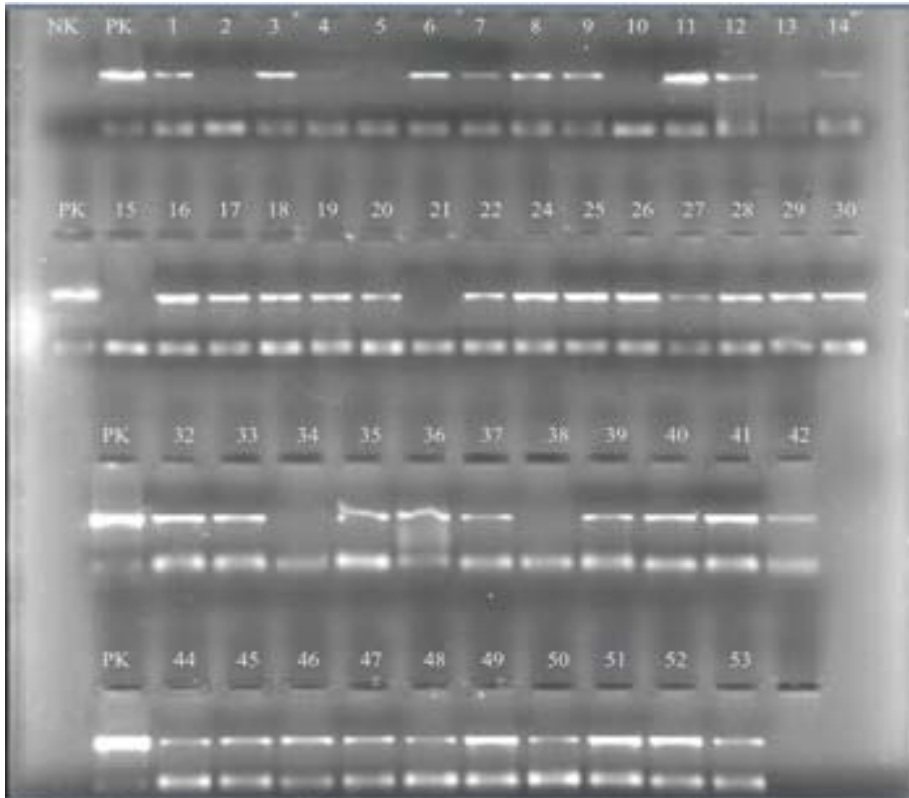
4.4.1.1. *H. pylori ureA* Geninin Amplifikasyonu

Pozitif sulandırımaların ve negatif kontrol örneğinin *ureA* genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyonu sonucu 411 baz çifti uzunluğundaki ürün sadece 10^7 , 10^6 , 10^5 bakteri/ml olan kontrollerde görüldü. Negatif kontrolde bant saptanmadı. Düşük yoğunlukta bakteri içeren örneklerde bant saptanabilmesi amacıyla reamplifikasyon yöntemi kullanıldı. İlk amplifikasyonda elde edilen PCR ürünleri ikinci amplifikasyonda kalıp olarak kullanıldı. Böylelikle hem PCR inhibitörlerinin oranı azaltıldı hem de siklus sayısı artırılarak düşük ürün yoğunluğu nedeniyle görüntülenemeyen bantların görünür hale gelmesi sağlandı. İlk amplifikasyonda bakteri saptama alt limiti 10^5 bakteri/ml iken reamplifikasyonda 10^3 bakteri/ml olarak saptanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3: *H. pylori ureA* genine ait reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü: M: Marker, 10^7 - 10^0 bakteri/ml olan kontroller, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

İlk turunda pozitif örnek saptanamayan 54 örnekten reamplifikasyon yöntemiyle 42'si (%77,78) pozitif, 12'si (%22,22) negatif olarak bulundu (Tablo 8). Şekil 4'te bazı örneklerin reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü verilmiştir



Şekil 4: *H. pylori ureA* genine ait reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü: NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, Rakamlar: Örnekler

Gaita antijen testi pozitif olan 43 örnekten 36'sının PCR testinin sonucu pozitif, 7'sinin negatif olarak bulundu. Gaita antijen testi negatif 11 örnekten 5'inin PCR testi sonucu negatif, 6'sının sonucu pozitif olarak saptandı (Tablo 9). HpSA testi sonuçları ile *ureA* PCR sonuçları arasındaki uyum %76 olarak belirlendi.

Tablo 9: *ureA* PCR sonuçlarının gaita antijen testiyle karşılaştırılması

	<i>ureA</i> PCR (-)	<i>ureA</i> PCR (+)	TOPLAM
HpSA (-)	5	6	11
HpSA (+)	7	36	43
TOPLAM	12	42	54

Mide biyopsi örneğinin mikrobiyolojik incelemesinde *H. pylori* negatif olarak belirlenen 13 hastanın 7'sinin gaita PCR sonucu negatif 6'sı pozitif olarak saptanmıştır. En az biriyle *H. pylori* pozitif olarak belirlenen 14 hastanın 13'ü pozitif 1'i negatif olarak belirlenmiştir (Tablo 10). Mikrobiyolojik inceleme sonuçlarını standart olarak kabul ettiğimizde *ureA* PCR testinin duyarlılığı %92.86 özgüllüğü ise %53.85 olarak hesaplandı.

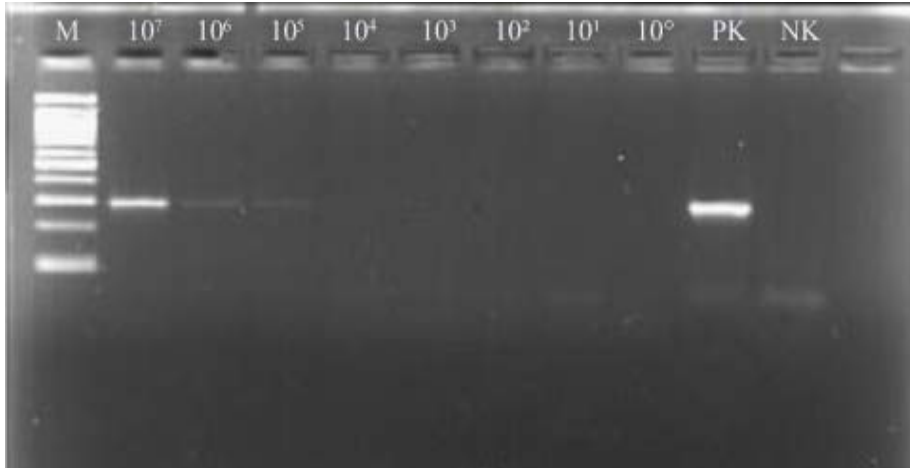
Tablo 10: *ureA* PCR sonuçlarının, invaziv test sonuçlarıyla karşılaştırılması

	<i>ureA</i> PCR (-)	<i>ureA</i> PCR (+)	TOPLAM
İnvaziv Testler (-)	7	6	13
İnvaziv Testler (+)	1	13	14
TOPLAM	8	19	27

Kültür sonucu pozitif olan 11 hastadan alınan gaita örneklerinin hepsinde *ureA* PCR sonucu pozitif olarak bulundu. Kültür sonucu negatif olan 16 hastanın 8'inin *ureA* PCR sonucu negatif, 8'inin sonucu pozitif olarak bulundu. Kültür pozitifliğini standart olarak aldığımızda, duyarlılığı %100, özgüllüğü %50 olarak belirlendi.

