

HELICOBACTER PYLORI'DE ANTİBİYOTİK DİRENCİ VE DİRENCİN SAPTANMASINDA KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *HELICOBACTER PYLORI* AND MOLECULAR METHODS FOR THE DETECTION OF RESISTANCE

Ebru DEMİRAY*, Özlem YILMAZ*

ÖZET: *Helicobacter pylori* peptik ülser, gastrik kanser ve gastrik lenfoma etiolojisinde önemli yeri olan, sınıf I karsinojen olarak tanımlanmış, kronik enfeksiyon etkeni olan bir bakteridir. *H.pylori* enfeksiyonu tanısında invazif ve invazif olmayan testler kullanılmaktadır. Günümüzde klaritromisine dirençli *H.pylori* suşları artmakta ve eradikasyon tedavisinin başarısını azaltmaktadır. Kültür dışı tanı yöntemlerinden biri olan floresan in situ hibridizasyon (FISH) metodu, *H.pylori* varlığını ve klaritromisin direncini eş zamanlı olarak saptayan bir yöntemdir. Bu derleme yazıda, *H.pylori* 'de antibiyotik direncinin prevalansı ve klinik etkisi, direncin moleküler mekanizmaları ve direnç saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler, FISH metodu ön planda tutularak tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, klaritromisin direnci, floresan in situ hibridizasyon (FISH).

ABSTRACT: *Helicobacter pylori* which is the major agent causing peptic ulcer, gastric cancer and gastric lymphoma, is identified as a class I carcinogen. Invasive and non-invasive tests have been used in the diagnosis of *H.pylori* infection. Clarithromycin resistance in *H.pylori* strains is increasing nowadays, thus leading to failures in eradication therapy. Fluorescence in situ hybridization (FISH) method which can simultaneously detect the presence of *H.pylori* and clarithromycin resistance is a non-culture dependent molecular technique. In this review article the prevalence and clinical outcome of antibiotic resistance in *H.pylori*, molecular mechanisms of the resistance and molecular methods to detect the resistance, with priority of FISH technique have been discussed.

Key words: *Helicobacter pylori*, clarithromycin resistance, fluorescence in situ hybridization (FISH).

G İ R İ Ő

Helicobacter pylori hareketli, spiral yapıda mikroaerofilik Gram negatif bir bakteridir¹⁻⁶. Gastrit, gastrik ve duodenal ülserler, gastrik adenokarsinoma ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomasında major patojen olarak bildirilen

* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

H.pylori'nin, fonksiyonel dispepsideki rolü ise tartışmalıdır^{7,8}. *H.pylori*'ye bağlı gastroduodenal hastalıklar göz önüne alındığında bakterinin halk sağlığı açısından önemli bir rolü bulunmaktadır⁸. Bakteri gastrik mukozada kolonize olur ve gastrik epitel hücreleri hedef alır⁹. Gelişmekte olan ülkelerde *H.pylori* enfeksiyonunun prevalansı %70-90, gelişmiş ülkelerde ise %25-50'dir^{5,10}. İnsandan insana bulaşın primer yol olduğu düşünülmekte olup, fekal-oral ve oral-oral geçiş yolları bildirilmektedir¹¹. Midenin kronik *H.pylori* enfeksiyonu, gastroduodenal hastalıkların gelişiminde temel bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. *H.pylori*, "International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından Sınıf I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır¹².

H.pylori'nin mide mukozasına kolonizasyonunda; hareket özelliği, üreaz üretimi, yüzey lektinlerinin ekspresyonu gibi hücresele faktörler rol oynar⁹. *H.pylori* enfeksiyonunun tanısında invazif (kültür, histopatolojik inceleme, hızlı üreaz testi, biyopsi örneğinde polimeraz zincir reaksiyonu gibi endoskopi gerektiren biyopsi temelli yöntemler) ve invazif olmayan (idrara, tükürük, vb klinik örneklerin incelenmesi, seroloji, ¹³C üre nefes testi, dışkı örneğinde antijen testleri ve polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemler kullanılabilir^{2,5,13}. Histoloji ve kültür, *H.pylori* enfeksiyonunun saptanmasında kolay ve pratik olmamasına rağmen duyarlılık ve özgüllük açısından altın standart kabul edilen yöntemlerdir^{1,2}.

H.pylori enfeksiyonunun eradikasyonunda klaritromisin ve amoksisilin ya da metranidazol ile proton pompa inhibitörü (PPI) temelli yedi ve 14 günlük üçlü tedavi protokolü uygulanmaktadır^{3,6,14}. Klaritromisin, *H.pylori* eradikasyonu için önerilen birçok tedavi protokolleri içinde önemli bir role sahiptir¹⁵. Ancak günümüzde klaritromisine dirençli suşlar artmakta ve eradikasyon tedavisinin başarısını azaltmaktadır⁶. Klaritromisin direnci Amerika'da %5-14 ve Avrupa'da %10'un üzerindeki oranlarda bildirilirken^{6,16}, ülkemizde bu oran %17-56 arasında rapor edilmektedir¹⁷⁻¹⁹.

Zor üreyen bir bakteri olması nedeniyle *H.pylori*'nin kültürü ve antibiyogram uygulamalarındaki teknik zorluklar, direncin belirlenmesinde kolay uygulanabilir ve ucuz yöntemlerin gerekli olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, tedavi öncesi direnç varlığının saptanmasının önemi vurgulanmaktadır^{13,20}.

