

GASTRO-İNTESTİNAL YAKINMASI OLAN HASTALARDA GRAM BOYAMA, ÜREAZ VE KÜLTÜR TESTLERİ İLE *HELICOBACTER PYLORI* VARLIĞININ BELİRLENMESİ

DETECTION OF *HELICOBACTER PYLORI* IN PATIENTS WITH GASTROINTESTINAL COMPLAINTS BY GRAM STAIN, UREASE TEST AND CULTURE

Neşe KAKLIKKAYA¹ Kıvanç ÇUBUKÇU¹ Yelda YAZICI¹ Orhan ÖZGÜR²
Abdülkadir REİS³ Hayriye BALTAOĞLU¹ Faruk AYDIN¹

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Trabzon

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Gastroenteroloji Bilim Dalı

³ Patoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: *Helicobacter pylori*, Gram boyama, üreaz, kültür, endoskopik bulgular, mide biyopsisi
Key Words: *Helicobacter pylori*, Gram stain, urease, culture, endoscopic findings, gastric biopsy

ÖZET

Bu çalışmada; gastro-intestinal yakınmalarla başvuran 200 olgunun (98 kadın, 102 erkek) antral biyopsi örneklerinde Gram boyama, üreaz ve kültür yöntemleri ile *Helicobacter pylori* pozitifliğinin belirlenmesi ve endoskopik bulgulara göre *H. pylori* saptama oranlarının karşılaştırılması amaçlandı. Gram boyama ile %49, üreaz ile %35, kültür ile %39.5 *H. pylori* pozitifliği saptandı. Yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri, sırasıyla; Gram boyama için %98.7 ve %83.4, üreaz testi için %77.2 ve %92, kültür için %87.1 ve %99 olarak bulundu. Endoskopik bulgularına göre en fazla duodenal ülserli hastalarda (%72.7) *H. pylori* varlığı saptandı. Normal bulgular gözlenen hastalarda bu oran %33.3 olarak bulundu. Sonuç olarak üreaz testi ve kültürün uygulanmasındaki çeşitli güçlüklerden dolayı Gram boyamanın en uygun hızlı tanı metodu olarak kullanılabileceği söylenebilir.

SUMMARY

In this study, detection of *Helicobacter pylori* by Gram staining, urease test and culture in antral biopsies of 200 subjects (98 females and 102 males) with gastrointestinal symptoms and determination of the rate of *H. pylori* presence according to endoscopic findings were aimed. *Helicobacter pylori* was determined in 49% by Gram staining, 35% by urease test and 39.5% by culture. The sensitivities and specificities of Gram staining, urease test and culture method were found as follows, respectively: 98.7% and 83.4%, 77.2% and 92%, 87.1% and 99%. According to the endoscopic findings, the presence of *H. pylori* was the highest (72.7%) in patients with duodenal ulcer. This ratio was found as 33.3% in patients with normal endoscopic findings. In conclusion; based on the various difficulties of using urease test and culture, Gram stain was found to be the best suited rapid method if used by the well-experienced.

GİRİŞ

Helicobacter pylori infeksiyonu dünyada en sık rastlanan gastro-intestinal bakteri hastalığıdır (1). Gelişmekte olan ülkelerde populasyonun %70-90'ı *H. pylori* ile infektidir

ve insanlar genellikle bu mikro-organizma ile hayatın ilk 10 yılında karşılaşmaktadırlar (2). Bu bakteri; Gram-negatif, mikro-aerofilik, üreaz üreten bir mikro-organizma olup gastrik mukozada kolonize olabilme ve burada uzun

süre kalabilme yeteneğindedir (3). *Helicobacter pylori* gastrik epitel hücre yüzeyi ve üzerini örten mukus tabakası arasında yerleşir (4). İnsanlarda kronik yüzeysel gastrit, kronik aktif gastrit, duodenal ülserasyon, kronik gastrit sonrası gelişen adenokarsinoma, gastrik non-Hodgkin lenfoma ve gastrik mukozal lenfoit doku lenfomasi gelişimine neden olduğu kanıtlanan bir bakteridir (5).

