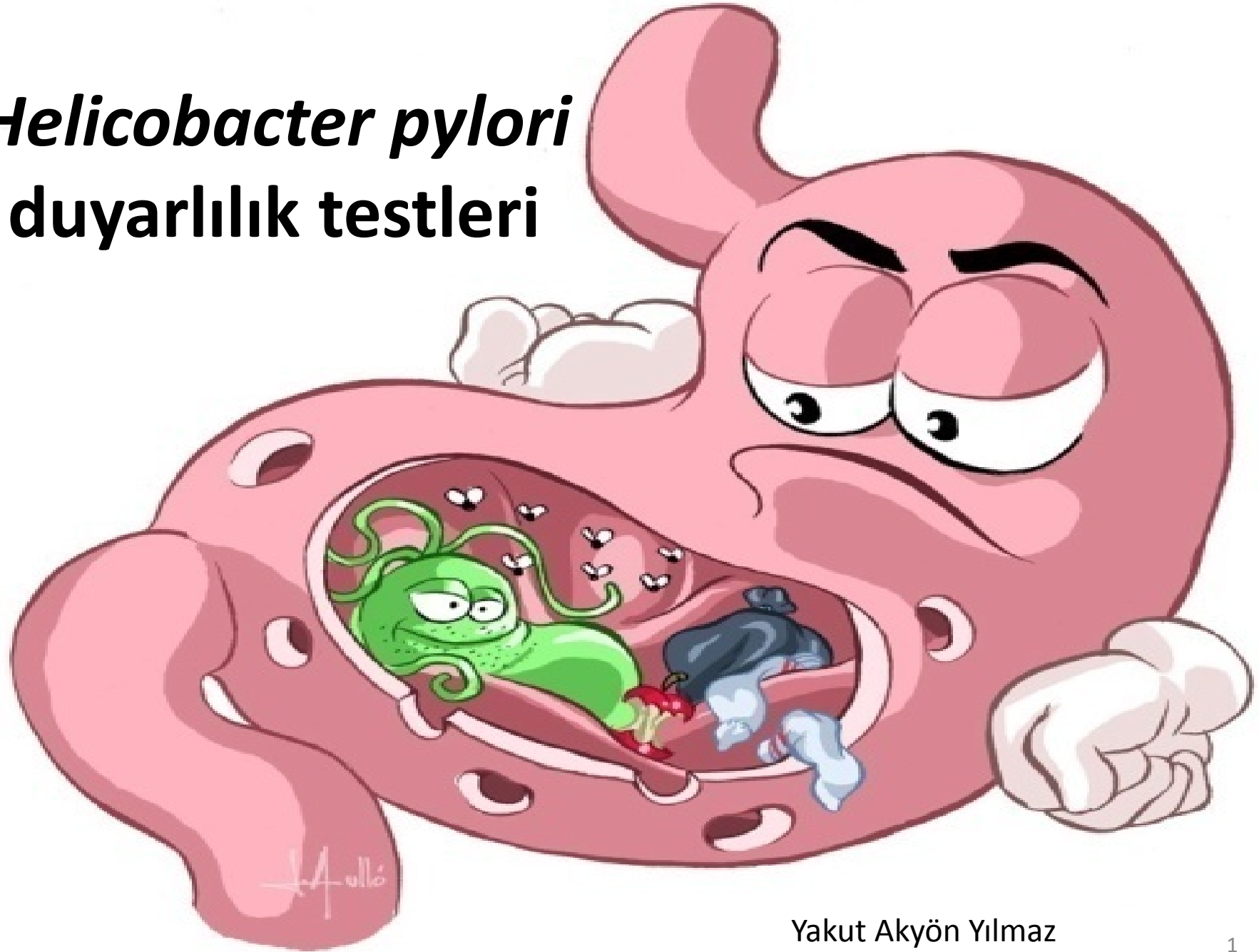


Helicobacter pylori **duyarlılık testleri**

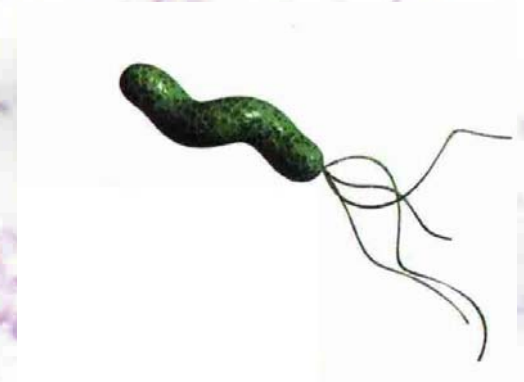


Yakut Akyön Yılmaz

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

H. pylori tedavisinde kullanılan antimikrobiyaller

- Metronidazol
- Klaritromisin
- Amoksisilin
- Tetrasiklin
- Kinolonlar
- Furozolidonlar
- Ketolidler
- Rifamisinler





H. pylori'de antibiyotik duyarlılık testleri

Fenotipik

Kültürden

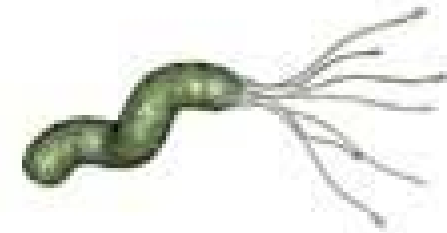
-Agar dilüsyon

-E-test

-Disk difüzyon

Genotipik

Biyopsi, Kültür ve Dışkı



Primer izolasyon

BHI agar, Columbia agar, Brucella agar vb.

+

Vankomisin → 10mg/L

Trimetoprim → 5mg/L

Sefzulodin → 5mg/L

Amfoterisin → 5mg/L

+

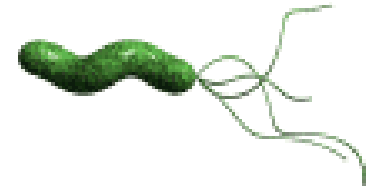
% 7 – 10 at kanı veya koyun kanı

35-37⁰C'de 5-7 gün, mikroaerofil koşullarda
(%8-10 CO₂, %5-6 O₂, %80-85 NO₂, %98 nem),
inkübe edilir.