H. pylori'nin klinik izolatlarında, klaritromisin direncinin 23S rRNA'da baskın üç ayrı nokta mutasyonu ile gerçekleştiği bildirilmektedir^{3,14,21}. Adenin rezidüsünün 2143 ve 2144 pozisyonlarında guaninle (A2143G ve A2144G) ya da 2143 pozisyonunda sitozinle (A2143C) yer değiştirdiği üç mutasyon 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesinde lokalizedir^{3,13,21,22}. Gastrik biyopsi örneklerinde *H.pylori* rRNA'sının ve klaritromisin direncinin floresan in situ hibridizasyon (FISH) metodu ile belirlenmesi; kültürden bağımsız, güvenilir, duyarlı, pratik ve özgül bir yöntem olarak bildirilmektedir^{3,6,21}. FISH ile, gastrik dokuda *H.pylori*'nin tanımlanması ve eş zamanlı olarak rRNA hedefli floresanla işaretlenmiş oligonükleotid problemleri ile klaritromisin direnç genotipinin saptanması mümkündür^{4,21}.

ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ

H.pylori'de antibiyotik direnci tedavi başarısızlığının temel nedenidir. Bu nedenle bakterinin antibiyotik direnç durumunun bilinmesi gereklidir. *H.pylori*'nin antibiyotik duyarlılığı genellikle E-test, agar dilüsyon ve disk difüzyon gibi kültür temelli

metotlar ile araştırılmaktadır. Antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonunu (MİK) saptayan bu testler zaman alıcıdır ve sonuçlar değişkenlik gösterir. Hücre geçirgenliği, inokülasyon miktarı, inkübasyon şartları ve üreme ortamı gibi faktörler sonucu etkileyebilir. Moleküler temelli metotlar bu faktörlerden bağımsızdır ve alternatif yöntemlerdir. Bu testler tekrarlanabilir sonuçlar verir ve kolaylıkla standardize edilir. Ayrıca kültür temelli testlerden daha hızlıdır ve gastrik biyopsi örneklerine direk olarak uygulandığı zaman, sonuç endoskopinin yapıldığı gün elde edilebilir²³.

Antimikrobiyal Direncin Prevalansı

H.pylori'de antibiyotik direncinin prevalansı değişkendir. Az sayıda suşların çalışıldığı tek merkezli çalışmalarda, hastaların seçimi sınırlı kalmakta ve kullanılan yöntemlerin farklı olmasından kaynaklanan farklı oranlar elde edilebilmektedir. Dolayısıyla *H.pylori*'nin antibiyotik direnç oranları standart metotların kullanıldığı çok merkezli tarama programlarından sağlanmalıdır. Sürveyans programları pahalıdır ve yalnızca uygulanan bölgelerde değil, daha sıklıkla araştırmacıların olduğu birkaç ülkede yapılmıştır²³.

H. pylori'de antibiyotik direnci oldukça yaygındır ve direnç oranları giderek artmaktadır. Metranidazol direnci (MİK \geq 8mg/L) *H.pylori*'de görülen en yaygın antimikrobiyal dirençtir. Gelişmekte olan ülkelerde metranidazol direnç oranı yüksek olmasına karşın, endüstrileşmiş ülkelerde bu oran yaklaşık %35 olarak verilmektedir. *H.pylori* suşlarında yüksek metranidazol direnç oranları, jinekolojik, dental ve paraziter hastalıklarda nitroimidazol ve metranidazolün yaygın olarak kullanıldığı bölgelerde daha sık saptanmaktadır²³.

Metranidazol direnci ile karşılaştırıldığında, klaritromisin direncinin prevalansı (MİK \geq 2 mg/L) oldukça düşüktür. Endüstrileşmiş ülkelerde, *H.pylori* suşlarının yaklaşık %10'u klaritromisin dirençlidir^{6,10}. Gelişmekte olan ülkelerde, klaritromisine karşı direnç oranı daha yüksektir ve %25-50 arasında değişmektedir²³. Ülkemizde yapılan bir çalışmada %16.8 olarak verilen oran, diğer çalışmalarda ise %52-56 olarak bildirilmektedir¹⁷⁻¹⁹.

H.pylori'de amoksisilin direnci (MİK \geq 0.5 mg/L) ve tetrasiklin direncinin (MİK \geq 4 mg/L) 20. yüzyılın sonlarına kadar olmadığı ya da çok ender olduğu bildirilmiştir. *H.pylori*'de amoksisilin ve tetrasiklin direnç insidansının, özellikle bu antibiyotiklerin reçetesiz elde edilebildiği belli coğrafik bölgelerde arttığı görülmektedir. Çin'de *H.pylori* amoksisilin ve tetrasiklin direnç oranı %72 ve %59 olarak bildirilmiştir²³.

Antimikrobiyal Direncin Klinik Etkisi

Birçok çalışma, antimikrobiyal direncin *H.pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde başarısızlığa neden olduğunu göstermektedir. *H.pylori* ilişkili hastalıklarda antibiyotik direnci ile klinik ilişki araştırılmaktadır. *H.pylori* eradikasyonunu azaltan antibiyotik direnci; suşların direnç düzeyi, tedavinin süresi, antimikrobiyal ilaçların dozu ve tedavide kullanılan bileşenler gibi birçok faktörden etkilenmektedir.