İlk olarak 1982 yılında *H. pylori*'nin tanımlanmasından sonra bakteriyi saptamak için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler invazif (üreaz, kültür, histoloji ve polimeraz zincir reaksiyonu için biyopsi alınmasına yönelik endoskopi gerektiren) veya noninvazifdir (*H. pylori*'ye karşı gelişen antikorları test etmeye dayalı veya üre soluk testi) (6). Henüz altın standart bir testin olmayışından dolayı *H. pylori* infeksiyonlarının tanısında ve eradikasyon tedavisinin izlenmesinde biyopsiye dayalı testler hala referans yöntem olarak kullanılmaktadır (7). Klinik çalışmalar ve hastaların klinik takibinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğünden dolayı endoskopi ile alınan örneklerle uygulanan testlerden en az ikisinin birarada kullanılması önerilmektedir (8).

Bu çalışmada gastro-intestinal yakınmalarla hastaneye başvuran hastaların yapılan endoskopileri sonucu elde edilen biyopsi örneklerinde *H. pylori* pozitifliğinin belirlenmesi, kadın-erkek dağılımının saptanması, Gram boyama, üreaz testi ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması ve endoskopik bulguların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Gastroenteroloji Polikliniği'ne Şubat 2002-Ağustos 2002 tarihleri arasında gastro-intestinal sistemle ilgili yakınmalarla başvuran ve yapılan muayeneleri sonucu endoskopi indikasyonu konan 200 olgu alındı. Uzman bir gastroenterolog tarafından Pentax EG-2940 video endoskop kullanılarak yapılan üst gastro-intestinal endoskopi ile antral bölgeden beş biyopsi örneği alındı.

Alınan biyopsi örnekleri steril serum fizyolojik içerisinde gönderildi. Biyopsi örneklerinden biri en geç altı saat içerisinde %5-7 insan kanı, 10 mg/l vankomisin, 5 mg/l trimetoprim ve 1 mg/l amfoterisin B içeren Brucella agar (Merck) besiyerine ekildi. Kültürler mikro-aerofilik ortamda 37° C'de 72-96 saat inkübe edildi. Süre sonunda 1 mm çapındaki şeffaf kolonilerden Gram boyama, hızlı üreaz, oksidaz ve katalaz testleri yapıldı. Gram-negatif, spiral morfolojiye sahip, hızlı üreaz aktivitesi gösteren, oksidaz ve katalaz pozitif olan bakteriler *H. pylori* olarak belirlendi. İkinci biyopsi örneğinden iki tane preparat hazırlandı. Gram boyama yöntemi ile boyanarak immersiyon mikroskopu ile incelendi ve Gram-negatif, kokoit, spiral veya martı kanadı görünümü oluşturan çomakların görülmesi ile *H. pylori* pozitif olarak kabul edildi. Üçüncü biyopsi

örneği ise üreaz testi için son konsantrasyonu %2 olacak şekilde üre içeren katı besiyeri [Christensen urea agar base (Merck)] içine batırıldı ve 30 dakika içerisinde pembe renk oluşması ile üreaz pozitif olarak değerlendirildi. Diğer iki biyopsi örneği histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderildi.

Gram boyama ve doku üreazı için kültür pozitifliği, kültür için diğer iki testin beraber pozitifliği geçerli test alınarak testlerin duyarlılık ve özgüllükleri "receiver operating characteristic (ROC)" tablosundan yararlanılarak hesaplandı (9).

BULGULAR

Gram boyama, üreaz ve kültür yöntemlerinden en az birinde pozitiflik saptandığında *H. pylori* pozitif olarak değerlendirildi. İkiyüz olgunun 99'unda (%49.5) *H. pylori* saptandı.

Çalışmaya alınan 200 olgunun cinsiyet dağılımı ve cinsiyetin *H. pylori* varlığı ile ilişkisi Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Olguların cinsiyet ve *H. pylori* varlığına göre dağılımı

	Kadın		Erkek	
	Olgu sayısı	%	Olgu sayısı	%
<i>H. pylori</i> (+)	42	42.9	57	55.9
<i>H. pylori</i> (-)	56	57.1	45	44.1
Toplam	98	100	102	100

$$\chi^2 = 3.39, p = 0.066$$

Gastrik biyopsi örneklerinden yapılan Gram boyama, üreaz ve kültür yöntemleri karşılaştırıldı. Tüm olguların %49'unda Gram boyama, %35'inde üreaz ve %39.5'inde kültür ile *H. pylori* varlığı saptandı. *Helicobacter pylori* saptanan 99 olgunun 61'inde her üç testte aynı anda pozitiflik elde edildi.

