

HELICOBACTER PYLORI İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ ORANLARI VE KLARİTROMİSİNE DİRENÇLİ SUŞLARIN SAPTANMASINDA E-TEST VE FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ANTIBIOTIC RESISTANCE RATES OF *HELICOBACTER PYLORI* ISOLATES AND THE COMPARISON OF E-TEST AND FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION METHODS FOR THE DETECTION OF CLARITHROMYCIN RESISTANT STRAINS

Saliha BAKIR ÖZBEY¹, Cüneyt ÖZAKIN², Murat KESKİN³

¹ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.
(salihaozbey@mynet.com)

² Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

³ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Helicobacter pylori enfeksiyonu, dünyada yaygın olarak görülen kronik bakteriyel enfeksiyonlardan biri olup kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik kanser ile ilişkilidir. *H. pylori* eradikasyonunda geçerli tedavi rejimi, proton pompa inhibitörü (PPI) ile amoksisilin, klaritromisin ve metronidazolü içeren iki antibakteriyel ajanın kombinasyonudur. Son yıllarda *H. pylori*'de antibiyotiklere karşı giderek artan direnç oranı tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Bu çalışmada, dispeptik yakınmaları nedeniyle Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Gastroenteroloji Kliniğine başvuran 31 hastaya (yaş aralığı: 24-65 yıl; yaş ortalaması: 48.3 ± 11.3 yıl) ait gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* izolatlarının antibiyotik direnç oranları incelenmiş ve klaritromisin direncinin saptanmasında E-test (AB Biodisk, İsveç) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH; SeaFAST® Hemakim, Macaristan) yöntemleri karşılaştırılmıştır. Çalışılan 31 *H. pylori* izolatının klaritromisin, amoksisilin, metronidazol, tetrasiklin ve siprofloksasine karşı duyarlılığı E-test yöntemi ile çalışılmış ve direnç oranları sırasıyla %41.9, %3.2, %41.9, %3.2 ve %45.2 olarak saptanmıştır. İzolatların %32.2'sinde tek antibiyotiğe karşı direnç, %45.2'sinde ise çoklu antibiyotik direnci belirlenmiştir. Hibridizasyonda, biri 16S rRNA'ya özgül ve "fluorescein" boyası ile işaretli, diğerleri 23S rRNA'daki mutasyonlara özgül ve Cy3 boyası ile işaretli probalar kullanılmış; yeşil ışımının saptanması *H. pylori* varlığı açısından, kırmızı ışımının saptanması ise klaritromisine dirençli *H. pylori* varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak FISH yönteminde izolatların tamamı yeşil ışımaya vermiş, E-test ile klaritromisin direnci saptanan 13 izolatın hepsinde kırmızı ışımaya gözlenmiş ve klaritromisin diren-

cini saptamada her iki yöntem arasında bir fark saptanmamıştır. Bizim çalışmamız, suş sayımızın az olmasına rağmen, bölgemizdeki *H.pylori* antibiyotik duyarlılık oranlarının bildirildiği öncü çalışma olup daha fazla sayıda izolatin incelendiği çok merkezli geniş araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, antibiyotik direnci, E-test, floresan in situ hibridizasyon, Türkiye.

ABSTRACT

Helicobacter pylori which is one of the commonly seen chronic bacterial infections in the world, has been demonstrated to have a relationship with chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. Current management of *H.pylori* infection involves the use of a proton pump inhibitor (PPI) and any two of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in combination. Antibiotic resistance which is in an increasing trend in *H.pylori* since the recent years, is the main cause of treatment failure. This study was conducted to determine the susceptibility of 31 *H.pylori* strains to several antibiotics by using E-test method (AB Biodisk, Sweden) and also to detect clarithromycin resistance by fluorescent in situ hybridization (FISH; SeaFAST®, Hungary). The strains were isolated from the gastric biopsy specimens of patients who were admitted to Uludağ University Hospital, Bursa, Turkey with dyspeptic complaints. Clarithromycin, amoxicillin, metronidazole, tetracycline and ciprofloxacin resistance rates were as 41.9%, 3.2%, 41.9%, 3.2% and 45.2%, respectively. Resistance to single antibiotic was detected in 32.2% of the isolates whereas multiresistance was seen in 45.2%. For the hybridization process one probe specific for 16S rRNA and labeled with a fluorescein dye and the other probe specific for the mutations in 23S rRNA and labeled with Cy3 stain were used. Green signalling denoted presence of *H.pylori* in the specimen and red signalling was associated with clarithromycin resistance. All of the isolates yielded green signalling and the 13 isolates found to be resistant to clarithromycin by E-test, gave red signalling. No difference was detected between the two methods in terms of clarithromycin resistance determination. This was a preliminary study reporting the *H.pylori* resistance rates in our region, however, further larger scale studies are required for obtaining countrywide data.

