

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

KEDİ VE KÖPEKLERDE *HELICOBACTER PYLORI*'NİN DOT-  
IMMUNOBINDING ASSAY VE POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYONU İLE TEŞHİSİ

DOKTORA TEZİ

DİLEK ÖZTÜRK

DANIŞMAN  
PROF. DR. OSMAN ERGANİŞ

KONYA-2004

157572

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**KEDİ VE KÖPEKLERDE *HELICOBACTER PYLORI*'NİN DOT-  
IMMUNOBİNDİNG ASSAY VE POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYONU İLE TEŞHİSİ**

DOKTORA TEZİ

DİLEK ÖZTÜRK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 07.05.2004 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

(S.B.E. Yön. Kur.Tarih ve No:.....)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Osman ERGANİŞ (Danışman).....  
Prof. Dr. Osman KAYA.....  
Prof. Dr. Mehmet ATEŞ.....  
Prof. Dr. Kürşat TURGUT.....  
Doç. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU.....

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	3
3. MATERYAL VE METOT .....	29
3. 1. MATERYAL .....	29
3. 1. 1. Hayvan Materyali .....	29
3. 1. 2. Deneme Hayvanları .....	29
3. 1. 3. Referens Suş .....	29
3. 1. 4. Besiyerleri.....	29
3. 1. 5. Endoskop .....	30
3. 1. 6. Dot-Immunobinding Assay (DIA) Testi'nde Kullanılan Malzemeler.....	30
3. 1. 6.1. Nitrosellüloz membran .....	30
3. 1. 6. 2. Konjugat .....	30
3. 1. 6. 3. Substrat .....	30
3. 1. 6. 4. Stop Solüsyonu .....	30
3. 1. 6. 5. Sulandırma ve Yıkama Solüsyonları .....	30
3. 1. 6. 6. Pozitif ve Negatif Serumlar .....	30
3. 1. 7. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Malzemeler .....	31
3. 1. 7. 1. Lizis Buffer.....	31
3. 1. 7. 2. Fenol:Kloroform:İsoamilalkol .....	31
3. 1. 7. 3. Na-asetat .....	31
3. 1. 8. DNA Amplifikasyonu'nda Kullanılan Malzemeler.....	31
3. 1. 8. 1. Thermal cyclers .....	31
3. 1. 8. 2. Primerler .....	31
3. 1. 8. 3. Taq Polimeraz.....	31
3. 1. 8. 4. Deoxynucleotide set.....	31
3. 1. 8. 5. Film.....	31
3. 1. 8. 6. Marker .....	32
3. 1. 8. 7. Pozitif ve Negatif Kontrol .....	32
3. 2. METOT .....	32
3. 2. 1. Endoskopi'nin Yapılışı.....	32
3. 2. 2. Direk Mikroskopik Muayene.....	32
3. 2. 3. Kan Örneklerinin Alınması .....	32
3. 2. 4. Besiyerinin Hazırlanması.....	33

3. 2. 5. Gastrik Helikobakter Türlerinin İzolasyonu .....	33
3. 2. 6. Biyokimyasal Testler .....	33
3. 2. 6. a. Oksidaz Testi .....	33
3. 2. 6. b. Katalaz Testi .....	34
3. 2. 6. c. Üreaz Testi .....	34
3. 2. 6. d. Direk Üreaz Testi.....	34
3. 2. 7. Hiperimmün Serum Eldesi İçin Antijen Hazırlanması .....	34
3. 2. 8. Hiperimmün Serum Hazırlanması .....	35
3. 2. 9. Dot Immunobinding Assay Test Antijeninin Hazırlanması .....	35
3. 2. 10. Dot-İmmunobinding Assay Testi (DIA) 'nin Yapılışı.....	35
3. 2. 11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR) .....	36
3. 2. 11. 1. DNA Ekstraksiyonu.....	36
3. 2. 11. 2. DNA Amplifikasyonu.....	36
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>37</b>
4. 1. Klinik Bulgular .....	37
4. 2. Bakteriyolojik Bulgular .....	37
4.2.a. Direk Mikroskopik Muayene.....	37
4.2.b. Direk Üreaz Testi.....	38
4. 3. Seroloji .....	38
4. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	39
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>42</b>
<b>6. ÖZET .....</b>	<b>49</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>51</b>
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>53</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>66</b>
<b>10. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>67</b>
<b>11. EKLER .....</b>	<b>68</b>

## KISALTMALAR

VacA	Vacuolating Cytotoxin A
CagA	Cytotoxic associated gen A
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DIA	Dot-Immunobinding Assay
NCM	Nitrosellüloz Membran
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopi
SEM	Scanning Elektron Mikroskop
EM	Elektron Mikroskop
BHIA	Brain Hearth Infusion Agar
BHIB	Brain Hearth Infusion Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
IL-8	Interleukin 8
LAT	Lam Aglütinasyon Testi
SAT	Serum Aglütinasyon Testi
CFT	Komplement Fikzasyon Testi
UBT	Üre Solunum Testi
mSAT	Mikro Serum Aglütinasyon Testi
PBS	Phosphate Buffer Solüsyonu
PBS-T	% 0.05 Tween-20 içeren Phosphate Buffer Solüsyonu
TP	Total protein
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBPT	Rose-Bengal Plate Testi
DNA	Deoxyribonükleik Asit
PCI	Fenol:Kloroform:İsoamilalkol
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. <i>Helicobacter</i> türlerinin bulunduğu konakçılar, yerleştiği organlar ve oluşturduğu hastalıklar.....	6
Tablo 2. 4. Kedi ve köpeklerde gastrik helikobakterlerin varlığında meydana gelen histopatolojik değişiklikler.....	13
Tablo 3. 1. 1. <i>Helicobacter</i> türlerinin izolasyonunda biyopsi örneklerinin alındığı bölgeler ve sayısı.....	29
Tablo 4. 1. Köpeklere ait mide örneklerinden izole edilen bakteriler.....	37
Tablo 4. 2. Kedi ve köpeklerde midenin değişik bölgelerine göre mikroskopik inceleme (gram boyama) ve direk üreaz test sonuçları .....	38
Tablo 4. 3. Kedi ve köpeklerde mide materyallerinin alındığı bölgeye göre PZR sonuçları.....	39
Tablo 4. 4. Köpeklerde helikobakterlerin kültür, direk üreaz testi, mikroskopik muayene, DIA ve PZR sonuçları.....	39
Tablo 4. 5. Köpeklerde beş farklı teşhis yönteminin birlikte karşılaştırılması.....	40

## GİRİŞ

*Helicobacter* türleri, insan ve çeşitli hayvanların sindirim sistemine yerleşen spiral şekilli mikroorganizmalar olup, insan ve hayvanlarda varlığı uzun zamandır bilinmektedir (Yıldırım 1996, Diker 1997, Fox ve Lee 1997). Bu mikroorganizmalar insanlarda gastritis, peptik ülser ve mide adenokarsinomunun bir nedeni olarak gösterilmişlerdir (Tytgat ve ark 1991, Strauss-Ayali ve ark 1999). Önceleri *Campylobacter* olarak isimlendirilen gastrik spiral bakteri daha sonra *Helicobacter* olarak tanımlanmış ve *Campylobacter*'lerden rRNA dizisi, tipik yağ asidi dizisi (*metylated menaquinone-6* bölgesi *H. pylori*'de yoktur), kuvvetli üreaz üretimi, kılıflı flagellaya sahip olması gibi özelliklerle ayrılmışlardır (Lee ve ark 1992, Jenkins ve Basset 1997).

İnsanlarda *Helicobacter pylori* ve gastrik hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesiyle, benzer mikroaerofilik mikroorganizmalar araştırılmış ve *Helicobacter* cinsi içinde birçok mikroorganizma türü (*H. felis*, *H. bilis* vs) tanımlanmıştır. Günümüze kadar insan ve hayvanlarda 29 *Helicobacter* türü belirlenmiştir (Melito ve ark 2001, Gueneau ve Goer 2002). İnsanlardaki önemi bilinmesine rağmen, kedi ve köpeklerde *Helicobacter* türleri ve gastrik hastalıklar arasındaki ilişki hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Köpek midesinde bulunan helikobakterler, *Helicobacter felis*, *H. heilmannii* (*Gastrospirillum hominis*), *H. bizzozeronii*, *H. bilis* ve *Flexispira rappini*, *H. salomonis* kedilerde ise; *H. felis*, *H. pylori* ve *H. heilmannii* olarak bildirilmiştir (Eaton ve ark 1996, Simpson ve Burrows 1997, Jalava ve ark 1998).

İnsanlarda helikobakterler üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunurken, kedi ve köpek helikobakterleri hakkında oldukça az çalışma bulunmaktadır (Eaton ve ark 1996, Happonen ve ark 1996b, Cattoli ve ark 1999, Jalava ve ark 1999, Strauss-Ayali ve ark 1999).

*H. pylori* dışkı, salya, dental plak ve sudan izole edildiği için, fekal-oral, oral-oral bulaşmanın olabileceğinden yola çıkılarak zoonoz olabileceği düşünülmüştür (Dolar ve ark 1992, Hulten ve ark 1996, Li ve ark 1996, Jenkins ve Basset 1997, Malathy ve ark 2000, Park ve ark 2001). Ancak *H. pylori*'nin kedi, köpek gibi hayvanlardan insanlara, eğer varsa, bulaşma yolu hala bilinmemektedir (El-Zaatari ve ark 1997, Jenkins ve Basset 1997, Vandenplass 1999). *H. pylori* sağlıklı ve enfekte köpeklerden izole edilememiş (Jalava ve

ark 1998, Cattoli ve ark 1999, Strauss-Ayali ve ark 1999), ancak deneysel olarak enfeksiyon oluşturulan köpeklerden izolasyon yapılmıştır (Rossi ve ark 1999).

Bu araştırma, insanlarda gastrit, peptik ülser ve mide kanserinden sorumlu tutulan, yüksek oranda mortalite ve morbiditeye sebep olabilen ve potansiyel zoonoz olması muhtemel olan *H. pylori*'nin, kedi ve köpeklerde varlığının kültür, *Dot-İmmunobinding Assay (DIA)* ve *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)* ile tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır.



}



## 2. LİTERATÜR BİLGİ

Helikobakterler, insan ve hayvanların sindirim sistemine yerleşen çok sayıda türü (*H. pylori*, *H. felis*, *H. heilmannii*, *H. pametensis*, *H. mustelae*, *H. fenellinae*, *H. nemestrinae*, *H. canis* vs) içermektedir (Otto ve ark 1994). Günümüzde *H. pylori*'nin, gastrointestinal patojen olarak insanlarda kronik gastritis, duodenal gastritis ve gastrik kansere neden olabileceği bildirilmiştir (Dunn ve ark 1997). Gastrik ülserlerin % 60-80'inin ve duodenal ülserlerin % 90'ının nedeni olarak *H. pylori* gösterilmektedir (Lee 1996, Mazari-Hiriart ve ark 2001).

İnsanlarda *H. pylori* ile gastrik hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinden itibaren benzer ilişkilerin hayvanlarda da olabileceği düşünülerek, bu mikroaerofilik bakterilerin varlığı hayvanlarda da araştırılmaya başlanmıştır. Helikobakteriozisin insanlardaki önemi bilinmesine rağmen, kedi ve köpeklerde *Helicobacter* türleri ile gastrik hastalıklar arasındaki ilişkiye dair çok az bilgi bulunmaktadır (Jenkins ve Basset 1997, Simpson ve Burrows 1997). İnsan ve hayvanlarda, pH'sı düşük olduğu için steril bir organ olarak düşünülen mideye, gastrik spiral bakterilerin kolonize olduğu belirlenmiştir (Fox ve Lee 1997).

İnsanlarda ilk gastrik spiral mikroorganizmalar Bottcher tarafından 1874'de tanımlanmıştır. 1881'de Rappini bir köpeğin midesinde spiral şekilli mikroorganizmaların varlığını belirlemiş ve bunları "*Spirillum rappini*" olarak isimlendirmiştir. Daha sonra 1893'de Bizzozero bir köpeğin mide parietal hücreleri içerisinde spiral şekilli mikroorganizmaların bulunduğunu bildirmiştir. Salomon 1896'da köpek, kedi ve ratların midesinde spiral bakterilerin varlığını belirlemiştir. Balfour 1906 yılında gastroenteritisli köpek ve maymunların mide ve barsak ülserlerinde spiral şekilli mikroorganizmaların varlığını bildirmiştir (Jalava ve ark 1999, Strauss-Ayali ve ark 1999).

Gastrik spiral mikroorganizmalara ilgi; gastrik spiral *Campylobacter benzeri organizmalar* ile insanlardaki gastritis ve kronik peptik ülser hastalıkları arasındaki ilişkinin belirlenmesi ile başlamıştır. Bakterinin üretilmesi ile kılıflı flagellaya sahip olduğu belirlenmiş ve "*Campylobacter pyloridis*" olarak isimlendirilmiştir (Strauss-Ayali ve Simpson 1999). Taxonomik olarak *Campylobacter*lerden farklı tipik yağ asidi dizisi tesbit edilince yeni bir cins olarak ve helikal yapılarından dolayı "*Helicobacter pylori*" olarak isimlendirilmişlerdir (Dunn ve ark 1997, Fox ve Lee 1997). Helikobakterler,

*Campylobacter*lerden birkaç özelliği ile ayrılmaktadırlar (Lee ve ark 1992, Jenkins ve Basset 1997). Helikobakterler birden fazla kılıflı flagellaya sahip iken, *Campylobacter*ler bir tane kılıfsız flagellaya sahiptirler ve aynı zamanda rRNA dizisi, tipik yağ asidi profili, kuvvetli üreaz enzimi ile *Campylobacter*'lerden ayrılmaktadırlar. Bununla birlikte, katalaz ve oksidaz pozitifliği, karbonhidratları fermente edememesi ve mikroaerofilik şartlara ihtiyaç duyması nedeniyle *Campylobacter*'lere benzemektedirler (Diker 1997, Fox ve Lee 1997). *H. pylori*'nin ilk izolasyonu 1982 yılında Marshall ve Warren tarafından yapılmış ve gastrik mikrobiyolojide yeni bir dönem açılmıştır (Dunn ve ark 1997). *H. pylori* enfeksiyonunun hayvan modeline uygulanma ihtiyacı, patojen ve zoonoz bir bakteri olmasından şüphelenilmesi ile başlamış, ferretler, primatlar, kedi, köpek ve çitaların midelerinden çeşitli *Helicobacter* türleri izole edilmiş ve *Helicobacter* cinsine dahil edilmiştir (Fox ve Lee 1997, Strauss-Ayali ve Simpson 1999). *H. pylori*, önemli bir insan patojeni olduğu için deneysel hayvan modelleri, artan bir şekilde patogenezis çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Fox ve Lee 1997, Rossi ve ark 1999).

Stanley ve ark (1993) sağlıklı ve ishalleri köpeklerin dışkılarından *Campylobacter* benzeri mikroorganizmalar izole etmiş, 16 S rRNA dizisine göre bunları "*Helicobacter canis*" olarak isimlendirmişlerdir. Hermanns ve ark (1995) 122 köpek ve 127 kedinin mide biopsi örneklerini histopatolojik olarak incelemiş, 122 köpeğin % 82'si ve 127 kedinin % 76'sında helikobakterlerin varlığını tespit etmişlerdir. Eaton ve ark (1996) farklı kaynaklardan gelen köpeklerin mide biopsi örneklerinden 16 S rDNA dizisine göre *H. bilis*, *H. felis* ve *Flexispira rappini*'ye benzeyen yeni bir tür tanımlamışlardır. Bu yeni izole edilen büyük ve uzun spiral şekilli bakterileri morfolojik olarak "*Gastrospirillum*" olarak isimlendirmişlerdir. Happonen ve ark (1996b) gastrik helikobakterleri teşhis etmek amacıyla 10 köpek ve 10 kedinin mide biopsi örneğini mikroskopi, hızlı üreaz testi ve histolojik olarak incelemişler, mikroskopik olarak tümünde gastrik *Helicobacter* benzeri mikroorganizmaları tanımlarken direk üreaz testi ile köpeklerin corpus örneklerinin % 100, fundus örneklerinin % 95 ve antral örneklerinin % 62'sinde, histolojik olarak da köpeklerin fundus ve korpus örneklerinin tümünde antral örneklerin %74'ünde pozitiflik saptamışlardır. Yıldırım (1996) köpeklerde helikobakterlerin varlığını tespit etmek için 75 köpekte yapmış olduğu çalışmada, 2 adet *H. felis* suşu izole ederken, *H. pylori* izolasyonu bildirilmemiştir. Happonen ve ark (1998) helikobakterlerin prevalansını ve kolonizasyonunu, midedeki histolojik değişiklikleri 25 sağlıklı ve 21 hasta köpekte kültür, üreaz test, histolojik inceleme ve Transmisyon Elektron Mikroskopi (TEM) ile belirlemek

amacıyla yaptıkları çalışmada sağlıklı köpeklerin 6'sında (% 24) *H. bizzozeronii*, 2'sinde (% 8) *H. solomonis*, 1'inde (% 4) *H. felis*, gastritisli 6 köpeğin 2'sinde (% 33) *H. bizzozeronii*, 1'inde (% 16) *H. felis* izole etmiş, histolojik incelemede ise tüm köpeklerin pozitif olduğunu saptamışlardır. Jalava ve ark (1998) 95 köpek ve 22 kedide yaptıkları çalışmada, köpeklerden 21 *H. bizzozeronii*, 8 *H. felis*, 8 *H. salomonis*, 3 karışık kültür, 2 *Flexispira rappini* benzeri mikroorganizma ve 3 adet henüz isimlendirilememiş bakteri suşu ve kedilerden 3 *H. felis* suşu izole etmişlerdir.

Cattoli ve ark (1999) 25 köpeğin mide biopsi örneğini alarak, Gram boyama, kültür, SDS-PAGE, TEM ve PZR ile incelemiş, 25 köpeğin 23'ünde bakteriyoskopik olarak *Helicobacter* benzeri mikroorganizmaları tespit etmiş ve 23 köpeğin sadece 5'inden izolasyon yapmış, 4'ünün *H. felis* ve 1'inin *H. bizzozeronii* olduğunu bildirmişlerdir. Strauss-Ayali ve ark (1999) sağlıklı ve gastrik helikobakterler ile enfekte toplam 101 köpekten biopsi ve serum örnekleri alarak bunları üreaz, serolojik testler, PZR, immunoblot ve histopatolojik teknikler ile incelemiş *H. felis* ve *H. bizzozeronii*'nin varlığını ortaya koymuşlardır. Diker ve ark (2002) *Helicobacter* türlerinin köpek midelerindeki prevalansını belirlemek için 122 köpekte yaptıkları çalışmada 103 köpekte gastrik bakteriler tespit edilmiş, 6' sından (% 4.9) *H. felis* izolasyonu bildirmişlerdir.

*Helicobacter* türleri memeliler ve kuşların sindirim sisteminden de izole edilebilmiştir (Fox ve Lee 1997). *Helicobacter* cinsi, 16 S rRNA gen dizisine göre ayırt edilebilen çok sayıda türü içerebilir. *Helicobacter* cinsi içinde yer alan türler; *H. bilis* (köpek), *H. felis* (kedi, köpek ve insan), *H. pylori* (insan, kedi), *H. mustalae* (ferret, mink), *H. nemestrinae* (makak), *H. canis* (köpek, insan), *H. heilmannii* (insan, kedi, köpek, yabani hayvanlar, çita), *H. acinonyx* (çita), *H. salomonis* (köpek) *H. muridarum* (rodent), *H. cinaedi* (hamster, insan), *H. fennellinae* (köpek, insan), *H. hepaticus* (fare), *H. pametensis* (yabani kuş, domuz), *H. pullorum* (tavuk), *H. bizzozeroni* (köpek), *H. cholecysticus* (Suriye hamsteri), *H. aurati* (Suriye hamsteri), *Candidatus H. bovis* (inek), *H. canadensis* (insan), *H. ganmani* (laboratuvar faresi), *H. mesocricetorum* (Suriye hamsteri), *Candidatus H. suis* (domuz), *H. suncu* (Ev musk shrew) *H. cetorum*, *H. trogontum* (rat), *H. winghamensis* (insan), *H. typhlonicus* (laboratuvar faresi), *H. marmotae* (woodchuck, kedi), *H. mainz* (insan), *H. westmadii* (insan) dir (Eaton ve ark 1996, Diker 1997, Jalava ve ark 1998, Weir ve ark 1999, Melito ve ark 2001, Gueneau ve Goër 2002, Harper 2002). Taxonomisi

tamamlanmayan “*Flexispira rappini*” (koyun, fare, köpek, insan) 16 S rRNA dizisine göre *Helicobacter* cinsi içinde yer almaktadır (Dewhirst ve ark 1997).

**Tablo. 2. 1. *Helicobacter* türlerinin bulunduğu konakçılar, yerleştiği organlar ve oluşturduğu hastalıklar (Eaton ve ark 1996, Diker 1997, Jalava ve ark 1998, Weir ve ark 1999, Melito ve ark 2001, Gueneau ve Goër 2002, Harper 2002).**

Gastrik bakteriler	Hayvan	Yerleştiği organ	Enfeksiyon
<i>H. pylori</i>	İnsan, kedi	Mide	Gastritis, peptik-duodenal ülser
<i>H. felis</i>	Kedi, köpek, insan	Mide	Gastritis
<i>H. heilmannii</i>	İnsan, kedi, köpek, yabani hayvanlar, çita	Mide	Gastritis
<i>H. nemestrinae</i>	Makak	Mide	Komensal
<i>H. acinonyx</i>	Çita	Mide	Gastritis
<i>H. bizzozeronii</i>	Köpek	Mide	Gastritis
<i>H. bilis</i>	Köpek	Mide	Gastritis
<i>H. salomonis</i>	Köpek	Mide	Gastritis
<i>H. mustalae</i>	ferret, mink	mide	Gastritis, peptik-duodenal ülser
<i>Candidatus H. bovis</i>	İnek	mide	Gastritis
<i>Candidatus H. suis</i>	Domuz	Mide	Gastritis
<i>H. suncus</i>	Ev musk shrew	Mide	Gastritis
<b>Nongastrik türler</b>			
<i>H. canis</i>	Köpek/ insan	Barsak	İshal
<i>H. muridarum</i>	Rat/ fare	Barsak	Komensal/ gastritis
<i>H. cinaedi</i>	Hamster/ insan	Barsak	Komensal/ proktitis, sepsis
<i>H. fennellinae</i>	Köpek/ insan	Barsak	Komensal/ ishal
<i>H. hepaticus</i>	Fare	Barsak/ karaciğer	Komensal/ hepatitis
<i>H. pametensis</i>	yabani kuş, domuz	Barsak	Komensal
<i>H. pullorum</i>	Tavuk	Barsak/ karaciğer	Komensal/ hepatit
<i>H. aurati</i>	Suriye hamsteri	Mide/ barsak	Gastritis/ ishal
<i>H. winghamensis</i>	İnsan	barsak	İshal
<i>H. canadensis</i>	İnsan	Barsak	İshal
<i>H. mesocricetorum</i>	Suriye hamsteri	Dışkı	
<i>H. cetorum</i> ,			
<i>H. typhlonicus</i>	laboratuvar faresi		
<i>H. marmotae</i>	Woodchuck/ kedi		
<i>Flexispira rappini</i>	Koyun/fare, köpek/ insan	Plasenta/barsak/barsak	Abortus/komensal/kronik enteritis
<i>H. cholecysticus</i>	Suriye hamsteri	Safra kesesi	
<i>H. westmadii</i>	İnsan	Kan	
<i>H. mainz</i>	İnsan	Kan	
<i>H. rodentium</i>			
<i>H. suncu</i>	Ev musk shrew		
<i>H. ganmani</i>	laboratuvar faresi		
<i>H. trogontum</i> (rat)	rat		

Helikobakterler gastrik ve nongastrik (enterik) bakteriler olarak ayrılırlar (Goodwin ve Worsley 1993). Mikroorganizmaların mideye kolonizasyonu için üreaz enzimi gereklidir. Gastrik helikobakterlerin tümü üreaz pozitifken, enterik olanlar üreaz pozitif veya negatif olabilirler. Enterik üreaz pozitif bakteriler genellikle midede ve asit salgılanmayan bölgelerde bulunur veya ortamı alkalileştirerek bu bölgeye yerleşirler (Gueneau ve Goër 2002).