Kültür pozitifliği geçerli test olarak alındığında; Gram boyama ve üreaz testlerinin, Gram boyama ve üreaz testlerinin beraber pozitifliği geçerli test alındığında kültür testinin duyarlılık ve özgüllükleri belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Gram boyama, üreaz ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması

	<i>H. pylori</i> (+)	<i>H. pylori</i> (-)	Duyarlılık	Özgüllük
	Sayı	Sayı	%	%
Gram boyama	98	102	98.7	83.4
Üreaz testi	70	130	77.2	92
Kültür	79	121	87.1	99

Yapılan endoskopi sonucu elde edilen verilere göre *H. pylori* pozitifliği karşılaştırıldı (Tablo 3). İkiyüz olgunun

111'inde (%55.5) gastrit ve/veya duodenit, dokuzunda (%4.5) gastrik ülser, 22'sinde (%11) duodenit ülseri, 43'ünde (%21.5) özofajit, altısında (%3) gastrik kanser ve dokuzunda (%4.5) normal endoskopik bulgular saptandı. Bu bulgular histopatolojik bulgularla karşılaştırılarak doğrulandı.

Tablo 3. Endoskopik bulguların *H. pylori* varlığı yönünden değerlendirilmesi

Endoskopik bulgular	<i>H. pylori</i>				Toplam
	Pozitif	%	Negatif	%	
Duodenum ülseri	16	72.7	6	27.3	22
Kanser	4	66.7	2	33.3	6
Gastrit ve/veya duodenit	56	50.4	55	49.6	111
Gastrik ülser	4	44.4	5	55.6	9
Özofajit	16	37.2	27	62.8	43
Normal	3	33.3	6	66.7	9
Toplam	99		101		200

TARTIŞMA

Bu çalışmada; gastro-intestinal yakınmaları sonucu gastrik biyopsi alınan 200 olgunun %49.5'inde *H. pylori* saptanmıştır. Kadın ve erkek olgulardaki *H. pylori* pozitifliği değerlendirildiğinde, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aladağ ve ark. (10)'nın yaptıkları bir çalışmada, olguların %66'sında *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Aynı çalışmada kadın ve erkek olgular arasında *H. pylori* pozitifliği açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Monteiro ve ark. (6) yaptıkları çalışmada, bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde, olguların %45.5'inde *H. pylori* pozitifliği göstermişlerdir. Köseahmet ve ark. (11) ise *H. pylori* varlığını %71.2 olarak saptamışlar, cinsiyetler arasında *H. pylori* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmada Gram boyama, üreaz ve kültür ile sırasıyla %49, %35 ve %39.5 oranlarında *H. pylori* saptanmıştır. Gram boyama yöntemi diğer yöntemlere göre daha başarılı bulunmuştur. Aydın ve ark. (12) Gram boyama ile %76.92, kültür ile %53.80 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Laheij ve ark. (7) 869 biyopsi örneğinden 325'inde (%37.4) mikroskopik, 347'sinde (%39.9) üreaz testi ve 337'sinde (%38.7) kültür ile *H. pylori* saptamışlardır. Farklı yöntemlerle farklı pozitiflik oranlarının görülmesi, *H. pylori*'nin yama tarzında lezyonlar oluşturması ve hastalardan farklı bölgelerden alınan her üç biyopsi örneğinden üç testin aynı anda yapılmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda kültür pozitifliğinin özgüllüğü ve duyarlılığı %100'lere varan oranlarda bildirilmiştir. Aynı çalışmalarda histolojik yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü %90-100, üreaz testinin duyarlılık ve özgüllüğü %80-90

olarak bulunmuştur (6, 8, 13). Buna göre, bu çalışmada *H. pylori* tanısında en güvenilir yöntem olarak kabul edilen kültür pozitifliği geçerli test olarak alındığında, Gram boyamanın duyarlılığı %98.7 ve özgüllüğü %83.4, üreaz testinin duyarlılığı %77.2 ve özgüllüğü %92 olarak saptanmıştır. Aydın ve ark. (14) Gram boyamanın duyarlılığını %73.6 ve özgüllüğünü %42.8 olarak bulmuşlardır. Gram boyama özellikle yoğun kolonize örneklerde kısa sürede tanı koydurucu kolay ve ucuz bir yöntemdir. Bu konuda deneyimli kişiler tarafından inceleme yapılması bu testin güvenilirliğini artırmaktadır (15).