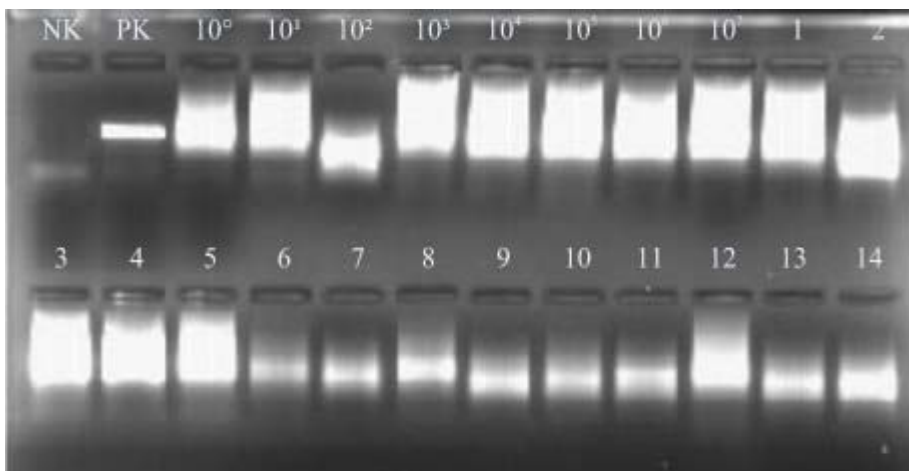
4.4.1.2. *H. pylori ureC* (glmM) Geninin Amplifikasyonu

İlk tur PCR işleminde bakteri yoğunluğu 10^7 , 10^6 , 10^5 bakteri/ml olan pozitif kontrollerden 294 bp uzunluğunda ürün elde edildi (Şekil 5). DNA izolasyonu yapılan 54 örnekten hiçbirinde bant gözlemlenemedi.



Şekil 5: *H. pylori ureC* genine ait ilk amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agoroz jelde elektroforez görüntüsü: M: Marker, 10^7 - 10^0 bakteri/ml olan kontroller, PK: Pozitif Kontrol (*H. pylori* DNA'sı), NK: Negatif Kontrol

Reamplifikasyonda ise nonspesifik amplifikasyonlar nedeniyle değerlendirme yapılamadı (Şekil 6). Primer, $MgCl_2$ ve diğer komponentler ile yapılan ayarlamalar neticeyi değiştirmedii.



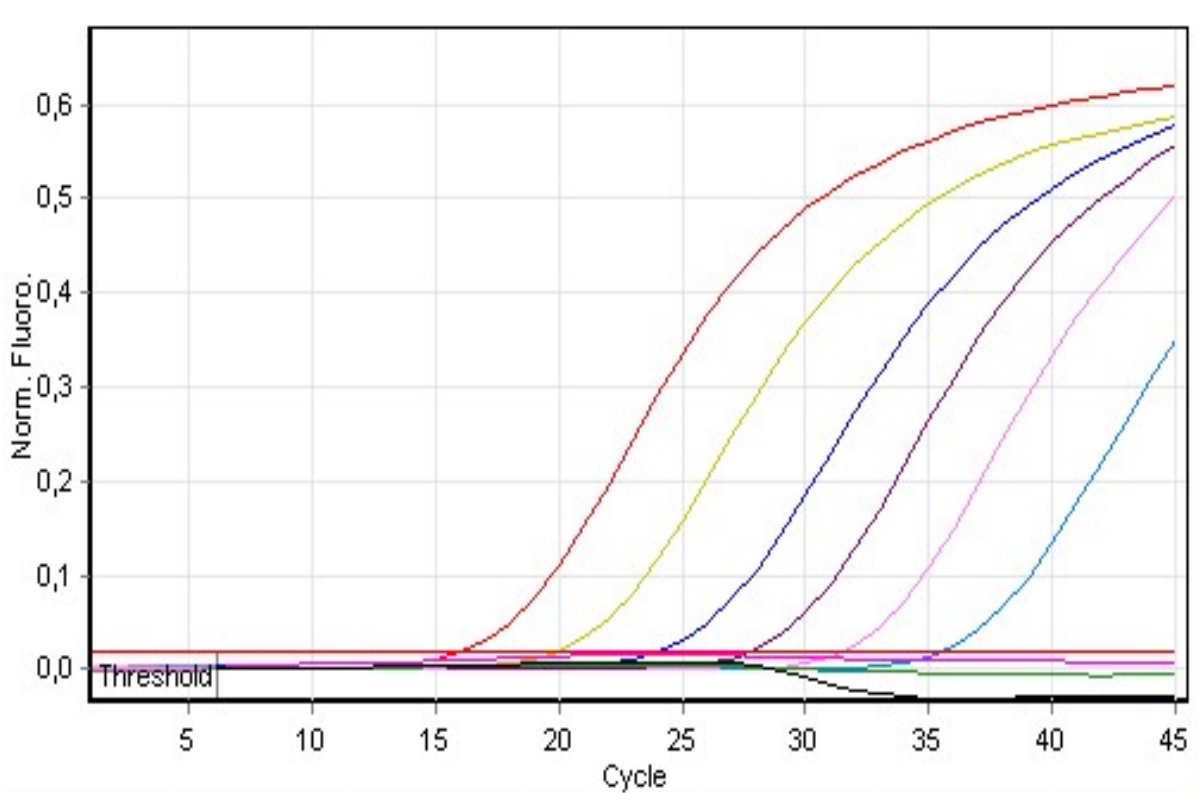
Şekil 6: *H. pylori ureC* genine ait reamplifikasyon ürünlerinin %2'lik agoroz jelde elektroforez görüntüsü: NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol (*H. pylori* DNA'sı), 10^7 - 10^0 bakteri/ml olan kontroller, Rakamlar: Örnekler

4.4.1.3. *H. pylori vacA* Geninin Amplifikasyonu

Pozitif sulandırılar, negatif kontrol örneği ve DNA izolasyonu yapılan 54 örnekte *H. pylori*'nin *vacA* geninin varlığını araştırmak için bu gene ait 259 bp veya 286 bp uzunluğundaki bölgeyi hedef alan VA1F ve VA1R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda pozitif kontroller dâhil örneklerin hiçbirinde ürün elde edilemedi. Master mix kompozisyonu ve termal döngü koşullarında yapılan değişiklikler sonucu etkilemedi.

4.4.2. Real Time PCR

Pozitif sulandırılar ve negatif kontrol örneğinin *ureA* genine özgül primerler ve universal probe kullanılarak yapılan amplifikasyonu sonucu 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ve 10^2 bakteri/ml olan kontrollerde amplifikasyon eğrisi belirlendi. Negatif kontrolde, 10^1 ve 10^0 sulandırılarında amplifikasyon eğrisi görülmedi. Eğrilere ait eşik değerlerinin (Ct) orantılı olduğu gözlemlendi (Şekil 7, Tablo 11).



Şekil 7: Kontrollerin Amplifikasyon Eğrileri

Tablo 11: Ct Değerleri

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/ml)	Calc Conc (copies/ml)	% Var
1		10 ⁷	Unknown	16,16			
2		10 ⁶	Unknown	20,09			
3		10 ⁵	Unknown	24,15			
4		10 ⁴	Unknown	27,89			
5		10 ³	Unknown	31,62			
6		10 ²	Unknown	35,64			
9		10 ¹	Unknown				
10		10 ⁰	Unknown				
11		NK	NTC				

Elli dört hastaya ait gaita örneklerinden izole edilen DNA'lerden yapılan real time PCR ile 34 (%62.96) örnek pozitif, 20 (%37.04) örnek negatif bulundu (Tablo 7).

H. pylori gaita antijen testi pozitif olan 43 örnekten 33'ünün real time PCR testinin sonucu pozitif, 10'nunun negatif olarak saptandı. HpSA testi negatif 11 örnekten 10'unun real time PCR testi sonucu negatif, 1'inin sonucu pozitif olarak bulundu (Tablo 12). Real time PCR ile HpSA test sonuçları arasındaki uyum %80 olarak belirlendi.