Bugün insanlarda *H. pylori*, fırsatçı bir mikroorganizma olarak değil, patojen olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda aktif kronik gastritisin, kronik atrofik gastritise bunun da gastrik atrofi, displazi ve kansere yol açabileceği ortaya atılmakla birlikte araştırmacılar en azından *H. pylori* enfeksiyonunun hazırlayıcı neden olabileceğini ileri sürmektedirler (Özden ve ark 1992, Dunn ve ark 1997, Neiger ve Simpson 2000). Kedi ve köpeklerde bu durum biraz daha farklı olmakla birlikte, sağlıklı hayvanlardan da helikobakterler tespit edilmiş olup, enfeksiyon ile helikobakterler arasındaki ilişki tam olarak ortaya konamamıştır (Simpson ve Burrows 1997, Neiger ve Simpson 2000).

*H. pylori* dünyanın her yerinde insanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. İnsanların % 20-90'ı bünyelerinde *H. pylori*'yi bulundurmalarına rağmen, enfeksiyon bunların çoğunda subklinik seyretmektedir (Jenkins ve Basset 1997). Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori* prevalansı, gelişmiş ülkelere göre daha yüksek olup, *H. pylori* tedavisi yapılmadığı/yapılmadığı sürece artmaktadır (Vandenplass 1999). *H. pylori* ile enfekte olan insanların % 70-90'ı iki yaş civarında bakteri ile enfekte olmaktadır (Özden ve ark 1992, Dunn ve ark 1997, Özşahin ve ark 2002). Çocuklarda *H. pylori*'nin prevalansı gelişmiş ülkelerde % 10 olarak belirlenirken sosyoekonomik durumu biraz düşük olan çocuklarda bu oranın % 30-40'a ulaşabileceği bildirilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda bu oranın % 80-100 arasında değişebileceği, çocukların okul öncesi yaşta *H. pylori* enfeksiyonu ile karşılaşmalarının ailenin büyüklüğüne, yaşam şartlarına, kontamine su ve gıdalara, genetik özelliklerine bağlı olarak şekillenebileceği belirtilmiştir. Yaş ile prevalans artmakla birlikte, eğitim seviyesi düşük olanlarda prevalans yüksek iken, eğitim seviyesi yüksek olanlarda düşük olduğu bildirilmiştir (Dunn ve ark 1997, Vandenplass 1999, Jr ve Clemens 2003).

Ülkemizde *H. pylori* enfeksiyonunun çocuklarda prevalansının yüksek olduğu belirlenmiş ve toplumun mide kanseri için yüksek risk altında olduğu saptanmıştır. Geri kalmış ve gelişen toplumlarda *H. pylori* enfeksiyonunun yaşamsal bir öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Özden ve ark 1992).

Gastrik *Helicobacter* enfeksiyonlarının hayvanlardaki morbiditesi çok yüksek, mortalitesi düşüktür (Yıldırım ve İstanbulluoğlu 2002). Helikobakterler köpek, kedi, çita, ferret, domuz, insan ve primatları içeren birçok memeli türünün midesinden izole ve identifiye edilmiştir (Fox ve Lee 1997). Kedilerden yapılan postmortem sorvey

çalışmasında, 55 yavru kedinin % 70'i ve yetişkin kedilerin % 97'sinde helikobakterlerin varlığı belirlenmiştir (Otto ve ark 1994). Gastrik helikobakterlerin, kedi ve köpek midelerinde yüksek prevalansa sahip olduğu bildirilmiştir (Eaton ve ark 1996, Happonen ve ark 1996b, Happonen 1999, Neiger ve Simpson 2000). Sağlıklı kedilerde gastrik *Helicobacter* türlerinden *H. felis* ve *H. heilmanni*'nin yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmuştur (Eaton ve ark 1996, Norris ve ark 1999, Lecoindre ve ark 2000). *H. felis* ilk kez kedilerden izole edildiği için bu şekilde isimlendirilmiş olup, kronik gastritisli köpeklerden de izolasyonu yapılabilmektedir (Hazıroğlu ve ark 1995, Eaton ve ark 1996, Yıldırım 1996, Lecoindre ve ark 2000, Diker ve ark 2002). Neiger ve ark (1998) evcil kedilerde *Helicobacter* enfeksiyonlarının prevalansını belirlemek için yaptıkları çalışmada 49 kedinin 38'inde PZR ile *H. heilmanni* pozitifliği saptarken, bir izolasyon yapabilmiş; *H. pylori* ve *H. felis*'in varlığı ise kültür ya da PZR ile tespit edilememiştir. Klinik olarak sağlıklı köpeklerde gastrik spiral bakterilerin prevalansı hasta köpeklerden daha yüksek bulunurken, sağlıklı ve hasta kediler arasında fark bulunmadığı bildirilmiştir (Papasouliotis ve ark 1997, Yamasaki ve ark 1998). Prevalansın sağlıklı köpek ve kedilerde sırasıyla % 86-100 ve % 41-100, üst gastrointestinal semptomları olan köpek ve kedilerde % 61-82 ve % 56-76 olarak belirlenmiş (Papasouliotis ve ark 1997), bunun nedeninin hasta hayvanlarda antibiyotik kullanımı veya gelişen koruyucu bir immün cevaba bağlanabileceği bildirilmiştir (Neiger ve Simpson 2000).

*H. pylori* sağlıklı ve enfekte köpeklerden izole edilememekle birlikte (Jalava ve ark 1998, Cattoli ve ark 1999, Strauss-Ayali ve ark 1999), deneysel çalışmalarda enfeksiyon oluşturulan köpeklerden izole edilebilmiştir (Rossi ve ark 1999). Kedilerde *H. pylori* izolasyonu yapılabilmemesine rağmen (Handt ve ark 1994, Perkins ve ark 1996) bu, oldukça güçtür ve genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (Happonen ve ark 1996b, Neiger ve Simpson 2000). Pet hayvanların midesini çeşitli *Helicobacter* türlerinin enfekte edebileceği ancak bu türlerin patojenik rollerinin belirlenmediği bildirilmektedir. Kedi ve köpeklerde gastrik helikobakterlerin prevalansı yüksek olup, insanlardakinin aksine geçiş yolu tam olarak belirlenememiştir (Neiger ve Simpson 2000). Diğer taraftan hayvanlarda da enfeksiyonun şekillenmesinde yaşın, önemli bir rol oynayabileceği ve bakterinin genç hayvanlarda yetişkinlere nazaran daha az sıklıkla kolonize olduğu bildirilmiştir (Otto ve ark 1994).

Helikobakterlerin kedi ve köpeklerden insanlara geçip geçmediği tam olarak belirlenememiş ancak, son zamanlarda kedilerden *H. pylori* izolasyonunun yapılması bu patojen için hayvanların rezervuar olabileceğini ve *H. pylori*'nin zoonoz olabileceğini ortaya koymuştur (Handt ve ark 1994, Perkins ve ark 1996, Lecoindre ve ark 2000). Köpeklerden *H. pylori* izolasyonu gerçekleştirilememiş, bu nedenle pet hayvanlardan insanlara *H. pylori* bulaşma riskinin az olduğu bildirilmiştir (Geyer ve ark 1993, Hermanns ve ark 1995, Eaton ve ark 1996). Ancak Buczolits ve ark (2003)'nın köpeklerde *H. pylori* varlığını belirlemek için PZR metodu ile Helikobakter-spesifik H276f/H676r primerlerini kullanarak yaptıkları çalışmada ilk defa iki köpekte "*H. pylori*" veya "*H. pylori benzeri mikroorganizmalar*" tespit edilmiş, bu nedenle *H. pylori*'nin potansiyel zoonoz olabileceği bildirilmiştir. Kedi, köpek ve domuzlar büyük spiral bakterilerle sıklıkla enfekte olurlar ki bu bakteriler insanlarda bulunan *H. heilmannii* suşuna benzerlik gösterir. *H. heilmannii*'ye benzeyen 3 tür (*H. salomonis*, *H. bizzozeronii* ve *H. felis*) kedi ve köpeklerden de izole edilmiştir. Hayvanlardan izole edilen helikobakterlerin insanlardan da izolasyonunun yapılması zoonoz potansiyele sahip olduklarını göstermektedir (Jalava ve ark 1998, Jalava ve ark 2001). İnsanlardan elde edilen *H. heilmannii* izolatının özellikleri, hayvanlardan izole edilen diğer helikobakterlerle fenotipik özellikleri, protein profili, 16 S rDNA dizisi ve DNA-DNA hibridizasyonuna göre karşılaştırılmış ve köpeklerde sık bulunan bir tür olan *H. bizzozeronii* olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle *H. bizzozeronii*'nin de potansiyel zoonoz olabileceği bildirilmiştir (Jalava ve ark 2001). Helikobakterlerin hayvandan hayvana ve hayvandan insana bulaşma yolu tam olarak ortaya konulamamıştır. Bulaşma yolunun tespit edilmesi, *Helicobacter* enfeksiyonlarından korunmada yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bulaşmanın iatrojenik, fekal-oral, veya oral-oral yolla olabileceği bildirilmiştir (Jenkins ve Basset 1997, Hanninen ve ark 1998, Vandenplas 1999).

İnsandan insana *H. pylori* bulaşmasında üç yol tanımlanmıştır. Bunlardan ilki ve en yaygın olanı *iatrojenik* bulaşma olup, midenin endoskopisi esnasında, endoskop aparatları aracılığı ile olabilir. Endoskop aparatları yeterince dezenfekte edilmeden başka bir hastada kullanıldığı takdirde bulaşma şekillenebilir. Her uygulama sonrası aletlerin dezenfeksiyonu ile bulaşma olasılığı azaltılabilir (Dunn ve ark 1997, Hanninen ve ark 1998). İkincisi en önemlisi olup, fekal-oral bulaşmadır. Fekal-oral bulaşma gelişmemiş ülkelerde, sanitasyonun uygun olmadığı bölgelerde yüksek enfeksiyon oranına bağlı olarak bildirilmiştir. Bu ülkelerde bakteriler çocuk dışkılarından da izole edilebilmiştir (Jenkins

ve Basset 1997). Enfekte ebeveynler özellikle anneler bulaşmada rol oynayabilir (Vandenplas 1999). Hayvanlardan izole edilebilen bazı *Helicobacter* türlerinin insanlarda da enfeksiyonlara neden olması, *Helicobacter* enfeksiyonlarının zoonoz olabileceğini düşündürmektedir (Dunn ve ark 1997, Strauss-Ayali ve ark 1999). *H. pylori* kedi ve çocuk dışkılarından izole edilmesine rağmen, dışkıdan izolasyon pratik değildir ve dışkıdan izolasyona gidilmemektedir. Bunun nedeni dışkıda kültüre edilemeyen kokoid bakteri sayısının fazla olması ile açıklanmaktadır (Dunn ve ark 1997). Bununla birlikte bakterinin özellikle kokoid formu çevresel kaynaklı bulaşmada rol oynayabilir (Vandenplas 1999). Üçüncü bulaşma yolu oral-oral bulaşmadır. Mide biopsi örneklerinden *H. pylori* izole edilen hastaların aynı zamanda salya ve dental plaklarından da *H. pylori* üretilmiştir. Bu durum salya ve dental plağın rezervuar olabileceğini göstermektedir (Dolar ve ark 1992, Li ve ark 1996, Malathy ve ark 2000). Mide dışındaki diğer bölgelerden (salya, dental plak, dışkı vs) PZR ile *H. pylori* identifikasyonu yapılabilirken, izolasyon oldukça güçtür (Dunn ve ark 1997, Strauss-Ayali ve Simpson 1999, Malathy ve ark 2000, Monteiro ve ark 2001). Gelişmekte olan ülkelerde salyada, dışkıdan daha çok *H. pylori* ürediği bildirilmiştir (Li ve ark 1996).

*H. heilmannii*, *Helicobacter* cinsi içinde en geniş konakçı dağılımına sahip türdür. Hayvan türlerindeki *H. heilmannii* suşlarının antijenik yapısının konakçı özgüllüğüne sahip olması, etkenin hayvan türlerine adapte olduğunu göstermektedir. Etken köpeklerin kusmuğunda 14 günden fazla yaşamaktadır. Bulaşma kedi ve köpeklerde oral-oral yolla ve aynı türün bireyleri arasında olmaktadır (Hanninen ve ark 1998, Vandenplas 1999). Kusma yolu ile insandan insana bulaşma belirlenememiş (Dunn ve ark 1997), ancak kusma ve özefagial reflüksün, oral-oral kontaminasyonda rol oynayabileceği bildirilmiştir (Vandenplas 1999). Hanninen ve ark (1998) köpekler üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada, köpek yavrularının laktasyon periyodu boyunca annelerinden *Helicobacter* enfeksiyonunu (*H. salomonis*) aldıklarını, aynı zamanda birbirlerine de bulaştıklarını ortaya koymuşlardır.

PZR ile mide sıvısı örneklerinde *H. pylori* DNA'sının tesbiti, mide sıvısı ile bulaşmanın olabileceğini göstermiştir (Yoshida ve ark 1998, Young ve ark 2000).

İsveç, Peru ve Mexico City içme sularında *Helicobacter* DNA'sı, PZR ile ortaya konulmuş ve bulaşmada suyun rol oynayabileceği bildirilmiştir (Hulten ve ark 1996,



Hulten ve ark 1998, Mazari-Hiriart ve ark 2001, Park ve ark 2001). *H. pylori*'nin canlılığını distile su, tuzlu su ve deniz suyunda 1-16 gün devam ettirebileceği bildirilmiştir (Mazari-Hiriart ve ark 2001). Svec ve ark (2000) köy ve kasabalarda yaşayan insanların, şehirde yaşayan insanlara göre daha sık *H. heilmannii*'ye maruz kaldığını ve evcil hayvanlarla daha sık temasta bulunmaları nedeniyle hayvanların rezervuar olabileceğini bildirmişlerdir.

Dore ve ark (1999) koyun sütünden *H. pylori* izole ederek bunun hayvanlar arasında bulaşmada rol oynayabileceğini ve *H. pylori*'nin koyunların doğal konakçısı olabileceğini bildirmişlerdir. Dore ve ark (2001) *H. pylori* enfeksiyonlarının koyun ve çoban köpeklerinde varlığını belirlemek için yaptıkları çalışmada, ELISA testi ile serumda IgG aramış, 44 koyunun 43'ünde ve 6 köpeğin tümünde pozitiflik saptamış, koyunların insan ve köpekler için rezervuar olabileceğini bildirmişlerdir.

Deneyisel olarak köpekler *H. felis*, *H. pylori* ve *H. salomonis* ile enfekte edilmiş, diğer köpeklere bu bakterileri kusmuk ve temas yoluyla bulaştırdıkları gözlenmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkılarak insanlara *H. pylori* bulaşmasında köpeklerin rol oynayabileceği bildirilmiştir (Lee ve ark 1992, Hanninen ve ark 1998, Strauss-Ayali ve Simpson 1999).

*H. pylori* ile enfekte insanlarda, semptomatik olarak kronik gastrik yangı şekillenir. Peptik ülser hastalığı, Zollinger Ellison Sendromu, Crohn's disease ve diğer ciddi yangısal rahatsızlıkların tedavisinde uygulanan aspirin veya non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların kronik mide yangısına sebep olabileceği bildirilmiştir (Dunn ve ark 1997). Blomberg ve ark (2001) *H. pylori* ile kuru göz hastalığı ve kononer kalp hastalığı arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ho ve ark (2001) *H. pylori*'nin "ani bebek ölümü" sendromu ile ilişkisini ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada, *H. pylori*'nin etkisinin bulunmadığını rapor etmişlerdir. Safra kanalı tümörleri ile safrada bulunan *H. pylori* arasında güçlü bir ilişki bulunmakla birlikte sigara ve kahve alışkanlıklarının bu oranı artırdığı bildirilmiştir (Bulajic ve ark 2001).

*H. pylori* asidik mide sıvısında uzun süre canlı kalabilir. Bakteri, midenin mukus tabakasına ve epitel hücre membranlarına lektinlerin yardımı ile yapışır. *H. pylori* proteaz, lipaz ve fosfolipaz enzimleri ile mide mukus tabakasını yıkımlar ve mukus geçirgen hale

gelir. *H. pylori* aynı zamanda çeşitli toksinler salgılar (Tytgat ve ark 1991). Bakterinin yüzeyinde ve sitoplazmasında bulunan üreaz aracılığı ile bakteri mide mukus tabakasını geçerek mideye kolonize olur. Üreaz, gastrik sıvıda bulunan üreyi parçalayarak amonyak ve bikarbonat iyonlarına ayırır. Amonyak, su ile amonyum formuna dönüşür. Bakteri çevresindeki mide mukus tabakasının pH' sı artar ve mukus yüzeyi alkali hale dönüşür. Bakteri bu sıvıda uzun süre canlı kalabilir. Amonyak epitel hücrelerine zarar verir ve mukozada yangı reaksiyonları başlar. Mide mukozal bariyeri yıkılır, mukozal erozyon ve ülserler meydana gelir. Mide pH'sının artması ile parietal hücrelerden gastrik asit salgısı uyarılır. Bu asit salgısındaki artışa bağlı olarak asit duodenuma kadar ulaşır ve duodenumda ülserlere neden olur. Helikobakterlerin helikal yapısı ve hareket yeteneği de patojenitede önemli rol oynar ve bakterinin mukusa yapışmasını sağlar (Dunn ve ark 1997, Jenkins ve Basset 1997).

Köpeklerde gastrik hastalıkların patogenezisinde *Helicobacter* türlerinin rolü hala belirlenememiş, enfeksiyonun klinik belirtilerinin, enfekte köpeklerin çoğunda bulunduğu, *H. pylori* ile enfekte insanlarda ise gastrik neoplazi, kronik gastritis ve ülserlere rastlanıldığı bildirilmiştir (Strauss-Ayali ve Simpson 1999). Helikobakterlerin varlığında midede meydana gelen histopatolojik değişiklikler kedi ve köpeklerde farklı bulunmuştur. Midede oluşan ödem, köpeklerde kedilere göre daha sık meydana gelirken, glanduler dejenerasyon ve fibrozis köpeklerde nadiren şekillenir. Kedilerde bakteri kolonizasyonu yangı hücreleri, lenfoid foliküller, bezlerin dejenerasyonu ve epitel yüzeyindeki değişikliklerle direk ilişkili iken köpeklerde bu ilişki yoktur (Hermanns ve ark 1995, Happonen ve ark 1996a) (Tablo 2. 4.).

**Tablo 2. 4. Kedi ve köpeklerde gastrik helikobakterlerin varlığında meydana gelen histopatolojik değişiklikler (Hermanns ve ark 1995, Happonen ve ark 1996a).**

Histopatolojik değişiklikler	Kedi	Köpek
Gastrik helikobakterlerin varlığı ve yangı arasındaki ilişki	Önemli	Önemli değil
Ödem	Nadiren	Daha sık ve şiddetli
Glanduler dejenerasyon ve fibrozis	Sıklıkla	Nadiren
Yangı hücreleri sayısı	Fazla	Az
Lenfoid Foliküller	Fazla	Az
Mide bezlerinin dejenerasyonu	Fazla	Yok
Mide yüzeyinin epitel değişikliği	Fazla	Yok

Bunun sebebi bilinmemekle birlikte, kedi ve köpeklerde meydana gelen bu değişikliklerin insanlarda *H. pylori*'nin oluşturduğu gastritis tablosundaki kadar ciddi olmadığı bildirilmiştir (Hermanns ve ark 1995, Happonen ve ark 1996a).

Gastrik Helikobakterler, mikroaerofilik veya anaerobik şartlarda üreyebilen, gram negatif, sporsuz, sık veya gevşek kıvrımlı spiral veya “ S ” şeklinde, polar flagellalı ve bazı türlerde periplazmik fibrillere sahip aktif hareketli mikroorganizmalardır (Holt ve ark 1994, Happonen ve ark 1996b, Jenkins ve Basset 1997, Strauss-Ayali ve Simpson 1999). *H. pylori*'nin iki morfolojik formunun bulunduğu ortaya konulmuştur. İlki aktif olan ve kültüre edilebilen helikal veya çomak form ikincisi, dejenere form olduğu düşünülen düzensiz veya kokoid formdur ki canlı, ancak kültüre edilemeyen formdur. Bakteri katı besiyerinde kültüre edildiğinde çomak şeklinde görülür. Spiral şekiller çok az veya yoktur (Goodwin ve Worsley 1993). *H. pylori* genel besiyerlerde uzun süre inkübe edildiğinde “kokoid forma” dönüşebilir. Elektron mikroskop ile kokoid formlar, bir membran yapısı, bir veya iki ucu kıvrılmış, “U” şeklinde basil olarak görünürler. Kokoid formlar metabolik olarak aktiftir ancak, *in vitro* kültüre edilemezler (Goodwin ve Worsley 1993, Dunn ve ark 1997).

*H. pylori*, gram negatif, üreaz pozitif, nitrat reaksiyonu negatif, spiral şekilli, 0,5-0,9 µm genişlikte ve 2-4 µm uzunlukta mikroaerofilik bir bakteridir. Kanlı agarda (% 5-7 defibrine at kanlı) 35-37 °C'de 2-3 gün inkübe edildiğinde 1-2 mm büyüklüğünde şeffaf koloniler gözlenir. Kültürlerde bakteriler U, V şeklinde gözlenebilir (Goodwin ve Worsley 1993). PSD (Peptone starch-dextrose agar) agarda üreme özelliği ile *H. mustelae*'dan ayrılır (Holt ve ark 1994).

Kedi ve köpeklerin mide mukozasından izole edilebilen helikobakterler *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. bilis* ve *Flexispira rappini*'dir (Jalava ve ark 1998, Simpson ve ark 1999, Strauss-Ayali ve ark 1999). Bunların tümü katalaz ve oksidaz pozitifdir. Köpeklerdeki gastrik *Helicobacter* türlerinin uzunluğu (5-15 µm) ve genişliği (0.3-1.2 µm) birbirine oldukça yakındır (Strauss-Ayali ve ark 1999).

Helikobakterleri diğer bakteri cinslerinden ayıran en önemli özellikleri karakteristik morfolojileri, birkaç kılıflı flagellaya sahip olmaları (*H. pullorum* hariç), karbonhidratları fermente edememeleri, tipik yağ asitleri dizisi, mikroaerofilik ortam ve seçici besiyerlerine

ihtiyaç duymalarıdır. Bu özellikleri ve 16 S rRNA dizileri ile *Campylobacter* ve *Archobacterler*'den ayrılırlar (Goodwin ve Worsley 1993, Fox ve Lee 1997). *Helicobacter* türleri arasında morfolojik farklılıklar bulunmaktadır. *Helicobacter* türleri köpeklerde negatif boyama, Skanning Elektron Mikroskop (SEM) ve Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) teknikleri ile birbirinden ayırt edilebilir. Bakterinin flagella sayısı, periplazmik fibril varlığı (*H. bizzozeronii* ve *H. heilmannii* dışında), bakterilerin spiral kalınlığı ve sayısı, sık veya gevşek kıvrımlı olmaları ile ayrımı yapılmaktadır (Utriainen ve ark 1997, Cattoli ve ark 1999).

*H. felis*, gram negatif, mikroaerofilik, üreaz pozitif, gevşek spiralli, uzun bir bakteri olup, 0.9-8 µm büyüklüğünde, 4-6 spiralli ve spiral genişliği 1-1.5 µm'dir. Hücreden köken alan periplazmik fibriller tektir. Her iki ucunda flagella bulunmakla birlikte bir ucunda yaklaşık 18 flagella bulunur. Besiyeri üzerinde ince film tabakası şeklinde ürer (Koneman ve ark 1992, Diker 1997, Utriainen ve ark 1997).