Metranidazol içeren PPI temelli üçlü tedavi ile elde edilen eradikasyon oranı dirençli suşlar için %63, duyarlı suşlar için %91 olarak belirtilmiştir. PPI temelli bir tedaviye bizmut bileşeninin eklenmesiyle, tedavinin etkinliği metranidazole

dirençli suşlar için %77, duyarlı suşlar için %91'den yüksek oranlara ulaşmaktadır. Metranidazol direncine karşı ranitidin bizmut sülfat bazlı üçlü tedavi çalışmalarının sınırlı olmasına rağmen, eradikasyon oranları dörtlü tedavide dirençli suşlar için %76, metranidazol duyarlı suşlar için %99'dur²³.

Klaritromisin içeren ikili tedavinin (PPI ya da bizmut bileşeni) eradikasyon oranına bakıldığında; klaritromisine dirençli suşlar için %28, duyarlı suşlar için %67'den %40'a azaldığı bildirilmektedir. Klaritromisin içeren üçlü tedavide ise (PPI ve amoksisilin ya da metranidazol) eradikasyon oranı, klaritromisine duyarlı suşlar için artmasına (%90) karşın, dirençli suşlar için azalmaktadır (%36). Tedavi başarısızlığının amoksisilin ve tetrasiklin dirençli *H.pylori* suşlarının varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir, ancak tedavi başarısında bu dirençlerin etkisinin saptanmasında henüz yeterli bir veri yoktur²³.

Antimikrobiyal İlaçlara Direncin Moleküler Mekanizması

H. pylori'de antibiyotik direncinin moleküler mekanizmaları tanımlanmış olup, çoğu kromozomda lokalize olan nokta mutasyonlarına bağlıdır (Tablo I). Bu durum, diğer bakterilerde plazmidler, transpozonlar ve integronlarda lokalize olan antibiyotik direnç mekanizmalarından farklıdır. *H.pylori*'de antibiyotik direncinin temeli muhtemelen "de novo" (doğal, yapısal) olmasına rağmen, dirençli ve duyarlı suşlar arasında in vivo horizontal gen transferi olduğu belirtilmiştir²³.

Tablo I: *H.pylori* Enfeksiyonlarında Kullanılan Antimikrobiyallerin Etki ve Direnç Mekanizmaları ile Prevalansları

Antimikrobiyal	Etki Mekanizması	Direnç Mekanizması	Direnç Prevalansı
Metranidazol	DNA hasarı	<i>rdxA</i> ve <i>frxA</i> genlerinde mutasyon	%20-95
Klaritromisin	Protein sentezinin inhibisyonu	23S rRNA'da nokta mutasyonları	%5-30
Amoksisilin	Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu	PBP-D (tolerans) ya da PBP1A (direnç) da afinitenin azalması, membran geçirgenliğinin azalması (direnç)	%1-2
Tetrasiklin	Protein sentezinin inhibisyonu	<i>rrnA</i> ve <i>rrnB</i> , 16S rRNA geninde nokta mutasyonları	≤ %1
Florokinolonlar	DNA replikasyonunun inhibisyonu	<i>gyrA</i> geninde nokta mutasyonları	< %1
Rifamisinler	Transkripsiyonun inhibisyonu	<i>rpoB</i> geninde nokta mutasyonları	< %1
Nitrofuraneler	DNA hasarı	Bilinmiyor	< %0.1
Bizmut	Protein, ATP ve hücre membran sentezinin inhibisyonu	Bilinmiyor	?

Antimikrobiyal İlaçlara Direncin Saptanmasında Moleküler Yöntemler

H.pylori'de çoğu direnç özgül mutasyonlara bağlı olup, moleküler temelli metotlar geleneksel kültür temelli yöntemlere alternatif olarak kullanılmaktadır. Moleküler temelli metotlar, bakterilerin üreme ya da hücre canlılığına bağlı değildir ve böylece kültür temelli yöntemlere göre daha güvenilir, hızlı ve tekrarlanabilir yöntemlerdir. Ayrıca, gastrik biyopsi örneklerine direk uygulanabilir ve böylece sonuçlar endoskopinin yapıldığı gün elde edilebilir. DNA dizi analizi, mutasyonel değişikliklerin saptanması için altın standart olmasına rağmen rutin kullanım için oldukça pahalıdır. Birçok moleküler temelli metot ile *H.pylori*'de klaritromisin, tetrasiklin ve siprofloksasin direncinin değerlendirilebilmesi mümkün iken, metranidazol ve amoksisilin direncinin değerlendirilmesi tam değildir (Tablo II)²³.

Tablo II: *H.pylori*'de Antimikrobiyal İlaçlara Direncin Saptanmasında Moleküler Metotlar

Antibiyotik	Moleküler Metot
Metranidazol	İmmunoblot
Klaritromisin	PCR-RFLP PCR-OLA PCR-DEIA PCR-LiPA PCR-PHFA 3M-PCR Real-time PCR hibridizasyon FISH
Tetrasiklin	PCR-RFLP Real-time PCR hibridizasyon
Siprofloksasin	Real-time PCR hibridizasyon

PCR: Polymerase chain reaction, RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, OLA: Oligonucleotide Ligation Assay, DEIA: DNA Enzyme Immunoassay, LiPA: Line Probe Assay, PHFA: Preferential Homoduplex Formation Assay, 3M-PCR: 3'-Mismatched Reverse Primer PCR, FISH: Fluorescence In Situ Hybridization.

KLARITROMİSİN

Etki ve Direnç Mekanizması

Klaritromisin, 23S rRNA molekülü V kangalının peptidil transferaz bölgesine bağlanan makrolid grubuna ait bakteriostatik bir antibiyotiktir. Bu bağlanma, protein elongasyonunu engeller ve böylece bakteriyel protein sentezi durur. Klaritromisinin antibakteriyel aktivitesi diğer makrolidlerle benzerdir, ancak klaritromisin asidik gastrik mukus tabakasında daha iyi absorbe olur ve bu nedenle *H.pylori*'ye karşı daha etkilidir.