Tablo 12: Real time PCR sonuçlarının gaita antijen testiyle karşılaştırılması

	RT PCR ^a (-)	RT PCR (+)	TOPLAM
HpSA (-)	10	1	11
HpSA (+)	10	33	43
TOPLAM	20	34	54

^aRT PCR: Real Time PCR

Mikrobiyolojik yöntemlerin hepsinde negatif olarak belirlenen 13 hastanın 6'sının real time PCR sonucu negatif, 7'si pozitif olarak saptanmıştır. En az biriyle pozitif olarak belirlenen 14 hastanın 13'ünün real time PCR sonucu pozitif 1'i negatif olarak bulunmuştur

(Tablo 13). Mikrobiyolojik inceleme sonuçlarını standart olarak kabul ettiğimizde real time PCR testinin duyarlılığı %92.86 özgüllüğü ise %46.15 olarak hesaplandı.

Tablo 13: Real time PCR sonuçlarının invaziv test sonuçlarıyla karşılaştırılması

	RT PCR ^a (-)	RT PCR (+)	TOPLAM
İnvaziv Testler (-)	6	7	13
İnvaziv Testler (+)	1	13	14
TOPLAM	7	20	27

^aRT PCR: Real time PCR

H. pylori tanısında altın standart kabul edilen mide biyopsi örneğinden yapılan kültür sonucu pozitif olan 11 hastanın tamamında real time PCR sonucu pozitif olarak belirlendi. Kültür sonucu negatif olan 16 hastanın 9'unun real time PCR sonucu pozitif, 7'sinin sonucu negatif olarak saptandı. Kültür sonuçlarını standart olarak kabul ettiğimizde real time PCR testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %43.75 olarak hesaplandı.

5. TARTIŞMA

Helicobacter pylori, dünya nüfusunun yarısından fazlasında görülen; kronik gastrite, gastroduodenal ülser, gastrik adenokarsinoma ve lenfomaya neden olabilen bir bakteridir (3-5). Toplum sağlığı açısından risk oluşturan *H. pylori*'nin güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlanması etkin tedavinin sağlanması açısından önemlidir.

H. pylori'nin tanısında endoskopi işlemi ile alınan mide biyopsi örneğinin incelenmesini gerektiren invaziv yöntemler (kültür, histolojik inceleme ve hızlı üreaz testi) ve endoskopi işlemi gerektirmeyen noninvaziv yöntemler (üre nefes testi, serolojik testler, gaita antijen testleri) kullanılmaktadır. Ayrıca, invaziv ve noninvaziv olarak elde edilen örneklerden moleküler yöntemlerle *H. pylori* varlığı araştırılmaktadır (7-10).

Çalışmamızda, antijen aranması esasına dayalı bir immunokromatografik yöntemle *H. pylori* açısından incelenen gaita örneklerinde, farklı primerler ve DNA izolasyon metotları kullanarak, konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemleriyle *H. pylori* varlığının araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

H. pylori gaita antijen testi, hızlı sonuç alınabilmesi, testin yapılışının kolaylığı ve maliyetinin düşük olması sebebiyle son yıllarda *H. pylori* enfeksiyonlarının rutin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, diğer *Helicobacter türleri*yle çarpaz reaksiyon gelişmesi ve tedavi sonrası *H. pylori* antijenlerinin ve ölü bakterilerin kalıntılarının atılmasının uzun sürmesi yalancı pozitif sonuçlara neden olmaktadır (67-70).

Kaklıkaya ve ark. (89), 2006 yılında yaptıkları çalışmada, HpSA testinin tedavi öncesi ve sonrası tanısallığı, kültür, histoloji ve hızlı üreaz testi sonuçlarıyla karşılaştırarak incelenmiştir. HpSA testinin, tedavi öncesi duyarlılığını %70.6, özgüllüğünü %100, tedavi bitiminde 4 hafta sonra duyarlılığını %84.2, özgüllüğünü ise %64.7 olarak bildirmişlerdir.

Blanco ve ark. (90) invaziv testleri standart olarak yaptıkları çalışmada, *H. pylori* antijenlerini gaitadan tespit etmek amacıyla geliştirilen 3 farklı HpSA ELISA ve 3 farklı HpSA immünokart testinin tanısallığı incelenmiştir. HpSA ELISA (Immunodiagnostik ELISA, Premier Platinum HpSA EIA, ve Amplified IDEIA HpStAR) testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %87.3, %92.5 ve %95, özgüllükleri ise %83.3, %72.2 ve %66.6 olarak bildirilmiştir. HpSA immünokart (Letitest *H. pylori* CARD, ImmunoCard HpSA ve RAPID HpStAR)

testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %83.8, % 52.5 ve % 78.8, özgüllükleri ise %66.6, %94 ve %55.5 olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda, mide biyopsi örneğinin mikrobiyolojik yöntemlerle *H. pylori* açısından incelemesini standart olarak aldığımızda, HpSA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %46.15 olarak hesaplandı.

Moleküler yöntemlerden, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) son yıllarda enfeksiyon hastalıklarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan oldukça özgül ve duyarlı bir yöntemdir. Biyopsi materyali, mide sıvısı, tükürük ve diş plakları, dışkı gibi klinik örneklerden PCR yöntemi ile *H. pylori* tespit edilebilmektedir (10, 57, 79, 84).

Gaitadan *H. pylori* DNA'sının tespit edilmesi esasına dayalı olarak yapılan çalışmalarda başarı %25-100 arasında değişen oranlarda rapor edilmiştir. Bu değişkenliğe gaitada bulunan PCR inhibitörlerinin sebep olduğu düşünülmektedir (15, 72, 91). Bu nedenle DNA izolasyonunda kullanılan yöntem PCR başarısı açısından büyük önem teşkil etmektedir.

Notarnicola ve ark. (16), PCR inhibitörlerinin uzaklaştırılmasında polipropilen membran kullandıkları çalışmada, *ureA* geninin 411bp'lik fragmentini hedef alan HPU1-HPU2 primerleriyle yapılan PCR'ın duyarlılığını %95.6 özgüllüğünü ise %100 olarak bildirmişlerdir. Aynı primerlerin kullanıldığı bir başka çalışmada, inhibitörlerin uzaklaştırılmasında immünmanyetik ayırma yöntemi kullanılmış ve PCR'ın duyarlılığını %61 özgüllüğünü ise %100 olarak bildirmişlerdir (14).

Gaitadan DNA izolasyonu amacıyla geliştirilen fekal DNA izolasyon kitleri PCR inhibitörlerinin uzaklaştırılmasında çeşitli kromatografik yöntemler kullanmaktadır. Fekal DNA izolasyon kitlerinin PCR inhibitörlerini uzaklaştırmada yetersiz olduğunu bildiren çalışmalar da vardır. Zambon ve ark. (92) gaitadan DNA izolasyonunda QIAmp DNA Stool kit (Qiagen) kullandıkları çalışmada, *ureA* geninin 323 bp'lik fragmentini hedef alan primerler ile yapılan PCR'ın duyarlılığını %35, özgüllüğünü ise %98 olarak bildirmişlerdir. Aynı fekal DNA izolasyon kitinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise *ureA* genine özgül primerlerle yapılan seminested PCR'ın duyarlılığı %26 olarak bildirilmiştir (18).

Gaita örneklerinden moleküler yöntemlerle *H. pylori* varlığının saptanmasında PCR inhibitörlerinden kaynaklanan sorunlar göz önünde bulundurularak çalışmamızda iki farklı yöntemle (Fekal DNA izolasyon ve fenol kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyon yöntemi) DNA izolasyon çalışması yapıldı.