Helicobacter pylori'nin üreaz aktivitesinin belirlenmesinde çeşitli ticari test kitleri kullanılabilir. Bu testlerin duyarlılığı %88-93, özgüllüğü %99-100 olarak bildirilmiştir (16). Bu çalışmada, ticari kitlerden ucuz olması ve kolay hazırlanabilmesi nedeniyle Christensen urea agar kullanılmıştır. Büke ve ark. (17)'nin yaptıkları çalışmada; Stuart'ın %10'luk üre sıvı besiyeri kullanılmış, duyarlılığı %90 ve özgüllüğü %96 olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada (10); %20 dextroz ve %0.5'lik agar içeren üreli besiyerine homojenize edilerek hazırlanan biyopsi örnekleri ekilerek yapılan üreaz testinde duyarlılık %80.3 ve özgüllük %85.2 olarak saptanmıştır.

Helicobacter pylori'nin üretilmesi için özel atmosferik koşullara ve zengin besiyerlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bakterinin çeşitli faktörlerden kolaylıkla etkilenebilmesi nedeni ile laboratuvara taşınma ve ekim yapıncaya kadar süre içerisinde canlılığını yitirmesi de söz konusu olabilir (18). Bu çalışmada, üreaz testi ve mikroskopinin birlikte pozitifliği baz alındığında, kültürün duyarlılığı %87.1 ve özgüllüğü %99 olarak bulunmuştur. Aladağ ve ark. (10) kültürün duyarlılığını %51.51, özgüllüğünü %100; Laheij ve ark. (7) bu oranları sırasıyla % 91.4 ve %96.3; Aydın ve ark. (14) ise sırasıyla %63.4 ve %100 olarak saptamışlardır.

Helicobacter pylori'nin duodenal ülserde major etyolojik ajan olduğu düşünülmektedir (5). Endoskopik bulgusu duodenum ülseri olarak saptanan olguların %72.7'sinde *H. pylori* saptanmıştır. Sadr ve ark. (19) duodenal ülserli hastalarda bu oranı %86.6, Büke ve ark. (17) da %95 olarak bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada gastrik ülserli hastalarda *H. pylori* pozitifliği duodenal ülserli olgulara göre belirgin bir şekilde az (%44.4) olarak bulunmuştur. Sadr ve ark. (19)'nın çalışmasında böyle bir fark gözlenmezken Büke ve ark. (17), bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde, gastrik ülserlerde daha düşük oranda (%63) saptamışlardır. Literatürde bu verilerle uyumlu olarak gastrik ülser patogeneğinde duodenal ülserde göre *H. pylori* dışındaki faktörlerin daha fazla rol oynadığı öne sürülmüştür (20).

Helicobacter pylori ve özofajit arasındaki ilişki oldukça komplekstir ve tam olarak anlaşılamamıştır. Reflü ösefajitli olgularda *H. pylori*'nin prevalansı düşük bulunmuştur (21). Bu çalışmada da, uyumlu olarak, bu oran %37.2 olarak saptanmıştır.

Endoskopik bulgu olarak gastrit ve/veya duodenit saptanan, normal endoskopik bulgular görülen ve mide kanseri tanısı konulan olgularda, sırasıyla, %50.4, %33, %66 oranlarında *H. pylori* saptanmıştır. Buke ve ark. (17) antral gastritli olgularda %90, antral gastrit ve bulbitte %77, atrofik gastritte %37, normal olgularda %50 oranında