Antibiyotik duyarlılık testleri

- -70'de saklanmış olan *H. pylori* suşları antibiyotik içermeyen zengin besiyerinde çoğaltılır.
- Primer izolasyon sonrasında maksimum 3 defa pasaj yapılabilir.
- Mc Farland 0.5'e uygun süspansiyon yapılır, besiyerine L şeklindeki öze ile yayılır.
- 3 günlük kültürden antibiyotik duyarlılık testi uygulanır.





Kanlı agarda üç günlük kültür

➤Kültürdeki *H. pylori* suşları **sarmal formda** olmalı, kokoid olmamalı.

CLSI standartlarına göre uygulanacak agar dilüsyon testi



Besiyeri: Mueller – Hinton agar (MHA) + % 5
koyun kanı

İnokulum: SF içinde hazırlanmış 2 Mc Farland'a (1×10^7 - 1×10^8 CFU/ml) uygun bulanıklıkta
süspansiyondan, 1-3 μ L damla, antibiyotik
içeren plaklara

İnkübasyon: 35°C'de 3 gün, mikroaerofilik
atmosfer

CLSI standartlarına göre uygulanacak agar dilüsyon testi

Kalite kontrol için kullanılacak;

standart suş: *H. pylori* ATCC® 43504

H. pylori NCTC® 11637

MİK aralıkları: µg/ml

Amoksisilin:	0.016 – 0.12
Klaritromisin:	0.016 – 0.12
Metronidazol:	64 – 256
Tetrasiklin:	0.12 – 1.0



Avrupa *H. pylori* çalışma grubunun agar dilüsyon testi için önerileri

Besiyeri: Mueller – Hinton agar (MHA) + % 5 koyun kanı veya at kanı

İnokulum: SF içinde hazırlanmış 4 Mc Farland'a (1×10^9 CFU/ml) uygun bulanıklıkta süspansiyondan, 1-3 µL damla, antibiyotik içeren plaklara

İnkübasyon: 37°C'de 3 gün, mikroarofilik ortam

Avrupa *H. pylori* çalışma grubunun agar dilüsyon testi için önerileri

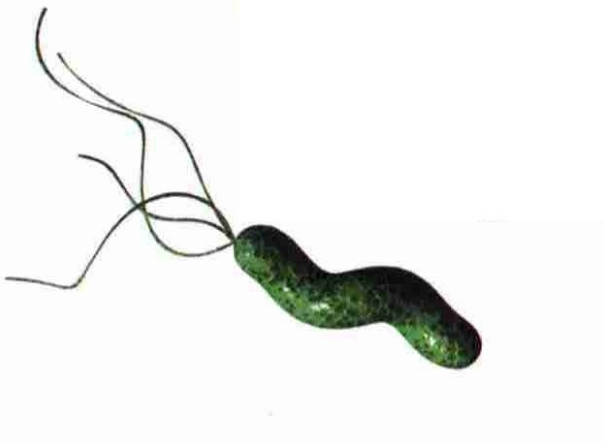
Kalite kontrol için kullanılacak;

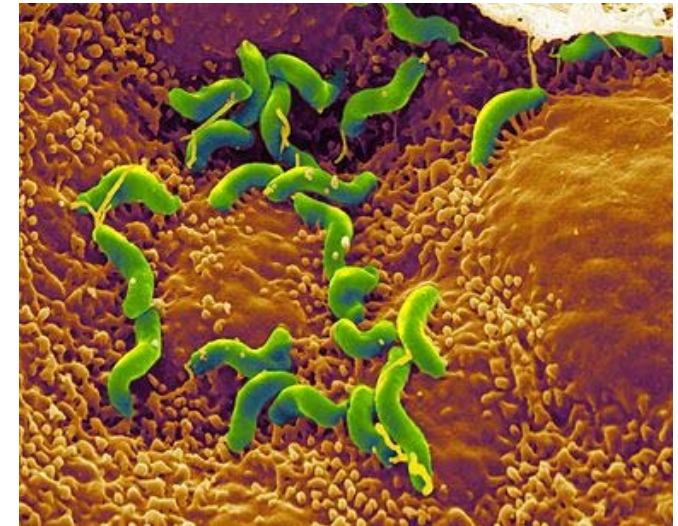
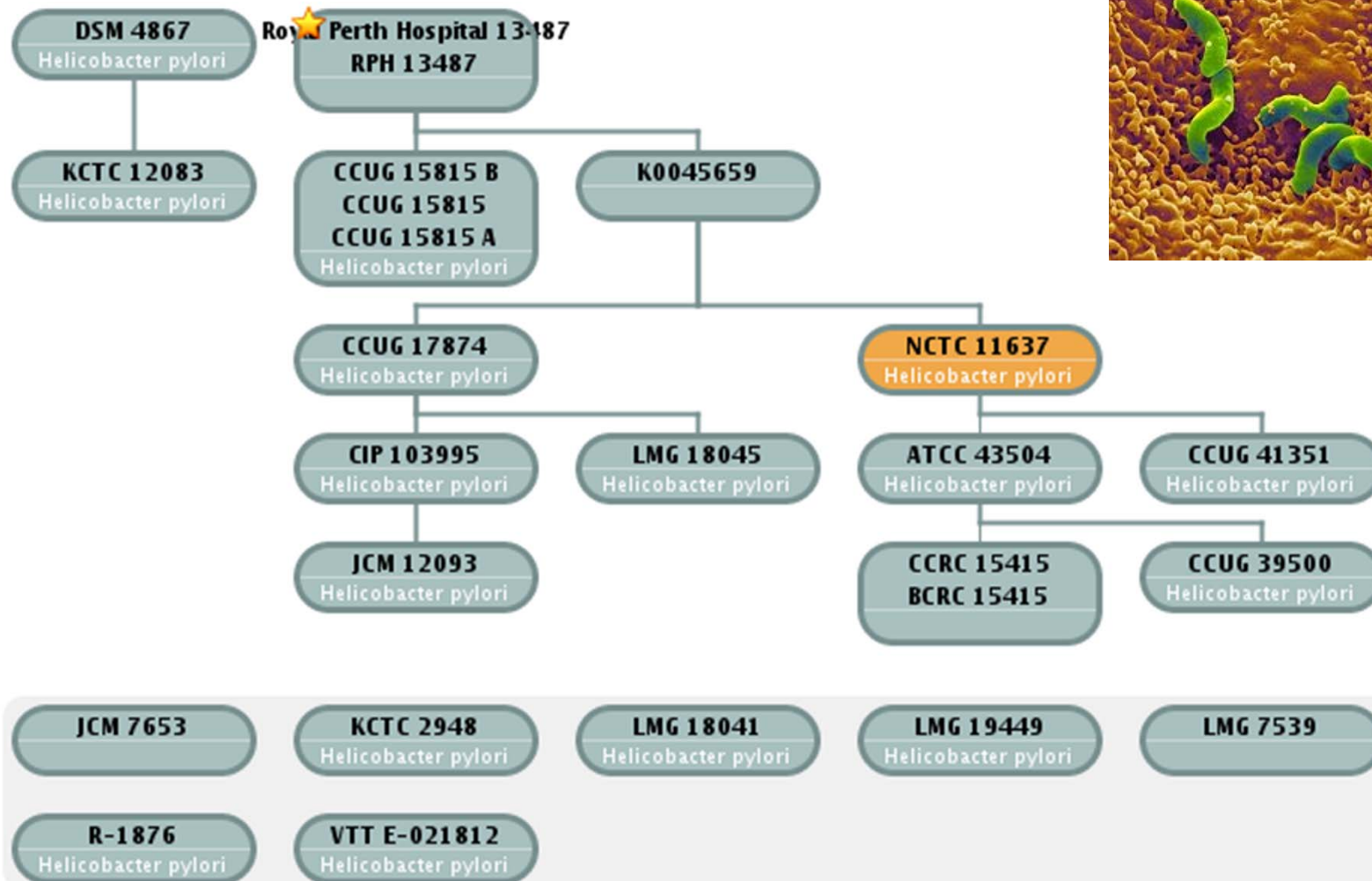
standart suş: *H. pylori* NCTC 11637