PCR inhibitörlerinin eliminasyonunda jel filtrasyon yöntemi kullanan ExtractMaster Fekal DNA Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies) ile yapılan izolasyonda DNA varlığı

gözlemlenmedi. Az miktarda da olsa DNA olması ihtimali göz önüne alınarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Yapılan amplifikasyon çalışmalarında da sonuç alınamadı.

Stephen ve ark (93) gaitadan DNA izolasyonu amacıyla geliştirilen 4 farklı marka DNA izolasyon kitinin (ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit; Epicentre Biotechnologies, QIAamp DNA Stool Mini Kit; Qiagen, UltraClean Fecal DNA Kit; MoBio and ZR Fecal DNA Kit; Zymo Research) başarısını karşılaştırdıkları çalışmada, ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit'in DNA izolasyonunda başarısız olduğu bildirilmiştir. Nitekim, tarafımızdan yapılan çalışmada benzer sonuç elde edilmiş bu nedenle izolasyon metodu değiştirilmiştir.

Fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyon yöntemi ile çeşitli doku ve sıvılarda başarılı bir şekilde nükleik asit izole edilebilmektedir (84, 94, 95). Bu yöntemde, çalışmamızda PCR inhibitörlerini uzaklaştırmak için modifikasyonlar yapıldı. Örnek tekrarlayan PBS ile yıkama süreçlerinden geçirilerek daha çok karbonhidrat kökenli olan inhibitörler uzaklaştırılmaya çalışıldı. Yapılan amplifikasyon çalışmaları aslında bu sürecin yeterli olmadığını gösterdi. Zira yüksek DNA konsantrasyonlarında PCR ile ürün elde edilemedi. Konvansiyonel PCR'da ürün elde edilmesi ancak elde edilen DNA'nın 10 kat sulandırılması sonucunda gerçekleştirilebildi. Yıkama sürecinin uzatılması veya sıvısının değiştirilmesi inhibitörleri uzaklaştırmada yardımcı olabileceği düşünüldü.

Argyros ve arkadaşları (96), 2000 yılında yaptıkları çalışmada, kültürden izole edilen bakterilerden fenol-kloroform yöntemiyle 10^3 CFU/ml, gaitadan 10^6 CFU/ml bakteriyi saptayabilmişlerdir. Çalışmamızda bakteri alt saptama limiti, *ureA* PCR ile 10^3 ; real time PCR ile 10^2 bulunmuştur. Yaptığımız yıkama işlemleri ve elde edilen DNA'ların on kat sulandırılarak kullanılması PCR inhibitörlerinin etkisini ve miktarını azaltarak bakteri saptama alt limitini düşürdüğü belirlenmiştir.

PCR başarısının yalnızca DNA izolasyon protokolüne bağlı olmadığı bilinmektedir. Al-Soud ve ark. (97) inhibitör içeren örneklerde bazı enzimlerin daha iyi amplifikasyon ürünü verdiklerini belirtmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde 3 farklı enzim ile yapılan amplifikasyon denemelerinde ürün elde edilmesi ancak FastStart Taq polimeraz enzimi (Roche) ile mümkün olabildi.

PCR'ın başarısını etkileyen faktörlerden biri de kullanılan primerlerdir. Bu çalışmada üç gen bölgesine (*vacA*, *ureA* ve *ureC*) ait çeşitli referanslarda belirtilen primerler kullanılmasına karşın en iyi verim *ureA* genine özgül HPU1-HPU2 primerlerinden alındı. Aynı nedenle real-time PCR primerleri ve probu seçiminde yine *ureA* geni kullanıldı.

H. pylori barsak patojeni olmadığı için gaitada düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu nedenle, mide biyopsi örneğinde PCR ile *H. pylori*'yi tespitinde önerilen 30-40 siklus

gaita örneklerinde yeterli olmamaktadır. Bazı çalışmalarda nested, seminested PCR veya reamplifikasyon yöntemiyle gaitadan *H. pylori* DNA'sının başarılı bir şekilde tespit edilebildiği bildirilmiştir (68, 74, 98). Siklus sayısının artırılması testin duyarlılığını artırmakta bununla birlikte az sayıda, kolonize olmamış veya ölü bakterilerin varlığında pozitif sonuçlar alınmasına sebep olmakta ve testin özgüllüğünü düşürmektedir.

Çalışmamızda, gaitadan reamplifikasyon yöntemi ile *H. pylori* DNA'sının varlığı *ureA* genine özgül primerler ile kullanarak araştırıldı. İlk amplifikasyonda 10^7 - 10^5 bakteri/ml olan pozitif kontrollerden bant gözlemlendi, örneklerin hiçbirinde bant gözlemlenemedi. İkinci amplifikasyonda, ilk amplifikasyonda bant gözlemlenmeyen 54 örnekten 43'ünde ve 10^4 , 10^3 bakteri/ml olan pozitif kontrollerden 411 bp uzunluğunda bant gözlemlendi.

Şen ve ark. (98), yaptıkları çalışmada, bizim kullandığımız primerlerle gaitada *H. pylori*'nin reamplifikasyon yöntemiyle tespitinin doğruluğu histoloji ve hızlı üreaz testi sonuçları ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Testin duyarlılığını %65.22, özgüllüğünü ise %75 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, yöntemin tanısal doğruluğunu, invaziv test sonuçlarını standart olarak değerlendirdiğimizde, duyarlılık %92.86, özgüllük ise %53.85 olarak hesaplandı.

Real time PCR, konvansiyonel PCR'a göre daha hızlı ve özgül bir yöntemdir. Bu çalışmada Roche Universal probe ve *ureA* genine özgül primerler kullanarak gerçekleştirilen real time PCR'da 54 örnekten 34'ünde ve 10^7 - 10^2 bakteri/ml olan pozitif kontrollerden amplifikasyon eğrisi elde edildi. İnvaziv test sonuçlarını standart olarak kabul ettiğimizde real time PCR testinin duyarlılığı %92.86 özgüllüğü ise %46.15 olarak hesaplandı.

Konvansiyonel PCR'da stok DNA sulandırılması (1/10) yapılmadan amplifikasyon ürünü elde edilemezken, real time PCR metoduyla stok DNA örneğinden de amplifikasyonun gerçekleştirilebildiği saptandı. Ancak yapılan sulandırmanın etkinliği artırdığı görüldü.

Uyanık ve ark. (99) yaptıkları çalışmada kültür yöntemini altın standart olarak kabul ettiklerinde real time PCR yöntemiyle gaitadan *H. pylori* tanısının duyarlılığını %68.0, özgüllüğünü ise %72.7 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, kültür sonuçlarını altın standart olarak kabul ettiğimizde real time PCR'ın duyarlılığı %100, özgüllüğü %43.75 olarak hesaplandı.

H. pylori tanısında ve tedavi başarısının izlenmesinde endoskopi gerektiren testler referans olarak kullanılmaktadır. Ancak enfeksiyon gastrik mukozada yama şeklinde dağılım gösterdiğinden invaziv testlerde örnek alım hatası dolayısıyla yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Ayrıca proton pompa inhibitörü, bizmut preperatları ve antibiyotik kullanımı da invaziv testlerin duyarlılığını düşürmektedir. Bu yüzden tanıda sadece invaziv testlerin

kullanılması mevcut enfeksiyonun belirlenememesine neden olabilmektedir. İnvaziv ve noninvaziv testlerin bir arada kullanılması tanıda başarıyı artırmaktadır (11, 22). Bu nedenle çalışmamızda gaita örneklerinden *H. pylori* DNA'sının tespitinde kullandığımız yöntemlerin başarısını hem noninvaziv test (HpSA) sonuçlarıyla hem de invaziv test (kültür, hızlı üreaz testi, mikroskopi) sonuçlarıyla karşılaştırarak değerlendirildi.