Key words: *Helicobacter pylori*, antibiotic resistance, E-test, fluorescent in situ hybridization, Turkey.

GİRİŞ

Dünya nüfusunun %70-90'ının gastrik mukozasını enfekte eden *Helicobacter pylori* gram-negatif, spiral şeklinde mikroaerofilik bir bakteridir. *H.pylori* enfeksiyonunun mide-de peptik ülser ve kronik gastrite neden olduğu bilinmekte; ayrıca gastrik mukoza ile ilişkili lenfatik doku lenfoması ve gastrik kanserlerin gelişmesi ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir^{1,2}. *H.pylori* enfeksiyonunun tedavisinde henüz ideal bir tedavi rejimi bulunmama ile birlikte Avrupa *H.pylori* Çalışma Grubu (EHPSCG) tarafından hazırlanan Maastricht 3-2005 konsensus raporunda *H.pylori* eradikasyonunda ilk seçenek tedavi tavsiyesi proton pompa inhibitörü (PPI) + klaritromisin + amoksisilin ya da metronidazol ile kombinasyonunu içeren üçlü tedavidir³. Klaritromisin direnci %20'den fazla olan toplumlarda bu tedavi şemasının etkinliği azalmaktadır. Metronidazol direnci %40'tan az olan toplumlarda metronidazol içeren birinci basamak tedaviler önerilmektedir⁴.

H.pylori'de antibiyotiklere karşı gelişen direnç tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Antibiyotik direncinin belirlenmesinde E-test yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin saptanması pratik olarak kullanılmaktadır. Klaritromisin duyarlılığını saptamada kolay ve kısa sürede sonuç alınabilen FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) yöntemi ise son yıllarda giderek artan kullanım alanı bulmaktadır⁵. Bu çalışmada,

dispeptik yakınmaları olan hastalardan izole edilen *H.pylori* suşlarının antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi ve klaritromisin direncinin saptanmasında E-test ve FISH yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Gastrik Biyopsi Örnekleri

Çalışmaya, dispeptik yakınmaları nedeniyle Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesinde endoskopik incelemeleri yapılan, yaşları 24-65 yıl (ortalama: 48.3 ± 11.3 yıl) arasında değişen 31 hasta dahil edildi. Hastalardan antrum ve korpustan olmak üzere ikişer adet gastrik biyopsi örneği alındı.

H.pylori Kültürü

Biyopsi örnekleri "Brain-Heart Infusion Broth" (Becton Dickinson, ABD) içeren ependorf tüpler içerisinde laboratuvara ulaştırıldı ve modifiye *Helicobacter* agara (Becton Dickinson, ABD) ekim yapıldı. Mikroaerofilik ortam, anaerop kavanozlar içerisinde konan CampyGen *Campylobacter* sistemi (Oxoid, İngiltere) ile sağlandı. $37^{\circ}\text{C}'$ de 3-10 gün inkübasyon sonrası saydam, konveks, 0.5-1 mm çapında, su damlasına benzer kolonilere Gram boyama, üreaz, katalaz ve oksidaz testleri uygulandı. Pozitif saptanan suşlar mikrobank (Cryobank mixed, Mast Group Ltd, Merseyside, İngiltere) saklama tüpüne hızla aktarılıp $-80^{\circ}\text{C}'$ de saklandı.