bulmuşlardır. Sadr ve ark. (19) üst gastro-intestinal sistem kanserli hastaların %69.6'sında *H. pylori* saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada literatürle uyumlu olarak, *H. pylori*'nin başta duodenal ülser, gastrik kanser, gastrit ve duodenit olmak üzere birçok gastro-intestinal patolojide etkin rol oynadığı görülmüştür. Ancak normal endoskopik bulguları olan bireylerde de bulunabilmektedir. *Helicobacter pylori* tanısında kullanılan ucuz, kolay uygulanabilen ve kısa sürede sonuç alınan bir yöntem olan Gram boyama yöntemi güvenilir bir yöntem olarak görülmektedir. Ancak kültür ve üreaz testi gibi diğer testlerle birlikte değerlendirilmesi tanı koyma değerini artıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Kikuchi S, Wada O, Nakajima T, et al. Serum anti-*Helicobacter pylori* antibody and gastric carcinoma among young adults. *Cancer* 1995; 75: 2789-93.
2. Taylor D, Personnet J. Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infections. In: Blaser MJ, Smith PF, Ravdin J, Greenberg H, Guerrant RL, ed. *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 1995: 551-64.
3. Kolts BE, Joseph B, Achem SR, Bianchi T, Monteiro C. *Helicobacter pylori* detection: a quality and cost analysis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 650-5.
4. Gur G, Boyacioglu S, Demirhan B, et al. The importance of increasing the number of gastric biopsies in the diagnosis of *Helicobacter pylori* Hepato-Gastroenterology 1998; 45: 2219-23.
5. Kaklıkkaya N, Çubukçu K, Aydın F, Yetişkul S, Yazıcı Y, Kapıcıoğlu S. Gastrik biyopsi örneklerinden *Helicobacter pylori*'nin belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonunun önemi. *İnfek Derg* 2001; 15: 307-10.
6. Monteiro L, Mascarel de A, Sarrasqueta AM, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 353-8.
7. Laheij RJF, Boer WA, Jansen JBM, et al. Diagnostic performance of biopsy-based methods for determination of *Helicobacter pylori* infection without a reference standard. *J Clin Epidemiol* 2000; 53: 742-6.
8. Pajares-Garcia JM. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive methods. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 320-3.
9. McNeil BY, Hanley JA. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Med Decision Making* 1984; 4: 137-40.
10. Aladağ A, Akgün Y, Şahintürk V, Gürer F, Sarçam T. *Helicobacter pylori* saptanmasında modifiye Brown-Brenn Gram boyama yönteminin yeri. *Mikrobiyol Bül* 1996; 31: 1-11.
11. Köseahmet F, Aydın F, Çetinarslan B, Bakır T, Bingöl R. *Helicobacter pylori* (HP)'nin antral mukoza biyopsilerinde belirlenmesi. *İnfek Derg* 1993; 7: 303-7.
12. Aydın F, Katırcıoğlu İ, Köseahmet F, Bakır T, Bingöl R. Antral kronik gastritte *Helicobacter pylori* (HP) izolasyonun gastrit şiddetine göre sıklığı. *İnfek Derg* 1995; 9: 47-8.
13. Fidan I, Türet S. *Helicobacter pylori* infeksiyonunda patogenezi ve tanı. *İnfek Derg* 1999; 13: 455-60.
14. Aydın F, Köseahmet F, Katırcıoğlu İ, Albayrak L, Çalık A, Bingöl R. Antral mide biyopsi örneklerinde *Helicobacter pylori*'nin (HP) belirlenmesinde kullanılan bazı yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1994; 24: 176-8.
15. Kyle EB, Pevra DA. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 105-15.
16. Dun BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-41.
17. Buke AÇ, Günhan C, Günşar F, Alkanat MB, Aydın A, Özütmez Ö. Mide ve duodenum hastalıklarında *Helicobacter pylori*'nin doku üreaz, kültür ve histopatoloji yöntemleri ile araştırılması. *İnfek Derg* 1998; 12: 61-4.
18. Han SW, Flamm R, Hachem CY, et al. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 349-52.
19. Sadr YE, Köksal F, Sandıkcı M ve ark. Mide hücre metapilazisi ile karakterize hastalarda *Helicobacter pylori* insidensinin kültür ve serolojik yöntemlerle saptanması. *İnfek Derg* 1995; 9: 49-54.
20. Laine L. *Helicobacter pylori*, gastric ulcer and agents noxious to the gastric mucosa. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 117-25.
21. Günşar F, Aydın A, Ersöz G ve ark. *Helicobacter pylori* eradikasyonundan sonra gastroözofajial reflü sendromu. *Türk J Gastroenterol* 1999; 10: 411-8.