H. pylori CCUG 38770

H. pylori CCUG 38771

H. pylori CCUG 38772



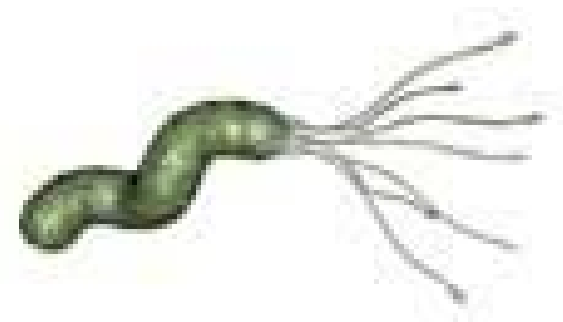


Histri for NCTC 11637 - © 2012/4 StrainInfo.net

<http://www.straininfo.net/strains/49235>

Agar dilüsyon testi

- ❖ FDA onaylı bir antibiyotik duyarlılık testi
- ❖ Çok miktardaki *H. pylori* suşunun antibiyotik duyarlılığını çalışmak için ideal ve standart bir yöntem
- ❖ Uygulaması zor
 - ❖ Kontaminasyon
 - ❖ Mikroaerofil



E-test

Besiyeri: Mueller – Hinton agar (MHA) + % 5 kan
Columbia kanlı agar
İzosensitest kanlı agar



İnokulum: Buyyon içinde hazırlanmış 3 Mc
Farland'a uygun bulanıklıkta
süspansiyondan, tüm agar yüzeyine
yayılır

Uygulama: 90 mm plaklara bir tek strip

İnkübasyon: 35°C'de 3 gün, mikroarofilik ortam

E-test

- ❖ FDA onayı olmayan bir antibiyotik duyarlılık testi

- ❖ BSCA (The British Society for Antimicrobial Chemotherapy)

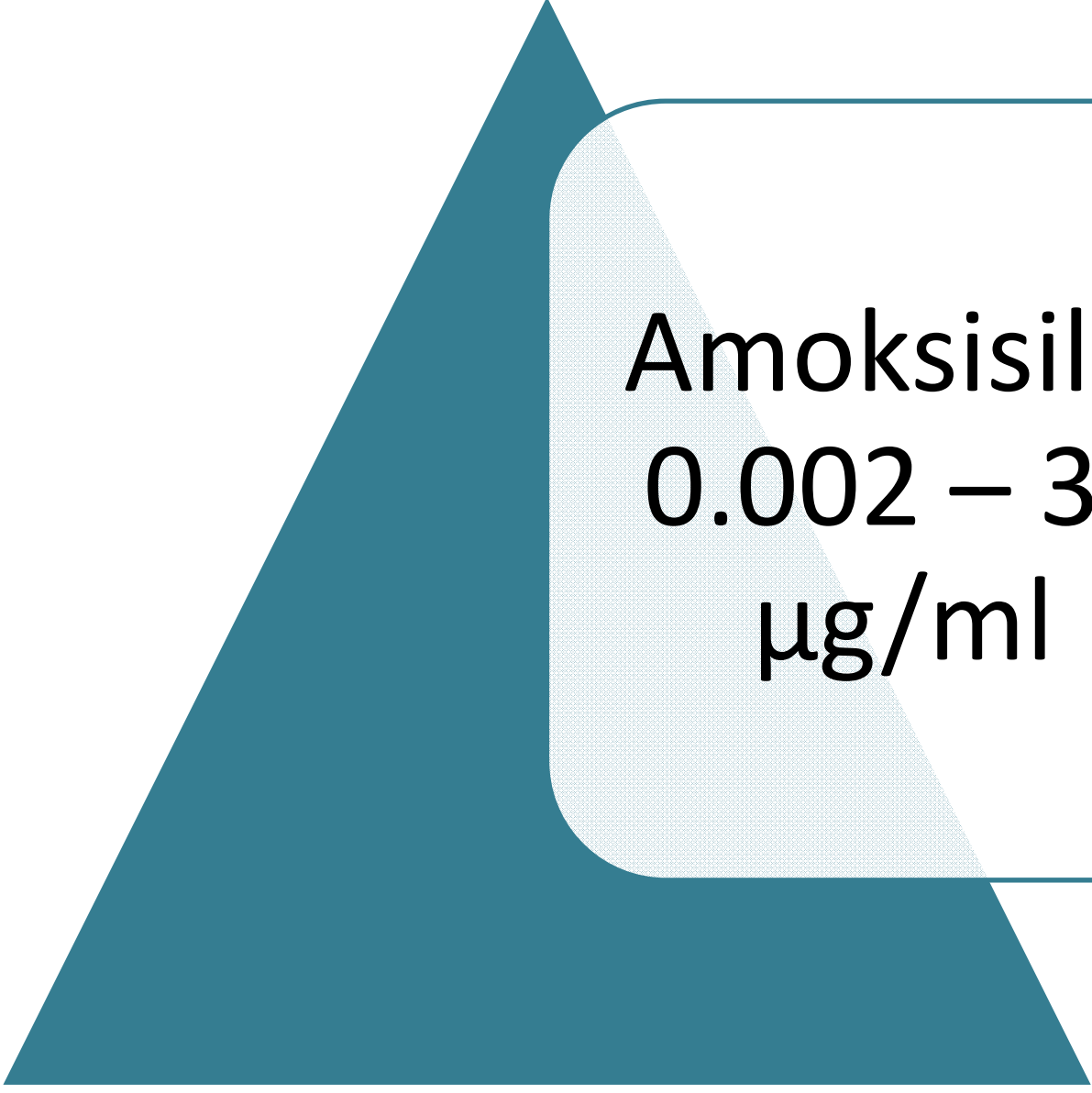
- ❖ EHSB (European Helicobacter Pylori Study Group)