E-test

Helicobacter agar besiyerinde 48-72 saatlik inkübasyon sonrası inokulum yapmak için 3 McFarland bulanıklıkta olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanarak %5 koyun kanlı Mueller Hinton agara (Becton Dickinson, ABD) ekim yapıldı. Bakteri süspansiyonu steril eküvyonlar ile 5 ayrı plağa ekildi. Klaritromisin, amoksisilin, metronidazol, siprofloksasin ve tetrasiklin E-test stripleri (AB Biodisk, Solna, İsveç) her bir plağa yerleştirildi. $37^{\circ}\text{C}'$ de mikroaerofilik ortamda 72 saat inkübe edildi. Çalışmada *H.pylori* NCTC 11637 (ATCC 43504) suşu kalite kontrolü olarak kullanıldı. Klaritromisin için $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ (NCCLS M100-S10 Ocak 2006), tetrasiklin, amoksisilin ve metronidazol için sırasıyla $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ (AB BIODISK 2007-06), siprofloksasin için ise $> 2 \mu\text{g/ml}^{6,7}$ olan suşlar dirençli olarak kabul edildi.

FISH Yöntemi

Klaritromisin direncinin belirlenmesinde SeaFAST® (Hemakim, Macaristan) ticari kiti kullanıldı. *H.pylori* suşlarından 1.0 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hibridizasyon yapıldı. Hibridizasyonda, biri 16S rRNA'ya özgül ve "fluorescein" boyası ile işaretli, diğerleri 23S rRNA'daki mutasyonlara özgül ve Cy3 boyası ile işaretli probalar kullanıldı. Hibridizasyon sonrası örneklerin üzerine 5'er μl "anti-fade" damlatıldı. Nikon E 600 marka floresan mikroskop üzerine kurulmuş olan kırmızı, yeşil ve DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) filtrelerine sahip Q-ips Imaging System (Applied Biosystems, İngiltere) ile analiz edildi. Fluorescein boyası ile işaretli probalarla hibridize olan suşlar floresan mikroskopunda yeşil ışığa vererek *H.pylo-*

ri varlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi. Cy3 boyası ile işaretli problar ile hibridize olan ve kırmızı ışığa veren suşlar ise dirençli olarak yorumlandı. Çift (dual) bantta ise klaritromisine dirençli bu suşlar sarı renkte gözlemlendi.

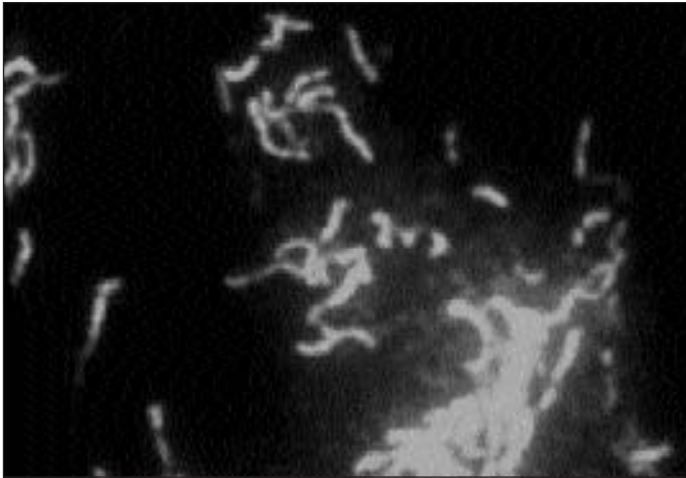
BULGULAR

Çalışmaya alınan 31 *H.pylori* izolatının E-test ile saptanan antibiyotik direnç oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