*H. bizzozeronii* 0.9-9 µm büyüklükte periplazmik fibrilleri olmayan sık kıvrımlı, bir veya iki ucunda 10-17 flagella bulunduran, 37 ve 42 °C'de üreyebilen ancak, 25 °C'de ve kan katılmış Brucella agarda üreyemeyen spiral bir mikroorganizmadır. Katalaz, oksidaz, nitrat ve indoksil asetat pozitif, hippurat hidroliz reaksiyonu negatif bulunmuştur (Yıldırım 1996, Fox ve Lee 1997, Utriainen ve ark 1997).

*Flexispira rappini*, üreaz pozitif, küt kenarlı, tek periplazmik flagellaya sahip, büyüklüğü 0.6-7 µm olan bir veya iki ucunda 4-10 flagellaya sahip, 43 °C'de üreyebilen bir mikroorganizmadır. Katalaz ve nitrat reaksiyonları negatif olup, % 1 glisin içeren ortamlarda üreyebilirler (Koneman ve ark 1992, Utriainen ve ark 1997).

*Gastrospirillum hominis*, insan gastrik mukozasından kültüre edilemeyen *H. pylori*'den daha büyük ve sık kıvrımlı olup, patojenite çalışmaları için uygun bir bakteri olduğu bildirilmiştir (Handt ve ark 1994, Solnick ve ark 1993).

*H. heilmannii*, 6-10 adet gevşek kıvrımlara sahip, periplazmik fibrilleri bulunmayan spiral bir bakteridir. İzolasyonu yapılabilen ve yapılamayan iki suşa sahip olup, biyokimyasal özellikleri ortaya konulmamıştır (Norris ve ark 1999, Diker ve ark 2002).

*H. mustelae*, ferretlerin mide mukozasından izole edilmiş spiral bir bakteri olup, insanlardan izole edilememiş, oksidaz, üreaz ve katalaz pozitif, nitrat redüksiyonu pozitif, hippurat hidroliz negatif (Koneman ve ark 1992), 42 °C'de üreme özelliğine sahip, polar flagella ve çok sayıda lateral flagellaya sahip, % 10 CO<sub>2</sub> 'li ortamda ve PSD agarda üremeyen bir mikroorganizmadır (Holt ve ark 1994).

*H. nemestrinae*, mikroaerofilik, spiral bir gastrik bakteri olup, biyokimyasal özellikleri *H. pylori*' ye benzer (Koneman ve ark 1992).

Kedi ve köpek midelerine yerleşen in vitro izolasyonu zor, mikroskopta görülebilen *Helicobacter* benzeri bakteriler vardır ki, bunlar “*Gastrik Helicobacter Benzeri Organizmalar*” olarak isimlendirilmektedir (Hermanns ve ark 1995, Happonen ve ark 1996a).

*H. pylori*'nin genom büyüklüğü 1.6-1.73 Mb. arasında değişmektedir. G+C kompozisyonu ortalama % 35.2 mol' dür (Goodwin ve Worsley 1993). *H. pylori* izolatlarının % 40'ı plazmide sahiptir ancak, bu plazmidler bilinen virülens faktörlerini içermezler. *H. pylori* genomu, 16 S ve 23 S rRNA genlerinin her iki kopyasını aktarır. *H. pylori*, üreaz, protein (yardımcı), flagellin, vakuol yapan sitotoksin ve CagA kodlarını içeren multiple genlerdeki dizi farklılığı önemlidir (Dunn ve ark 1997). Üreaz geni, kromozomun 44 kb'lık kısmına bağlanır (Goodwin ve Worsley 1993). *H. pylori*'nin virülens faktörleri ile ilgili çalışmalar *Helicobacter* enfeksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlamakla beraber bunlar sınırlı sayıdadır (Dunn 1993, Vandenplass 1999, Higashi ve ark 2002, Seydel ve ark 2002). *H. pylori*'nin sahip olduğu virülens faktörleri; üreaz enzimi, anti-asit proteini, bakterinin spiral yapısı, hareket, müsinaz, lipaz, fosfolipaz, hemolizin ve katalaz enzimleri, fibriler pilus benzeri yapı, hemaglütinin gibi adhezinler, epitel hücre reseptörleri, sitotoksinler ve lipopolisakkaritlerdir (Dunn 1993, Vandenplass 1999). Bazı virülens faktörleri (üreaz ve flagella) tüm suşlarda bulunur ve bunlar patogenezi ve kolonizasyonu için mutlaka gereklidir. Üreaz, enfeksiyonun başlaması ve mide kolonizasyonu için gerekli olup, üre A ve üre B olmak üzere iki alt üniteden oluşur. Amonyak, bakteri için bir besin maddesidir ve mide epitelinde lezyonlara yol açar. Üreaz, interlökin β, interlökin-6, TNF ve IL-8 gibi çeşitli yangı sitotoksinlerinin salınmasını uyarır (Vandenplass 1999).

*H. pylori* aynı zamanda gastrik mukus ve mukozanın hidrofobisini azaltan farklı fosfolipazlar üretir. *Vacuolating Citotoxin A (VacA)* geni tüm suşlarda bulunmakla birlikte *H. pylori*'nin % 50'sinde baskılanmıştır. Diğer bir virülens faktörü olan *Cytotoxic associated gen A (cagA)* sadece suşların bir kısmında bulunur. CagA, flagella hareketi ve mideye kalıcı kolonizasyonu sağlar. *H. pylori* tarafından üretilen enzimler, metabolik, antioksidant ve toksik özelliklere sahiptir ve bunların çoğu tüm izolatlarda bulunur (Vandenplass 1999).

*H. pylori*, kurumaya oldukça duyarlı bir bakteridir. Bu nedenle biyopsi örneklerinin hızlı bir şekilde nakli gerekli olup, bu amaçla çeşitli nakil besiyerleri (% 20 glikoz içeren), Stuart's transport medium, yatık çikolata agar, gliserol içeren besiyerlerinin kullanılması önerilmiştir (Rautelin ve ark 1997).

Helikobakterler temel besiyerlerinde güç üremeleri nedeniyle, üretilmeleri için aminoasit, kan, serum gibi maddelerle zenginleştirilmiş, selektif besiyerleri kullanılması ve besiyerlerinin taze olarak hazırlanması gerektiği bildirilmiştir. *H. pylori*'yi üretebilmek için katı besiyeri olarak genellikle serum veya kan ilave edilmiş *Charcoal Base Agar*, *Brain Hearth Infusion agar (BHIA)*, *Columbia Agar*, % 6 koyun kanlı agar, çikolata agar ve *Campylobacter Selective Medium* kullanılmıştır (Goodwin ve Worsley 1993, Xia ve ark 1994, Stevenson ve ark 2000, Tee ve ark 2000). *Skirrow supplement* içeren kanlı agar (Eaton ve ark 1996), % 7 at kanı içeren *BHIA* (Happonen 1996b), % 5 lize at kanlı *Brucella Agar* da kullanılmıştır (Diker ve ark 2002). Biyopsi örneklerindeki kontaminasyon etkenlerinin üremesini engellemek ve *H. pylori*'nin izolasyonunu sağlamak için *Skirrow medium* gibi seçici besiyerleri kullanılmış olup, bu besiyerlerine ilaveten *Dent's CP Medium* ve *Glupczynski's Brucells Campylobacter Charcoal (BCC) medium* gibi besiyerleri geliştirilmiştir (Tee ve ark 1991). Sıvı besiyeri olarak *Brain Hearth Infusion Broth (BHIB)*, *Mueller-Hinton Broth*, *Brucella Broth* kullanılmıştır (Ho ve Vijayokamir 1993, Stevenson ve ark 2000). Perkins ve ark (1996) antibiyotik içeren (trimetoprim, vankomisin ve polimiksin) % 5 koyun kanlı *Tryptic Soy Agar (TSA)* ve *Brucella Agar*'ı *H. pylori*'yi üretmek amacıyla kullanmışlardır.

*H. pylori*'nin üremesi için mutlaka mikroaerofilik veya % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren çevre şartları gereklidir. Optimum üreme ısısı 35-37 °C olup, besiyerinin pH'sı 6.5-7.5 olarak ayarlanmalıdır (Ho ve Vijayokumari 1993). İlk izolasyonda değişmekle birlikte 4-12 gün

inkübasyon gerektiği ve *H. pylori*'nin kanlı agarda şeffaf küçük koloniler meydana getirdiği gözlenmiştir (Goodwin ve Worsley 1993). Bu uzun inkübasyon süresinin, kontaminantların üremesini arttırdığı bunun da helikobakterlerin izolasyonunu zorlaştırdığı, bu nedenle besiyerine Skirrow supplement eklenmesinin gerekli olduğu belirtilmiştir (Happonen ve ark 1998). Xia ve ark (1994) *H. pylori*'nin sadece mikroaerofilik bir bakteri olmadığını, aynı zamanda aerobik ortamlara da adapte olabileceğini ancak, aerobik üretildiği zaman canlı bakteri sayısının oldukça az olduğunu ve hemoliz özelliğinin geç şekillendiğini bildirmişlerdir.

Helikobakterler, karbonhidratları fermantatif veya oksidatif yolla kullanamazlar. Enerjilerini *Kreb's* döngüsü yolu ile organik asitlerden ve aminoasitlerden sağlarlar. Oksidaz ve katalaz reaksiyonları genellikle pozitif, hippurat ve nitrat reaksiyonları negatiftir (Koneman ve ark 1992, Happonen ve ark 1996b). Gastrik helikobakterler üreaz pozitif iken, nongastrik helikobakterler negatiftir. *H. pylori*'nin üreaz reaksiyonu oldukça hızlıdır (Dunn 1993, Yıldırım 1996). Katalaz, sitokrom oksidaz, üreaz ve fosfatazın, *H. pylori* türlerinin çoğu tarafından homojen olarak üretildiği bildirilmiştir (Goodwin ve Worsley 1993). *H. pylori*'nin hippurat hidrolizi, nitrat redüksiyon ve sefalotine duyarlılık testleri negatif olarak belirlenmiştir (Goodwin ve Worsley 1993). İndoksil asetat değişmekle birlikte *H. pylori* için negatif bulunmuştur. *H. pylori*'nin nalidiksik aside duyarlılığı negatif iken, sefalotin'e karşı duyarlılığı pozitifdir (Koneman ve ark 1992). Helikobakterler % 0.5 glisin içeren ortamda üreyemezler. Değişik sıcaklık derecelerinde üreme özellikleri incelendiğinde 15 °C' de üreme olmazken, 30 ve 42 °C' de üremeleri değişkendir. Optimum üreme sıcaklığı 35-37 °C olup, bazı suşların (*Flexispira rappini*, *H. bizzozeronii*) 42 °C' de üreyebileceği ortaya konulmuştur (Fox ve Lee 1997, Utriainen ve ark 1997).

Gastrik *Helicobacter* türleri için teşhis metotları invaziv ve noninvaziv olarak ikiye ayrılır. Endoskop gerektiren invaziv metodlar (kültür, histopatoloji, sürme preparat, direk biopsi üreaz testi, elektron mikroskop, hibridizasyon testleri ve PZR) mide biopsi örneği gerektirirken, noninvaziv metotlar (seroloji, üre solunum testi (UBT) ve üre kan (UBBT) testi) biopsi örneği gerektirmezler (Dunn ve ark 1997).

İnsanlarda *H. pylori*'nin kültürü teşhis için en iyi metot olup, gastrik biopsilerden bakteri üretilebilir. Bunun iki avantajı bulunmaktadır; ilki, antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesi, ikincisi elde edilen izolatların özelliklerinin belirlenebilmesidir. İnsanlarda kültürün sensitivitesi % 95'den fazladır. Ancak *H. pylori*'nin diğer metodlarla (sürme preparat, direk üreaz testi) teşhisi; basit, uygulayan kişiden kişiye değişkenliği daha az ve daha kısa sürede sonuç vermesi gibi avantajlara sahiptir (Dunn ve ark 1997). Birçok *Helicobacter* türü köpek midesinde izole edilmesine (*H. felis*, *H. salomonis*, *H. bizzozeronii*, *H. bilis*) rağmen (Eaton ve ark 1996, Jalava ve ark 1998, Diker ve ark 2002), bir kısmının (*Gastrospirillum ssp*, *H. heilmanni*, *H. pylori* gibi) izolasyonu zor veya mümkün değildir. İzolasyon, kedi ve köpeklerde oldukça düşük sensitiviteye (% 13.6, % 51) sahiptir. İzolasyon oranı direk üreaz testi ile karşılaştırıldığında (kedi ve köpekler birlikte değerlendirildiğinde), izolasyon oranı % 43.6 bulunurken, direk üreaz testi ile % 56.4 bulunmuştur (Jalava ve ark 1998). Köpeklerde kültür ile teşhisin sensitivitesinin düşük, insanlarda ise yüksek olmasının sebebi insanların midesine sadece *H. pylori*'nin, köpeklerin midesine ise değişik *Helicobacter* türlerinin ve bakterilerin kolonize olması ve birlikte enfeksiyon meydana getirmeleri ile açıklanabilir (Eaton ve ark 1996, Jalava ve ark 1998, Strauss-Ayali ve ark 2001).

Kedi ve köpeklerde mide biyopsi örneklerinin alınmasından hemen sonra ekilmesinin izolasyon şansını arttırdığı bildirilmektedir (Goodwin ve Worsley 1993). Biyopsi örnekleri gliserol içeren ortamlarda -70 °C'de uzun süre muhafaza edilmiştir (Dunn ve ark 1997).

*H. pylori*'nin dışkıdan izolasyonu yapılmasına rağmen (Li ve ark 1996), kültüre edilemeyen kokoid formdaki bakterilerin yoğunluğu nedeniyle izolasyon oldukça güçtür (Kabir 2001).

Histopatoloji, mide doku kesitlerinde spiral bakterilerin görerek varlığının tespit edilmesi şeklinde yapılmış ve örnekler midenin birkaç bölgesinden alınmıştır. Mide biopsi örneklerinde spiral bakterilerin teşhisinde *Warthin-Starry*, *Hematoxylen-Eosin*, *Alcian blue*, *Steiner silver* boyamaları güvenilir boyama yöntemleri olarak bildirilmiştir (Dunn ve ark 1997, Vandenplas 1999). Silver boyama ile, köpeklerde bakteri kolonizasyonunun az olduğu durumlarda *Helicobacter* türlerinin teşhisi yapılmaktadır (Strauss-Ayali ve ark 1999). *Helicobacter* benzeri mikroorganizmaların mide mukozasında belirlenmesinde bakteri kolonizasyonu ve histolojik bulgular kedi ve köpeklerde farklı bulunmuştur. *H.*



*felis* ile yapılan deneysel bir çalışmada histopatolojik olarak, germ-free köpeklerin mide mukozasında sağlıklı köpeklere göre önemli bir farklılık belirlenememiş, fakat *Warthin-Starry* boyama ile midenin mukus tabakası içinde çok sayıda mikroorganizma tespit edilmiştir (Lee ve ark 1992).

Hasta ve sağlıklı köpekler arasında mikroorganizma sayısı ile mide yangısı, lenfoid hücre ve mide pH artışı arasında ilişki bulunamamış, *H. felis*'in köpeklerde gastrik patojen olmayabileceği bildirilmiştir (Simpson ve ark 1999). Klinik olarak sağlıklı köpeklerde gastrik spiral bakterilerin varlığı hasta köpeklerden daha yüksek olup, kedilerde bu fark önemsiz bulunmuştur (Yamasaki ve ark 1993). Köpeklerde *H. pylori* ile deneysel enfeksiyon oluşturulmuş, birinci haftada akut gastritis lezyonları (korpus ve antrumda hiperemi ve ödem), sekizinci haftada kronik gastritis (antrumda lenfoid foliküller, korpus ve fundus bezleri arasında lenfoplazmosit hücre artışı, hücre dejenerasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu) lezyonları gözlenmiştir (Rossi ve ark 1999).

Happonen ve ark (1996b) 10 köpek ve 10 kedide yapmış oldukları çalışmada, midenin değişik bölgelerinden alınan biopsi örneklerinde kültür, EM ve histolojik incelemeler yapmış, köpeklerin tümünün fundus ve corpusunda, 9 köpeğin ise sadece antrumunda helikobakterlerin bulunduğunu göstermişlerdir. Kedilerde helikobakterlerin varlığı ile fundus ve corpustaki kronik gastritis arasında önemli bir ilişki bulunurken, köpeklerde bu açık bir şekilde gösterilememiştir. Kedi ve köpeklerde şekillenen histopatolojik değişiklikler insanlarda *H. pylori*'nin oluşturduğu gastritis tablosundaki kadar ciddi bulunamamıştır (Hermanns ve ark 1995). Histolojinin, insanlarda *H. pylori* teşhisinde *gold standart* olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Pacheco ve ark 2001). Köpeklerde *H. pylori* ve *H. pylori* benzeri mikroorganizmalar kültür ve histolojik incelemeler ile teşhis edilememiştir (Eaton ve ark 1996).

Kedi ve köpek midelerinin çoğunda görülen ancak üretilmeyen spiral mikroorganizmaların teşhisinde en uygun yolun mide mukoza kazıntılarının mikroskopik muayenesi olduğu bildirilmiştir (Happonen ve ark 1996b, Cattoli ve ark 1999, Strauss-Ayali ve ark 1999, Diker ve ark 2002). Gastrik helikobakterler *May-Grünwald-Giemsa*, *Gram* ve *Diff Quick* boyalarla kolayca görülebilir (Strauss-Ayali ve Simpson 1999, Erdeğer ve ark 2001). Köpek ve kedilerde midenin fundus, antrum ve corpus bölgelerinden hazırlanan sürme preparatlarda tüm örneklerde spiral *Helicobacter* benzeri

mikroorganizmalar tespit edilmiş olup, oldukça sensitiv ve kolay uygulanabilen bir teşhis yöntemi olarak belirtilmiştir (Happonen ve ark 1998). Dispeptik hastalarda *H. pylori*'nin hızlı teşhisinde kazıntı sitoloji, üreaz testi, kültür ve histopatolojik incelemeler arasında çok fark bulunmamasına rağmen, direk boyama ve üreaz testi uygulaması kolay, pratik ve ekonomik bulunmuştur. Kazıntı sitolojisi, helikobakterlerin mide mukozasının değişik bölgelerindeki yoğunluğu karşılaştırılmak istendiğinde kabaca bilgi vermektedir (Strauss-Ayali ve ark 1999, Erdeğer ve ark 2001).

Biyopsi üreaz testi, mide biyopsi dokusunda mikroorganizmanın indirekt teşhisi amacıyla geliştirilmiş bir test olup, *Helicobacter* türlerinin ürettiği üreazın belirlenmesi esasına dayanır (Dunn ve ark 1997). Bakteriyel üreaz düşük pH'da üreyi, amonyak ve bikarbonata parçalar. Biopsi örnekleri üre ve pH indikatörü olarak fenol red içeren üreli buyyon içine koyulur. Ortamda üreaz enziminin varlığı, pH değişimi ile yani sarı-turuncu rengin parlak pembe renge dönüşmesi ile anlaşılır (Strauss-Ayali ve Simpson 1999). Direk üreaz testi köpeklerin biopsi örneklerinde; *corpus*'da % 100, *fundus*'da % 96.3 ve *antrum* örneklerinin % 62'sinde gerçek pozitif sonuç vermektedir (Happonen ve ark 1996b). Gastrik spiral bakterilerin bulunmadığı hayvanlarda direk üreaz testi negatif sonuç vermektedir (Yamasaki ve ark 1998). Diker ve ark (2002) helikobakterler yönünden pozitif olan 103 köpekte uyguladıkları direk üreaz testi ile 103 fundus (% 100), 101 korpus (% 98.1) ve 53 antrum (% 51.5) örneğinde pozitiflik tespit etmişlerdir. Biyopsi üreaz testi çabuk sonuç veren, uygulaması kolay ve ucuz bir test olup, Avusturalya'da insanlara uygulanmış *H. pylori*'nin teşhisinde sensitivitesi % 93-97, spesifitesi % 98 olarak tespit edilmiştir (Midolo ve Marshall 2000). Hızlı üreaz testi için alınan antral biyopsi örneklerinden kültür (% 93) yapılabilmiştir. Erdeğer ve ark (2001) insanlarda yaptıkları çalışmada üreaz testinin sensitivitesini % 93 ve spesifitesini % 88 olarak tespit etmişlerdir. Antibiyotik tedavisi sonrası üreaz testi uygulandığında yanlış negatif sonuç verebileceği gibi, midede diğer üreaz üreten bakterilerin varlığında (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus* vs) da yanlış pozitif sonuç verebileceği bildirilmektedir (Enroth ve ark 1999, Strauss-Ayali ve Simpson 1999).

Elektron mikroskopi, *Helicobacter* türlerini morfolojik özelliklerine göre birbirinden ayırt etmek amacıyla kullanılmaktadır. Köpeklerden izole edilen *Helicobacter* türleri EM ile incelenmiş, periplazmik fibrilleri, spiral sayısı, sıklığı ve kalınlığı, flagella sayısına göre bunların ayrımı yapılmıştır (Eaton ve ark 1996, Utriainen ve ark 1997). EM ile teşhis,

karmaşık ve pahalı bir teknik olup, kültüre edilemeyen mikroorganizmaların teşhisine imkan sağladığı bildirilmektedir. Öte yandan Cattoli ve ark (1999) yaptıkları çalışmada EM ile negatif bulunan bir örnekten *H. felis* izole etmiş ve kültürün, EM'dan daha sensitiv olduğunu bildirmişlerdir.

Gastrik biyopsi örneklerinden PZR, "*Helicobacter tür spesifik primerler*" ve "*Helicobacter cins spesifik primerler*" kullanılarak uygulanabilir. Primerler 16 S rRNA, üreaz ve adhezin genlerinden elde edilebilir (Neiger ve Simpson 2000). PZR, insanlarda *H. pylori* teşhisinde sensitivite ve spesifitesi yüksek bir test olmakla birlikte, primerlerin seçimi, hedef DNA, örneğin hazırlanması, bakteri yoğunluğu, PZR prosedürü test sonucunu etkilemektedir (Dunn ve ark 1997). İnsan ve hayvanlarda biyopsi örneklerinden ve mide sıvısından ekstrakte edilen DNA'nın PZR'a tabi tutulması ile *Helicobacter* türleri identifiye edilebilir (Westblom ve ark 1993, Eaton ve ark 1996, Perkins ve ark 1996, Young ve ark 2000). İnsanlarda mide sıvısından PZR ile *H. pylori*'nin teşhisi % 96 sensitivite ve % 100 spesifiteye sahip bulunmuştur (Westblom ve ark 1993). Kültürü negatif olan peptik ülserli hastaların biyopsi örneklerinde pozitiflik saptanmış, *H. pylori* teşhisinde doğrulama testi olarak PZR'ın kullanılabilceği bildirilmiştir (Clayton ve ark 1992, Westblom ve ark 1993, Germani ve ark 1997, Yoshida ve ark 1998). Li ve ark (1996) insanlarda 98 mide biyopsi, 85 salya ve 71 dışkı örneğinde *H. pylori* DNA'sını teşhis etmek amacıyla PZR'ı kullanmışlar, salya (% 84) ve mide biyopsi (% 100) örneklerinden *H. pylori*'nin teşhisinde güvenilir bir test olduğunu ancak, dışkıdan (% 25) teşhiste kullanılmasının uygun olmadığını bildirmişlerdir.

El-Zaatar ve ark (1997) *H. pylori* enfeksiyonunun sokak kedilerinde varlığını göstermek amacıyla 25 kедiden alınan biopsi örneklerini kültür, histolojik inceleme ve PZR'la araştırmışlar, histolojik incelemede spiral ve büyük mikroorganizmalar gözlenirken, izolasyon yapılamamış, 16 S rRNA cins spesifik PZR metodu ile tüm örnekler *Helicobacter* pozitif tesbit edilirken, adhezin subunit-A (hpaA) tür spesifik PZR metodu ile sadece 6 kedinin *H. heilmannii* ile enfekte olduğu belirlenmiş ancak *H. pylori* tesbit edilememiştir. Perkins ve ark (1996) üçlü antibiyotik tedavisi yapılan kedilerde *H. pylori*'nin teşhisi amacıyla PZR ve kültürü karşılaştırmışlar, tedavinin takibi esnasında PZR'ın, kültürden daha sensitiv olduğunu ortaya koymuşlardır. Lu ve ark (1999) *H. pylori*'nin teşhisi amacıyla beş farklı PZR metodunu incelemiş ve *ureC* geni'nin PZR'ının en spesifik ve sensitiv test olduğunu belirlemişlerdir.