H. pylori'de klaritromisin direnci çok yakın iki 23S rRNA nükleotidinde (2142 ve 2143) nokta mutasyonu ile oluşur. 2142. pozisyonda bir adeninin sitozin ile yer değiştirmesi ya da 2142. ve 2143. pozisyonlarından birinde adeninin guanin ile

yer değiştirmesi söz konusudur. Bu mutasyonlar birçok makrolid için ribozomların afinitesinin azalmasına neden olur ve direncin artışıyla sonuçlanır. A2143G (alt çizgi, baz çifti değişikliğini göstermektedir) yer değişikliği, MİK değeri düşük (<64 mg/L) izolatlarda sık bulunurken, A2142G ve A2142C özellikle MİK değeri yüksek (>64 mg/L) izolatlarda görülmektedir. Aynı zamanda diğer 23S rRNA mutasyonları da gösterilmiştir; diğerleri düşük düzey dirençle ilişkiliyken, bunlardan bazıları yüksek düzey dirençle ilişkilidir²³. Bu mutasyonlarda, klaritromisin direnci 23S rRNA'da baskın üç ayrı nokta mutasyonu aracılığı ile gerçekleşir^{3,14,21}. Adenin rezidüsünün 2143. ve 2144. pozisyonlarında guaninle (A2143G ve A2144G) ya da 2143. pozisyonunda sitozinle (A2143C) yer değiştirdiği, üç nokta mutasyon 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesinde lokalizedir^{3,13,21,22}.

Klaritromisin dirençli *H.pylori* klinik izolatları arasında 2142. ve 2143. pozisyonunda G'ye karşı A'nın görünen yüksek prevalansının tanımlanması için, 2142 ya da 2143 pozisyonunda ya bir G ve C ya da T yer değişimini içeren bölgeye yönelik mutantlar geliştirilmiştir. Benzer bir izogenik zemin de, süregen direnç, yüksek MİK ve yüksek üreme oranlarından meydana gelen G'ye karşı A yer değişimi için gösterilmiştir^{3,13,23}.

H.pylori iki 23S rRNA geni içerir ve mutasyonlar genellikle her iki kopyada da bulunur. Heterojenite, klaritromisin direnci ile sonuçlanmasına rağmen, genellikle homojenik izolatlarda bulunandan daha düşük direnç seviyesiyle ilişkili görülmektedir. *H.pylori*'de heterojenitenin üzerinde homojenitenin daha yüksek prevalansı, bu organizmada DNA rekombinasyonunun varlığını yansıtabilir. 23S rRNA'nın bir kopyasında mutasyon, yüksek klaritromisin direncinin homolog DNA rekombinasyonu ile diğer 23S rRNA genine kolayca transfer olabildiği gösterilmiştir^{13,21-23}.

Beklendiđi gibi, klaritromisin direnci diğer makrolidlere karşı dirençle uyudur. A2143G mutasyonu streptogramin ve klindamisine orta düzey direnç ve eritromisine yüksek düzey direnç artışı gösterirken, A2142G ve A2142C mutasyonları bütün makrolidlere yüksek düzey çapraz direnç verdiği bildirilmiştir (23).

Klaritromisin Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması

H.pylori'de klaritromisin direncinin saptanması için birçok teknik geliştirilmiştir. Amplikonların çalışılmasında kullanılan farklı metotlar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli yöntemlerdir. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) amplikon içinde restriksiyon bölgesinin bulunmasını temel alan basit bir metottur. Bu test *BceA1* (A2142C), *BsaI* (A2143G), *BbsI* (A2142G) ve *MboI* (A2142G) restriksiyon endonükleazlarını kullanarak, önceden tanımlanan 23S rRNA mutasyonlarının saptanmasına olanak tanır. PCR-RFLP başlangıçta A2142C mutasyonunu saptayamazken, 3' uygunsuz ters primer PCR (3-mismatched reverse primer PCR; 3M-PCR) metodu geliştirilmiştir.

PCR-Line Prob (LiPA) testi, ayrıcalıklı homodubleks formasyonu (PCR-preferential homoduplex formation assay; PHFA), PCR oligonükleotid ligasyon testi (OLA) ve PCR-DNA enzim immün testi (DEIA) gibi diğer metotlar ise PCR'dan

sonra ek bir hibridizasyon basamağı içerirler. PCR ürünleri oldukça zorlu şartlar altında işaretlenmiş oligonükleotit problemleriyle hibridize edilir ve hibridler sonradan streptavidin-alkalen fosfataz ya da özgül antikorlarla saptanır.

Son zamanlarda, bir çok gerçek zamanlı (real-time) PCR hibridizasyon testleri geliştirilmiştir. Bu testlerde floresanla işaretlenmiş mutasyonlu ya da sıkıca bağlanan probun varlığında bir 23S rDNA fragmenti amplifiye edilir. Bu problemler PCR ürünleriyle hibridize olduğu zaman, bir floresan sinyal oluşur. PCR tamamlandıktan sonra ısı, mutasyon probunun erime noktasını saptamak için artırılır. Floresan sinyalin oluşturduğu ısı, mutasyon probunun ayrıldığı noktada sinyal verir (erime noktası). Hedef sekansta uyumsuzluk olduğunda, daha düşük erime sıcaklığı hibrid birleşimi karşılaştırılarak elde edilir. Bu teknik basit ve hızlıdır. Direk gastrik dokuya uygulandığında sonuçlar üç saat içerisinde elde edilebilir²³.