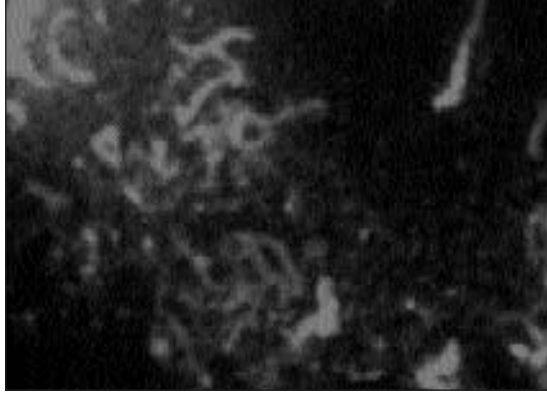
FISH yönteminde; izolatların tamamı fluorescein boyası ile işaretli problarla hibridize olmuş ve yeşil ışığa vermiştir (Resim 1). E-test ile klaritromisin direnci saptanan 13 izolatın tamamında ise FISH yöntemi ile kırmızı ışığa gözlenmiş (Resim 2), bu suşlar çift bantta sarı renkte izlenmiştir (Resim 3). E-test yöntemi ile FISH yöntemi karşılaştırıldığında klaritromisin direncinin saptanmasında fark saptanmamıştır.

Tablo 1. *Helicobacter pylori* İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları

Antibiyotikler	Dirençli suş sayısı	%
Klaritromisin	13	41.9
Metronidazol	13	41.9
Amoksisilin	1	3.2
Tetrasiklin	1	3.2
Siprofloksasin	14	45.2
Tek ilaca direnç	10	32.2
Çoklu direnç	14	45.2



Resim 1. Fluorescein boyası ile işaretli, 16S rRNA'ya özgül proba hibridize olmuş *H.pylori*'nin görüntüsü (yeşil filtre).



Resim 2. Cy3 boyası ile işaretli, 23S rRNA'ya özgül proba hibridize olmuş klaritromisine dirençli *H.pylori*'nin görüntüsü (kırmızı filtre).



Resim 3. Fluorescein boyası ile işaretli, 16S rRNA'ya özgül proba ve Cy3 boyası ile işaretli 23S rRNA'ya özgül proba hibridize olmuş klaritromisine dirençli *H.pylori*'nin görüntüsü (ikili filtre).

TARTIŞMA

H.pylori enfeksiyonunun tedavisinde kombine antibiyotik kullanımı gerekmektedir. Klaritromisin, metronidazol, amoksisilin, tetrasiklin ve siprofloksasin, enfeksiyonun tedavisinde seçilen antimikrobiyal ajanlardır. *H.pylori*'de antibiyotiklere karşı gelişen yüksek direnç oranları eradikasyon tedavisinde başarısızlığa neden olmaktadır^{4,8,9}.

H.pylori'de nitroredüktaz enzimlerinin kodlanmasından sorumlu *rdxA* ve *frxA* gen mutasyonları metronidazol direncine neden olmaktadır^{10,11}. Metronidazol direncinin saptanmasında standart metodlara güvenilmemektedir, zira testlerin standardizasyonunun gerektiği bildirilmektedir⁹. Bölgeler arasında farklılıklar olmakla birlikte *H.pylori*'de metronidazol direnci %40-52 arasında değişmektedir¹²⁻¹⁴. Ülkemizde de metronidazol di-

renci yaklaşık olarak %50 oranındadır^{8,15,16}. Bizim çalışmamızda da metronidazol direnç oranı %41.9 olarak saptanmıştır.

H.pylori'de 7 adet penisilin bağlayan protein (PBP) tanımlanmıştır. PBP-1A'da serin-arginin değişiminin yüksek düzeyde amoksisilin direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir^{17,18}. Tüm dünyada amoksisilin direncinin %1'in altında olduğu bildirilmekle birlikte, 2007 yılında Tayvan'da %36.1 oranında direnç saptanmıştır^{9,14}. Bizim çalışmamızda da amoksisilin direnci 1 (%3.2) izolatta gösterilmiştir.