Kedi ve köpeklerdeki gastrik helikobakterlerin prevalansı, helikobakterleri teşhis etmede kullanılan teşhis metotlarının spesifite ve sensitivitesine bağlıdır (Neiger ve Simpson 2000). Kedi ve köpeklerde direk mikroskopide görülen spiral mikroorganizmaların cins ve tür bazında teşhisi, kullanılan primerlere göre değişmekle birlikte, PZR'la başarılı bir şekilde yapılmaktadır (Stanley ve ark 1993, Eaton ve ark 1996, Neiger ve ark 1998, Cattoli ve ark 1999, Norris ve ark 1999)

Günümüzde, *H. pylori*'ye spesifik *Vac A* genotipinin belirlenmesi için iki ayrı PZR reaksiyonu gereklidir. Chisholm ve Owen (2001a) geliştirmiş oldukları multipleks PZR metodu ile mide biyopsilerinden tek reaksiyonda *VacA* genotipinin hızla belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu multipleks PZR metodu ile *16 S rDNA* hedefli *H. heilmannii* spesifik genlerini kullanarak dispeptik hastaların midesinden aynı anda *H. heilmannii* ve *H. pylori*'yi teşhis etmeyi başarmışlardır (Chisholm ve Owen 2001b). PZR ile teşhis spesifik ve sensitiv olmasına rağmen, oldukça pahalı olması nedeniyle pratikte pek fazla kullanılmamaktadır (Pacheco ve ark 2001). *PZR-Denaturan Gradyan Jel Elektroforezis* tekniği bu nedenle geliştirilmiş ve *Helicobacter* türlerinin belirlenmesinde kolay, ucuz ve etkili bir yöntem olarak belirlenmiştir (Abu-Al-Soud 2001). Dönmez-Altuntaş ve Güven (2002) 64 hastaya ait mide biyopsi örneğinden *H. pylori*'nin teşhisi amacıyla nested-PZR ve hızlı üreaz testini kullanmışlar, nested-PZR testinin daha spesifik (% 53.1) ve sensitiv (% 93.8) olduğunu belirlemişlerdir.

*H. pylori*'nin varlığını ortaya koymada çeşitli serolojik testler mevcuttur. Bunlar; hemaglutinasyon, komplement fiksasyon, aglutinasyon, immunfloresans, indirekt immunfloresans, enzim immunoassay ve immunoblot teknikleridir (Wulffen 1992, Strauss-Ayali ve ark 1999, Rocha ve ark 2000)' dır.

*H. pylori* enfeksiyonunda serolojik testler endoskopiden kaçınıldığı durumlarda, seroepidemiolojik araştırmalarda, tedavinin kontrolü esnasında ve dispeptik hastalarda tarama testi olarak kullanılmaktadır (Wulffen 1992, Kist ve ark 1999, Monteiro ve ark 2001). İnsanlarda *H. pylori*'ye karşı oluşan dolaşımdaki IgG'nin ölçümü, *H. pylori* enfeksiyonunun teşhisinde spesifik ve sensitiv olmakla birlikte, aynı anda çok sayıda örnek kısa sürede işlenebilme olanağı sağlar (Wulffen 1992). ELISA testinde en önemli problem *H. pylori*'ye özgü saf antijenin elde edilmesidir. *H. pylori*'den elde edilen iki temel antijenin (flagella ve üreaz antijenleri) diğer bakterilerde de (*Campylobacter jejuni*, *C. coli*

ve *Gastrospirillum hominis*) bulunması (Wulffen 1992, Seidel ve ark 1999, Strauss-Ayali ve ark 2001), tedavi sonrası vücutta uzun süre ölü bakteri bulunması yanlış pozitifliğe yol açmaktadır (Kabir ve ark 2001). Dolaşan antikorların yetersiz oluşması veya yeterli bir şekilde oluşan antikorların dolaşıma geçmemesi (Fox ve ark 1999, Simpson ve ark 2000, Strauss-Ayali ve ark 2001), *H. pylori* enfeksiyonunun akut fazda olması, antijenin saf olarak hazırlanamamasının yanlış negatifliğe yol açtığı ileri sürülmektedir (Özden ve ark 1992). ELISA yetişkinlerde *H. pylori* enfeksiyonunu doğru bir şekilde teşhis ederken, özellikle 2-12 yaş arasındaki çocuklarda serum antikorları düşük seviyede bulunduğu için doğru teşhis yapılamamaktadır (Rocha ve ark 2000).

IgA' nın immun cevabı genellikle azdır ancak, ciddi yangı olaylarında işaretlenirse görülebilir. Sebebi bilinmemekle birlikte, *H. pylori* ile enfekte hastaların küçük bir yüzdesinde sistemik IgG antikorları oluşmaksızın, sadece IgM antikorları gözlenmektedir. *H. pylori*'ye karşı IgM cevabının bakterinin alınmasından 18 gün sonra, IgG ve IgA cevabının ise 60 gün sonra ve birlikte geliştiği belirlenirken, IgG ve IgA cevabı artarken IgM titresinin azaldığı bildirilmiştir. Bu durum *H. pylori* enfeksiyonunun erken döneminde IgM titresinin arttığını ve *H. pylori*'ye karşı oluşan immun cevabın diğer kronik enfeksiyonlardaki gibi olduğunu göstermektedir. Bu nedenle IgM ölçümünün, *H. pylori* enfeksiyonlarının erken teşhis ve tedavisinde faydalı olabileceği bildirilmiştir (Wulffen 1992, Alem ve ark 2002).

İnsan midesine sadece *H. pylori* kolonize olduğu için insanlarda enfeksiyonun serolojik teşhisi doğru ve basit bir şekilde yapılmakta ve ELISA testinin sensitivite (% 85-95) ve spesifitesi (% 95) yüksek bulunmaktadır (Özden ve ark 1992). Köpek midesine ise farklı gastrik bakteriler kolonize olmakta ve birden fazla *Helicobacter* türü birlikte koenfeksiyon meydana getirmektedir (Eaton ve ark 1996, Hanninen ve ark 1998, Fox ve Lee 1997, Strauss-Ayali ve ark 2001). Strauss-Ayali ve ark (2001), *H. felis*'ten hazırlanan HM-CAP antijenin kullanıldığı ELISA ile kedilerde 3 farklı gastrik *Helicobacter* türüne (*H. heilmannii*, *H. felis*, isimlendirilmemiş *Helicobacter spp.*) karşı oluşan IgG'leri teşhis edilebilmiş, ancak tek bir *Helicobacter* türünün varlığında serum antikorlarının önemini ortaya koyamamıştır. Köpeklerde de *H. pylori*, *H. felis* ve *H. bizzozeronii* antijenleri ile yapılan çalışmada da benzer bulgular tespit edilmiştir. Bu nedenle *Helicobacter* türlerine karşı oluşan antikorların serolojik teşhisi karmaşıktır. *Helicobacter* enfeksiyonlarına karşı bazı köpeklerin yetersiz immun cevap oluşturması da ELISA'nın sensitivitesini

etkilemektedir. ELISA *H. felis* ve *H. pylori* ile deneysel enfeksiyon sonrası serumda IgG antikorlarının tespiti amacıyla kullanılabilir. Germ free köpeklerde *H. pylori* ile deneysel enfeksiyon sonrası serum antikorları hızlı şekilde oluşurken, *H. felis*'le deneysel olarak enfekte köpeklerde daha yavaş ve değişik antikor oluşumu şekillenir. Köpekler mide florasında normalde gastrik bakterileri bulundurabilir bu nedenle de enfeksiyonun durumu serolojik olarak belirlenmemektedir (Fox ve ark 1999, Simpson ve ark 2000, Strauss-Ayali ve ark 2001).

Dot-İmmunobinding Assay (DIA), insan ve hayvan serumlarında antikor ve antijenlerin tespit edilmesi ve bunların işaretli antikorlar ile gösterilmesi esasına dayanan, katı faz olarak plastik, nitrosellüloz membran (NCM), agaroz ve sellülozun kullanıldığı modifiye bir enzim immunoassay'dir (Chand ve ark 1989). Katı faz olarak nitrosellüloz membran kullanılması, çok az miktarda antijen, antikor, konjugat ve substrat harcanmasını sağlar. Testte antikorları işaretlemek için enzim olarak peroksidaz, alkalen fosfataz veya avidin-biotin kullanılabilir (Cummins ve Reynolds 1990). DIA, enfeksiyonların tespiti, bakteri suşlarının antijenik ve patojenik özelliklerinin karşılaştırılması (Kempf ve ark 1994), monoklonal antikorların tespiti (Steinitz ve ark 1990) ve çözünmüş Fc $\gamma$  reseptörlerinin belirlenmesi (Kristoffersen ve ark 1994) amacıyla kullanılabilir.

Radhakrishnan ve Mathal (1991) dot-ELISA ve ELISA'yı *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu menenjit enfeksiyonu'nun tespitinde karşılaştırmışlar, kültür pozitif hastaların tespitinde dot-ELISA'nın yanlış negatiflik (% 60) verdiğini saptamışlar, bu nedenle ELISA testinin daha hassas olduğunu bildirmişlerdir. Tsai ve Saif (1991) hindilerde *Bordetella avium*'un tespiti amacıyla avidin-biotinle yükseltgenmiş DIA ve ELISA testlerini karşılaştırdıkları çalışmada ELISA'nın daha sensitiv olduğunu ortaya koymuşlardır. Ramadass ve ark (1993) sığırlarda rinderpest antikorlarının tespitinde dot-ELISA ve ELISA testlerini karşılaştırmış, sensitivite her iki metotda da benzer bulunmuş, uygulanmasında pahalı mikroplyetlere, ELISA okuyucusuna ve laboratuvara ihtiyaç duyulmadığı için dot-ELISA'nın ELISA'ya tercih edilebileceğini bildirmişlerdir. Chand ve ark (1989) sığır serumunda *Brucella* antikorlarının tespitinde NCM'de uygulanan DIA ve diğer serolojik testleri (SAT, RBPT ve CFT) karşılaştırmış, DIA ile 79, SAT ile 71, RBPT ile 72 ve CFT ile 78 serum pozitif olarak tesbit edilmiş olup, 6 serum örneği sadece DIA ile pozitif bulunmuş, bunun nedeninin NCM'e sekonder bağlanmaların

diğer testlere göre daha düşük olmasından kaynaklandığını ve bu sebeple daha hassas bir test olduğunu bildirmişlerdir.

DIA'nın diğer serolojik testlere göre yapılması kolay, saha şartlarında kolayca uygulanabilen, pahalı malzemeler gerektirmeyen, hızlı, oldukça spesifik ve sensitiv bir test olduğu, kan ve/veya serumla uygulanabilir olması ve eğitilmiş personele gerek duyulmaması gibi avantajları bulunduğu bildirilmektedir (Chand ve ark 1989, Condorelli ve Ziegler 1993).

Mukozal antikorlar Western blot tekniği ile incelendiğinde farklı hastalarda *H pylori*'nin değişik antijenlerine karşı farklı antikorlar oluştuğu gösterilmiş, bunun immun yanıtta farklılığa bağlı olabileceği bildirilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonu, bakteriyel antijenlerin konakçı epitoplarına benzerlik göstermesi nedeniyle gastrik otoimmünite şekillenmesine yol açabilir (Karasu ve Akarca 2000). İmmunoblot metodları; antijen hazırlama ve çeşitlerini çalışmada, antijen olarak bir veya birden fazla antijen kullanılmasına karar vermede, antijen miktarının kontrolünde, *H. pylori* antijenlerine karşı serum immun cevabını değerlendirmede, *H. pylori*'ye karşı oluşmuş düşük seviyedeki antikorları tesbit etmede başarılı bir şekilde kullanılabilen, *H. pylori* ile enfekte ve sağlıklı köpekleri birbirinden ayırt edebilen sensitiv bir metod olmasına rağmen, pahalı, zaman alıcı ve ELISA' dan zor bir metot olduğu bildirilmiştir (Wulffen 1992, Rocha ve ark 2000). ELISA ile birlikte kullanıldığında enfekte köpeklerin % 80'inin teşhisinin yapılabileceği bildirilmiştir (Strauss-Ayali ve ark 1999).

Serolojik testlerin, pratik ve uzun süreli tedavilerde, hastanın takibinde ve hastaya endoskop uygulanmasına karar vermede önemli olduğu belirtilmiştir (Wulffen 1992).

Üre solunum testi, işaretlenmiş ürenin midede üreaz enzimi ile amonyak ve bikarbonata ayrışması ve daha sonra solunum havasında işaretli karbonatın belirlenmesi esasına dayanan bir testtir. Köpeklerde gastrik helikobakterler ile enfekte köpekleri teşhiste güvenilir bir testtir. Tedaviyi izleyen 4-6 hafta sonra üre solunum testi tekrarlandığında bakteri yoğunluğunun ve üreaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak yanlış negatifliği önlediği ancak, üreaz üreten helikobakterler dışındaki bakterilerin varlığında (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeroginosa* vs) yanlış pozitiflik verdiği bildirilmiştir. Köpeklerde

enfeksiyon sonrası tedavinin doğrulanmasında da bu testin kullanılabilceği bildirilmiştir (Strauss-Ayali ve ark 1999).

Kearney ve ark (2001) sağlıklı ve *H. pylori* enfeksiyonu olan insanlarda ekspresyon havasındaki amonyak seviyesini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, hastaların ekspresyon havasındaki amonyak miktarının sağlıklı olanlara göre daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. *H. pylori*'nin teşhis ve tedavisinde Karbon 13 üre testinin (<sup>13</sup>C-UBT) kullanılması ile dispeptik rahatsızlığı olan hastalarda gereksiz endoskop uygulaması engellenebileceği (Sreedharan ve ark 2001) ancak, üreaz pozitif olan mikroorganizmaların yanlış pozitifliğe sebep olabileceği bu nedenle gözardı edilmemesi gerektiği bildirilmiştir (Strauss-Ayali ve ark 1999, Özşahin 2002). UBT'nin *H. pylori* enfeksiyonunun tedavi öncesi ve sonrası teşhisinde en duyarlı ve spesifik test olup küçük hayvanlarda da uygulanabileceği bildirilmiştir (Goddard ve Logan 1997). Karbon 13 üre testi, büyük çocuklarda ve erişkinlerde güvenilir olmasına rağmen, özellikle küçük çocuklarda güvenilir bulunmamış ve endoskopiye alternatif kabul edilmemiştir (Özşahin 2002).

*H. pylori*'ye karşı aşı çalışmalarında antijenik determinant olarak daha çok üreaz enzimi üzerinde durulmaktadır. Diğer virülens faktörleri (*VacA*, *CagA*, *UreB*, *HspA* ve *fosfolipaza* gibi yüzey antijenleri) de aşılama çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu antijenlerden hazırlanan aşılarda hayvanlarda tedavi amacıyla aşılama çalışmalarında kullanılmasına ve önerilmesine rağmen, mide mukozasından *H. pylori*'yi tamamen yok etmek, enfeksiyonun veya reenfeksiyonun şekillenmesini önlemek % 100 mümkün olmamaktadır (Hatzifoti ve ark 2000). *H. pylori*'ye karşı aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Fareler üzerinde yapılan bazı çalışmalar ümit verici olup, immünizasyon çalışmalarının mevcut enfeksiyonu % 100 olmasa da iyileştirebileceğini gösteren çalışmalar bildirilmektedir (Chen ve ark 2001, Zhu ve ark 2001)

İnsanlarda *Helicobacter* enfeksiyonu mortalite ve morbiditeye yol açmakta bu nedenle tedaviden ziyade korunma amaçlanmaktadır. Oral aşılama, farelerde *Helicobacter* enfeksiyonlarının tedavisi ve önlenmesinde başarılı bulunmuş olup, bu nedenle aşı çalışmaları üzerinde yoğunlaşmıştır (Veldhuyzen van Zanten ve ark 1997, Chen ve ark 2001, Zhu ve ark 2001).



Zayıflatılmış canlı *Salmonella typhimurium* suşu (mutant SL 3261 suşu) ile verilen *UreB*, *HpaA* veya *UreB/HpaA* füzyon proteini ile yapılan oral immünizasyon, *H. pylori*'ye karşı koruyucu immünite (% 75) sağladığı ve bivalan aşuların monovalan aşulara göre daha etkili olduğu bildirilmiştir (Zhu ve ark 2001). *H. pylori*'nin patojenik faktörü olarak bilinen katalaz enziminin sentezinden sorumlu genin, zayıflatılmış canlı *S. typhimurium* suşu (mutant SL 3261 suşu) ile farelerin oral yolla aşılması sonucu *H. pylori* enfeksiyonuna karşı korunma (% 61.5) sağlanmaktadır (Chen ve ark 2001).

*H. pylori*, *in vitro* bir çok antibiyotiğe duyarlı bulunurken, bakterinin mide mukus tabakası altına yerleşmesi, midenin asidik ortamı ve bazı antibiyotiklere tedavi sırasında direnç gelişmesi nedeniyle tedaviyi zorlaştırmakta ve kombine tedaviyi gerektirmektedir (Kadayıfçı ve Savaş 1997). Sağlıklı mide sıvısı asidik olduğundan birçok antibiyotik *H. pylori*'ye karşı zayıf aktivite göstermektedir. Bununla birlikte birçok antibiyotik (trimetoprim, vankomisin, sülfonamidler vs) pH 7.0'de duyarlıdır. Bu nedenle antibiyotikler asidi azaltan ilaçlarla birlikte kullanılmalıdır. İnsanlarda tedavide çoğul antibiyotik uygulamaları tercih edilmekte (Özden ve ark, 1993, Vandenplass 1999, Özşahin 2002), en iyi ilaç kombinasyonları olarak; omeprazol, klaritromisin ve metronidazol; omeprazol ve amoksisilin; bizmut subsalisilat, tetrasiklin ve metronidazol; omeprazol, bizmut subsalisilat, tetrasiklin ve metronidazol tavsiye edilmektedir (Veldhuyzen van Zanten ve ark 1997). Tedavide kullanılan ilaçların en az iki hafta kullanılması önerilmektedir (Tytgat ve ark 1991, Kadayıfçı ve Savaş 1997, Vandenplass 1999, Özşahin 2002).

Hayvan orjinli *Helicobacter* türlerinin antibiyotik duyarlılığını gösteren geniş kapsamlı çalışmalar yapılmamakla birlikte, ülserin ilerlemesini yavaşlatmak amacıyla antiasit grubu ilaçlardan proton pompa inhibitörleri ve H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Yıldırım ve İstanbulluoğlu 2002)

Gelişmekte olan ülkelerde insanlarda *H. pylori* enfeksiyonlarında metronidazol sık kullanıldığı için direnç şekillenmekte, bu nedenle tedavide metronidazol kullanılacaksa önce duyarlılık testi yapılması gerektiği bildirilmektedir (Şahin ve ark 1994). Amoksisilin, metronidazol ve bizmut subsitratdan oluşan insanlarda uygulanan 3'lü tedavi yöntemi, köpek gastrik bakterilerinin tedavisinde etkili bulunmuş, alternatif olarak, tetrasiklin ve omeprazole'ün de kullanılabilceği belirlenmiştir (Happonen ve ark 1998). Birçok

tedavi yöntemi, *H. pylori* enfeksiyonunu baskılamasına rağmen, tedavinin bırakılmasından hemen sonra aynı suş mideye tekrar kolonize olmaktadır. İlaç kombinasyonlarının tek ilaç kullanımından daha etkili olduğu belirlenmiş, bizmut preparatları, metronidazol, tinidazol, ve ofloksasin kısmi olarak tek başına etkili bulunmuştur (Tytgat ve ark 1991). *In vitro* olarak *H. pylori* suşları penisilin ve bazı antibiyotiklere karşı duyarlı bulunmuştur (Dunn ve ark 1997).

Özden ve ark (1993) dispepsi rahatsızlığı olan hastalara uyguladıkları dört farklı tedavi yöntemi içinde en etkili tedavinin üçlü tedavi olduğunu ortaya koymuşlar (Özşahin 2002), üçlü tedavinin (proton pompa inhibitörü + iki antibiyotik) 7-14 gün uygulanması ile *H. pylori* tedavisinin sağlanabileceğini bildirmişlerdir (Tytgat ve ark 1991, Vandenplass 1999).

Bu çalışma; insanlarda gastritis ve ülserden sorumlu tutulan, zoonoz olması muhtemel olan *H. pylori*'nin kedi ve köpeklerin mide biopsi örneklerinde varlığının kültür, direk üreaz testi, dot-immunobinding assay ve polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilmesi amacıyla yapılmış olup, kedi ve köpeklerde izolasyonu zor olan *H. pylori* için uygun besiyeri ortamının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kedi ve köpeklerde DIA'nın kullanılması ile endoskopa gerek kalmaksızın, *H. pylori* teşhisinde kullanılabilirliği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar tarandığında kedi ve köpeklerde *H. pylori*'nin varlığının PZR ile tesbiti tek bir çalışmada bildirilmiş olup, mevcut çalışma ile *H. pylori*'nin PZR ile de varlığının tespitine çalışılmıştır.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3. 1. MATERYAL

##### 3. 1. 1. Hayvan Materyali

Bu çalışma, 50 sokak köpeği ve 2 sokak kedisi üzerinde yapıldı. Endoskopta 41 köpeğin antrum ve aynı köpeklerin 40'ının korpus ve kardiasından biyopsi örneği, nekropsi ile de 9 köpeğin midesinin antrum, corpus ve kardiasından mide mukoza örneği alındı. Materyal alınan mide bölgeleri Tablo 3. 1. 1.'de gösterilmiştir. DIA testinde serumları kullanılmak amacıyla köpeklerin 39'undan kan alınırken, kedilerden alınamamıştır.

**Tablo 3. 1. 1. *Helicobacter* Türlerinin İzolasyonunda Biyopsi Örneklerinin Alındığı Bölgeler ve Sayısı**

Materyal	Materyal Sayısı	
	Köpek	Kedi
Antrum	50	2
Corpus	49	2
Cardia	49	2

##### 3. 1. 2. Deneme Hayvanları

*Dot-ELISA* testinde kullanılmak amacıyla *H. pylori*'ye karşı antiserum hazırlanmasında yetişkin Yeni Zelanda ırkı 5 adet beyaz tavşan kullanıldı.

##### 3. 1. 3. Referans Suş

Antijen hazırlamak ve PZR' da pozitif kontrol olarak *Helicobacter pylori* ATCC 11637 suşu kullanıldı. Referans suş, Hacettepe Üniv. Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yakut ÖZDEN tarafından sağlandı. Suşun morfolojik, kültürel, biyokimyasal özellikleri kontrol edilerek doğrulandı (Goodwin ve Worsley 1993, Bulut ve ark 2001).

##### 3. 1. 4. Besiyerleri

Biyopsi örneklerinin laboratuvara taşınması, örneklerden *H. pylori*'nin izolasyonu, dot-ELISA testi için antijen hazırlanması ve üreaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla; *Blood Agar Base (Oxoid)*, *Brain-Heart Infusion Agar (Oxoid)*, *Brain-Heart Infusion Broth (Oxoid)*, *Colombia Agar Base (Oxoid, CM331)*, *Urea Broth Base (Oxoid)* kullanıldı. Ayrıca kontaminasyonları önlemek amacıyla *H. pylori Skirrow Supplement 147 E (Oxoid)* kullanıldı.

### **3. 1. 5. Endoskop**

Biyopsi örneklerinin alınmasında Olympus GIF/CF/JF TYPE E (Olympus Optical CO., 2951 Ishikawa-cho, Hachioji Tokyo 192-8507, Japan) beşeri endikasyon amaçlı endoskop kullanıldı.

### **3. 1. 6. Dot-Immunobinding Assay Testi'nde Kullanılan Malzemeler**

#### **3. 1. 6. 1. Nitrosellüloz membran**

Katı faz olarak 0.22 µm pora sahip, 15x15 cm ebatlarda milipor nitrosellüloz membran (NCM) (Millipore, INCP 15150) kullanıldı. NCM' ler 0.75 x 0.75 cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesildi.