- ❖ Tek tek olgularda *H. pylori* suşunun antibiyotik duyarlılığını çalışmak için ideal bir yöntem

- ❖ Uygulaması kolay

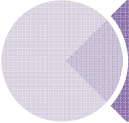
- ❖ Pahalı





Amoksisilin
0.002 – 32
μg/ml

E – test MiK aralıkları $\mu\text{g/ml}$

	Klaritromisin ≥ 1
	Metronidazol = 8
	Amoksisilin = 0.5
	Levofloksasin = 0.5
	Tetrasiklin = 1
	Rifampin = 1

Biofilm Demolition and Antibiotic Treatment to Eradicate Resistant *Helicobacter pylori*: A Clinical Trial

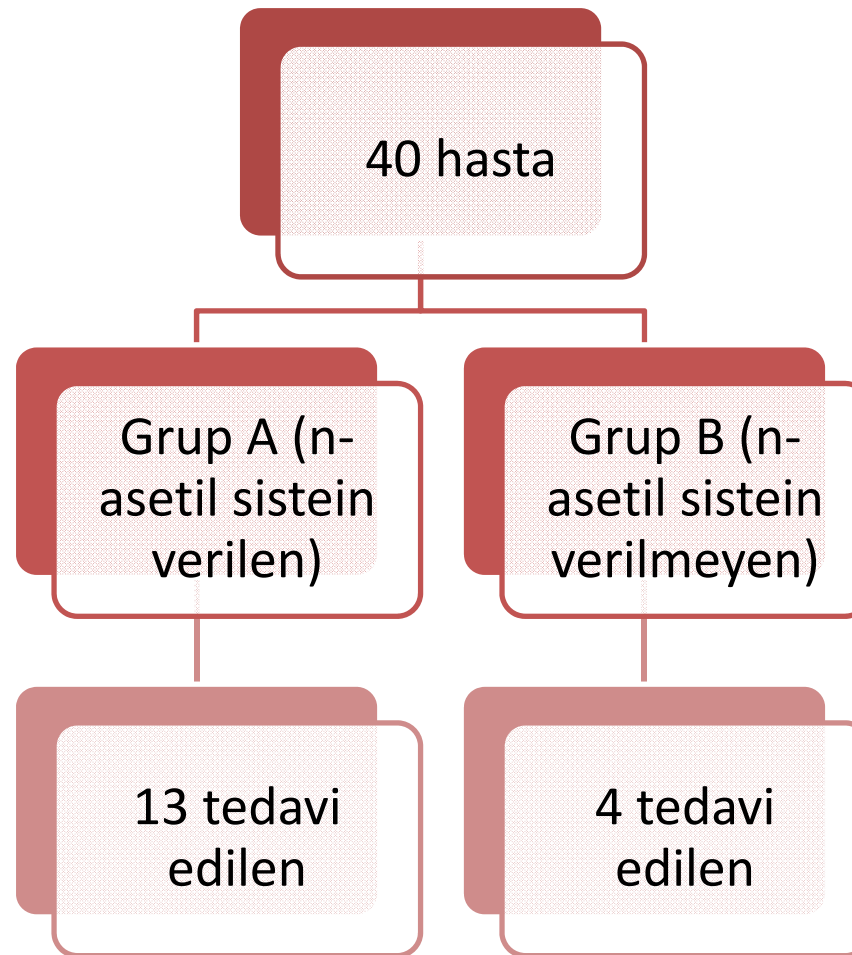
Helicobacter pylori gastrik mukozaya tutunup biyofilm olarak ürer. (*J. Bacteriol.* 2004, 186(10):3124.)

Antibiyotiklerden korunmasını sağlar.

Amaç:N-asetil sistein ile biyofilm yok edilmesi ve antibiyotik direncinin üstesinden gelinmesi.

En az 4 *H pylori* eradikasyon başarısızlığı

Tedavi antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre verildi, sonuçlar üre nefes testi ile kontrol edildi.