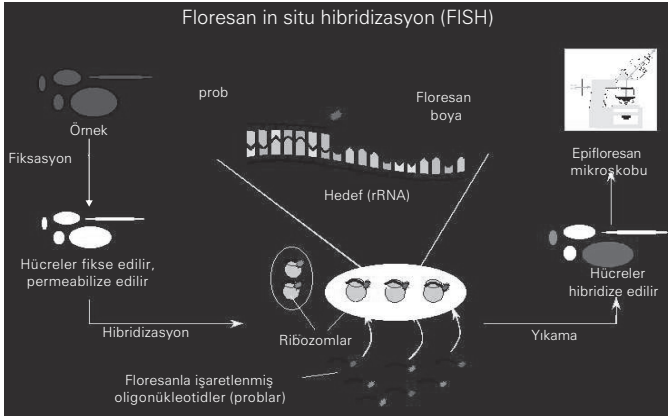
Klaritromisin direncinin saptanması PCR dışında floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile de mümkündür. Bu testte *H.pylori*, floresanla işaretlenmiş özgül 16S ve 23S rRNA ile hibridize edilir. İşaretlenmiş bakteriler floresan mikroskopunda incelenir. Bu test eş zamanlı olarak *H.pylori*'nin varlığının gösterilmesine ve klaritromisin direncinin saptanmasına olanak sağlamaktadır. DNA preparasyonuna gerek yoktur ve direk olarak gastrik biyopsi örneklerine uygulanabilir^{3,4,23}.

FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ (FISH)

İn situ hibridizasyon, nükleik asit dizilerinin (DNA ve RNA) morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak gösterilmesini sağlayan ve temel olarak çift iplikli nükleik asit oluşumu kinetiğini kullanan özgün bir yöntemdir. FISH yönteminin hibridizasyon yöntemlerinden (Southern veya Northern blot) farkı, nükleik asitlerin kendi hücresel ortamlarında tanınarak gösterilmesidir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin hücredeki yeri belirlenmiş olur²⁴.

Son yıllarda nükleik asitleri işaretlemek için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Biotin, dioksijenin, dinitrofenil veya florokromlarla enzimatik olarak işaretleme genellikle tercih edilmektedir. Rekombinant DNA preparasyonları ile saf prob elde edilebilmektedir. Prob seçimine bağlı olarak, belirli genom ve kromozomlar, tekrarlayan DNA dizileri, tek kopyalı diziler, mRNA ve viral diziler gibi farklı hedefler saptanabilmektedir²⁴.

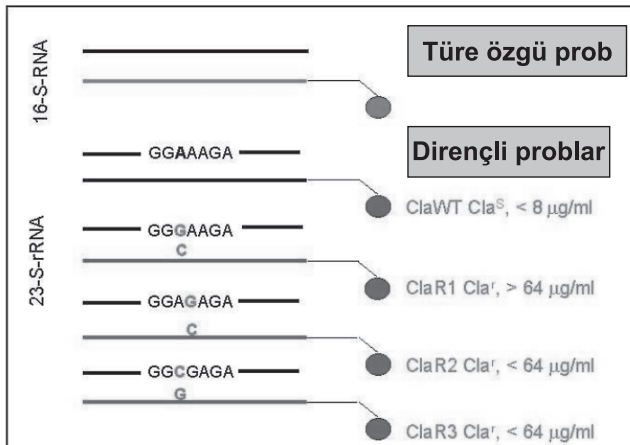
FISH yönteminde, hedef nükleik asit moleküllerinin saptanması için haptan işaretli proba bağlanan florokrom konjuge antikorlar ya da proba kovalent bağlı farklı renkte emisyon veren florokrom molekülleri kullanılır. Bu teknik, özellikle kromozomal anomalilerin tanımlanması için ve gen haritalaması için uygundur. FISH, inceleme ve boyama için araştırmacının istediği DNA dizilerine komplementer olan prob olarak adlandırılan tek iplikli DNA'nın kısa dizilerinin hazırlanmasını kapsar. Bu problemler hibridize olur ya da komplementer DNA'ya bağlanır ve onlar floresan işaretlendiğinden DNA'nın bu dizilerinin yerinin görülmesini sağlar. Prob sinyali bir floresan mikroskopunda incelenir ve klinik örnekteki DNA sinyalinin varlığı ya da yokluğu ile değerlendirilir (Şekil 1). Diğer tekniklerden farklı olarak, aktif olarak bölünebilen hücrelerdeki kromozomlarla çalışılabilmekte, aynı zamanda bölünmeyen hücrelerde de uygulanabilmektedir²⁵⁻²⁷.



Şekil 1: FISH metodu.

Bakteriyel FISH teknolojisi, bir bakteri türünün ribozomal RNA'sının çoklu kopyaları ile oligonükleotidlerinin tanımlanmasının özgül DNA-DNA hibridizasyonuna bağlıdır (16S rRNA, 23S rRNA). Floresan boyalarla işaretli oligonükleotidler, bakteri hücrelerine penetre olur ve hedef diziye bağlanır. Bu teknik ile bakteri, hayvan modellerinde ya da enfekte insanların gastrik mukoza örnekleri gibi doğal habitatlarda floresan mikroskopu kullanılarak saptanabilmektedir²⁸⁻³⁰.