H.pylori'de tetrasiklin direncinin 16S rRNA'daki üç baz çifti yer değişimine bağlı olduğu (AGA 926-928 TTC) bildirilmiştir¹⁹. Qing Hao ve arkadaşları¹² 2004 yılında *H.pylori*'de tetrasiklin direncini %6.7 olarak saptamakla birlikte dünyada tetrasiklin direnci %1'in altında olarak bildirilmiştir⁹. Ülkemizde ise tetrasiklin direnci yaklaşık %4 oranındadır^{15,16}. Çalışmamızda tetrasiklin direnci de 1 (%3.2) suşta pozitif saptanmıştır.

Son yıllarda giderek artan kinolon direnci, QRDR (quinolon resistance determining region) bölgesindeki *gyrA* gen mutasyonuna bağlı olarak ya da dışa-atım (efflux) mekanizması ile gelişmektedir^{9,20}. Ülkemizde %6-8 arasında değişen direnç oranları bildirilmiştir^{15,16}. Bizim çalışmamızda ise *H.pylori*'de siprofloksasin direnci %45.2 olarak bulunmuş ve yapılan az sayıdaki çalışmalarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda klaritromisin direncinde sorumlu olan ana mekanizmaların, 23S rRNA geninin A2142G veya A2143G mutasyonu, daha az sıklıkla da A2142C mutasyonları olduğu bildirilmiştir. Dirence yol açan ve nadir saptanan diğer mutasyonlar ise A2115G, G2141A ve T2717C olarak tanımlanmıştır^{21,22}. Klaritromisin direnç prevalansı coğrafi olarak farklılık göstermekle birlikte dünya çapında artmaktadır. Yapılan değişik çalışmalarda klaritromisin direnci %13.5-%23.3 arasında değişen oranlarda saptanmıştır¹²⁻¹⁴. Avrupa'da klaritromisin direnci güney bölgelerinde %18, kuzeyde %4 olup toplamda yaklaşık %10 oranında bildirilmiştir⁹. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise klaritromisin direncinde son yıllarda giderek artış saptanmış ve %55'lere varan direnç oranları rapor edilmiştir^{15,16,23,24}. Bizim çalışmamızda da klaritromisin direnci E-test ve FISH yöntemlerinin her ikisi ile de %41.9 olarak saptanmış olup son yıllarda yapılan diğer çalışmalara benzerlik göstermektedir. FISH yönteminde, klaritromisin direncinden sorumlu ana mekanizmalar olan 23S rRNA genindeki 3 ayrı (A2143G, A2144G ve A2143C) nokta mutasyonunu saptayacak problar kullanılmaktadır. *H.pylori*'de klaritromisin direncinin saptanmasında E-test ve FISH yönteminin karşılaştırıldığı birçok çalışmada FISH'in duyarlılığının yüksek ve güvenilir olduğu bildirilmiştir^{25,26}. Bizim çalışmamızda da *H.pylori* suşlarında klaritromisin direncinin saptanmasında uygulanan her iki yöntem arasında fark saptanmamıştır. Bu iki yöntem arasında saptanan uyum, direncin belirlenmesinde her iki yöntemin de kullanılabilirliğini göstermektedir. E-test ile 72 saat inkübasyon sonrası MKK değerleri saptanabilirken, FISH yöntemi ile 3 saat içerisinde klaritromisin duyarlılığı belirlenebilir. Her laboratuvar kendi şartlarına uygun olan yöntemi tercih edebilir.

Sonuç olarak antibiyotiklere dirençli *H.pylori* varlığı eradikasyon tedavisinde başarısızlıklara yol açabilir. Bu nedenle bakteri direncinin önceden saptanması ve uygun duyarlılık yönteminin kullanılması büyük önem taşır. Uygun ampirik tedavi seçeneklerini belir-