#### **3. 1. 6. 2. Konjugat**

Tavşanlardan hazırlanmış Alkalen fosfataz enzimi ile işaretli *Anti-dog IgG konjugatı* (Sigma, A-6042) kullanıldı. Konjugat yapılan standardizasyon gözönüne alınarak 1/6000 oranında sulandırıldı.

#### **3. 1. 6. 3. Substrat**

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma, B-5655) kullanıldı.

#### **3. 1. 6. 4. Stop solüsyonu**

Reaksiyonu durdurmak amacı ile % 0.12' lik hidroflorik asit kullanıldı.

#### **3. 1. 6. 5. Sulandırma ve Yıkama solüsyonu**

Antijen sulandırma solüsyonu olarak Phosphate buffer solüsyonu (PBS), konjugat ve serum örneklerinin sulandırma ve yıkama solüsyonu olarak % 0.05 Tween 20 (Sigma P-1379) içeren PBS (PBS-T) ve nitrosellüloz membranlara nonspesifik bağlanmaları engellemek için % 5 süt tozu içeren PBS-T kullanıldı.

#### **3. 1. 6. 6. Pozitif ve Negatif Serumlar**

Pozitif serum olarak tavşanlarda hazırlanan antiserum, negatif serum olarak tavşanlardan antiserum öncesinde alınan serum kullanıldı.

### **3. 1. 7. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Malzemeler**

#### **3. 1. 7. 1. Lizis Buffer**

50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM etilen diamin tetraasetikasit (EDTA), %1 sodyum dedosil sülfat ve ml'de 100 µg proteinaz K (Sigma, P 2308) içeren lizis buffer hazırlandı. Her bir örnek için 200 µl lizis buffer kullanıldı.

#### **3. 1. 7. 2. Fenol: Kloroform:İsoamilalkol**

Phenol: Chloroform:Isoamylalcohol (PCI) (sigma, P 2069) ( 25:24:1) kullanıldı.

#### **3. 1. 7. 3. Na-asetat**

3 N Na-asetat (pH 7.4) hazırlandı. 0.2 µm por çapına sahip süzgeç kağıdından süzülerek sterilize edildi.

### **3. 1. 8. DNA Amplifikasyonu' nda Kullanılan Malzemeler**

#### **3. 1. 8. 1. Thermal-cycler**

PTC- 100 Programmable Controller, MJ Research, Inc. (USA) kullanıldı

#### **3. 1. 8. 2. Primerler**

Primer olarak *H. pylori* kromozomal DNA dizisinden seçilen

CAM-2 (5'-TAA CAA ACC GAT AAT GGC GC-3') ve

CAM-4 (5'-CAT CTT GTT AGA GGG ATT GG-3') oligonükleotid primerleri

(Valentine ve ark 1992) (Qiagen) sentezletirildi. Primerler ¼ oranında sulandırılarak 25 µM kullanıldı.

#### **3.1.8.3. Taq Polimeraz**

Taq DNA polimeraz (Sigma, D 1806) kullanıldı.

#### **3. 1. 8. 4. Deoxynucleotide Set**

dNTP' ler (Sigma, DNTP-100) 25 µm oranında ddH<sub>2</sub>O ile sulandırılarak kullanıldı

#### **3. 1. 8. 5. Film**

Professional Coaterless B&W Instant Pack Film 3 ¼ x 4 ¼ in (8.5-10.8 cm, Polaroid 667) kullanıldı.

### **3. 1. 8. 6. Marker**

Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, SM02435 (0.01 mg) kullanıldı.

### **3. 1. 8. 7. Pozitif ve Negatif Kontrol**

Mide dokusuna BHI'da üretilen *H. pylori* referens suşu ilave edilerek DNA ekstraksiyon işlemi uygulandı ve PZR'a tabi tutuldu. Elde edilen PZR ürünü pozitif kontrol olarak kullanıldı. Steril ultra saf su ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

## **3. 2. METOT**

### **3. 2. 1. Endoskopi'nin Yapılışı**

Endoskop öncesi kedi ve köpekler bir gün aç bırakıldı. Endoskop aparatları uygulama öncesi ve sonrasında % 5' lik gluteraldehit ile dezenfekte edildi. Midenin antrum, corpus ve cardia bölgelerinden 3'er parça alındı. Bunların bir tanesi PZR'da kullanılmak üzere FTS içeren endoskopi tüplerine konarak - 80 °C' de muhafaza edildi. Örneklerin biri çabuk üreaz testi için üreli buyyona konuldu. Bir örnek de BHIB içinde homojenize edilerek ekime hazır hale getirildi.

Nekropsi yapılan köpeklerden aseptik şartlarda alınan mideler steril pens ve makaslar yardımıyla açıldı. Mide steril distile su ile yıkanarak mide içeriği uzaklaştırıldı. Bu işlem sonrasında midenin antrum, corpus ve cardia bölgelerinden 3'er parça alındı ve yukarıdaki işlemler uygulandı.

### **3. 2. 2. Direk Mikroskopik Muayene**

Kedi ve köpeklerden midenin antrum, corpus ve cardia bölgelerinden alınan biopsi örnekleri ile sürme froti yapılarak kurutuldu ve alkolle tespit edildi. Daha sonra Gram boyama ile boyanarak, mikroskopta spiral, gram negatif mikroorganizmalar arandı (Happonen 1999)

### **3. 2. 3. Kan Örneklerinin Alınması**

Anestezi öncesi köpeklerden kan örnekleri alınarak, serumları çıkması için oda sıcaklığında 4 saat (20-22 °C) bekletildi ve kan serumları kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Kedilerden kan alınmadı.

### 3. 2. 4. Besiyerinin hazırlanması

Antijen hazırlanması ve bakteri izolasyonu amacıyla çeşitli besiyerleri kullanıldı. Antijen hazırlanması amacıyla kanlı agar 40 g/lt olacak şekilde hazırlandı. pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Sıcaklığı 45 °C'ye düşürülerek besiyerine % 7 oranında defibrine at kanı ilave edildi ve petri kutularına döküldü. Hazırlanan besiyerleri 37 °C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı (Tee ve ark 1991, Xia ve ark 1994, Eaton ve ark 1996, Happonen 1996, Stevenson ve ark 2000). Bakteri izolasyonu amacıyla 3 farklı besiyeri *H. pylori* *Selektif* Supplement (Vankomisin 5 mg, Trimethoprim laktat 2.5 mg, Cefsulodin 2.5 mg, Amphotericin B 2.5 mg) ve % 7 defibrine at kanı içeren BHIA (Happonen ve ark 1998, Dore ve ark1999, Jalava 1999), Colombia Agar Base (Xia ve ark 1994, Hulst ve ark 1996, Bulut ve ark 2001) ve kanlı agar kullanıldı (Kjoller ve ark 1991, Hulst ve ark 1996). Bu besiyerleri üzerinde yazdığı şekilde hazırlandı ve sıcaklığı 45 °C'ye düşürüldükten sonra besiyerlerinin tümüne defibrine at kanı ve suplement ilave edildi. Besiyerleri taze olarak veya + 4 °C'de saklanarak, 2 hafta içinde kullanıldı.

### 3. 2. 5. Gastrik *Helicobacter* Türlerinin İzolasyonu

Endoskopi veya nekropsisi ile alınan örnekler BHIB'lu tüplere konularak hemen laboratuvara getirildi veya direk besiyerlerine ekildi (Happonen ve ark 1998, Jalava 1999). Mide örnekleri taze hazırlanmış % 7 defibrine at kanlı skirrow supplementli üç farklı besiyerine ekilerek, anaerobik (Anaerobik Gas Generating Kit, Oxoid BR 38) ve mikroaerofilik (Campygen, Oxoid CN 025) ortamlarda katalizatör bulunmayan jar içerisinde 37 °C' de 8-12 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde üreyen mikroorganizmaların koloni morfolojileri Helikobakterler yönünden incelendi. Şüpheli koloniler gram boyama yöntemi ile boyandı. Gram negatif spiral bakterilerin gözlendiği kolonilerden supplementli ve at kanlı BHIA'a pasaj yapılarak 37 °C' de 6-10 gün inkübe edildi. Üreyen mikroorganizmaların biyokimyasal testleri (oksidaz, katalaz ve üreaz) yapıldı (Happonen ve ark 1998, Jalava ve ark 1999, Bulut ve ark 2001).

### 3. 2. 6. Biyokimyasal Testler

#### 3. 2. 6. a. Oksidaz Testi

Bu testte Bactident Oksidaz (Oxoid, BR 64A) stripleri kullanıldı. BHIA' da üreyen ve pasajı yapılan gram negatif bakterilerden birkaç koloni alınarak Bactident oksidaz

şeritlerine sürüldü. 30-60 sn sonra meydana gelen mor renk “pozitif”, rengin değişmemesi “negatif” olarak değerlendirildi (Beşe 1974, Arda 1985, Koneman ve ark 1992).

### **3. 2. 6. b. Katalaz Testi**

Lam üzerine bir damla % 0.3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den konuldu. Bunun üzerine katı besiyerinden alınan koloni sürüldü. Hava kabarcıklarının görülmesi “pozitif” olarak değerlendirildi (Beşe 1974, Arda 1985, Koneman ve ark 1992).

### **3. 2. 6. c. Üreaz Testi**

Üreaz testi için katı besiyerinde üreyen şüpheli kolonilerden % 10 üre ve % 0.001 fenol red içeren üreli buyyona ekim yapıldı. 15-30 dak içerisinde sarıdan pembeye renk değişikliği “pozitif”, rengin değişmemesi “negatif” olarak değerlendirildi (Beşe 1974, Koneman ve ark 1992, Jalava 1999).

### **3. 2. 6. d. Direk Üreaz Testi**

Midede oluşan üreaz varlığını göstermek amacıyla yapıldı. Üreli buyyon 100 ml distile su içinde 10 gr üre eritilerek hazırlandı. İçerisine % 0,01 olacak şekilde fenol kırmızısı ilave edildi. Hazırlanan üreli buyyon 0.45 µm milipor filtreden geçirilerek sterilize edildi. Daha sonra 1.5 ml olacak şekilde küçük tüplere dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar +4 °C’ de muhafaza edildi. Alınan biyopsi örnekleri bu üreli buyyon içine konularak, 15-30 dakika içerisinde oda ısısında sarıdan pembeye renk değişikliği “pozitif”, rengin değişmemesi “negatif” olarak değerlendirildi (Happonen 1999, Jalava 1999, Erdeğer ve ark 2001).

### **3. 2. 7. Hiperimmün Serum Eldesi İçin Antijen Hazırlanması**

*H. pylori* ATCC 11637 suşu antijen kaynağı olarak kullanıldı. Bakteri % 7 defibrine at kanlı ve *Skirrow supplementli* kanlı agar’a ekilip 37 °C’de 4 gün inkübe edildi. Üreyen koloniler *fosfat buffer solüsyonu (PBS)* içeren tüplere toplanarak santrifüj edildi, toplanan bakteriler 3 kez PBS ile yıkandı. İçerisine % 0.3 olacak şekilde formol ilave edildi. Bakteri yoğunluğu McFarland No:7’ye göre ayarlandı. Kullanılıncaya kadar buzdolabında + 4 °C’ de muhafaza edildi (Poxton ve Blackwell 1986).



### 3. 2. 8. Hiperimmün serum Hazırlanması

Yeni Zelanda tavşanlarının kanları alınıp serumları çıkarıldı ve *H. pylori*'ye karşı antikor olup olmadığı lam aglütinasyon testi (LAT) ve mikro serum aglütinasyon testi (mSAT) ile kontrol edildi. Hazırlanan antijenler, tavşanlara kulak venasından damar içi yolla 5'er gün aralıkla 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml, 4 ml ve 5 ml dozlarında 6 hafta süreyle verildi. Son enjeksiyondan 10 gün sonra kanları alınarak serumları çıkartıldı.

Antikor oluşumu lam aglütinasyon testi ile negatif (-), +, ++ ve +++ olarak değerlendirildi. Daha sonra pozitif serumlar 1/10, 1/20, 1/40.....1/5120, 1/10240 olacak şekilde iki katlı sulandırmaları yapıldı ve antikor titreleri ölçüldü (Drasser 1986).

### 3. 2. 9. Dot Immunobinding Assay Test Antijeninin Hazırlanması

*H. pylori* ATCC 11637 suşu % 7 defibrine at kanlı ve *selektif supplementli* BHIA'da 4 gün inkübe edilerek üretildi. Üreyen koloniler PBS içinde toplanarak santrifüj edildi ve 3 kez PBS'le yıkanarak antijen konsantrasyonu  $1 \times 10^7$  (TP değeri 0.37 g/ml) olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonuna % 0.3 olacak şekilde formol ilave edildi ve 2500 rpm'de 45 dak santrifüj edildi. Bu üst sıvı antijen olarak kullanıldı (Erganiş ve ark 2002).

### 3. 2. 10. Dot-İmmunobinding Assay Testi (DIA) 'nin Yapılışı:

Serum örnekleri test edilmeden önce antijen, antiserum ve konjugatın (rabbit anti-dog IgG) optimal sulandırmalarının standartizasyonu yapıldı. Tavşanlarda hazırlanan antiserumun DIA ile en yüksek dilüsyonu 1/12800 olarak belirlendi.

Katı faz olarak 0.22 µm pora sahip NCM (0.75 x 0.75) kullanıldı. NCM'ler distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. PBS ile 1/6400 oranında sulandırılan antijen NCM'nin ortasına 1µl damlatıldı ve oda ısısında kurutuldu. Nonspesifik bağlanmalar % 5 süt tozu ilave edilmiş, PBS -T (% 0.005 Tween 20 içeren phosphate buffer solution) ile oda ısısında 1 saat tutularak engellenmeye çalışıldı. Daha sonra 3 kez PBS-T ile yıkandı. Oda ısısında kurutulduktan sonra üzerine PBS-T ile 1/100 oranında sulandırılmış test serumları 1µl olacak şekilde damlatıldı. Her test için pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. 37°C' de 30 dak inkübe edildikten sonra NCM' ler 5 kez PBS-T (her yıkamada 10 dak) ile yıkandı. NCM oda ısısında kurutuldu (Erganiş ve ark 2002). PBS-T ile 1/6000 oranında sulandırılan Konjugat (Alkale fosfataz, anti-dog IgG, Sigma, A-6042) ilave edilerek 37 °C'de 30 dak inkübe edildi. PBS-T ile 5 kez yıkandı. Daha sonra üzerine taze hazırlanmış substrat olarak

BCIP/NBT ilave edildi. Oda ısısında karanlık yerde 20 dak bekletilen substrat ilave edilmiş NCM'lerde renk değişimi gözlemlendi. Membranlar stop solüsyonu ile yıkanarak reaksiyon durduruldu. Mavi-mor renk gelişmesi "pozitif" olarak değerlendirildi (Folitse ve ark 1998).

### **3. 2. 11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR)**

#### **3. 2. 11. 1. DNA Ekstraksiyonu**

Dondurulmuş veya taze biyopsi örnekleri yeni ependorf tüplerine alındı. Örnekler üzerine 200µl lizis buffer konuldu. 56 °C' de 3 saat bekletildi. Daha sonra üzerine 200 µl fenol:kloroform:isoamilalkol (PCI) (25:24:1) (Sigma, P-3803) ilave edildi. 14000 rpm'de 10 dak 4 °C' de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Üst kısım başka bir tüpe alındı. 1:10 hacimde 3 M sodyum asetat ve 2,5 katı etanol ilave edildi. Tüpler -80 °C' de en az bir saat bekletildi. 14000 rpm'de 20 dak 4 °C' de santrifüj edilerek üst kısım atıldı. Üzerine 500 µl % 70'lik soğuk etanol ilave edildi ve tekrar 14000 rpm' de 15 dak 4 °C' de santrifüj edildi. Tekrar üst kısım atıldı. Dipteki DNA peleti iyice kuruyana kadar 37 °C'de bekletildi. DNA peleti üzerine 50 µl ultra saf su ilave edildi. DNA ekstraksiyonları PZR yapılarına kadar -20 °C'de muhafaza edildi (Valentine ve ark 1991, Bulut ve ark 2001).

#### **3. 2. 11. 2. DNA Amplifikasyonu**

Amplifikasyon her bir oligonükleotid primerinden (CAM-2 ve CAM-4) 0.5 µM içeren 40 µl PZR karışımında uygulandı. 10 X tepkime tamponundan (10 mM Tris-HCl (pH:9.0), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, % 0.1 Triton X-100) 5 µl, her bir primerden (0.5 µM) 1µl, 28.7 µl steril distile su, 0.3 µl Taq DNA Polimeraz (5U/ µl), 250 µM olan dNTP karışımı ve 10 µl kalıp DNA kullanılarak PZR'a uygulandı. Bu karışımın üzerine 2 damla mineral yağ bırakılarak ısı döngü cihazında, her döngüsü 95 °C'de 1 dakika, 42 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakikalık adımlardan oluşan 40 döngülük bir tepkimede çoğaltıldı. Daha sonra PZR ürünleri 0.5µg/ml etidyum bromid ve % 2'lik agaroz içeren jel ortamında elektroforez edildi. Marker olarak 100 bp'lık marker kullanıldı. 203 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *H. pylori* ilave edilmiş mide dokusunun ekstraksiyonu (doku+bakteri) veya sadece saf bakteri ekstraksiyonu kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4. 1. Klinik Bulgular

Endoskopi uygulanan kedi ve köpeklerin tümü klinik olarak sağlıklıydı. Endoskopik muayenede köpeklerden 2'sinde mide mukozasında ülser lezyonlarına ve 1' inde poliplere rastlandı. Otopsi yapılan köpeklerin midesinde patolojik herhangi bir lezyon görülmedi.

### 4. 2. Bakteriyolojik Bulgular

50 köpek ve 2 kedi midesinden alınan mukoza örneklerinden yapılan ekimler sonunda *Helicobacter* cinsine ait bakteri izole edilemedi. Ancak mide örneklerinin 3'ünde mantar, 4'ünde mantar+*Proteus spp.*, 6'sında sadece *Proteus spp.*, 2'sinde *Staphylococcus spp.*+ gram pozitif basil, 1'inde mantar+*E. coli*, 1'inde *Staph. spp.*+ gram pozitif basil, 2'sinde sadece gram pozitif basil, 1'inde mantar+ gram pozitif basil üretildi. *Proteus spp.* ve mantar besiyeri yüzeyini kapladığı için oluşan koloniler izole edilemedi. Köpeklerin 6'sının değişik bölgelerinden gram pozitif bakteriler üredi ancak bunların identifikasyonu yapılmadı (Tablo 4.1). Yirmialtı köpek midesinden yapılan ekimde ise herhangi bir üreme tesbit edilmedi. Kedilerden yapılan ekimlerde de üreme olmadı.

**Tablo 4. 1. Köpeklere ait mide örneklerinden izole edilen bakteriler**

Mikroorganizma	İzole edilen hayvan sayısı
<i>Proteus spp.</i>	10
<i>Staph. spp.</i>	3
<i>E. coli</i>	1
*Gram pozitif basil	6
**Mantar	9
Toplam	29

\* Gram pozitif basiller identifiye edilmedi

\*\* Kontaminasyon olduğu düşünülen mantarların identifikasyonu yapılmadı.

### 4. 2. a. Direk Mikroskopik Muayene

Köpeklere ait 50 mideden hazırlanan ve gram boyama yapılan 148 sürme preparattan 145'inde kısa ve uzun gevşek ve sık spiral mikroorganizmalar gözlemlendi. Bir köpeğe ait mide mukozasından boyamada herhangi bir bakteri görülmedi. Köpeklerin 3'ünde 10-12 kıvrımlı uzun spiraller gözlenirken (Resim 3), diğerlerinde gevşek ve sık kısa spiraller yaygın olarak gözlemlendi (Resim 4, 5). Midenin antrum bölgesinde bakteriler daha yoğun (20-25 bakteri/ mikroskop alanı), cardia bölgesinde ise daha az yoğunlukta (2-3 bakteri/mikroskop alanı)

gözlendi. Kedilere ait mide mukoza örneklerinin mikroskopik incelemesinde spiral gram negatif mikroorganizmalar tüm örneklerde gözlendi .

**Tablo 4. 2. Kedi ve Köpeklerde Midenin Değişik Bölgelerine Göre Mikroskopik inceleme (Gram boyama) ve Direk Üreaz Test Sonuçları**

Mide Bölgesi	Materyal sayısı		*Mikroskopik inceleme (Gram boyama)				*Direk üreaz Testi	
	Köpek	Kedi	Köpek		Kedi		(%) Köpek	(%) Kedi
			Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif		
Antrum	50	2	49	1	2	0	24( % 48)	2(%100)
Corpus	49	2	48	1	2	0	17( % 35)	2(%100)
Cardia	49	2	48	1	2	0	12( % 24)	2(%100)
Toplam	148	6	145	1	6	0	53( % 35)	6(%100)

\* Gram boyama ile spiral mikroorganizmaların gözlendiği mide mukozası örnek sayısı

\*\* Üreli buyyonda 30 dak. içinde renk değişiminin tesbit edildiği örnek sayısı

#### 4. 2. b. Direk Üreaz Testi

Midenin antrum, corpus ve cardia bölgelerinden alınan biyopsi materyallerine direk üreaz testi uygulandı (Resim 6). Köpeklerin tümünün antrumundan biyopsi materyali alınırken, 1'inin corpus ve cardiasından biyopsi örneği alınmadı. Elli köpeğin antrum biyopsilerinin 24 (% 48)'ü, 49 köpeğe ait corpus biyopsilerinin 17 (% 35) ve cardia biyopsilerinin 12 (% 24)'si direk üreaz testi ile pozitif bulundu. Kedilere ait biyopsi materyallerinin tümünde direk üreaz testi ile pozitiflik saptandı (Tablo 4. 2).

#### 4. 3. Seroloji

Kan serumları test yapılmadan önce antijen, antiserum ve konjugatın standardizasyonu yapıldı. En yüksek antijen titresi 1/6400 ve en düşük antikor titresinin 1/100 olduğu belirlendi. Konjugat sulandırması 1/6000 olarak tesbit edildi.

Bu sonuçlara göre test antijeni 1/6400 ve köpek kan serumları 1/100 ve konjugat sulandırması 1/6000 sulandırılarak test edildi. Mor renk değişimi pozitif olarak kabul edildi. Test serumlarının tümü dot-ELISA testi ile pozitif bulundu. Her test için pozitif ve negatif kontroller bırakıldı. Pozitif kontrollerde renk değişimi meydana gelirken, negatif kontrollerde renk değişikliği meydana gelmedi (Resim 7).

#### 4. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışmada 2 kedi ve 50 köpeğin mide mukozasından (antrum, corpus, cardia) alınan 154 biyopsi materyalinin kültüründe üreme tespit edilmezken, CAM-2 ve CAM-4 primerleri ile yapılan PZR’ında köpeklere ait biyopsi materyallerinin yalnızca 1’inin corpusunda (4 no’lu köpek) *H. pylori* yönünden pozitiflik bulundu (Tablo 4. 3, Resim 8). Smear veren örnekler ½ oranında sulandırılarak tekrar PZR’ a tabi tutuldu, bunların daha sonra da negatif verdiği gözlemlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan bakteri+doku ve bakteri ekstraksiyonlarının PZR ürünleri 203 bp’lik bant oluşturdu ve oluşan bant büyüklükleri örneklerle karşılaştırıldı (Resim 9).

**Tablo 4. 3. Kedi ve Köpeklerde mide materyallerinin alındığı bölgeye göre PZR sonuçları**

İncelenen mide bölgesi	İncelenen örnek sayısı	*PZR
Antrum	52	-
Corpus	51	1
Cardia	51	-
Toplam	154	1

\*Mide mukozasından PZR ile *H. pylori*’nin teşhis edildiği örnek sayısı

Köpeklerden elde edilen bütün test sonuçları Tablo 4. 4.’de verilmiştir.