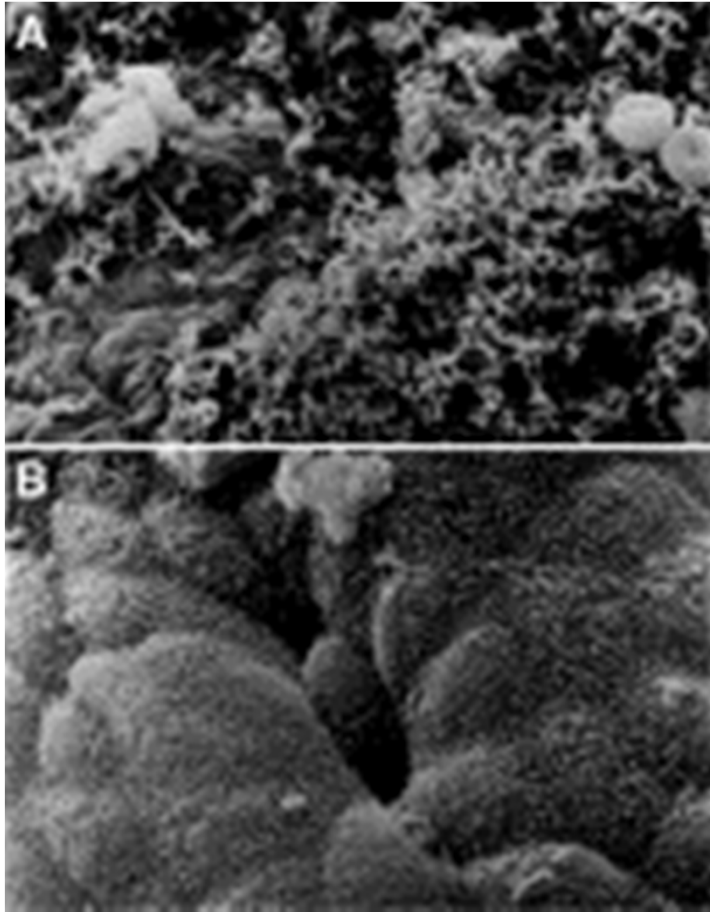


Figure 1. (A) Scanning electron micrograph of gastric mucosal surface covered in a blanket of biofilm before the treatment. (B) Biofilm disappearance after *H. pylori* eradication.

[Cammarota, G. Clin Gastroenterol Hepatol](#) 8, 2010, 817–820.

H. pylori'de klaritromisin direncini saptamak için moleküler testler

23S rRNA gen amplifikasyonu gerekenler

- Sequencing, pyrosequencing
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- OLA (Oligonucleotide Ligation Assay)
- DEIA (DNA Enzyme Immunoassay)
- INNO-LiPA (Line Probe Assay)
- 3' mismatch PCR
- PHFA (Preferential Homoduplex Assay)
- Real-time PCR FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-MCA (Melting Curve Analysis)
- DG-DGGE (Double Gradient-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

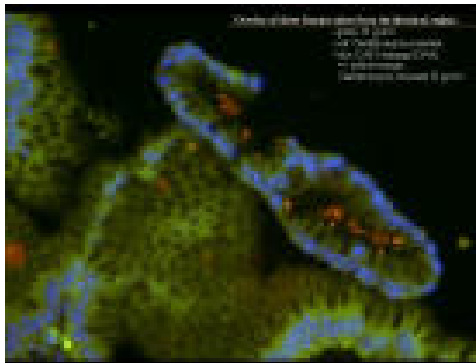
Amplifikasyon gerekmeyen

- FISH assay (Fluorescence *in situ* Hybridization assay)

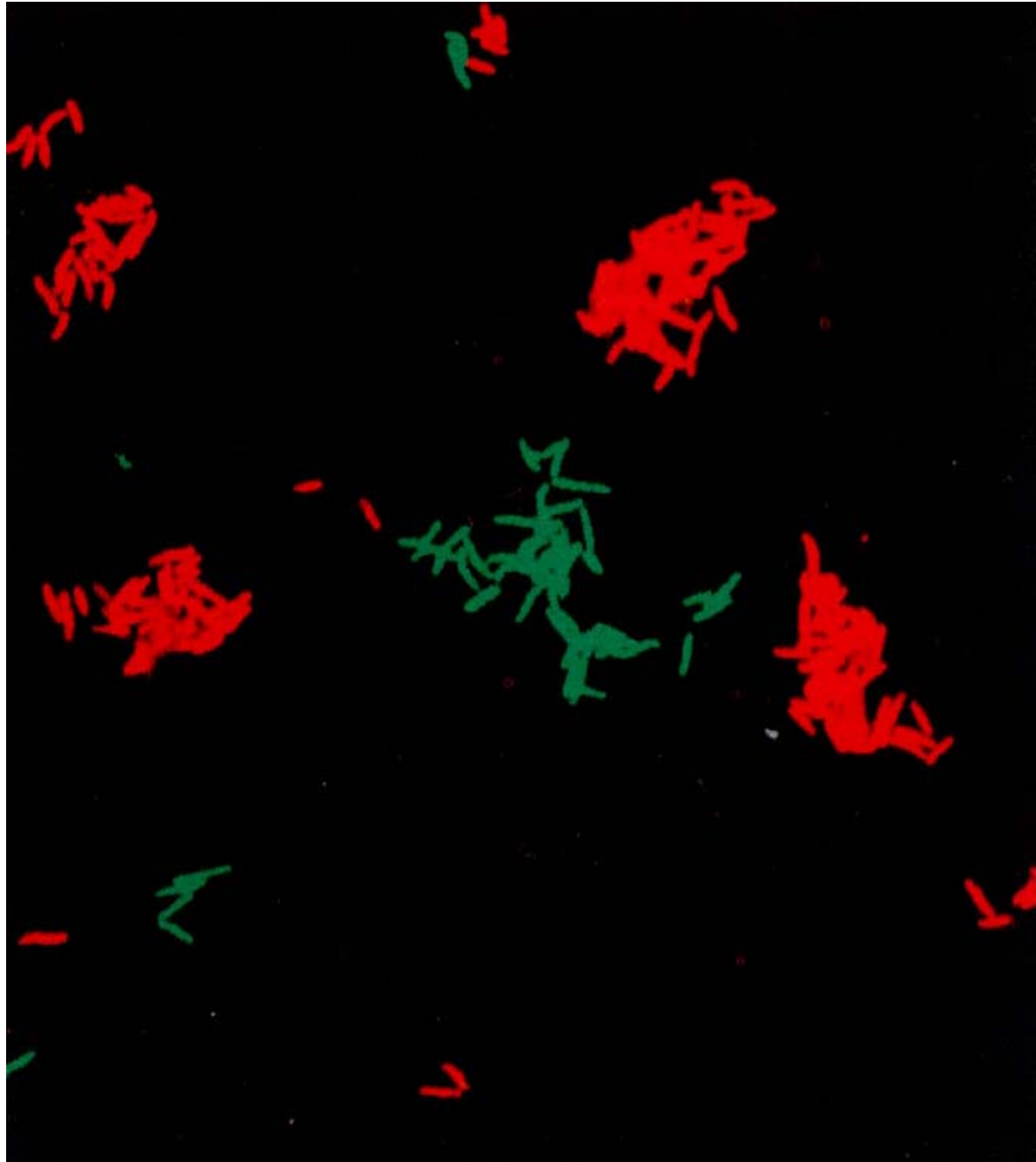
FISH assay

Bir çift floresan işaretli oligonükleotid prob kullanılır (16S rDNA veya 23S rDNA)