Çalışmamızda alınan sonuçlar *H. pylori* gaita antijen testi sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, *ureA* PCR ile 41 sonucun, real time PCR ile 43 sonucun aynı olduğu görüldü. Bununla birlikte HpSA testi ile *ureA* PCR sonuçları arasındaki uyum %76 olarak saptandı. HpSA testi ile real time PCR sonuçları arasındaki uyum ise %80 olarak hesaplandı.

Queralt ve ark. (100) *ureA* genine özgül primerler kullanarak seminested PCR ve HpSA testi ile *H. pylori* varlığını analiz ettikleri bir çalışmada, iki test arasındaki uyumu %75 olarak saptamışlardır. Bu oran, Wisniewska ve ark. (18), tarafından da benzer şekilde bulunmuştur.

Mide biyopsi örneğinin mikrobiyolojik incelemesinde *H. pylori* pozitif bulunan 14 örneğin tamamı HpSA testinde pozitif, *ureA* PCR ve real time PCR'da birer örnek negatif diğerleri pozitif olarak saptandı. İnvaziv testlerle negatif olarak belirlenen 13 örnekten 7'si HpSA, 6'sı *ureA* PCR ve 7'si real time PCR ile pozitif olarak belirlendi. HpSA testinde pozitif olarak belirlenen bu 7 örnekten 6'sı real time PCR ile örtüşürken, 4'ü hem real time PCR'la hem de *ureA* PCR'la örtüşmektedir.

İnvaziv testlerle negatif olarak belirlendiği halde HpSA, *ureA* PCR ve real time PCR testi ile pozitif olarak bulunan örneklerin yüksek oranda örtüşmesi, midede dağınık yerleşim gösteren *H. pylori*'ye alınan biyopsi örneğinde rastlanamamış olması ihtimalini düşündürmektedir.

HpSA ve gaita PCR'da tedavi sonrası erken dönemde *H. pylori* antijenlerinin ve ölü bakterilerin kalıntılarının atılmasının uzun sürmesi yalancı pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Makristathis ve ark. (74) yaptıkları çalışmada, gaita örneklerinden PCR ve antijen testleriyle *H. pylori* tespitinin tedavi öncesi ve sonrası tanısal doğruluğunu, histoloji ve kültür sonuçlarıyla karşılaştırarak incelenmiştir. Primer tanıda duyarlılık ve özgüllük sırasıyla HpSA testinin %88.9 ve %94.6, gaita PCR'ın ise %93.7 ve %100 olarak bildirilmiştir. Tedaviden 1 ay sonra ise histoloji ve kültür sonuçlarında negatif olarak saptanan 41 hastanın 21'i gaita PCR ile, 13'ü HpSA testi ile pozitif bulunmuştur. Tedavi sonrası duyarlılık ve özgüllük sırasıyla HpSA testinin %85.7 ve %68.3, gaita PCR'ın %92.9 ve %48.8 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, kültür pozitif örneklerden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında HpSA ve PCR testlerinin hiç birinde yalancı negatif sonuç saptanmamıştır. Kültür negatif örneklerde ise belirtilen testlerin pozitif olmaları antibiyotik baskısı nedeniyle üreyememeleri veya tedavi sonrası *H. pylori* atılımının devam etmesi olgusuyla açıklanabilir.

Çalışma hastaları randomize olarak seçilmiştir. Mide biyopsi örneği alındığı dönemde bazı hastaların gaita örneği verememeleri, hastanın aldığı tedavi protokollerine ulaşamama gibi sorunlar nedeniyle uyumsuz sonuçların açıklanabilmesi bu çalışmada mümkün olmamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na *H. pylori* antijen testi için gönderilen 54 gaita örneğinde, farklı primerler ve DNA izolasyon metotları kullanarak, konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemleriyle *H. pylori* varlığı araştırıldı.

Çalışmaya dahil edilen 54 hastanın 27'sinden aynı dönemde alınmış mide biyopsi örneklerinin mikrobiyolojik yöntemlerle (hızlı üreaz testi, mikroskopi, kültür) *H. pylori* açısından incelenmesinde; 14'ü pozitif (en az birinde pozitif) , 13'ü negatif olarak saptanmıştır.

H. pylori gaita antijen testi ile 54 örnekten 43'ü (%79.63) pozitif, 11'i (%20.37) negatif olarak bulundu. Biyopsi örneğinin mikrobiyolojik yöntemlerle *H. pylori* açısından incelemesini standart olarak aldığımızda HpSA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %46.15 olarak bulundu.

ExtractMaster Fecal DNA Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies) ile gaitadan DNA izolasyonunda başarı sağlanamadı. Fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu yöntemiyle başarılı bir şekilde DNA izole edildi. İzolasyon kitlerinin seçiminde daha dikkatli olunması gerektiği düşünülmektedir.

Konvansiyonel PCR'da FastStart Taq DNA polimeraz (Roche), GoTaq DNA polimeraz (Promega) ve Hot Start Taq DNA polimeraz (Fermentas) enzimleri kullanıldı. En iyi çalışan enzim olarak FastStart Taq polimeraz (Roche) belirlendi. Diğer enzimler kültürden izole edilmiş *H. pylori* DNA'sı kullanıldığında çalışmaktayken; gaita izolatlarında kötü performansa sahip oldukları görüldü.

ureA konvansiyonel PCR'da reamplifikasyon yöntemi kullanıldı. İlk amplifikasyonda bakteri saptama alt limiti 10^5 bakteri/ml iken reamplifikasyonda 10^3 bakteri/ml olarak saptandı.

ureA konvansiyonel PCR'da 54 örnekten 42'si (%77.78) pozitif, 12'si (%22.22) negatif olarak bulundu. Biyopsi örneğinin mikrobiyolojik yöntemlerle *H. pylori* açısından incelemesini standart olarak aldığımızda *ureA* PCR testinin duyarlılığı %92.86 özgüllüğü ise %53.85 olarak hesaplandı. Kültür sonucunu standart olarak kabul ettiğimizde ise duyarlılık %100, özgüllük %50 olarak bulundu.

ureC konvansiyonel PCR'da reamplifikasyon yöntemi kullanıldı. İlk amplifikasyonda bakteri yoğunluğu 10^7 , 10^6 , 10^5 bakteri/ml olan pozitif kontrollerden ürün elde edildi. DNA izolasyonu yapılan 54 örnekten ürün elde edilemedi. Reamplifikasyonda ise nonspesifik amplifikasyonlar nedeniyle değerlendirme yapılamadı.

vacA konvansiyonel PCR sonucunda pozitif kontroller dahil örneklerin hiçbirinde ürün elde edilemedi. Master mix kompozisyonu ve termal döngü koşullarında yapılan değişiklikler sonucu etkilemedi.

ureA genine özgül primerler ile universal probe kullanılarak yapılan real time PCR'da 10^7 - 10^2 bakteri/ml olan pozitif kontrollerde amplifikasyon eğrisi belirlendi.

Real time PCR ile 54 örnekten 34'ü (%62.96) pozitif, 20'si (%37.04) negatif olarak bulundu. Biyopsi örneğinin mikrobiyolojik inceleme sonuçlarını standart olarak kabul ettiğimizde real time PCR testinin duyarlılığı %92.86 özgüllüğü ise %46.15 olarak hesaplandı. Kültür sonucunu standart olarak kabul ettiğimizde ise duyarlılık %100, özgüllük ise %43.75 olarak saptandı.

Kültür sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, özgüllük ve duyarlılık açısından *ureA* PCR gaita örneklerinde *H. pylori* tanısını, *H. pylori* antijenlerini saptayan HpSA testine göre daha başarılı bir şekilde yerine getirmektedir. Bu bağlamda HpSA'nın yalancı pozitifliklerine rastlanabileceğini düşünülmektedir.