lemek, gereksiz antibiyotik kullanılmasını ve antibiyotik direnç artışını önlemek için bölgesel direnç oranlarının bilinmesi önemlidir. Çalışmamızda klaritromisin, metronidazol ve siprofloksasin dirençleri yüksek olarak saptanmıştır. Klaritromisin ve siprofloksasinin *H.pylori* tedavisi dışında diğer enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde de artan yaygın kullanımına bağlı olarak direnç oranlarının da arttığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamız, suş sayımızın az olmasına rağmen, bölgemizdeki *H.pylori* antibiyotik duyarlılık oranlarının bildirildiği öncü çalışma olup daha fazla sayıda izolatin incelendiği çok merkezli geniş araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720-41.
2. Parsonnet J, Hansen S, Rodriquez L, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 1994; 330: 1310-1.
3. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al; The European Helicobacter Study Group (EHSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007; 56: 772-81.
4. Dzieniszewski J, Jarosz M. Guidelines in the medical treatment of *Helicobacter pylori* infection. J Physiol Pharmacol 2006; 57: 143-54.
5. Yılmaz O, Demiray E, Tümer S, et al. Detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin susceptibility using formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens by fluorescence in situ hybridization. Helicobacter 2007; 12: 136-41.
6. Mishra KK, Srivastava A, Garg A, Ayyagari A. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* clinical isolates: comparative evaluation of disk-diffusion and E-test methods. Curr Microbiol 2006; 53: 329-34.
7. Heep M, Kist M, Strobel S, Beck D, Lehn N. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 538-41.
8. Akyön Yılmaz Y. *Helicobacter pylori*'de antimikrobiyal ajanlara karşı direnç oluşturan mekanizmalar ve moleküler tanı yöntemleri. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 28 Haziran-1 Temmuz 2004, Ankara. Program ve Bildiri Özet Kitabı, s: 42.
9. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 280-322.
10. Mukhopadhyay AK, Jeong JY, Dailidienne D, Hoffmann PS, Berg DE. The *fdxA* ferredoxin gene can down-regulate *frxA* nitroreductase gene expression and is essential in many strain of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 2003; 185: 2927-35.
11. Megraud F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998; 115: 1278-82.
12. Hao Q, Li Y, Zhang ZJ, Liu Y, Gao H. New mutation points in 23S rRNA gene associated with *Helicobacter pylori* to claritromycin in northeast China. World J Gastroenterol 2004; 10: 1075-7.
13. Ziemniak W. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication taking into its resistance to antibiotics. J Physiol Pharmacol 2006; 57: 123-41.
14. Hu CT, Wu CC, Lin CY, et al. Resistance rate to antibiotics of *Helicobacter pylori* isolates in eastern Taiwan. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22: 720-3.
15. Kantarçeken B, Yıldırım B, Karıncaoğlu M, Aladağ M, Hilmioğlu F. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. Turk J Gastroenterol 2000; 11: 1-6.
16. Aşel E, Durmaz B, Tevfik MR, Aşgın N. The isolation and antibiotic resistant pattern of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients. Turk J Med Sci 2000; 30: 143-6.
17. Haris AG, Hazell SL, Netting AG. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 591-8.

18. Gerrits MM, Schuijffel D, van Zwet AA, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Alterations in penicillin-binding proteins 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2229-33.
19. Ribeiro ML, Gerrits MM, Benvenuto YH, et al. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 15: 57-61.
20. Glocker E, Kist M. Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2241-6.
21. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, et al. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of claritromycin resistance mutations in *H.pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4573-7.
22. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridization. *Gut* 2000; 46: 608-14.
23. Kolaylı F, Karadenizli A, Çelebi A, Bingöl R. *Helicobacter pylori* suşlarının metronidazol, klaritromisin, amoksisiline in vitro duyarlılıkları. *İnfeksiyon Derg* 2004; 18: 473-6.
24. Bağlan PH, Bozdayı G, Özkan M, Özden A. Klaritromisin dirençli *Helicobacter pylori*'nin saptanmasında, E-test ve agar dilüsyon metodlarının karşılaştırılması. *Akademik Gastroenteroloji Derg* 2005; 4: 83-7.
25. Moosavian M, Tajbakhsh S, Samarbaf-Zadeh AR. Rapid detection of claritromycin-resistant *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia by fluorescent in situ hybridization (FISH) compared with the E-test. *Ann Saudi Med* 2007; 27: 84-8.
26. Rüssmann H, Kempf VA, Koletzko S, Heesemann J, Autenrieth IB. Comparison of *Helicobacter pylori* in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 304-8.