**Yöntem → hibridizasyon
yıkama
Floresan mikroskopta gözlem**



Trebesius, Gut 2000, 46: 608-14

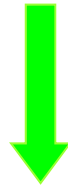


Real-time PCR FRET MCA

Biyopsi

1 saat

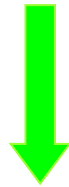
DNA eldesi



DNA

45 dakika

PCR (gerçek zamanlı)



Nokta mutasyonu saptanması ve tanımlama

Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies

Stephanie A. Chisholm, Robert J. Owen*

Gastrointestinal, Emerging, and Zoonotic Infections Department, Centre for Infections, Health Protection Agency, London, UK

Received 21 August 2007; accepted 4 December 2007

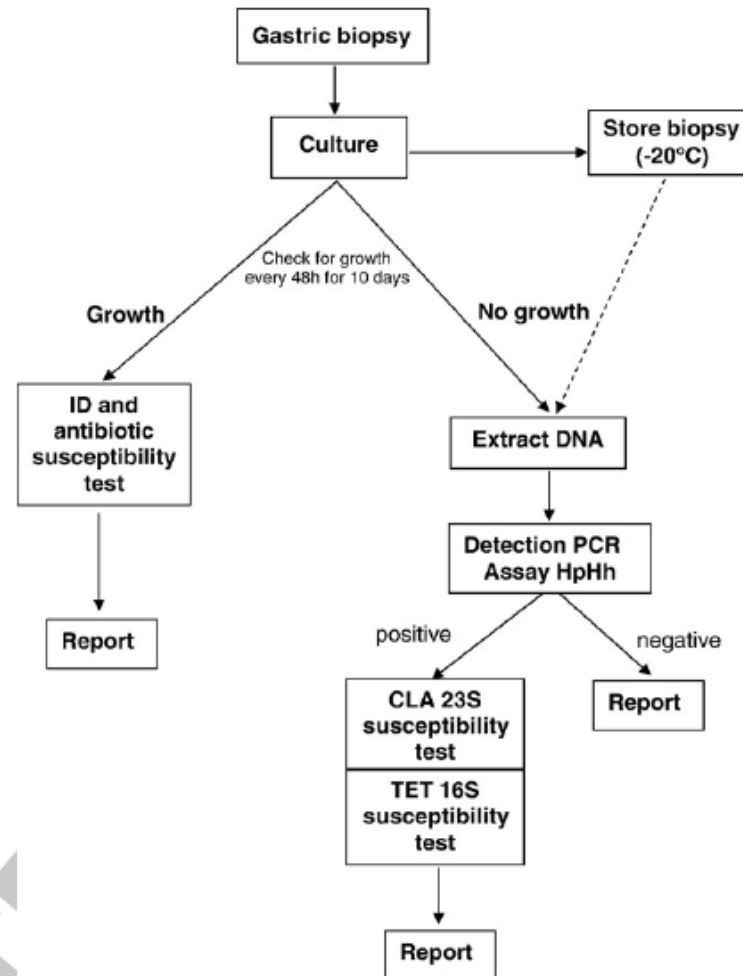


Fig. 1. Algorithm for investigating gastric biopsies for *H. pylori* either by culture or by PCR molecular testing as part of a routine laboratory service.

Evaluation of a New Test, GenoType HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*[▽]

Emmanuelle Cambau,^{1,2*} Vera Allerheiligen,³ Céline Coulon,¹ Céline Corbel,² Christine Lascols,¹ Lionel Deforges,^{1,2} Claude-James Soussy,^{1,2} Jean-Charles Delchier,^{1,4} and Francis Megraud^{5,6}