Çalışmamıza dahil edilen gaita örneklerinin alındığı hastalardan aynı dönemde alınan mide biyopsi örneğinin mikrobiyolojik incelemesi yapılmış örnek sayısı bu çalışmada 27'dir. Bu sayının artırılması durumunda rutin tanıda yaygın olarak kullanılan HpSA testinin yalancı reaksiyonlarının olup olmadığı daha sağlıklı istatistikler yapılarak ortaya konabilecektir.

İnvaziv yöntemlerle *H. pylori* açısından incelenen örnek sayısının az ve hasta bilgilerinin yetersiz olduğu düşünülmektedir. İnvaziv yöntemlerle *H. pylori* negatif olarak belirlenen hastaların gerçek negatif olup olmadıkları, tedavi alıp almadıkları belirlenemediğinde yapılan karşılaştırmanın çok sağlıklı olmadığını düşünmekteyiz. Bu çalışmanın invaziv yöntemlerle tedavi öncesi ve sonrasını içine alacak şekilde değerlendirilmiş hasta popülasyonunda yapılmasının testlerin sağlıklı karşılaştırılması açısından yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Çalışma sonucunda HpSA ile *ureA* PCR sonuçları arasındaki uyum %76, HpSA ile real time PCR sonuçları arasındaki uyum ise %80 olarak bulunmuştur. Çalışma verilerine göre; daha kolay ve ucuz olması nedeniyle gaita örneklerinde *H. pylori* tanısı amacıyla HpSA'nın tercih edilmesi doğru bir yaklaşımdır.

7. ÖZET

Farklı Primerler ve DNA İzolasyon Yöntemleri Kullanarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Dışkı Örneklerinde *Helicobacter pylori* Varlığının Araştırılması ve Sonuçların İmmünokromatografik Yöntemle Karşılaştırılması

H. pylori, kronik gastrite, gastroduodenal ülser, gastrik adenokarsinoma ve lenfomaya neden olabilen karsinojenik bir bakteri olarak değerlendirilmektedir. *Helicobacter pylori* tanısında kesin olarak belirlenmiş altın standart bir test olmayışı nedeniyle günümüzde hala tanı ve tedavi başarısının izlenmesinde endoskopi gerektiren testler referans olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada hastalardan Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na gönderilen ve antijen aranması esasına dayalı bir immünokromatografik yöntemle *H. pylori* açısından incelenen gaita örneklerinde, farklı primerler ve DNA izolasyon metotları kullanarak, konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemleriyle *H. pylori* varlığının araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

DNA izolasyonunda, fekal DNA izolasyon kiti (Epicentre) ve fenol kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyon yöntemi kullanıldı. Fekal DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyonunda başarı sağlanamadı. Fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu yöntemiyle başarılı bir şekilde DNA izole edildi.

vacA, *ureA*, *ureC* gen bölgelerine özgül primerler ile yapılan konvansiyonel PCR çalışmalarında, *ureA* geninin 411 bp uzunluğundaki fragmentini hedef alan HPU1-HPU2 primer çiftinin başarılı olduğu belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen 54 örnekten 43'ü HpSA testi ile, 42'si *ureA* PCR ile, 34'ü real time PCR ile *H. pylori* pozitif olarak belirlendi.

Mide biyopsi örneğinin mikrobiyolojik inceleme sonuçlarını standart olarak kabul ettiğimizde duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla HpSA testinin %100 ve %46.15, *ureA* PCR'in %92.86 ve %53.85, real time PCR'in ise %92.86 ve %46.15 olarak hesaplanmıştır.

HpSA ile *ureA* PCR sonuçları arasındaki uyum %76, HpSA ile real time PCR sonuçları arasındaki uyum ise %80 olarak bulunmuştur.

Çalışma sonucunda, *H. pylori* tanısında noninvaziv yöntem olarak gaita örneklerinde *H. pylori* DNA'sının gösterilmesinin antijen testi kadar tanı değerine sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte avantajları nedeniyle HpSA testinin kullanılmasının daha mantıklı olduğu yargısına varılmıştır.

8. SUMMARY

Investigation of Presence of *Helicobacter pylori* in Fecal Samples, by various primers and DNA Isolation Methods Using Polymerase Chain Reaction Method and Comparison of Results with Immunochromatographic detection Method

Helicobacter pylori is a carcinogenic bacterium which causes chronic gastric, gastroduodenal ulcers, gastric adenocarcinoma and lymphoma in human being. There is no gold standard test available for diagnosis of *H. pylori* therefore tests that require endoscopy for diagnosis and monitoring of treatment success are still being used as a reference.

This study analyzed the presence of *H. pylori* in stool samples sent by Department of Medical Microbiology Laboratories by an immunochromatography method, using various DNA isolation protocols and primers, conventional PCR and real time PCR, finally the results were compared.

Stool DNA isolation kit (Epicentre), phenol-chloroform extraction method and ethanol precipitation method were used to isolate DNA from stool samples.

DNA was isolated successfully by phenol–chloroform extraction and ethanol precipitation methods while fecal DNA isolation kit failed.

Among conventional PCR protocols with specific primers targeted to *vacA*, *ureA*, *ureC* gene regions of *H. pylori*, only 411 bp yield was obtained with HPU1-HPU2 primers on *ureA* gene successfully in samples.

From 54 samples involved in this study, 43 by HpSA, 42 by *ureA* PCR and 34 by real time PCR were determined as *H. pylori* positive.

If we accept the microbiological examination results of gastric biopsy specimen as a standard, then sensitivity and specificity of the methods used are as below: HpSA test 100%, 46%, ure A PCR 92.86%, 53.85% and 92.86%, 46.15% for real time PCR, respectively.

Results agreement between HpSA and *ureA* PCR was 76% while this was 80% between HpSA and real time PCR.

As a result assessing *H. pylori*'s DNA by a noninvasive method in stool samples has as diagnostic value as an antigen test. However, because of the advantages of using the HpSA test, it was suggested to be more logical.

9. KAYNAKLAR

1. Marshall B.J., Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 21:1311–1315, 1984.
2. Warren J.R.: Spiral bacteria of the gastric antrum. *Med J.Aust.*, 141:477–478, 1984.
3. Peterson W.L.: *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *New Engl. J. M.*, 324:1043–1048, 1991.
4. Parsonnet J., Friedman G.D., Vandersteen D.P. et al.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New Engl. J. Med.*, 325:1127–1131, 1991.
5. Peterson W.L.: Review article; *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 16:40–46, 2002
6. Kandulski A., Selgrad M. and Maltfertheiner P: *Helicobacter pylori* infection: A clinical overview. *Digestive and Liver Disease*, 40:619-626, 2008.
7. Yılmaz Y.A.: *Helicobacter pylori*: mikrobiyolojik tanı yöntemleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:182-186, 2004.
8. Gramley W.A., Asghar A., Frierson H.F., Powell S.M.: Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *J. Clin. Microbiol.*, 37:2236–2240, 1999.
9. Vaira D., Holton J., Menegatti M. et al.: Invasive and noninvasive tests for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.*, 14(3):13-22, 2000.
10. Kabir S.: Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter*, 9:115–123, 2004.
11. Laheij R.J., de Boer W.A., Jansen J.B., van Lier H.J., Sneeberger P.M., Verbeek AL.: Diagnostic performance of biopsy-based methods for determination of *Helicobacter pylori* infection without a reference standard. *J. Clin. Epidemiol.*, 53:742–746, 2000.
12. Manes G., Balzano A., Iaquinto G. et al.: Accuracy of stool antigen test in posteradication assessment of *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.*, 46:2440-2444, 2001.
13. Lopez Penas D., Naranjo Rodriguez A., Munoz Molinero J., Rodriguez Lopez F., Galvez Calderon C., Chicano Gallardo M. et al.: Efficacy of the fecal determination of *Helicobacter pylori* by the HpSA test in patients with upper gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterol. Hepatol.*, 24:5-8, 2001.
14. Watanabe T., Tomita S., Kudo M., et al.: Detection of *Helicobacter pylori* gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in feces. *Scand J. Gastroenterol.*, 33:1140–1143, 1998.