**Tablo 4. 4. Köpeklerde Helikobakterlerin Kültür, Direk Üreaz testi, Mikroskopik muayene, Dot-ELISA ve PZR sonuçları.**

	Materyal sayısı	Pozitif (%)	Negatif (%)
<b>Kültür</b>	148	-	148
<b>Direk üreaz test</b>	148	53 (% 36)	95 (% 64)
<b>Mikroskopik muayene</b>	148	145 (% 98)	3 (% 2)
<b>PZR</b>	148	1 (% 0.68)	147( % 99.32)
<b>DIA</b>	39	39 (% 100)	-

Köpeklerden alınan 148 mide mukoza örneğinin hiçbirinden *Helicobacter* türüne ait bakteri izole edilemezken, direk üreaz testi ile örneklerin 53’ünde (% 36) pozitiflik, 95’inde (% 64) negatiflik tesbit edildi. Örnekler mikroskopik olarak incelendiğinde % 98’inde gram negatif spiral mikroorganizmalar gözlenirken, % 2’sinde görülmedi.

Tüm köpeklerden 5 farklı teşhis yöntemi ile elde edilen sonuçlar Tablo 4. 5.’de sunuldu.

**Tablo 4. 5. Köpeklerde beş farklı teşhis yönteminin birlikte karşılaştırılması**

Köpek No	Kültür	Direk Üreaz Testi			Mikroskopi	Seroloji	PZR
		antrum	corpus	cardia			
1	Mantar	-	-	-	+	+	-
2	Mantar	-	-	-	+	+	-
3	Mantar+ Proteus spp	-	-	-	+	+	-
4	Mantar +Proteus spp	+	-	-	+	+	+(corpus)
5	Proteus spp	-	-	+	+	+	-
6	Mantar+ Proteus spp	-	-	-	+		-
7	Mantar+ Proteus spp	+	+	-	+	+	-
8	Proteus spp	+	+	+	+	+	-
9	Staphylococcus spp + Gram pozitif basil	-	+	+	+	+	-
10	Proteus spp	+	+	+	+	+	-
11	mantar+E.coli	+	+	+	+	+	-
12	Staphylococcus spp + Gram pozitif basil	-	-	-	+	+	-
13	Staph spp+ gr pozitif basil	-	-	-	+	+	-
14	Proteus spp	-	-	+	+	+	-
15	Gram pozitif basil	-	-	-	+	+	-
16	Proteus spp	+	-	-	+	+	-
17	mantar +Gram pozitif basil	-	-	-	+	+	-
18	Üreme yok	+	-	-	+	+	-
19	Mantar	-	-	-	+	+	-
20	Proteus spp	-	-	-	+	+	-
21	Üreme yok	+	-	-	+	+	-
22	Üreme yok	+	+	-	-	+	-
23	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
24	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
25	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
26	Üreme yok	+	-	-	+	+	-
27	Gram pozitif basil	-	-	-	+	+	-
28	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
29	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
30	Üreme yok	+	-	-	+	+	-
31	Üreme yok	-	+	-	+	+	-
32	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
33	Üreme yok	+	+	+	+	+	-
34	Üreme yok	-	+	-	+	+	-
35	Üreme yok	+	+	-	+	+	-
36	Üreme yok	+	+	-	+	+	-
37	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
38	Üreme yok	+	+	+	+	+	-
39	Üreme yok	+	+	+	+	+	-
40	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
41	Üreme yok	+	-	+	+	+	-
42	Üreme yok	+	+	+	+	+	-
43	Üreme yok	+	-	-	+	+	-
44	Üreme yok	+	-	-	+	+	-
45	Üreme yok	+	+	-	+	+	-
46	Üreme yok	-	-	-	+	+	-
47	Üreme yok	+	+	-	+	+	-
48	Üreme yok	-	-	+	+	+	-
49	Üreme yok	+	+	-	+	+	-
50	Üreme yok	+	-	-	+	+	-

Kedilerden alınan 6 mide mukoza örneğinden bakteri izolasyonu yapılamazken mikroskopi ve direk üreaz testi ile örneklerin tümünde pozitiflik saptandı. Kedi mide mukoza örneklerinin PZR'ın da ise *H. pylori* tespit edilemedi.

Çalışmada 50 köpeğin mide mukozalarından alınan biyopsi örnekleri ve 39 köpekten alınan kan serumları bakteriyolojik (kültür, direk üreaz ve mikroskopi), serolojik ve PZR karşılaştırması Tablo 4. 5' de sunuldu.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Helikobakterler gram negatif, spiral ve mikroaerofilik mikroorganizmalardır. *Helicobacter* cinsinin gastrik spiral bakterisi olarak tanımlanan *H. pylori*, insanlarda peptik ülser, kronik gastritis ve mide kanserinin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Dunn 1993, El-Zaatari ve ark 1997, Strauss-Ayali ve Simpson 1999). İnsanlarda *H. pylori* enfeksiyonu dünyadaki en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biridir (Rocha ve ark 2000). *Helicobacter* türleri insanlar, primatlar, kedi, köpek, ferret, çita ve domuzların mide mukozalarından izole edilmiştir. Tedavisi olmasına rağmen dünyadaki insan popülasyonunun yarısının *H. pylori* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (Jenkins ve Basset 1997).

Ülkemizde hayvanlarda *Helicobacter* türleri ile ilgili birkaç çalışma bulunmaktadır (Hazıroğlu ve ark 1995, Yıldırım 1996, Diker ve ark 2001). Diker ve ark (2001) köpek midelerinde helikobakterlerin varlığını ortaya koymak için yaptıkları çalışmada 122 köpek midesini kültür, mikroskopi (kazıntı sitoloji) üreaz testi ve histolojik muayene ile incelemişler, 103 köpekte boyalı preparatta spiral mikroorganizmaları belirlemişlerdir. Midelerin 6'sından izole edilen spiral mikroorganizmaları *H. felis* olarak tanımlamışlardır. Yıldırım (1996) 75 köpek midesinden 2 *Helicobacter* suşu izole etmiş ve bunları *H. felis* olarak tanımlamıştır. Köpek midelerinde direk mikroskopi ve direk üreaz tanı yöntemleriyle de gastrik *Helicobacter* türlerinin teşhisi yapılmış olup, 75 köpeğin 46' (% 62) sında sık kıvrımlı spiral bakterileri tespit etmişlerdir. Direk üreaz testi ile de destekleyici sonuçlar (% 62) elde etmişlerdir. Helikobakterlerin boyalı preparatlarda tipik şekillerinin görülmesi, direk mikroskopi ile teşhisin spesifite ve sensitivitesini % 100 yapmaktadır. Yapılan çalışmada direk bakteriyoskopi ile gastrik spiral mikroorganizmalar yönünden pozitiflik oranının yüksek olması (% 98), önceki çalışmalarla uygun bulunmuştur (Hermanns ve ark 1995, Hanninen ve ark 1998, Cattoli ve ark 1999). Direk mikroskopi ve direk üreaz testi ile teşhis insanlarda rutin olarak kullanılmakta ve midede üreaz varlığı *H. pylori* enfeksiyonlarının önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Dolar ve ark 1992, Bulut ve ark 2002). Kedi ve köpeklerde mideye iki veya ikiden fazla *Helicobacter* türü kolonize olması nedeniyle direk bakteriyoskopide görülen bakterileri gastrik *Helicobacter* benzeri mikroorganizmalar olarak isimlendirmek ve tür ayırımında kullanmamak daha doğru olacaktır.



Bu çalışmada 50 köpek ve 2 kediye ait 154 mide biyopsi örneğinden yapılan ekimlerde *H. pylori* veya *Helicobacter benzeri mikroorganizmalar* izole edilemedi. Köpeklerde yapılan diğer çalışmalarda mideden *H. pylori* izolasyonu bildirilmemekle birlikte (Happonen ve ark 1996b, Jalava ve ark 1997, Jalava ve ark 1999, Buczolits ve ark 2003), kedilerde izolasyon bildirilmiştir (Perkins ve ark 1996, Handt ve ark 1994). Köpeklerde *H. pylori* izolasyonunun yapılamama sebebi; köpek midesinin *H. pylori* için uygun olmaması, bu nedenle de *H. pylori*'nin spiral formdan kültüre edilemeyen ancak canlı olan kokoid forma geçmesine bağlı olabilir (Buczolits ve ark 2003). Ayrıca insan ve köpeklerde mide ortamlarının farklı olması nedeniyle köpeklerde *H. pylori* var ise, mevcut *H. pylori*'yi üretmek için gerekli ortamın (besiyeri, suplement, pH vs) sağlanamaması ile açıklanabilir. Yapılan çalışmada, *H. pylori* dışındaki diğer gastrik *Helicobacter* türlerinin izole edilmeme nedeni ise çalışmada kullanılan kedi ve köpeklerin sağlıklı olması veya kültüre edilemeyen gastrik *Helicobacter* türlerinin çokluğu ile açıklanabilir. *H. heilmannii*'nin kültüre edilen ve edilemeyen iki formu bildirilmiş olup, birçok araştırmacı tarafından direk mikroskopide görülen ancak izole edilemeyen spiral mikroorganizmalar *H. heilmannii* veya *Gastrospirillum ssp* olarak isimlendirilmiştir (Cattoli ve ark 1999, Diker ve ark 2002). Bu çalışmada, alınan örnekler üç farklı besiyerine ekilerek anaerobik ve mikroaerofilik ortamlarda inkübe edilmiş, izolasyon bakımından besiyerleri ya da kitler arasında üreme yönünden fark gözlenmedi. Bu çalışma ile gastrik *Helicobacter* türlerinin kültürünün kedi ve köpeklerde zor ve genellikle başarısızlıkla sonuçlanabileceği ortaya konuldu.

Yapılan çalışmada otopsi ile alınan örneklerden yapılan ekimlerde rastlanan *Proteus ssp*/mantar izolasyonu kontaminasyon olarak açıklanabilir.

Kedi ve köpeklerde gastrik helikobakterlerin mikroskopik inceleme ile prevalansının yüksek olduğu belirlenmiştir. Helikobakterler köpeklerin midesinde yaygın bir şekilde kolonize olmaktadır. Bu bulgu benzer araştırmalarda (Hermanns ve ark 1995, Hanninen ve ark 1998, Cattoli ve ark (1999) da ortaktır. Pet köpekleri ve laboratuvar köpeklerinin % 67- % 100'ünde *Helicobacter* türleri tanımlanmıştır. (Geyer ve ark 1993, Hermanns ve ark 1995, Hanninen ve ark 1998, Yamasaki ve ark 1998). Klinik olarak sağlıklı köpeklerde gastrik spiral bakterilerin prevalansı, sağlıklı olmayanlardan daha yüksek bulunmuştur (Yamasaki ve ark 1998). Klinik olarak sağlıklı insanlarda da *H. pylori* tanımlanmıştır (Geyer ve ark 1993).

Bu çalışmada köpek mide mukozaları bakteriyoskopi ile incelendiğinde, antrumda corpus ve cardia' ya göre bakteri yoğunluğunun fazla olduğu belirlenirken, diğer çalışmalarda (Jalava ve ark 1998, Cattoli ve ark 1999, Jalava 1999) fundus ve corpus'da, antruma göre daha yoğun bakteri kolonizasyonu bildirilmiştir. İnsanlarda *H. pylori* antruma daha sık yerleşmektedir (Ekinci ve ark 1992, Erdeğer ve ark 2001). Bu çalışmada da köpek midesinde helikobakterlerin kolonizasyon yoğunluğu insanlara benzer bulunmuştur.

Çalışmada 50 köpek ve 2 kediden alınan 154 mide biyopsi örneğinden yapılan direk üreaz testinde kedilerin tümünde pozitiflik saptanırken, köpeklerin antrum, body ve cardia bölgelerinden sırasıyla 24 (% 48), 17 (% 35), 12 (% 24) pozitiflik tesbit edilmiştir. Köpeklerde direk üreaz testi ile bulunan sonuçlar, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında çok düşük bulunmuştur. Nitekim, Happonen ve ark (1996) kedi ve köpeklerde yaptıkları çalışmada direk mikroskopi ile 10 köpeğin 10'unda (% 100) ve 10 kedinin 6'sında (% 60) gastrik *Helicobacter* türlerinin varlığını belirlemişler, direk üreaz testi ile de tüm örneklerde (corpus örneklerinin % 100, fundus örneklerinin % 95 ve antrum örneklerinin % 62' sinde) pozitiflik tespit etmişlerdir. Happonen ve ark (1998) 25 sağlıklı ve 21 gastritisli köpekte yaptıkları çalışmada mide örneklerinin tümünde direk mikroskopi ve direk üreaz testi ile pozitiflik saptamış ancak antrumda, corpus ve fundusa göre daha az bakteri yoğunluğu tespit etmişlerdir. Diker ve ark (2002) 122 köpekte yaptıkları çalışmada direk üreaz testi ile tüm örneklerde pozitiflik tespit ederken, 103 örnekte gram negatif, spiral mikroorganizmaların varlığını belirlemişlerdir. Bunun sebebi; biyopsi örneklerinin üreli buyyona atıldıktan 30 dakika sonra sonucun okunmasına bağlı olabilir. Nitekim gastrik *Helicobacter* türleri kuvvetli üreaz enzimi nedeniyle 15-30 dakika içinde üreyi parçalamaktadır. Negatif olarak değerlendirilen tüpler süre uzadıkça pozitif reaksiyon vermektedir. Diğer çalışmalarda ise test süresinin 60 dakika hatta 24 saat sonra değerlendirildiği bildirilmiştir. Köpeklerin sağlıklı olmasına bağlı olarak bakteri sayısının az olması, üreazın geç şekillenmesine neden olabilir.

Ülkemizde pet hayvanlara endoskopi nadiren uygulanmaktadır. Bu çalışmada köpeklerden örnekleme endoskop ile yapılmış olup, uygulaması oldukça kolay bulunmuştur. Endoskop midede geniş bir alanın taranmasını sağlamakta ve örnekleme yapılırken hayvanlara herhangi bir zarar verilmemektedir (Lee ve ark 1992, Eaton ve ark 1993, Jenkins ve Basset 1997).

Bu çalışmada DIA testi ile 39 köpek kan serumunda *H. pylori*'ye karşı oluşmuş antikor titreri tespit edilmeye çalışıldı. Serum örneklerinin tümü DIA testi ile pozitif (% 100) bulundu. Köpeklerde *H. pylori*'ye karşı oluşan IgG'lerin tespiti, midede 5 farklı gastrik *Helicobacter* türünün (*H. felis*, *H. bilis*, *H. bizzozeroni*, *H. salomonis*, *H. heilmanii*) bulunması ve birden fazla türün birlikte enfeksiyon meydana getirmesi nedeniyle serolojik testlerin kullanımında insanlardaki gibi doğru sonuç alınmasını engellemekte ve yalnız bir tür için serolojik testlerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. *H. pylori*'de bulunan üreaz ve flagellar antijenlerin diğer *Helicobacter* türleri ve bakterilerde bulunması sadece *H. pylori*'ye spesifik antijen hazırlanmasını engellemektedir (Strauss-Ayali ve ark 1999). DIA testi ile pozitifliğin % 100 olması bu sebeplere ve çapraz reaksiyonlara bağlanmıştır.

Strauss-Ayali ve ark (1999) sağlıklı ve enfekte köpeklerde *ELISA* ile *H. pylori*'nin *ÜreA*, *ÜreB* ve *HSP* antijenlerine karşı IgG varlığını teşhis etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, köpeklerdeki *ELISA* bulguları insanlardakine benzer bulunurken, sensitivite düşük bulunmuştur. Sağlıklı köpeklerin aynı zamanda *ÜreB*'ye karşı oluşmuş antikorlara sahip olduğu tespit edilmiş, bunun midede bulunan diğer üreaz üreten bakterilere (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* vs) karşı oluşan immün cevaptan kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Bazı köpeklerde de *H. pylori* enfeksiyonlarına karşı immün cevap oluşmamakta bu da serolojik testlerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Seidel ve ark (1999) 49 kedi ve 61 köpek serumunda *H. felis*'i teşhis etmek için yaptıkları çalışmada, köpeklerin 26'sında (% 43) kedilerin 19'unda (% 39) serum pozitif bulmuş, *ELISA*'nın teşhiste kolayca kullanılabileceğini, ancak *Helicobacter* türleri arasında serolojik olarak kros reaksiyon bulunduğunu bu nedenle tek bir türe karşı serolojik cevabın karmaşık olduğunu bildirmişlerdir. Dore ve ark (2001) 6 çoban köpeğinde *H. pylori*'nin varlığını *ELISA* ile tesbit etmek için yaptıkları çalışmada, köpeklerin tümünde pozitiflik tesbit etmişlerdir. İnsan, kedi ve köpekte teşhiste serolojik testleri tek başına kullanmanın uygun olmadığı bildirilmiştir (Strauss-Ayali ve ark 1999). İnsan *ELISA* kiti ile tek bir *Helicobacter* türünü kedi ve köpeklerde teşhiste kullanmak çapraz reaksiyonlar nedeniyle uygun olmayabilir. *Helicobacter* türleri arasında ve bazı bakterilerle homolog antijene sahip olmaları nedeniyle serolojik testlerle tek bir bakterinin teşhisi yapılmamalı, diğer tekniklerle teşhis yoluna da gidilmelidir. Bu çalışmada *H. pylori* 'den hazırlanan antijenle diğer helikobakterlere veya ortak fagella ve üreaz antijenleri bulunduran bakterilere karşı oluşan homolog antikorlarda tespit edilmiş olabilir. Bu nedenle test sonuçlarının diğer serolojik testlerle birlikte değerlendirilmesi gereği ortaya çıkmaktadır. Dot-*ELISA*'da test

edilen serum örneklerinin ticari ELISA test kitleri ile de doğrulanması gerektiği düşünülmektedir.

Moleküler çalışmalar son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış olup, biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin hızlı bir şekilde teşhisi ve kültür ile izole edilen helikobakterlerin tiplendirilmesi amacıyla başvurulmaktadır. Klinik örneklerden *H. pylori* saptanması için çeşitli genlere (*cagA*, *HspR*; *iceA*, *üreC(glmM)*, *üreazA* vs) yönelik PZR metotları geliştirilmiştir (Lu ve ark 1999, Ito ve ark 2000, Sozzi ve ark 2001, Altuntaş-Dönmez ve Güven 2002, Delany ve ark 2002, Saltık ve ark 2003). PZR yönteminin bakterinin canlılığına gerek olmaması, çok az sayıdaki bakteriyi teşhis etmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Bulut ve ark 2001).

Bu çalışmada 154 mide mukoza örneğinin kültüründe *H. pylori* ve *Helicobacter* türlerinin izolasyonu yapılamazken, CAM-2 (5'-TAA CAA ACC GAT AAT GGC GC-3') ve CAM-4 (5'-CAT CTT GTT AGA GGG ATT GG-3') primerlerinin kullanıldığı PZR ile 1 pozitiflik saptanmış olup, köpeklerde *H. pylori*'nin bulunabileceğini göstermektedir. Nitekim Buczolics ve ark (2003) ilk defa köpeklerde *Helicobacter* spesifik H276f/H676r primerlerini kullanarak PZR ile *H. pylori*'nin varlığını göstermiş ancak izolasyon bildirmemişlerdir.

“*Helicobacter tür spesifik*” ve “*Helicobacter cins spesifik primerler*” kullanılarak mide biyopsi örnekleri ve mide sıvısına PZR uygulanması oldukça spesifik ve sensitivdir (Eaton ve ark 1996, Perkins ve ark 1996, Neiger ve ark 1998, Strauss-Ayali ve ark 1999). Primerler 16 S rRNA, üreaz ve adhezin genlerinden elde edilebilir. İnsan orjinli *Helicobacter* türlerini (*H. pylori*, *H. felis*, *H. bizzozeroni*, *H. salomonis*, *H. canis* vs) birbirinden ayırt etmede ve yeni gastrik helikobakterlerin belirlenmesinde PZR'nin spesifite ve sensitivitesi oldukça yüksek bulunmuştur (Cattoli ve ark 1999).

Yoshida ve ark (1998) 114 hastanın mide sıvısı örneklerini alarak kültür, mikroskopi, hızlı üreaz testi ve PZR ile karşılaştırmışlar, kültür, mikroskopi, hızlı üreaz testi ile *H. pylori* negatif bulunan 18 hastada PZR ile pozitiflik saptamış ve kültür negatif peptik ülserli hastalara PZR'in uygulanması gerektiğini, biyopsi teşhis metoduna ek olarak mide sıvısının da kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Dönmez-Altuntaş ve Güven (2002), insanlarda mide biyopsi örneklerinde *H. pylori*'yi "nested" PZR ve hızlı üreaz testi ile belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 64 hastanın 42'si direk üreaz testi ile pozitif bulunurken, 60'ı nested PZR ile pozitif, 4'ü hem nested PZR hem de direk üreaz testi ile negatif bulunmuştur. PZR testinde ise % 53.1'lik pozitiflik saptanmış olup, nested PZR'ın daha spesifik ve duyarlı olduğu belirlenmiştir. PZR yönteminde kullanılan primerlerin seçimi test sonuçlarını etkilemektedir. Bu nedenle *Helicobacter* türleri arasında çapraz reaksiyon vermeyen primerler seçilmelidir (Neiger ve ark 1998). Lu ve ark (1999) beş farklı primer kullanarak insanlarda yaptıkları bir çalışmada, *16 S rRNA* geni kullandıkları PZR protokolünde pozitif tahmini değeri % 100, negatif değeri % 46, *CAM-2* ve *CAM-4* primerleri ile sırasıyla % 75 ve % 96, *26- kDa SSA* geni ile % 100 ve % 54, *üreA* geni ile % 38 ve % 96, *üreC (glmM)* geni ile % 100 ve % 96 saptamışlar, en duyarlı ve en özgül sonuçları *ÜreC* geni kullandıkları PZR protokolü ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Valentine ve ark (1992), *CAM-2* ve *CAM-4* primerlerini kullanarak insan mide dokusundan ve mide sıvısından DNA ekstraksiyonu yapmış ve PZR'a uygulamışlardır. Kültür ve mikroskopi ile pozitif 14 mide örneğinin 13'ünden PZR ile pozitiflik saptanmış, negatif olduğu belirlenen 19 örneğin hiçbirinden tesbit edilememiş, kültür ve mikroskopi ile pozitif 13 mide sıvı örneğinin 11'inden (% 85) ve negatif olduğu belirlenen 14 örneğin 1'inden (% 7) PZR ile pozitiflik saptamışlardır. Bulut ve ark (2001) *CAM-2* ve *CAM-4* primerlerini kullanarak yaptıkları çalışmada kültür pozitif olan insan mide mukoza örneklerinin tümünde PZR ile pozitiflik saptamış, pozitif tahmini değeri (PPD) % 65, negatif tahmini değeri (NPD) % 100 olarak bildirmişlerdir.

Lu ve ark (1999), insanlarda yaptıkları çalışmada *CAM-2* ve *CAM-4* primerlerini kullandıkları PZR metodunda % 75 PPD ve % 96 NPD bildirmişlerdir. Bulut ve ark (2001) *CAM-2* ve *CAM-4* primerlerini kullandıkları çalışmada ise sensitivite % 100, spesifite % 64.4, PPD % 65, NPD % 100 olarak saptamışlardır. *H. pylori* DNA dizgisinden seçilen *CAM-2* ve *CAM-4 (random dizisi)* primerlerini kullanılan bu çalışmada 148 örnekten sadece 1'inde pozitiflik saptanmış olup, yukarıdaki çalışmalara göre özgüllüğü oldukça düşük bulunmuştur. Bunun sebebi; bildirilen çalışmaların insanlarda yapılmış olması ve insan midesinin sadece *H. pylori* ile kolonize olması, insanlardan *H. pylori* izolasyonunun kedi ve köpeklerle göre daha kolay olması, köpeklerde *H. pylori* izolasyonunun yapılamaması ve mideye *H. pylori* yerine diğer helikobakterlerin kolonize olabilmesi ile açıklanabilir.