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2009, p. 3600–3607

VOL. 47, 2009

MOLECULAR DETECTION OF RESISTANCE IN *H. PYLORI* 3603

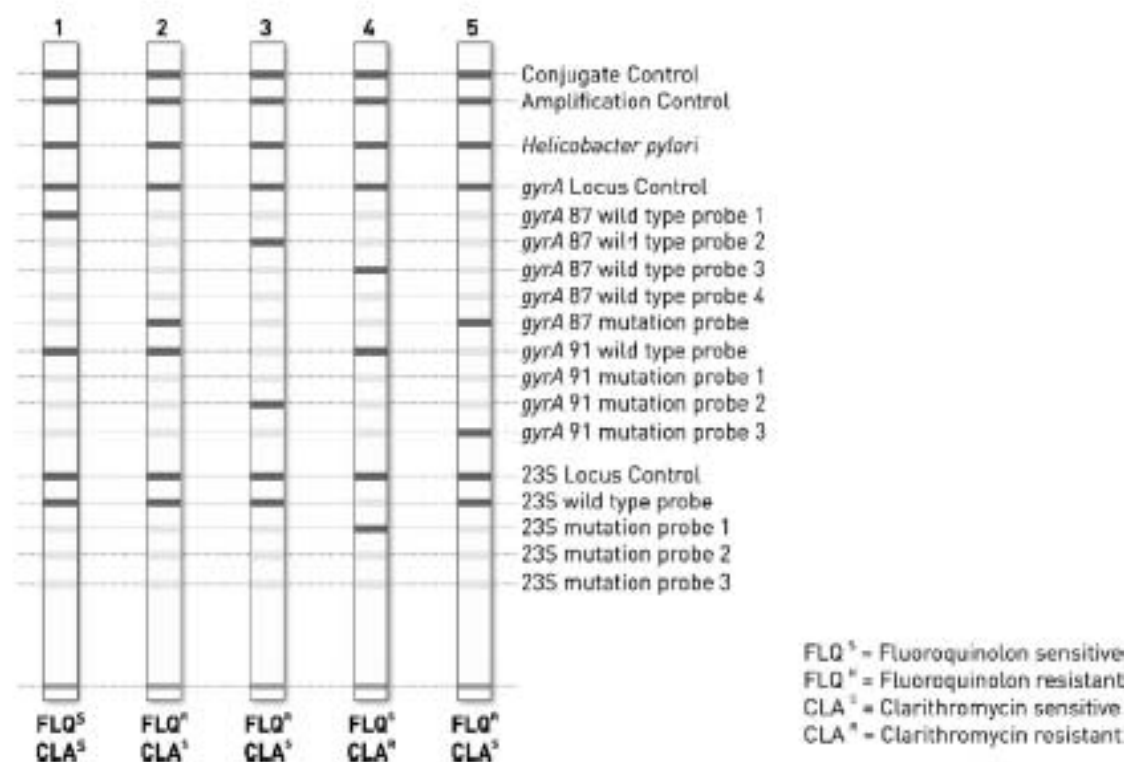


FIG. 1. Prototype of the strip of the GenoType HelicoDR test. Lane 1, *gyrA* pattern with a wt1 codon at position 87, a wt codon at codon 91, and a wild-type *ml* pattern; lane 2, *gyrA* pattern with a MUT codon at position 87, a wt codon at codon 91, and a wild-type *ml* pattern; lane 3, *gyrA* pattern with a wt2 codon at position 87, a MUT2 codon at position 91, and a wild-type *ml* pattern; lane 4, *gyrA* pattern with a wt3 codon at position 87, a wt codon at position 91, and a MUT1 *ml* mutation; lane 5, double mutation in *gyrA* with mutation at both 87 (MUT) and 91 (MUT3) and a wild-type *ml* pattern.

Metronidazol direnci

- Avrupa → %14.9-40
- Avusturya → % 22.9
- ABD → %22-37
- Brezilya → %53
- Meksika → %76
- Asya → %9-77
- Alaska → % 42
- Polonya → % 46
- **Türkiye → %47.7**

Klaritromisin direnci

- Avrupa → %1.7-27.5
- Avusturya → % 34
- ABD → %4-15
- Brezilya → %9.8
- Meksika → %25
- Asya → %1-13.8
- Polonya → %28 (ç) %15 (e)
- Alaska → % 30 (2011)
- Portekiz → %39.4 (çocuk)
- **Türkiye → %27.6-30.9**

Amoksisilin direnci

Avrupa → %0.2- 0.6

Kore → %8.8-18.8

İran → % 2.4

Alaska → % 2

Kim et al. J Clin Gastroenterol 2006; 40: 683-687

Kim et al. Int J Ant Agents 2006; 28: 6-13

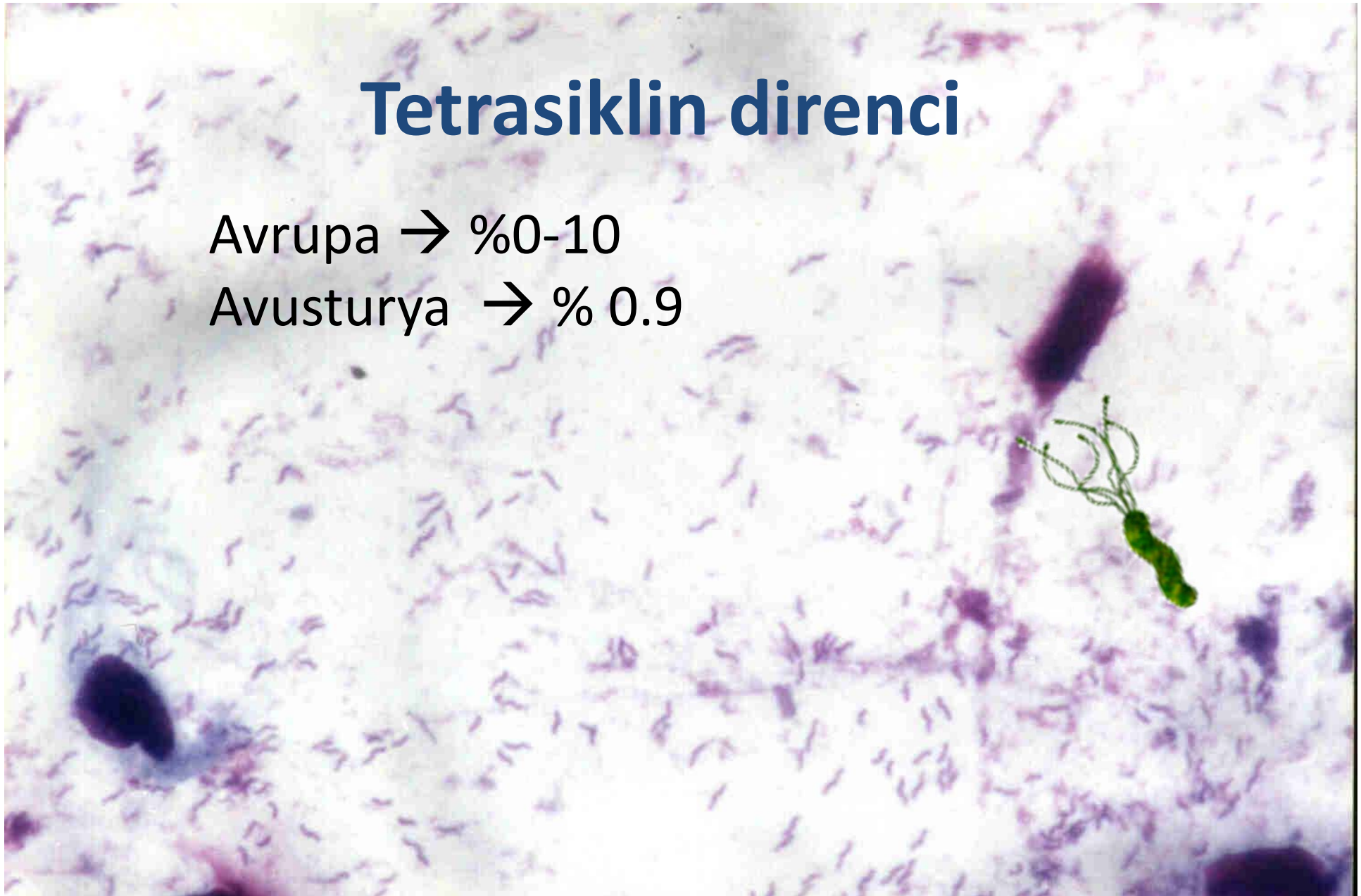
Shorkrzadeh et al. Saudi J Gastroenterol 2011; 17: 261-264

Tveit et al. J Clin Microbiol 2011; 3638-3643

Tetrasiklin direnci

Avrupa → %0-10

Avusturya → % 0.9



Florokinolon direnci

- Avrupa % 3.9-20
- Kore % 20
- Japonya % 15
- İtalya % 14
- Çin (Pekin) % 55.7 (%26.6)
- Tayvan % 2.8 (1998-2003), %11.8 (2004-2007)
- Alaska % 19



Furozolidon direnci

Avrupa → % 0-5

H. pylori'de Heterodirenç

Aynı hastada antimikrobiyal ajana duyarlı ve dirençli suşlar!!!