15. Monteiro L., Gras N., Megraud F.: Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. J. Clin. Microbiol., 39:3778–3780, 2001.
16. Notarnicola M, Russo F, Cavallini A, et al.: PCR identification of *Helicobacter pylori* DNA in faeces from patients with gastroduodenal pathology. Med. Sci. Res., 24:785–787, 1996.
17. Russo F., Notarnicola M. et al.: Detection of *Helicobacter pylori* *cagA* gene by polymerase chain reaction in faecal samples. Eur J Gastroenterol Hepatol, 11:251–256, 1999.
18. Wisniewska M., Nilsson H.O., Bak-Romaniszyn L, et al. Detection of specific *Helicobacter pylori* DNA and antigens in stool samples in dyspeptic patients and healthy subjects. Microbiol. Immunol., 46: 657–665, 2002.
19. Khuori, R., Frexinos, J.: References des grandes etapes en hepatogastroenterologie. Paris: Editions Louis Pariente, 1995. In: Farthing M.: British Medical Bulletin, London: Royal Society of Medicine Press Limited, 1998
20. Dunn B.E., Cohen H., Blaser M.J.: *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews, 10(4): 720-741, 1997.
21. Kidd M., Modlin I.M.: A century of *Helicobacter pylori*: Paradigms lost paradigms regained. *Digestion*, 59:1-15, 1998.
22. Bizzozzero G.: Sulle ghiandole tubulari del tubo gastroenterico e sui rapporti del loro coll'epitelio di rivestimento della mucosa. Arch Mikr Anat 42:82-86, 1893. In: Farthing, M.:British Medical Bulletin, London: Royal Society of Medicine Press Limited, 1998.
23. Salomon H.: Uber das spirillum des saugetiermagens und sein verhalten zu den belegzellen. Centralbl Bakt (Abt. 1) 19:422-433, 1896. . In: Farthing, M.: British Medical Bulletin, London: Royal Society of Medicine Press Limited, 1998.
24. Steer H.W., Colin-Jones D.G.: Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. Gut. Aug;16(8):590–597, 1975.
25. Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., et al.: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol., 39:397–405, 1989.
26. Owen R.J., Borriella S.P., Murray P.R., Funke G. Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology. 10th ed. Volume 2, London: ASM Press; 2005. pp. 1563-1590
27. Windsor, H.M., O'Rourke.: Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology Clinics of North America, 29(3): 633-649, 2000.

28. Owen R.J., Borriella S.P., Murray P.R., Funke G. Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology. 10th ed. Volume 2, London: ASM Press; 2005. pp. 1563-1590.
29. Goodwin CS, Worsley BW.: Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol. Clin. North Am., 22(1):15-19, 1993.
30. Tompkins, D.H.: Survival and growth of *Campylobacter pylori*. In: *Campylobacter pylori* and gastroduodenal diseases (Rathbone, B.J. and Heatley, R.V., Eds.), Blackwell scientific publications, Oxford. 24-30, 1989.
31. Francis M., Philippe L.: *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2007, 280–322
32. Winn W.C., Allen S.D., Janda W.M., Koneman E.W., Procop G.W., Schreckenberger P.C., Woods G.L.: Curved Gram-Negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: *Campylobacteraceae* and *Vibrionaceae*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 392-428, 2006.
33. Erdem B. *Campylobacter ve Helicobacter*. Mutlu G, Emir T, Cengiz AT, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö (editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Günes Kitabevi, Ankara. 1999: 531-540
34. Atherton, J.C.: The pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastroduodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.*, 1:63-96, 2006.
35. O'Toole P.W., Kostrzynska M., Trust T.J.: Nonmotile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. *Mol. Microbiol.*, 14:691–703, 1994.
36. Go M.F., Crowe S.E.: Virulence and pathogenicity of *H. pylori*. *Gastroenterology Clinics of N. America*, 29: 649–671, 2000.
37. Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T. ve diğerleri. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279 (5349), 373-377.
38. Yu, J., Leung, W.K., Go, M.Y., Chan, M.C., To, K.F., Ng, E.K. ve diğerleri.: Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut*, 51 (4), 480-484, 2002.
39. Köksal F. *Helicobacter pylori*. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 1643-1647
40. Cover, T.L.: The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 20 (2), 241-246, 1996.
41. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M., Jr. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem*, 270:17771–17777, 1995.

42. Letley D.P., Lastovica A, et al: Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *VacA s1a* genotype and natural occurrence of *ans2/m1* allele. J Clin Microbiol, 37: 1203-5, 1999.
43. Atherton J.C.: *H. pylori* virulence factors. Br. Med. Bull., 54(1): 105-120, 1998.
44. Blaser M.J., Atherton J.C.: *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J. Clin Invest 113(3): 321-333, 2004
45. Kadanalı A., Özkurt Z.: *Helicobacter pylori* enfeksiyonu: Epidemiyoloji, patogenez ve ilişkili hastalıkları. Klimik Dergisi, 17(3): 146-50, 2004.
46. Christine P.J., Vogel J.P.: Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules. Trends Microbiol., 8:354-360, 2000.
47. Forman, D.: The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther., 9(suppl2): 71-76,1995.
48. Kikuchi, S., Wada, O., Nakajimi, T.: Serum anti *Helicobacter pylori* antibody and gastric carcinoma among young adults cancer. 75: 2789-2793, 1995.
49. Kadayıfçı A. *Helicobacter pylori* epidemiyolojisi. Sivri B (ed.) Modern tıp seminerleri-5, Peptik Ülser Tedavisinde Yenilikler. Ankara, Öncü Basımevi, 14-20, 1999.
50. Selimoğlu M.A., E.V.v.Ğ.T.: Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children living in eastern Turkey. Pediatrics International, 44, 666-669, 2002.
51. Özden, A., Bozdayi, G., Özkan, M., Kose, K.S.: Changes in the seroepidemiological pattern of *Helicobacter pylori* infection over the last 10 years. Turk J Gastroenterol, 15 (3), 156-158, 2004.
52. Ertem, D., Harmanci, H., Pehlivanoglu E.: *Helicobacter pylori* infection in Turkish preschool and school children: role of socioeconomic factors and breast feeding. Turk J. Pediatr., 45 (2), 114-122, 2003.
53. Altındış, M., Özdemir, M.: *Helicobacter pylori* ve tanısı. Kocatepe Tıp Dergisi, 2: 1-12, 2003.
54. Vaira D., Holton J., Ricci C., Menegatti M., Gatta L., Berardi S. ve ark.: Review article: the transmission of *Helicobacter pylori* from stomach to stomach. Aliment Pharmacol Ther., 15(Supplemet 1):33-42, 2001.
55. Queralt, N., Araujo, R.: Analysis of the survival of *H. pylori* within a laboratory-based aquatic model system using molecular and classical techniques., Microb. Ecol., 54(4),771-777, 2007.
56. Katoh M., Saito D., Noda T., Yoshida S., Oguro Y., Yazaki Y. ve ark.: *Helicobacter pylori* may be transmitted through gastrofiberscope even after manual hyamine washing. Jpn. J. Cancer Res., 84: 117-119, 1993