H. pylori için türe özgül saptama, yeşille işaretli 16S rRNA oligonükleotidi Hpy-1 ile yapılmaktadır. Eş zamanlı olarak tür için genotipik antibiyotik direncin saptanması mümkündür (kırmızı ile işaretleme sonucu). Yöntemde, *H. pylori*'de klaritromisin direncinin ortaya çıkmasına yol açan 23S rRNA'daki üç nokta mutasyonu, ClaWT ve Cla1, Cla2, Cla3 probları ile özgül olarak hedeflenmektedir (Şekil 2). Farklı mutasyonlar, antibiyotiklerin farklı MİK değerleri ile (ClaR1 >64 µg/ml, ClaR2 ve ClaR3: 8-64 µg/ml) uyumludur²⁹.



Şekil 2: *H. pylori*'ye özgül oligonükleotid probları.²⁹

S O N U Ç

H.pylori enfeksiyonunun klinik öneminin ve tedavideki başarısızlığın artması, tanı ve direnç tespitinde yeni yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. *H.pylori* enfeksiyonunun laboratuvar tanısında altın standart bakterinin izolasyonudur. Ancak ¹³C üre nefes testi, hızlı üreaz (CLO) testi ve histopatolojik inceleme de tanıda büyük önem taşımaktadır²⁰. Gastrik biyopsi örneklerinden patojenin kültüründen sonra, büyük olasılıkla birçok laboratuvar, makrolid direncinin saptanması için E-test ya da disk difüzyon yöntemini kullanmaktadır. Her iki teknik, kültürün daha uzun sürede inkübasyonunu gerektirir ve suşta varolan nokta mutasyonlarının tipini tanımlayamaz¹⁴. Buna karşın FISH yönteminin temel avantajı, eş zamanlı olarak hem bakterinin tanımlanması hem de makrolid duyarlılığının belirlenmesi ile klinisyene doğru tedavi programı için önemli bilgi sağlamasıdır²⁰. Fenotipik olarak klaritromisin direncini saptayan E-teste karşın FISH, klaritromisine dirençli mutantlar ile klaritromisine duyarlı vahşi tip arasında ayırım yapabilme özelliğine sahip bir tekniktir¹³. Dolayısıyla FISH yöntemi kısa sürede (endoskopiden sonra üç saat içinde) sonuç vermesi, problemlerin ticari olarak uygun maliyet ile sağlanabilmesi ve epifloresan mikroskopu dışında özel donanıma gerek duymadan uygulanabilmesi gibi özellikleriyle klinik laboratuvarlarda kullanılabilir bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Park CS, Kim J: Rapid and easy detection of *Helicobacter pylori* by in situ hybridization. J Korean Med Sci 1999, 14: 15-20.
2. Vinette KM, Gibney KM, Proujansky R, Fawcett PT: Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients. BMC Microbiol 2004, 4: 5.
3. Russmann H, Kempf VAJ, Koletzko S, Heesemann J, Autenrieth IB: Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 2001, 39: 304-308.
4. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, et al: Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. Gut 2000, 46: 608-614.
5. Kabir S: Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. J Med Microbiol 2001, 50: 1021-1029.
6. Jüttner S, Vieth M, Miehke S, et al: Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue. Mod Pathol 2004, 17: 684-689.
7. 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 2000, 38: 3710-3714.
8. Braden B, Caspary WF: Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? Ann Med 2001, 33: 91-97.
9. Ruiz-Bustos E, Ochoa JL, Wadström T, Ascencio F: Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. J Med Microbiol 2001, 50: 215-222.
10. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ: *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997, 10: 720-741.
11. Young KA, Akyon Y, Rampton DS, et al: Quantitative culture of *Helicobacter pylori* from gastric juice: the potential for transmission. J Med Microbiol 2000, 49: 343-347.
12. Parsonnet J, Harris RA, Hack HM, Owens DK: Should we treat *H.pylori* infection to prevent gastric cancer? Gastroenterology 1997, 112: 1044-1045.

13. Şen N: *Helicobacter pylori* antijen ve DNA'sının dışkıda, IgG antikorunun serumda saptanması, invaziv ve invaziv olmayan tanı yöntemlerinin karşılaştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık tezi, 2004. İzmir.
14. Feydt-Schmidt A, Russmann H, Lehn N, et al: Fluorescence in situ hybridization vs. epsilometer test for detection of clarithromycin-susceptible and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains in gastric biopsies from children. Aliment Pharmacol Ther 2002, 16: 2073-2079.
15. Russmann H, Adler K, Haas R, Gebert B, Koletzko S, Heesemann J: Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 2001, 39: 4142-4144.
16. Graham SK, Graham DY: Contemporary diagnosis and management of *H.pylori*-associated gastrointestinal diseases, p: 121. 2002, 2nd ed. Handbooks in Health Care, Pennsylvania.
17. Çırak MY, Ünal S, Türet S ve ark: Klaritromisine dirençli ve duyarlı *Helicobacter pylori* suşlarının midedeki dağılımı. Turkish Journal of Gastroenterology 2004, 15 (Suppl 1): 41.
18. Önder GF, Aydın A, Akarca US, Özütemiz Ö, İltter T: Ülkemizde *Helicobacter pylori*'nin klaritromisine direncinin real time PCR yöntemi ile araştırılması. Turkish Journal of Gastroenterology 2004, 15 (Suppl 1): 40.
19. Özden A, Bozdayı G, Bağlan P ve ark: *Helicobacter pylori*'nin klaritromisine karşı direncinin sıklığı. Turkish Journal of Gastroenterology 2004, 15 (Suppl 1): 40.
20. Mégraud F: Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. Aliment Pharmacol Ther 1997, 11 (Suppl 1): 43-53.
21. Russmann H, Feydt-Schmidt A, Adler K, Aust D, Fischer A, Koletzko S: Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in shock-frozen gastric biopsy samples by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 2003, 41: 813-815.
22. Debets-Ossenkopp YJ, Sparrius M, Kusters JG, Kolkman JJ, Vandenbroucke-Grauls CM: Mechanism of clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 1996, 142: 37-42.
23. Megraud F: *H.pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004, 53: 1374-1384.
24. Temizkan G, Arda N: Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, s: 72. İstanbul Üniversitesi BİYOGEM Yayın No. 1, 1999, İstanbul.
25. <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/fish.html>
26. <http://www.genome.gov/10000206>
27. <http://members.aol.com/chrominfo/fishinfo.htm>
28. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R: Molecular biology of the gene, p: 692. 2004, 5th ed. Pearson Education, San Francisco.
29. <http://pollux.mpk.med.uni-muenchen.de/alpha1/forschung/FISH.html>
30. <http://www.genetests.org>
31. Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB: Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000, 38: 830-838.