Sonuç olarak;

1. Köpeklerde *H. pylori* ve diğer gastrik helikobakterlerin izolasyonunun oldukça zor olduğu ve bu zorluğun köpeklerin midesinin *H. pylori* için uygun olmaması, bu nedenle de kültüre edilemeyen kokoid forma dönüşmesi, ayrıca köpek mide ortamının insanlardan farklı olması nedeniyle izolasyon için daha özel laboratuvar şartlarına gereksinim duymasına bağlı olabileceği,
2. Midenin antrum bölgesinde spiral mikroorganizmaların insanlardakine benzer şekilde, corpus ve cardiadan daha yoğun bulunduğu,
3. Kedi ve köpeklerde gastrik helikobakterlerin varlığının belirlenmesinde en spesifik teşhis metodunun mikroskopik muayene olması,
4. Direk üreaz testi ile de gastrik helikobakterlerin varlığının tespit edilebileceği,
5. DIA testinin köpeklerde *H. pylori* ve *Helicobacter* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılmasının olası çapraz reaksiyonlar ve homolog antijenlerden dolayı yanlış pozitifliğe yol açabileceği, bu nedenle serolojik testlerle teşhisinin oldukça karmaşık olduğu, birden fazla serolojik testin birlikte değerlendirilmesi gerektiği,
6. Gastrik *Helicobacter* türlerinin herbirine spesifik, birbirlerinden ve diğer bakterilerden farklı antijenik özelliklerinin tesbiti amacıyla çalışmalar yapılması gerektiği,
7. Köpeklerde mide mukozasına birden fazla *Helicobacter* türü yerleşebileceğinden, mikroskopik muayenede görülen fakat izole edilmeyen bakterilerin teşhisinde PZR'ın kullanılabilmesi, ancak tüm gastrik helikobakterlere spesifik primerlerle birlikte çalışılmasının faydalı olabileceği;
8. Köpeklerde *H. pylori* ve gastrik *Helicobacter* türlerinin izolasyonu için daha selektif besiyerlerinin yapılması ve standart üretme şartlarının belirlenmesi gerektiği ve serolojik olarak doğru teşhis için tür bazında farklı antijenik yapılarının belirlenmesi gerektiği,
9. SDS-Page analizleri ve diğer moleküler tiplendirme yöntemleri ile köpeklerde ve kedilerdeki olası *H. pylori* suşu ile insan orjinli *H. pylori* suşlarının karşılaştırılmasının gelecekteki çalışma konusunu oluşturabileceği kanısına varılmıştır.

## 6. ÖZET

S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Mikrobiyoloji (VET) Anabilim Dalı  
DOKTORA TEZİ/ KONYA-2004

Dilek ÖZTÜRK

### **Kedi ve Köpeklerde *H. pylori*'nin Dot-ImmunoBinding Assay (DIA) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Teşhisi**

*Helicobacter* türleri, insan ve çeşitli hayvanların sindirim sistemine yerleşen spiral şekilli mikroorganizmalar olup, insan ve hayvanlarda varlığı uzun zamandır bilinmektedir. *H. pylori*, insanlarda gastritis, peptik ülser ve mide adenokarsinomalarının bir nedeni olarak gösterilmektedir.

Bu çalışmada, kedi ve köpeklerin mide mukozalarından endoskopi ile biyopsi örnekleri alındı ve *H. pylori*, kültür, mikroskopi (firça sitoloji), üreaz testi, *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)* ve *Dot-ImmunoBinding Assay (DIA)* ile araştırıldı. Klinik olarak sağlıklı 50 köpek ve 2 kedi bu çalışmada kullanıldı. Köpek ve kedi midelerinin antrum, korpus ve kardial bölgelelerinden 3'er biyopsi örneği alındı. DIA testinde kullanılmak üzere köpek kan serum örnekleri alındı.

Kedi ve köpeklerde *H. pylori* ve diğer *Helicobacter* türleri izole edilemedi. İzole edilemeyen ancak mikroskopide görülen spiral, gram negatif mikroorganizmalar "*Gastrik Helicobacter Benzeri Mikroorganizmalar*" olarak isimlendirildi. Kedi ve köpeklerden alınan 154 mide mukozal örneğinin 59'u, Direk üreaz testi ile Helikobakterler yönünden pozitif bulundu. Üreaz testi ile antral örneklerin 26'sında (% 44), korpus örneklerinin 19'unda (% 32) ve kardial örneklerinin 14'ünde (% 24) gastrik mikroorganizmalar pozitif bulundu.

Köpeklerden alınan 39 serum örneği *DIA* ile test edildi ve tüm serum örnekleri, *Helicobacter* pozitif olarak tespit edildi. 148 köpek ve 6 kedi mide mukozal örneği, *CAM-2*(5'-TAA CAA ACC GAT AAT GGC GC-3') ve *CAM-4* (5'-CAT CTT GTT AGA GGG

GTT AGA GGG ATT GG-3') primerleri kullanılarak, PZR'a tâbi tutuldu. Bir köpeğin korpusunda *H. pylori* pozitif tesbit edildi.

Sonuç olarak; Bu çalışma ile, kedi ve köpeklerde gastrik helikobakterlerin kültürünün zor ve özel ihtiyaçları nedeniyle genellikle başarısızlıkla sonuçlandığı doğrulandı. Kültür, insanlarda gastrik *Helicobacter* türlerinin teşhisi için "gold standart" olmasına rağmen, kedi ve köpeklerde izolasyon zordur. Bu nedenle direk üreaz test ve direk mikroskopi (firça sitoloji) ön tanı amacıyla yapılmalıdır. DIA testi ile % 100 pozitiflik, homolog antijenler ve çapraz reaksiyonlar nedeniyle yanlış pozitiflik olarak değerlendirilmiş olup, *H. pylori*'ye spesifik antijenik yapıların ortaya konulması ile bu sorun ortadan kaldırılabılır. Çalışmada, PZR ile köpeklerde *H. pylori* varlığı tesbit edilmiştir. Yeni çalışmaların klinik olarak da hasta olan kedi ve köpeklerden alınacak biyopsi örnekleri ile farklı primerler kullanılarak yapılmasına ve zoonoz ihtimalinin araştırılmasına yönelmesi önerilebilir.



## 7. SUMMARY

### Detection of *H. pylori* by Dot-Immunobinding Assay (DIA) and Polymerase Chain Reaction (PCR) in Cats and Dogs

Species belong to *Helicobacter* genus which are spiral shaped microorganisms and colonised in the alimentary tract of human and several animal species have been known for a long time. *H. pylori* is shown as a causative agent for gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma in human.

Biopsy samples from gastric mucosas of cats and dogs were taken by endoscopy in this study. The presence of *H. pylori* in the samples was investigated by culture, microscopy (brush cytology), direct urease test, *PCR* and *DIA*. A number of 50 dogs and two cats which were clinically healthy was employed in the study. Three each of biopsy samples from gastric regions of antrum, corpus and cardia of the cats and dogs were taken. Serum samples from the dogs were also obtained to examine using for the *DIA* test.

Neither *H. pylori* nor any other *Helicobacter spp.* could be isolated from the animals used in the study. Gram negative microorganism which have not been able to be isolated although detection by other methods was achieved were called "*Gastric Helicobacter-Like - Microorganism*".

In 59 out of 154 gastric mucosa samples, positivity for *Gastric Helicobacter-Like - Microorganism* by the direct urease test were found in 26 (44 %) of samples from antrum, 19 (32 %) from corpus and 14 (24 %) from cardia.

Sera from the dogs (n=39) were tested by *DIA* and all found to be positive. Mucosa samples of the dogs (n=148) and cats (n=6) were analysed using *CAM-2* and *CAM-4* primers by *PCR* and produced only one positive result from a dog's corpus.

Consequently, culturing *Helicobacter* species from the gastric biopsy materials obtained from dogs and cats was verified to be difficult and be frequently resulted in failure since some specific requirements in culturing were necessary. Although culturing is referred as "gold standard" in diagnosis of human-originated *Helicobacter* species; it

should not be the case for the trials concerning cats and dogs. Therefore, it is concluded that the direct urease test and the microscopy (brush cytology) together is currently the only way to pre diagnose the *Helicobacter* in the mucosa of the cats and dogs.

Future work can be focused on investigating the presence of Helicobacters in biopsy samples from clinically sick cats and dogs by PCR using different primers and examining possible zoonotic nature of the infection.



## 8. KAYNAKLAR

- Abu Al-Soud W, Bennedsen M, Nilsson H, Son NT, Hynes S, Grondal C, Andersen LP and Wadström T (2001) *Hayvanlarda PCR-DGGE Yöntemi ile Helicobacter Türlerinin Belirlenmesi*, In "Gut, XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*", Strasbourg, France, 5-8 September, Çeviri, Edt Kalaycı C, Abstract,
- Alem M, Alem N, Cohen H, England T, Hamed N, Moussazadeh M, Roth JA and Shen GQ (2002), *Diagnostic Value of Detection of IgM Antibodies to Helicobacter pylori*, Exp Mol Pathol, 72, 77-83.
- Arda M (1985) *Biyokimyasal Aktivitenin Ölçülmesi*, "Genel Bakterioloji", 436-437, Ank Üniv Basımevi, Ankara.
- Beşe M (1974) *Biyokimyasal Deneyler*, "Mikrobiyolojide Kullanılan Biyokimyasal testler ve Besiyerleri", 96-100, Ank Üniv Basımevi, Ankara.
- Blomberg L, Luhr A, Meier PN, Hauschild S, Brewitt H (2001) *Helicobacter pylori infection and the Dry eye*, 99 Jahr der DOG, Abstract.
- Buczolits S, Hirt R, Rosengarten R and Busse HJ (2003) *PCR-based genetic evidence for occurrence of Helicobacter pylori and novel Helicobacter species in the canine gastric mucosa*, Vet Mic, 95, 259-270.
- Bulajic M, Mueller P, Loehr M, Stimec B and Bulajic M (2001) *Safradaki Helicobacter pylori Enfeksiyonu, Biliyer Maliniteler ve Yaşam Alışkanlıkları (Sigara ve Kahve Kullanımı) Arasındaki İlişki Var mı?* In "Gut, XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*", Strasbourg, France, 5-8 September, A 68, Çeviri, Edt Kalaycı C, Abstract.
- Bulut Y, Kizirgil A, Kalkan A, Koçköprü İ, Toraman ZA ve Doymaz MZ (2001) *Mide Biyopsi Örneklerinde Kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemleriyle Helicobacter pylori Araştırılması*, Mikrobiyol Bült, 35, 345-350.
- Cattoli G, Vugt R, Zanoni RG, Sanguinetti V, Chiochetti R, Gualtieri M, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Gaastra W, Kusters JG (1999) *Occurrence and characterization of gastric Helicobacter spp. in naturally infected dogs*, Vet Microb 70, 239-250.
- Chand P, Sadana JR, Batra HV and Khanna RNS (1989) *Comparison of Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) with other Serological Tests for the Detection of Brucella Antibodies in Bovine Sera*, J Vet Med 36, 346-352.

- Chen I, Chen MH, Yu J, Leung WK, Zhu SL, Lianol WJ, Hu PJ, Sung JJY (2001)** *H. pylori* Antijenleri Expresse eden Zayıflamış *Salmonella thphimurium* Farelerde Th1 tip İmmun Yanıt Ortaya Çıkarmaktadır, Gut, XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*, Strasbourg, France, 5-8 September, A 46, Çeviri, Edt Kalaycı C, Abstract.
- Chisholm SA and Owen RJ (2001)** Tek Aşamalı Multipleks PCR Sistemi ile *VacA* Genotipinin Doğrudan Mide Biyopsilerinden Tespit Edilmesi, In “Gut. XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*”, Strasbourg, France, 5-8 September, A 16. Çeviri, Edt Kalaycı C, Abstract.
- Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, and Tabaqchali S (1992)** *Sensitive Detection of Helicobacter pylori by Using Polymerase Chain Reaction*, J Clin Microbiol, 30 (1), 192-200.
- Condorelli F and Ziegler T (1993)** *Dot Immunobinding Assay for Simultaneous Detection of Spesific Immunoglobulin G Antibodies to Measles Virus, Mumps Virus and Rubella Virus*, J Clin Microbiol 31 (3), 717-719.
- Cummins DR and Reynolds DL (1990)** *Use of an Avidin-Biotin Enhanced Dot-Immunobinding Assay to Detect Antibodies for Avian Mycoplasma in Sera from Iowa Marked Turkeys*, Avian Dis 34, 321-328.
- Delany I, Spohn G, Rappuoli R and Scarlato V (2002)** *In vitro selection of high affinity HspR-binding sites within the genome of Helicobacter pylori*, Gene 283, 63-69.
- Deloney CR and Schiller NL (1999)** *Competition of Varous  $\beta$ -Laktam Antibiotics for the Major Penicillin-Binding Proteins of Helicobacter pylori: Antibacterial Activity and Effects on Bacterial Morphology*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43; 11, 2702-2709.
- Deloney BC, Wilson S, Roalfe A, Roberts L, Redman V, Wearn A and Hobbs FDR (2001)** *Randomised controlled trial of Helicobacter pylori testing and endoscopy for dyspepsia in primary care*, BMJ, 322; 14, 1-5.
- Diker S (1997)** *Helicobacter ve Helicobacter Enfeksiyonları*, “Özel Mikrobiyoloji” 139-146.
- Diker KS, Hazıroğlu R, Akan M, Çelik S, Kabakçı N (2002)** *The Prevalance, Colonization Sites and Pathological Effects of Gastric Helicobacters in Dogs*, Turk J Vet Anim Sci 26, 345-351.

- Dolar ME, Ateş KB, Karahan M, Acar Y, Caner ME, Boyacıoğlu S, Başar A, Şahin B (1992)** *Dental Plak: Helicobacter Pylori İçin Yeni Bir Rezervuar mı?* Gastroenterol, 3: 4.
- Dore MP, Sepulveda AR, Osato MS, Realdi G and Graham DY (1999)** *Helicobacter pylori in sheep milk*, Lancet, 354, July 10, 132.
- Dore MP, Sanna G, Cherchi GP, Negrini R, Marras S, Simula L, Graham DY and Realdi G (2001)** *Koyun ve Çoban Köpeklerinde Helicobacter pylori*, In "Gut. XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter pylori*", Strasbourg, France, 5-8 September, A 35, Çeviri, Abstract.
- Dönmez-Altuntaş H and Güven K (2002)** *Detection of Helicobacter pylori using nested polymerase chain reaction and rapid urease test in gastric biopsy samples*, Turk J Gastroenterol 13 (2), 94-97.
- Drasser DW (1986)** *Immunization of experimental animals*, In "Handbook of Experimental Immunology In four volumes", Ed. by Weir M, 4th, Alden Press, 8.1-8.21, Oxford.
- Dunn BE (1993)** *Pathogenic mechanism of Helicobacter pylori*, Gastroenterol Clin N Am, 22:43-57.
- Dunn BE, Cohen H and Blaser MJ (1997)** *Helicobacter pylori*, Clin Microbiol Rev, 10 (4), Oct, 720-741.
- Eaton KA, Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman BE, Paola J and Sherding R (1996)** *Prevalance and Varietes of Helicobacter Species in Dogs from Random Sources and Pet Dogs: animal and Public Health Implications*, J Clin Microbiol 34 (12), 3165-3170.
- Ekinci N, Ünsal B, Tancı G (1993)** *114 Antrum Biyopsisinde Görülen Histopatolojik Değişiklikler ve H. pylori Sıklığı*, Gastroenterol, 4: 2, 296-300.
- El-Zaatari FAK, Woo JS, Badr A, Osato MS, Serna H, Lichtenbergetr LM, Genta RM and Graham DY (1997)** *Failure to isolate Helicobacter pylori from stray cats indicates that H. pylori in cats may be an anthroponosis-an animal infection with a human pathogen*. J Med Microbiol 46, 372-376.
- Enroth H, Berglund H, Bergström M, Kraaz W, Tracz P, Gustafsson Sand Engstrand L (1999)** *<sup>13</sup>C-urea breath test results in pigs challenged with Helicobacter pylori or other urease producing bacteria*, FEMS Imm Med Microbiol, 23, 253-257.
- Erdeğer J, Yıldırım M, Diker S, Alponat A, Şirvan L and Öztürk E (2001)** *Dispeptik hastalarda Helicobacter Pylori'nin Çabuk Tanısı*, Vet Hek Mikr Derg, 1 (1), 25-30.

- Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Çorlu M and Öztürk D (2002)** *A comparative study on detection of Ornithobacterium rhinotracheale antibodies in meat-types turkeys by dot immunobinding assay, rapid agglutinations test and serum agglutination test*, Avian Pathology, 31, 201-214.
- Folitse R, Halvorson DA and Sivanandan V (1998)** *A Dot-Immunobinding Assay (Dot-blot ELISA) for Early Detection of Newcastle Disease Antibodies in Chickens*, Avian Dis, 42, 14-19.
- Fox JG and Lee A (1997)** *The Role of Helicobacter Species in Newly Recognized Gastrointestinal Tract Diseases of Animals* Lab Anim Sci, 47 (3), June, 222-255.
- Fox JG, Shen Z, Xu S, Feng Y, Dangler CA, Dewhirst FE, Paster BJ and Cullen JM (2002)** *Helicobacter marmotae* sp. Nov. Isolated from Livers of Cats, J Clin Microbiol 40 (7), 2513-2519.
- Germani Y, Dauga C, Duval P, Huerre M, Levy M, Pialoux G, Sansonetti P and Grimont PAD (1997)** *Strategy for the detection of Helicobacter species by amplification of 16 S rRNA genes and identification of H. felis in a human gastric biopsy*, Res Microbiol, 148, 315-326.
- Geyer C, Colbatzky F, Lechner J, Hermanns W (1993)** *Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats*, Vet Rec, 133, 18-19.
- Goddard AF and Logan RPH (1997)** *Review article: urea breath tests for detecting Helicobacter pylori*, Alim. Pharm, Ther, 11, 641-649.
- Goodwin CW and Worsley BW (1993)** *Microbiology of Helicobacter pylori*, Gast Clin North Am, 22 (1), March.
- Guardo G (1991)** *Helicobacter pylori and Nitrosamine interaction in gastric cancer : An Original Hipotesis*, Vet Can Soc Newsletter, 24-25.
- Gueneau P and Goër LD (2002)** *Helicobacter: molecular phylogeny and origin of gastric colonization in the genus*, Infect Gen Evol, 1, 215-223.
- Hanninen ML, Happonen I, Jalava K (1998)** *Transmission of canine gastric Helicobacter salomonis infection from dam to offspring and between puppies*, Vet Microbiol, 62, 47-58.
- Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, Rozmiarek H, Stals IH (1994)** *Helicobacter pylori isolated from the domestic cat:public health implications*, Infect Immun, 62; 2367-2374, Abstract.
- Happonen I (1999)** *Canine and Feline Gastric Helicobacters: Diagnosis and Significance in Chronic Gastritis*, <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/klin/vk/happonen/>

caninean.html.

- Happonen I, Linden J, Saari S, Karjalainen M, Hanninen ML, Jalava K, Westermarck E (1998)** *Detection and effects of helicobacters in healty dogs and dogs with signs of gastritis*, J Am Vet Med Assoc, 213, 1767-1774.
- Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hanninen ML, Westermarck E (1996a)** *Occurence and topographical mapping of gastric Helicobacter-like organisms and their association with histological chances in apparently healty dogs and cats*, J Vet Med, 43, 305-315.
- Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hanninen ML, Westermarck E (1996b)** *Comparison of Diagnostic Methods for Detecting Gastric Helicobacter-like Organisms in Dogs and Cats*, J Comp Path, 115, 117-127.
- Happonen I, Linden J, Westermarck E (1999)** *The effect of human triple therapy on eradication of canine gastric helicobacters, upper gastrointestinal signs and gastric histology- a follow up study*, J Small Anim Pract, 1-10, in press.
- Harper CG, Feng Y, Xu S, Taylor NS, Kinsel M, Dewhirst FE, Paster BJ, Greenueli M, Levine G, Rogers A and Fox JG (2002)** *Helicobacter cetorum sp. Nov., a Urease-Positive Helicobacter species Isolated from Dolphins and Whales*, J Clin Microbiol, Dec, 40 (12), 4536-4543.
- Hatzifoti C, Wren BW and Morrow JW (2000)** *Helicobacter pylori vaccine strategies-triggering a gut reaction*, Imm, Dec, 21(12), 615-619.
- Hazıroğlu R, Diker KS, Güvenç T, Kul O (1995)** *Canine gastritis associated with Helicobacter felis*, Dtsch Tierarztl Wschr, 102, 474-476.
- Hermanns W, Kregel K, Breuer W and Lechner J (1995)** *Helicobacter-like Organisms. Histopathological Examination of Gastric Biopsies from Dogs an Cats*, J Comp Path 112, 307-318.
- Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T and Hatakeyama (2002)** *Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites*, PNAS, Oct 29, 99 (22), 14428-14433.
- Ho B and Vijayakumari S (1993)** *A simple and efficient continious cultur system for Helicobacter pylori*, Microbios, 76, 59-66.
- Ho GY, Windsor HM, Snowball B and Marshall BJ (2001)** *Helicobacter pylori is Not the Cause of sudden Infant Death Syndrome (SIDS)*, Am J Gastroent, 96, 12, 3288-3294.

- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT and Williams ST (1994)** *Aerobic/ Microaerophilic, Motile, Helical/Vibroid Gram-negative Bacteria*, In “Bergey’s Manuel of Determinative Bacteriology”, Ed. by Holst JG, 9th ed, Williams&Wilkins, Baltimore, USA.
- Huang J, Keeling PWN and Smyth CJ (1992)** *Identification of erythrocyte-binding antigens in Helicobacter pylori*, J Gen Microbiol, 138, 1503-1513.
- Hulst RWM, Verheul SB, Weel JFL, Gerrits Y, Kate FJW, Dankert J and Tytgat GNJ (1996)** *Effect of Specimen Collection Techniques, Transport Media and Incubation of Cultures on the Detection Rate of Helicobacter pylori*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 15(3), 211-215.
- Hulten K, Han SK, Enroth H, Kleen PD, Opekun AR, Gilman RH, Evans DG, Engstrand L, Graham DY and El-Zaatari FAK (1996)** *Helicobacter pylori in the Drinking Water in Peru*, Gastroent 110, 1031-1035.
- Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kato T, Kohli Y, Keida Y and Kuriyama M (2000)** *Sequence Analysis and Clinical Significance of the iceA Gene from Helicobacter pylori Strains in Japan*, J Clin Microbiol, 38(2), 483-488.
- Jalava K, On SW, Vandamme PAR, Happonen I, Sukura A and Hanninen ML (1998)** *Isolation and Identification of Helicobacter spp. from canine and Feline Gastric Mucosa*, Appl Env Microbiol, Oct, 64 (10), 3998-4006.
- Jalava K (1999)** *Taxonomic Studies on Canine and Feline Gastric Helicobacter species*, <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/klin/vk/html>.
- Jalava K, On SLW, Vandamme PAR, Happonen I, Sukura A and Hanninen ML (1999)** *Isolation and Identification of Helicobacter spp. from Canine and Feline Gastric Mucosa*, Appl Environ Microbiol, 65:2, 877
- Jalava K, On SLW, Harrington CS, Andersen LP, Hanninen ML, Vandamme P (2001)** *A Cultured Strain of “Helicobacter heilmannii”, a Human Gastric Pathogen, Identified as H. bizzozeronii; Evidence for Zoonotic Potential of Helicobacter*, Emerg Infect Dis, 7 (6), Nov-Dec, 1036-1038.
- Jenkins CC and Basset JR (1997)** *Helicobacter Infection*, S. Animal Gast, 19(3), March, 267-279.
- Jr CVS (1998)** *An enzyme –linked immunosorbent assay to measure Helicobacter pylori adherence to cell lines in vitro*, J Microbiol Methods, 33 ,119-127.
- Jr RWJ and Clemens J (2003)** *Helicobacter in the developing world*, Microbs and Infects, In Press.