- i. Karışık enfeksiyon (farklı izolatlar)
- ii. Aynı suşun duyarlı ve dirençli varyantları
 - Koloni olarak birbirine bağlı suşlar:
 - **Intra-niş** → duyarlı ve dirençli izolatlar gastrik mukozada aynı yerde bulunur
 - **İnter-niş** → mide içinde farklı anatomik bölgelerde dirençli ve duyarlı izolatların bulunması → direncin farkına varılmaması





CONFLICT OF INTEREST

Speaker: Günsel Kutluk

Chair Person:

Session Title:

**SEQUENTIAL THERAPY VERSUS STANDARD TRIPLE
THERAPY FOR *HELICOBACTER PYLORI* ERADICATION
IN CHILDREN: ANY ADVANTAGE IN CLARITHROMYCIN-
RESISTANT STRAINS?**

Co-Authors: Aykut Bayrak, Burcu Volkan, Yakut Akyön,
Çiğdem Çelikel, Ender Pehlivanoğlu, Deniz Ertem

Tedavi

- almamış

Yaş aralığı

- 3-18

Ortalama
yaş

- 12.2 ± 3.5

139 örnek

68 biyopsi

71 parafin
blok

9 negatif

22 negatif

108 (+)

gyrA
mutasyonu

23S RNA
mutasyonu

10 % 9.3

33 % 30.5

88 suş (fenotipik)

MTZ

47 D

% 53.4

CL

18 D

% 20.5

42 çocuk örneği

MTZ

20 D

% 47.6

CL

9 D

% 21.4

46 erişkin örneği

MTZ

27 D

% 58.7

CL

9 D

% 19.6

Çocuk hastalarda primer klaritromisin direnci ve genotipik değerlendirmesi

Yaş aralığı

- 5 – 19

93

- Kültür +
- PCR +

59

- Fenotipik direnç +
- Genotipik direnç +

Klaritromisin dirençli

59

• % 63.4

15 (primer
direnç)

• % 25.4

Klaritromisin direnci

- 23S rRNA (2 kopya)
 - 2142, (MIK değerleri daha yüksek)
 - 2143 baz değişiklikleri.
 - A→G sık,
 - A→C ender

➤ A2115G

➤ G2141A

➤ T2717C

❖ G2224A

❖ C2245T

❖ T2289C

Primer dirençli suşların dizi analizi ön sonuçları

15 hasta suşu üretildi.

7 hasta suşu rastgele seçildi.

Purifiye edildi.

5 hasta suşu dizi analizine alındı.

Helicobacter pylori NCTC 11637 standart suşu kontrol olarak çalışmaya alındı.

Dizi analizi sonuçları

					
A2142G A2143G G2141A A2116G G2224A T2289C	A2142G T2289C	A2142G A2143G	A2142G A2143G	A2142G A2143G	MUTASYON YOK

**RETROSPECTIVE EVALUATION OF *HELICOBACTER PYLORI* CLARITHROMYCIN
RESISTANCE IN CHILDREN BY REAL-TIME PCR**

Age Groups	0-6	7-12	13-18	Total
Years	Total no. of strains	Total no. of strains	Total no. of strains	Total no. of strains
	(% Resistance)	(% Resistance)	(% Resistance)	(% Resistance)
2003	1(0)	12(18.2)	0(0)	13(18.2)
2004	11(22.2)	54(21.3)	12(36.4)	77(25.4)
2005	9(37.5)	83(28.8)	24(22.7)	116(28.1)
2006	12(42.8)	57(28.6)	26(44.4)	95(33.8)
2007	5(0)	50(23.1)	33(18.2)	88(19.2)
2008	4(0)	43(69.6)	47(54.5)	94(60.9)
Total	42(27.6)	299(30.5)	142(34.7)	483(31.4)

2009

- 122 *H. pylori* pozitif
- 102 Klaritromisin dirençli % 83.6
- 28 DUYARLI/DİRENÇLİ

2010

- 18 pozitif
- 14 dirençli
- 2 duyarlı/dirençli

Alpaslan Alp, Yakut Akyön Yılmaz

Levofloksasin

- 19 hasta
- Tedavi almamış
- E - test
- 2 erişkin (56, 49)
- 2 çocuk (16,17)
- 4 hastada direnç

Sonuç



- ✓ Agar dilüsyon toplu olarak çalışılacak suşlarda, yayınlar için, standartlara uygun olarak uygulanmalı.
 - ✓ Hastalarınızın *H. pylori* suşlarının antibiyotik paterni için aralıklı olarak uygulanmalı.
- ✓ E-test tek tek suşlar için kullanılabilir.
- ✓ Moleküler yöntemler; klaritromisin ve florokinolonlar için geliştirilmiş durumda, kontrollü kullanılmalı.





<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	1.6	? — ?	Idebenone
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.001 — ?	KRM-1657
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.004 — ?	Rifalazil (ABI-1648, KRM-1648)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.1 — ?	FNQ13
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.13 — ?	Rabeprazole sodium thioether
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.25 — ?	Lansoprazole
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.25 — ?	Metronidazole (Flagyl)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.25 — ?	Rabeprazole sodium
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.25 — ?	Rifampicin (Rifampin)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	0.5 — ?	Clarithromycin (Biaxin)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	1.6 — ?	1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	2.074 — ?	Garlic (Essential oil) (DAS)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	3 — 6	Garlic (Essential oil) (DATTS)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	6 — ?	Garlic (Essential oil) (Allicin)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	8 — 16	Garlic (Essential oil)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	8 — ?	Omeprazole
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	13 — ?	Garlic (Essential oil) (DATS)
<i>Helicobacter pylori</i> (NCTC 11637)	-	-	100 — ?	Garlic (Essential oil) (DADS)





TEŞEKKÜR EDERİM...