EDİTÖRE MEKTUP

İDRAR YOLU ENFEKSİYONU ŞÜPHESİ OLAN HASTALARDA TAM İDRAR ANALİZİ
SONUÇLARININ İDRAR KÜLTÜRÜ SONUÇLARIYLA UYUMU

Aynur EREN*, **Fehime Benli AKSUNGAR****, **Sinan AKŞİT*****
Fatma ÖZAKKAŞ*, **Leon SAPORTA*****

Sayın Editör,

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) her yaşta en sık saptanan bakteriyel enfeksiyonlardır ve etkenin eliminasyonu için antimikrobik tedavi gereklidir. Kesin tanı için standart yöntem kantitatif idrar kültürüdür. Ancak laboratuvarımızda idrar kültürlerinin %70-80'inden negatif sonuç alınmaktadır ve birçok mikrobiyoloji laboratuvarında da benzer oranlar saptanmıştır^{1,2}. Günümüzde, tam idrar analizi, bir çok hekim tarafından tarama testi olarak kullanılmaktadır. Klinik olarak, idrar yolu enfeksiyonu semptomları bulunan hastalarda ise tam idrar analizi ve idrar kültürü eş zamanlı olarak istenmektedir. 24-48 saatte sonuçlanan kültürün neden olduğu zaman kaybını, iş yükünü ve maliyeti düşürmek amacıyla, idrar stripleriyle bakteriüri ve piyürinin saptanması için tarama testleri geliştirilmiştir. İdrar striplerinde piyüri, lökosit esteraz (LE), bakteriüri ise nitrit varlığı ile saptanmaktadır. Ayrıca tam idrar tahlilinde (TİT), idrar sedimentinin değerlendirilmesi ve Gram boyama ile idrar preparatının incelenmesi, ÜSE tanısında hızlı sonuçlanan maliyeti düşük yöntemlerdir. Çalışmamızda, anlamlı bakteriüri esas alınarak, tam idrar tahlili sonuçlarının duyarlılık, seçicilik, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) hesaplanmıştır.

Eş zamanlı olarak, idrar analizi ve kültürü istenen, 18-60 yaş arasında 200 hasta (162 kadın, 38 erkek) örneği çalışılmıştır. Örnekler, kültüre uygun şekilde, orta akım idrarı olarak alınmıştır. Tam idrar analizi, Combur-M idrar stripleri (Roche-Diagnostics, Almanya) ile manuel olarak ve sedimentin mikroskopik değerlendirilmesi ile yapılmıştır. Sedimentte, kadınlarda 2-3, erkeklerde 1-2 lökosit görülmesi anlamlı kabul edilmiştir³. Kültür için idrar örnekleri %5 koyun kanlı triptik soy agara sayım plağı şeklinde ve ENDO ağara azaltma yöntemiyle 0.01 ml kalibre öze ile ekilmiştir. İdrar kültüründe; $>10^4$ cfu/ml tek tip bakteri üremesi ve $>10^4$ cfu/ml iki tip bakteri üremesi Gram boyama ile uyumlu ise anlamlı bakteriüri olarak değerlendirilmiş, üç veya daha fazla bakteri üremesi saptandığında kontaminasyon olarak kabul edilmiştir.

Örneklerden hazırlanan ve Gram ile boyanan preparatlar, 100x objektifle 10 alan olacak şekilde incelenmiş ve her sahada ortalama bir bakteri görülmesi anlamlı bakteriüri yönünde değerlendirilmiştir⁴. Piyüri için, santrifüj edilmemiş idrar örneklerinde Thoma lamı kullanılarak lökosit sayımı yapılmış ve ≥ 10 lökosit/mm³ piyüri olarak değerlendirilmiştir⁵. LE ve nitrit testi için idrar stripleri idrarın içine batırılmış ve bir dakika içinde oluşan renk değişiklikleri renk skalalarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Kültür sonuçları; 200 hastanın 39'unda (%19.5) pozitif, 115'inde (%57.5) negatif ve 46'sında (%23) kontaminasyon olarak belirlenmiştir. Kültür pozitif 39 hastanın 36'sında (%82) gram negatif bakteriler üremiş ve bu hastalardan 21'inde (%58) nitrit pozitif bulunmuştur. Örneklerin %45'inde LE, %24'ünde nitrit pozitif bulunmuştur. Sedimentte lökosit saptanma oranı %62 iken, Thoma'da anlamlı piyüri %28, Gram boyada bakteri görülmesi %99 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız testlerin anlamlı bakteriüriye göre duyarlılık, seçicilik, PPD ve NPD'leri tabloda gösterilmiştir. Duyarlılığı en yüksek olan test Gram boyama, seçiciliği en yüksek olan test ise nitrit testi olmuştur.

* Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

** Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul.

*** Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Testin Adı	Duyarlılık %	Seçicilik %	PPD %	NPD %
Lökosit esteraz	62	83	54	87
Sedimentte lökosit	78	83	53	94
Thoma lamında piyüri	65	94	80	88
Nitrit testi	68	98	93	90
Gram boyada bakteri	100	73	39	100
TİT (LE+Nitrit+Sediment)	83	75	42	95

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına kültür için en sık gönderilen örnek idrardır. Bizim çalışmamızda idrar örneklerinin %19.5'inde anlamlı sayıda bakteri üremiştir. Kadınlarda daha sık anlamlı bakteriüri saptanmış ve üreyen bakteriler arasında ilk sırayı gram negatif basiller almıştır. Çalışmamızda LE testinin, Thoma lamı ile elde edilen anlamlı piyüri sonuçlarıyla korelasyonu %80 olarak hesaplanmıştır. Anlamlı bakteriüri ile karşılaştırıldığında LE testinin duyarlılığı %62 seçiciliği %83 olmuştur. Literatürde, LE testinin duyarlılık ve seçiciliğiyle ilgili olarak bizim çalışmamızdakine benzer sonuçlar belirtilmekle birlikte, LE testinin duyarlılığı, tarama testi olmak için düşük kalmaktadır⁶. Piyüriyi saptamada kullandığımız diğer iki yöntemde de (sedimentin mikroskopik incelemesi ve Thoma lamında lökosit sayımı) LE'a göre daha yüksek duyarlılık ve seçicilik değerleri elde edilmiştir. Ancak sedimentte lökosit değerlendirilirken saptanan %17, Thoma lamında ise %11 yalancı pozitiflik oranları, bu testlerin anlamlı bakteriüri için tek başlarına tarama testi olarak kullanılmalarını sınırlamaktadır. Literatürde bakteriüri taramasında kullanılan nitrit testinin duyarlılığının düşük, seçiciliğinin yüksek olduğu belirtilmiştir⁷. Çalışmamızda nitrit testinin duyarlılığı önceki çalışmalardan yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda gram negatif bakteri üreme oranının yüksek olması, nitrit testinin duyarlılığının yüksek bulunmasını sağlamıştır. Gram boyamanın duyarlılığı %100, özgüllüğü %73 olarak bulunmuştur. Bu yöntem bakterinin morfolojisi ve Gram özelliğini de gösterdiği için ampirik tedavide ilaç seçimini kolaylaştırmaktadır. Acar ve arkadaşları⁸ Gram boyama yönteminin duyarlılığını %82 ve seçiciliğini %78 olarak bulmuşlardır. Her ne kadar idrar striplerini değerlendirmek daha pratik olsa da, anlamlı bakteriüriyi öngörmekte Gram boyama sonuçlarının striplerle birlikte değerlendirilmesi daha uygun bir yaklaşım olacaktır. Laboratuvarımızda kullandığımız yöntemlerden Gram boyama ve idrar sedimenti kültür sonuçlarımızla en uyumlu kombinasyon olmuştur. İdrar kültürü ve TİT eşzamanlı istenmemiş olsaydı ve önce TİT ile değerlendirilseydi, örneklerin %58'inden kültür istenmeyeceği anlaşılmıştır. Bu durumda nötropenik hastalar ve nitrat redüktazy olmayan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar atlanacaktır. Bu bilgilerin ışığında, Gram boyama ve idrar sedimentinin birlikte incelenmesinin uygun olacağı ve bu hastalara yalnız idrar tahlili yapılırsa %36'sının teşhis edilemeyeceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Özsüt H: İdrar yolu enfeksiyonları, s. 1059-1070. Willke AT, Söyletir G, Doğanay M(ed), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2002, ikinci baskı. Nobel tıp Kitapevi, Ankara.
- Semeniuk H, Noonan J, Gill H, Church D: Evaluation of the Coral UTI Screen system for rapid automated screening of significant bacteriuria in a regional centralized laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002, 44: 7-10.
- Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmeirczak SC (eds): *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, Correlation*, p. 1093-1109. 2003, 4th ed. Mosby Co, Missouri.
- Isenberg HD (ed): Initial processing, inoculation, and incubation of aerobic bacteriology specimens, p. 1.4. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology 1992. Washington DC.
- Semeniuk H, Church D: Evaluation of the leukocyte esterase and nitrite urine dipstick screening tests for detection of bacteriuria in women with suspected uncomplicated urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 3051-3052.
- Millar L, DeBuque L, Leialoha C, Grandinetti A, Killeen J: Rapid enzymatic urine screening test to detect bacteriuria in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2000, 95: 601-604.
- Larson MJ, Brooks CB, Leary WC, Lewis LM: Can urinary nitrite results be used to guide antimicrobial choice for urinary tract infection? *J Emerg Med* 1997, 15: 435-438.
- Acar NS, Kuzucu Ç, Kabakcıoğlu M, Üstün C: Üriner sistem enfeksiyonlarında mikrobiyolojik değerlendirme ve mikroorganizmaların dağılımının irdelenmesi. *Mikrobiyol Bül* 1999, 33: 119-126.