57. Vaira D., Gatta L., Ricci C., Miglioli M.R.: Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.*, 16 (Suppl. 1): 16-23, 2002.
58. Stabile E.B., Smith B.R., Weeks D.L.: *Helicobacter pylori* infection and surgical disease-Part 1. *Curr. Probl. Surg.*, 42: 756-789, 2005.
59. Ekstrom, A.M., M. Held, L.E. Hansson, L. Engstrand, and O. Nyren: *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*, 121, 784-791, 2001.
60. Vaira D., Holton J., Menegatti M., Ricci C., Landi F.: New Immunological assays for the diagnosis of *H. pylori* infection. *Gut*, 45(1): 123-127, 1999.
61. Gatta, L., Ricci, C., Tampieri, A., Vaira, D.: Non-invasive techniques for the diagnosis of *H. pylori* infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: 489-96, 2003.
62. Gisbert J.P., Pajares J.M.: Review article: ¹³C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection- a critical review. *Aliment Pharmacol Ther.* 20: 1001-1017, 2004.
63. Leodolter A., Wolle K., Malfertheiner P.: Current Standards in the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Digestive Diseases*, 19(2):116-122, 2001.
64. Gisbert J.P., Pajares J.M.: Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A systematic review. *Helicobacter*, 9(4): 347-368, 2004.
65. Chisholm S.A., Watson C.L., Teare E.L., Saverymuttu S., Owen R.J.: Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in South-east England: a comparative evaluation of two commercial kits, HpSA and HpStAR, for stool antigen detection. *Gut* 2002; 51 (Suppl. II): A107.
66. Paimela H.M., Oksala N.K., Kaariainen I.P., Carlson P.J., Kostiala A.A., Sipponen P.I.: Faecal antigen tests in the confirmation of the effect of *Helicobacter* eradication therapy. *Ann Med.* 38(5):352-6, 2006.
67. Taylor NS, Esteves M, Fox JG. Cross reactivity with *Helicobacter* species assayed with a *Helicobacter pylori* antigen capture assay. *Gastroenterology*, 116: A830, 1999.
68. Kabir S.: Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J. Med. Microbiol.* 50:1021-1029, 2001.
69. Vaira D., Malfertheiner P., Mégraud F., Axon A.T., Deltenre M., Gasbarrini G., et al: Noninvasive antigen-based assay for assessing *Helicobacter pylori* eradication: European multicenter study. *Am. J. Gastroenterol.*: 95:925-929, 2000.
70. Makristathis A., Barousch W., Pasching E., et al. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. *J. Clin. Microbiol.*; 38:3710-3714, 2000.

71. Costa F., Mumolo M.G., Bellini M., Romano M.R., Manghetti M., Paci A., et al: Post-treatment diagnostic accuracy of a new enzyme immunoassay to detect *Helicobacter pylori* in stools. *Aliment Pharmacol. Ther.*;15:395– 401, 2001.
72. Monteiro L., Gras N., Vidal R., Cabrita J., Megraud F.: Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods*. 45: 89–94, 2001.
73. Cavallini A., Notarnicola M., Berloco P., et al.: Use of macroporouspolypropylene filter to allow identification of bacteria by PCR in human fecal samples. *J. Microbiol. Methods*, 39:265-70, 2000.
74. Makristathis A., Pasching E., Schutze K., Wimmer M., Rotter M.L., Hirschl A.M.: Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*: 36:2772–2774, 1998.
75. Enroth H., Engstrand L.: Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*: 33:2162-2165, 1995.
76. Parsonnet J., Shmueli H., Haggerty T.: Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *J. Am. Med. Assoc.*, 282:2240–2245, 1999.
77. Demeke T., Adams R.P.: The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*, 12:332–334, 1992.
78. Mapstone N.P., Lynch DAF, Lewis F.A., et al.: PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet*, 341:447, 1993.
79. Li C., Ha T., Ferguson D.A., et al.: A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig. Dis. Sci.*, 41:2142–2149, 1996.
80. Fang G., Hammar S., Grumet R.: A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*;13:52–54, 1992.
81. Lim C.Y., Lee K.H.: Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric Mucosa of Patients with Gastroduodenal Diseases by PCR-Restriction Analysis Using the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7) 3387-3391, 2003
82. Yamazaki S., Yamakawa A., Okuda T., Ohtani M. et al.: Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43(8):3906–3916, 2005.
83. Lu J.J., Perng C.L., Shyu R.Y., Chen C.H. et al.: Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3):772–774, 1999.
84. Monteiro, L., C. Birac, and F. Megraud. 1996. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies by polymerase chain reaction, p. 112–120. *In* A. Lee and F. Megraud (ed.),

Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic research. W. B. Saunders Ltd., London, England

85. Clayton, C.L., H. Kleanthous, P.J. Coates, D.D. Morgan, and S. Tabaqchali.: Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:192–200, 1992.

86. Bickley J., Owen R.J., Fraser A.G., Pounder R.E.: Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the *urease C gene* of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol.*; 39:338–344, 1993.

87. Sicinschi L.A., Correa P., Bravo L.E., Schneider B.G.: Detection and typing of *Helicobacter pylori cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J. Microbiol. Meth.*; 52:197–207, 2003.

88. <https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCCConfigureUser?URL=StoreFramesetView&storeId=10151&catalogId=10151&langId=-1&countryId=tr>

89. Kaklıkkaya N., Akdoğan R.A., Özgür O., Uzun D.Y., Çobanoğlu U., Dinç U., Güngör E., Dabanca P.A., Arslan M., Aydın F., Ertürk M.: Evaluation of a new rapid lateral flow chromatography test for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Saudi Med J* 27:799–803, 2006.

90. Blanco, S., M. Forne, A. Lacoma, C. Prat, M.A. Cuesta, I. Latorre, J.M. Viver, G. Fernandez, S. Molinos, and J. Dominguez: Comparison of stool antigen immunoassay methods for detecting *Helicobacter pylori* infection before and after eradication treatment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61:150–155, 2008.

91. Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K.G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, and F. Megraud.: Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.*, 35:995–998, 1997.

92. Zambon, C.F., D. Basso, F. Navaglia, S. Mazza, M. Razetti, P. Fogar, E. Greco, N. Gallo, F. Farinati, M. Rugge, and M. Plebani.: Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: simplified C-13-urea breath test, stool antigen testing, or DNA PCR in human feces in a clinical laboratory setting? *Clin. Biochem.* 37:261–267, 2004.

93. Stephen H. Stauffer, Adam J. Birkenheuer, Michael G. Levy, Henry Marr, Jody L. Gookin.: Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20: 639–641, 2008.

94. Adriana Vince, Mario Poljak and Katja Seme. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. *British Journal of Haematology*, 1998, 101, 349-351

95. Cone, R.W., Huang, M.W., Ashley, R., Corey L.: Human Herpesvirus 6 DNA in Peripheral Blood Cells And Saliva From Immunocompetent Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1262-1267, 1993

96. Argyros, F. C., Ghosh, M., Huang, L., Masubuchi, N., Cave, D. R., Grubel, P.: Evaluation of a PCR Primer Based on the Isocitrate Dehydrogenase Gene for Detection of *Helicobacter pylori* in Feces. J. Clin. Microbiol. 38: 3755-3758, 2000.
97. Al-Soud, W.A. and Radstrom, P.: Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3748–3753, 1998.
98. Nazime Şen, Özlem Yılmaz, İlkay Şimşek, Ahmet Ali Küpelioglu and Hülya Ellidokuz. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a Simple Stool PCR method in Adult Dyspeptic Patients. *Helicobacter*, 2005, Volume 10, Number 4.
99. Muhammet Hamidullah Uyanık, Osman Aktaş, Ahmet Özbek, Ömer Yılmaz, Ahmet Ayyıldız *Helicobacter pylori* tanısında çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection); 22 (4): 197-202, 2008.
100. Queralt N., Bartolome R., Araujo R.: Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. J. Appl. Microbiol. 98: 889-895, 2004.