- Kabir S (2001)** *Detection of Helicobacter pylori in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay*, J Med Microbiol, Dec, 50 (12), 1021-1029.
- Kadayıfçı A ve Savaş MC (1997)** *Helicobacter pylori: patogenezi, tanısı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar*, Güncel Gastroent, 1 (1), 7-12.
- Kang J Y and Wee A (1991)** *Helicobacter pylori and Gastric Acid Output in Peptic Ulcer Disease*, Dig Dis Sci, 36(1), 5-9.
- Karasu Z ve Akarca US (2000)** *Helicobacter pylori ve gastrik kanser patogeneziindeki rolü*, Güncel Gastroent, 4:1, 8-21.
- Kearney DJ, Hubbard TW and Putnam D (2001)** *H. pylori Enfeksiyonunun Tanısı için Nefes Havasında Amonyak Ölçümü: Bir Ön Çalışma*, Gut, XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastrointestinal Pathology and Helicobacter pylori, Strasbourg, France, 5-8 September, Çeviri, Ed Kalaycı C, Abstract.
- Kist M, Strobel S, Kirchner T, Dammann HG (1999)** *Impact of ELISA and immunoblot as diagnostic tools one year after eradication of Helicobacter pylori in a multicentre treatment study*, FEMS Imm Med Microbiol, 24, 239-242.
- Kjoller M, Fischer A, Justesen T (1991)** *Transport Conditions and Number of Biopsies Necessary for Culture of Helicobacter pylori*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 10, 166-167.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1992)** *Curved rods, Campylobacter, Helicobacter, Wolinella, and Arcobacter*, In "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology", 4<sup>th</sup> ed, 254-258, Philadelphia.
- Kristoffersen EK, Matre R, Ulvestad H and Vedeler CA (1994)** *A dot-immunobinding assay for the demonstration of soluble Fcγ receptors*, J Imm Meth, 167, 15-19.
- Lecoindre P, Chevallier M, Peyrol S, Boude M, Ferrero RL and Labigne A (2000)** *Gastric helicobacters in cats*, J Feline Med Surg, Mar, 2 (1), 19-27.
- Lee A (1991)** *Spiral Organisms: What Are They? A Microbiologic Introduction to Helicobacter pylori*, Scand J Gastroenterol, 26 Suppl, 187, 9-22.
- Lee A, Krakowka S, Fox JG, Otto G, Eaton KA and Murphy JC (1992)** *Role of Helicobacter felis in Chronic Canine Gastritis*, Vet Pathol, 29, 487-494.
- Lee A (1996)** *Prevention of Helicobacter pylori infection*, Scand J Gastroenterol, 215: 11-15.
- Li C, Ha T, Ferguson DA, Chi DS, Zhao R, Patel NR, Krishnaswam YG and Thomas E (1996)** *A Newly Developed PCR Assay of H. pylori in Gastric Biopsy, Saliva and Feces*, Dig Dis Sci, 41(11), 2142-2149.

- Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SF and Lee CH (1999)** *Comparison of Five PCR Methods for Detection of Helicobacter pylori DNA in Gastric Tissues.* J Clin Microb, 37 (3), 772-774.
- Malaty HM, Kumagai T, Tanaka E, Ota H, Kiyosawa K, Graham DY and Katsuyama T (2000)** *Evidence from a Nine-Year Birth Cohort Study in Japan of Transmission Pathways of Helicobacter pylori Infection,* J Clin Microb, 38 (5), 1971-1973.
- Mazari-Hiriart M, Lopez- Vidal Y, Castillo-Rojas, Leon SP and Cranvioto A (2001)** *Helicobacter pylori and Other Enteric Bacteria in Freshwater Environments in Mexico City,* Arc Med Res, 32, 458-467.
- Melito PL, Munro C, Chipman PR, Woodward DL, Booth TF, and Rodgers FG (2001)** *Helicobacter winghamensis sp. Nov., a Novel Helicobacter sp. Isolated from Patients with Gastroenteritis,* J Clin Microbiol, July, 39 (7), 2412-2417.
- Midolo P, Marshall BJ (2000)** *Accurate diagnosis of Helicobacter pylori, Urease tests,* Gastroenterol Clin North Am, Dec, 29 (4), 871-878.
- Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J and Megraud F (2001)** *Detection of Helicobacter pylori DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors,* J Mic Meth, 45, 89-94.
- Neiger R, Dieterich C, Burnens A, Woldugel A, Cortesy-Theulaz I, Halter F, Lauterburg B, Schmassmann A (1998)** *Detection and Prevalance of Helicobacter Infection in Pet Cats,* J Clin Microbiol, 36: 3, 634-637.
- Neiger R and Simpson KW (2000)** *Helicobacter Infection in Dogs and Cats. Facts and Fiction,* J Vet Intern Med, 14; 125-133.
- Norris CR, Marks SI, Eaton KA, Torabian SZ, Munn RJ and Solnick JV (1999)** *Healthy Cats Are Commonly Colonized with "Helicobacter heilmannii" That Is Associated with Minimal Gastritis,* J Clin Microbiol, 37(1), 189-194.
- O'Rourke JL and Lee A (2003)** *Animal models of Helicobacter pylori infection and disease,* Microb and Infec, Baskida, 1-8.
- On SLW (1996)** *Identification Methods for Campylobacters, Helicobacters and Related Organisms,* Clin Microbiol Rev, 9 (3), 405-422.
- Otto G, Hazell SH, Fox JG, Howlett CR, Murpy JC, O'Rourke JL and Lee A (1994)** *Animal and Public Health Implications of Gastric Colonization of Cats by Helicobacter-Like Organisms.* J. Clin. Microbiol. Apr. 1043-1049.

- Özden A, Dumlu Ş, Dönderici Ö, Çetinkaya H, Soylu K, Özkan H, Balcı M, Sarıoğlu M, Uzunalımoğlu Ö (1992)** *Helicobacter Pylori İnfeksiyonunun Ülkemizde Seroepidemiolojisi*, 3 (4), 664-668.
- Özden A, Dönderici Ö, Dumlu Ş, Işıtan F, Çetinkaya H, Uzunalımoğlu Ö (1993)** *Helicobacter Pylori Pozitif Dispepsili Olgularda Değişik Tedavi Seçeneklerinin Değerlendirilmesi*. Gastroenteroloji. 4 (2), 287-291.
- Özşahin A (2002)** *Çocuklarda Helicobacter pylori enfeksiyonu*, Yeni Tıp Dergisi, 19 (1), 33-34.
- Pacheco N, Mago V, Gomez I, Gueneau P, Guelrud M, Reyes N, Pericci LR and Dominguez-Bello MG (2001)** *Comparison of PCR and common clinical tests for the diagnosis of H. pylori in dyspeptic patients*, Diag Microbiol Infect Dis, 39, 207-210.
- Papasouliotis K, Gruffydd-Jones TJ, Werrett G, Brown PJ and Pearson GR (1997)** *Occurrence of 'gastric Helicobacter-like organisms' in cats*, Vet Rec, April 5, 140, 369-370.
- Park SR, Mackay WG and Reid DC (2001)** *Helicobacter sp. Recovered from Drinking Water Biofilm Sampled from a Water Distribution System*, Wat Res, 35 (6), 1624-1626.
- Pascalis RD, Pezzo MD, Nardone G, Budillon G and Lavitola A (1999)** *Performance Characteristics of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay for Determining Salivary Immunoglobulin G Response to Helicobacter pylori*, J Clin Microbiol, 37 (2), 430-432.
- Perkins SE, Yan LL, Shen Z, Hayward A, Murphy JC and Fox JG (1996)** *Use of PCR and Culture To Detect Helicobacter pylori in Naturally Infected Cats following Triple Antimicrobial Therapy*. Antimicrob. Agents and Chem, June, 40 (6), 1486-1490.
- Piccolomini R, Bonaventura G, Neri M, Giralomo A, Catamo G and Pizzigallo E (1999)** *Usefulness of Leifson Staining Method in Diagnosis of Helicobacter pylori Infection*, Notes, 37 (1), 199-201.
- Poxton IR and Blackwell CC (1986)** *Isolation and identification of bacterial antigens* "Handbook of Experimental Immunology In four volumes", Ed. by Weir M, 4th, Alden Press, 4.1-4.22, Oxford.
- Radhakrishnan VV and Mathal A (1991)** *A dot-immunobinding assay for the laboratory diagnosis of tuberculous meningitis and its comparison with enzyme-linked immunosorbent assay*, J Appl Bacteriol, 71, 428-433.

- Ramadass P, Meerarani S and Padmanaban VD (1993)** *Dipstick enzyme immunoassay for rinderpest antibody in cattle*. Vet. Microbiol. 36, 385-388.
- Rautelin H, Seppälä K, Nuutinen H, Kärkkäinen P, Sipponen P, Kosunen TU (1997)** *Culture of Helicobacter pylori from Gastric Biopsies Transported in Biopsy Urease Test Tubes*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 16, 380-383.
- Rocha GA, Oliveira AMR, Queiroz DMM, Carvalho AST and Nogueira AMMF (2000)** *Immunoblot Analysis of Humoral Immune Response to Helicobacter pylori in Children with and without Duodenal Ulcer*, J Clin Microb, 38 (5), 1777-1781.
- Rossi G, Rossi M, Vitali CG, Fortuna D, Burrone D, Pancotto L, Capecchi S, Sozzi S, Renzoni G, Braca G, Del Giudice G, Rappuoli R, Ghiara P and Taccini E (1999)** *A Conventional Beagle Dog Model for Acute and Chronic Infection with Helicobacter pylori*, Infect Immun, 67, 3112-3120.
- Saltık İN, Demir H, Engin D, Ertunç ÖD, Akyön Y ve Koçak N (2003)** *The cag A status of Helicobacter pylori isolates from dyspeptic children in Turkey*, FEMS Imm Med Microbiol, 36, 147-149.
- Seidel KE, Stolte M, Lehn N and Bauer J (1999)** *Antibodies Against Helicobacter felis in Sera of Cats and Dogs*, J Vet Med B, 46, 181-188.
- Seydel A, Tasca E, Berti D, Rappuoli R, Giudice GD and Montecucco C (2002)** *Characterization and Immunogenicity of the CagF Protein of the cag Pathogenicity Island of Helicobacter pylori*, Infect Immun, Nov, 70 (11), 6568-6470.
- Simpson KW and Burrows CF (1997)** *Gastritis, ulcers and Helicobacter spp in Humans, Dogs and Cats*. Waltham Focus, 7, 2-6.
- Simpson KW, Mc Donough, Chang YF, Harpending P and Valentine BA (1999)** *Helicobacter felis infection in Dogs: Effect on Gastric Structure and Function*, Vet Pathol, 36, 237-248.
- Simpson K, Neiger R, DeNovo R and Sherding R (2000)** *The Relationship of Helicobacter spp. Infection to Gastric Disease in Dogs and Cats*, J Vet Intern Med, 14, 223-227.
- Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Paster BJ, Dewhirst FE and Tompkins LS (1993)** *An Uncultured Gastric Spiral Organism Is a Newly Identified Helicobacter in Humans*, J Infect Dis, 168, 379-385.
- Sozzi M, Crosatti M, Kim SK, Romero J and Blaser MJ (2001)** *Heterogeneity of Helicobacter pylori cag genotypes in experimentally infected mice*, FEMS Microbiol Lett, 203, 109-114.

- Sreedharan A, Clough M, Hemingbrough E and Moayyedi P (2001)** *Açık Yaklaşım endoskopi İsteklerinde, Karbon Üre Nefes Testinin (13C-UBT) Uzun Dönemdeki Etkisi*, Gut, XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*, Strasbourg, France, 5-8 September, A 101, Çeviri, Ed Kalaycı C, Abstract.
- Stanley J, Linton D, Burnens AP, Dewhirst FE, Owen RJ; Porter A, On SLW and Costas M (1993)** *Helicobacter canis sp. Nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype*, J General Microbiol, 139, 2495-2504.
- Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR (2000)** *Growth of Helicobacter pylori in various liquid and plating media*, Lett Appl Microb, 30, 192-196.
- Strauss-Ayali D and Simpson KW (1999)** *Gastric Helicobacter Infection in dogs*, Prog Gastroent, 29 (10), 397-413.
- Strauss-Ayali D and Simpson KW, Schein AH, McDonough PL, Jacobson RH, Valentine BA and Peacock J (1999)** *Serological Discrimination of Dogs Infected with Gastric Helicobacter spp and Uninfected Dogs*, J Clin Microbiol, 37 (5), 1280-1287.
- Strauss-Ayali D, Scanziani E, Deng D and Simpson KW (2001)** *Helicobacter spp. Infection in cats: evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric Helicobacter spp*, Vet Mic, 79, 253-265.
- Svec A, Kordas P, Pavlis Z and Novotny J (2000)** *High prevalence of Helicobacter heilmannii-associated Gastritis in a Small, Predominantly Rural Area. Further Evidence in Support of a Zoonosis?*, Scand J Gastroenterol, 35, 925-928.
- Şahin F, Özden A, Ünver E, Özenci H, Uzunalimoğlu Ö, Atalay G ve Koç Ö (1994)** *Agar Dilüsyon Yöntemi ile Helicobacter pylori için Metronidazol Dirençlilik Testi ve Disk Diffüzyon Yöntemi ile Amoxicilline ve Claritromisin'in H. pylori'ye Etkisi*, Gastroent, 5 (2), 203-206.
- Tee W, Fairley S, Smallwood R, Dwyer B (1991)** *Comparative Evaluation of Three Selective Media and a Nonselective Medium for the Culture of Helicobacter pylori from Gastric Biopsies*, J Clin Microbiol, Nov, 2587-2589.
- Tee W, Hinds S, Montgomery J and Dyall-Smith ML (2000)** *A Probable New Helicobacter Species Isolated from a Patient with Bacterimia*, J Clin Microbiol, Oct, 38 (10), 3846-3848.

- Tsai HJ and Saif YM (1991)** *Detection of Antibodies against Bordetella avium in Turkeys by Avidin-Biotin Enhancement of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and the Dot-Immunobinding Assay*, Avian Dis, 35, 801-808.
- Tytgat GNJ, Noach L and Rauws EAJ (1991)** *Helicobacter pylori*, Scand J Gastroenterol, 26 Suppl, 187, 1-8.
- Utriainen M, Jalava K, Sukura A and Hanninen ML (1997)** *Morphological Diversity of Cultured Canine Gastric Helicobacter spp*, Comp Immun Microbiol Infect Dis, 20 (4), 285-297.
- Valentine JL, Arthur RR, Mobley HLT and Dick JD (1991)** *Detection of Helicobacter pylori by using the Polymerase Chain Reaction*, J Clin Microbiol, 29 (4), 689-695.
- Vandenplas Y (1999)** *Helicobacter pylori Infection*, Infect Dis Pract, 23 (11/12), Nov/Dec, 97-107.
- Veldhuyzen van Zanten S, Sherman PM, Hunt RH (1997)** *Helicobacter pylori: new developments and treatments*, Can Med Assoc, 156 (11), 1565-1574.
- Weir SC, Gibert CL, Gordin FM, Fischer SH and Gill VJ (1999)** *An Uncommon Helicobacter Isolate from Blood: Evidence of a Group of Helicobacter spp. Pathogenic in AIDS Patients*, J Clin Microbiol, 37 (8), 2729- 2733).
- Westblom TU, Phadnis S, Yang P and Czinn SJ (1993)** *Diagnosis of Helicobacter pylori Infection by Means of a Polymerase Chain Reaction Assay for Gastric Juice Aspirates*, Clin Infect Dis, 16, 367-371.
- Wulffen H (1992)** *An Assesment of Serological Tests for Detection of Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol Infect Dis, 11 (7), 577-582.
- Xerry J and Owen RJ (2001)** *Conservation and microdiversity of the phospholipase A (pldA) gene of Helicobacter pylori infecting dyspeptics from different countries*. FEMS Immun Med Microb, 32, 17-25.
- Xia HX, Kalantar JS, Wyatt JM, Adams S, Cheung K, Eslick GD and Talley NJ (2000)** *High sensitivity and specificity of a laboratory-based serological test, H. pylori Detect ELISA, for detection of Helicobacter pylori infection*, Diag Microbiol Infect Dis, 36, 69-74.
- Xia HX, Keane CT and O'Morain CA (1993)** *Determination of the optimal transport system for Helicobacter pylori cultures*, J Med Microbiol, 39, 334-337.
- Xia HX, Keane CT, O'Morain CA (1994)** *Culture of Helicobacter pylori Under Aerobic Conditions on Solid Media*, Notes, 13, 5406-5409.

- Yamasaki K, Suematsu H, Takahashi T (1998)** *Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms*, JAVMA, 212 (4), February 15, 529-533.
- Yıldırım M (1996)** *Hayvanlardan Helicobacter Türlerinin İzolasyonu*, A. Ü. Sağlık Bil Enst, Doktora tezi.
- Yıldırım M ve İstanbulluoğlu E (2002)** *Evcil Hayvanlarda Helicobacter İnfeksiyonları*, Veterinarium, 13, 1, 16-20.
- Young KA, Akyön Y, Rampton DS, Barton SGRG, Allaker RP, Hardie JM and Feldman RA (2000)** *Quantitative culture of Helicobacter pylori from gastric juice: the potential for transmission*, J Med Microbiol, 49, 343-347.
- Yoshida H, Hirota K, Shiratori Y, Nihei T, Amano S, Yoshida A, Kawamata O and Omata M (1998)** *Use of a Gastric Juice –Based PCR Assay To Detect Helicobacter pylori Infection in Culture-Negative Patients*, J Clin Microbiol, 36, (1), Jan, 317-320.
- Zhu SL, Chen MH, Chen J, Yu J, Leung WK, Hu PJ and Sung JJY (2001)** *Farelerde Üreaz Altbirim B, HpaA veya Onların Füzyon Proteini UreB/HpaA Expresse Eden Zayıflatılmış Salmonella Tyhimurium ile Oral İmmunizasyon Yoluyla Helicobacter pylori'ye Karşı Korunma*, Gut, XIV<sup>th</sup> International Workshop on Gastroduodenal Pathology and Helicobacter pylori, Strasbourg, France, 5-8 September, Çeviri, Abstract.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Bakırköy/İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Isparta'da tamamladı. 1992 yılında S. Ü. Veteriner Fakültesi'ne girdi ve 1997 yılında mezun oldu. 1997'de S. Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Aynı yıl 2547 Sayılı Kanun'un 35. Maddesi uyarınca S. Ü. Veteriner Fakültesi'nde görevlendirildi. Evli ve bir çocuk annesidir.





## 10.TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışması yürütülmesinde ilgi ve yardımlarımı gördüğüm, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet ATEŞ'e, *H. pylori* ATCC 11637 suşunun sağlanmasında katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Yakut ÖZDEN'e, PZR çalışmalarım boyunca sağladıkları imkanlarla katkıda bulunan Sayın Dr. Leyla GÜLER'e, yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. U. Sait UÇAN, Dr. H. Hüseyin HADİMLİ ve Uzm. Bio. Mehmet ÇORLU'ya, bu çalışmaya maddi destek sağlayan TÜBİTAK (VHAG-1803)'a, çalışmalarım sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen eşime teşekkür ederim.



## 11. EKLER

**Resim 1.** *H. pylori* (ATCC 11637)'nin kanlı agarda koloni görünümü

**Resim 2.** *H. pylori* (ATCC 11637)'nin mikroskopik görünümü (Gram boyama).

**Resim 3.** Köpeklerde direk mikroskopide uzun gram negatif spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama).

**Resim 4.** Köpeklerde direk mikroskopide gevşek ve kısa, gram negatif spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama).

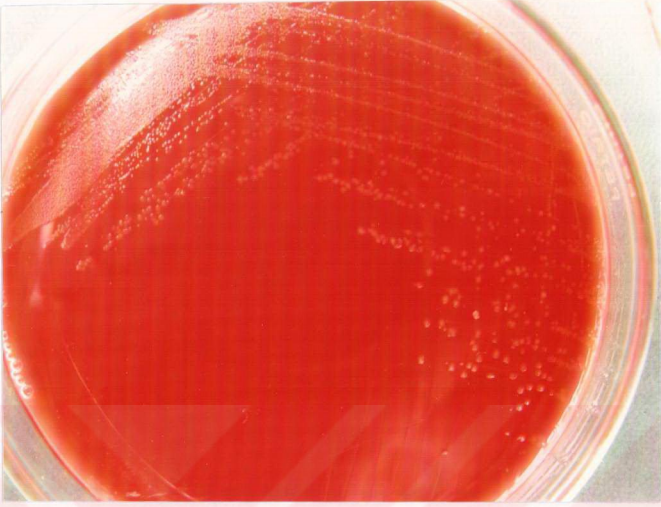
**Resim 5.** Köpeklerde direk mikroskopide gözlenen spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama)

**Resim 6.** Biyopsi örneklerinin Direk Üreaz Testi'ne uygulanması.

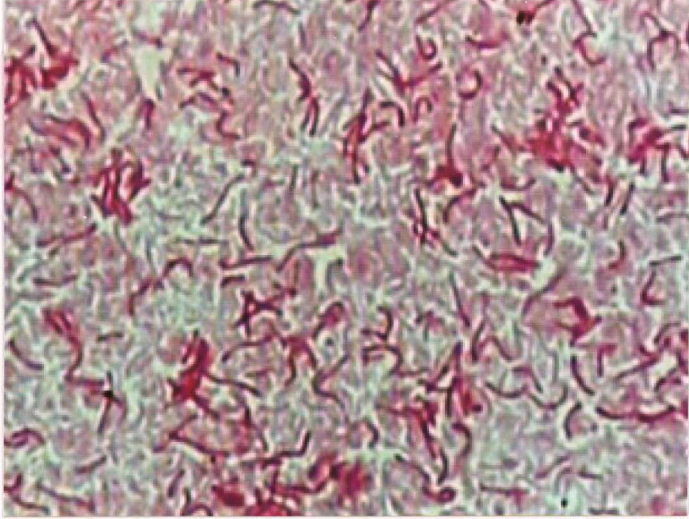
**Resim 7.** Köpek serum örneklerinin nitrosellüloz membranda DIA Testi ile test edilmesi (NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, 1-39 Kan serum örnekleri).

**Resim 8.** Köpek mide biyopsi örneklerinden elde edilen PZR ürünlerinin jelde yürütülmesi ile oluşan bantların görünümü (1-100 bp'lık marker, 2-pozitif kontrol (bakteri+doku ekstraksiyonu), 3-negatif kontrol, 4-pozitif örnek (4 no'lu köpeğe ait korpus biyopsi örneğinin PZR ürünü), 5-11-negatif örnekler).

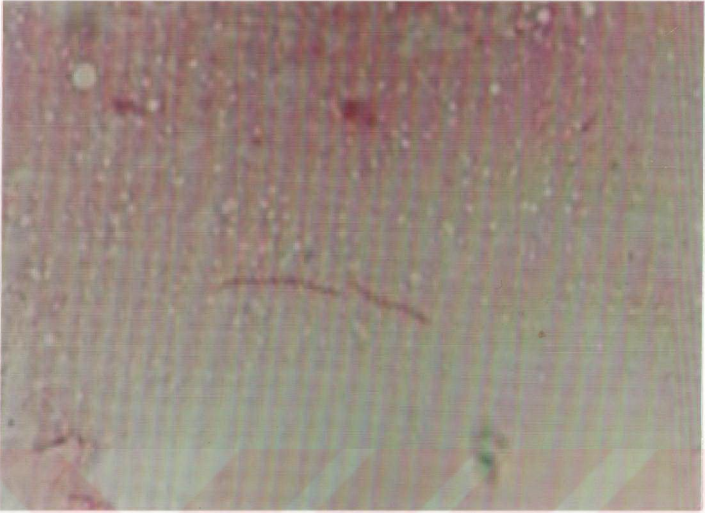
**Resim 9.** Kedi ve köpek midelerine ait PZR ürünlerinin jelde yürütülmesi ile oluşan bantların görünümü (1-marker, 2-pozitif kontrol, 3-negatif kontrol, 4-18-negatif örnekler).



**Resim 1.** *H. pylori* (ATCC 11637)'nin kanlı agarda koloni görünümü.



**Resim 2.** *H. pylori* (ATCC 11637)'nin mikroskopik görünümü (Gram boyama).



**Resim 3.** Köpeklerde direk mikroskopide uzun gram negatif spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama).



**Resim 4.** Köpeklerde direk mikroskopide gevşek ve kısa, gram negatif spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama).



**Resim 5.** Köpeklerde direk mikroskopide gözlenen spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama)

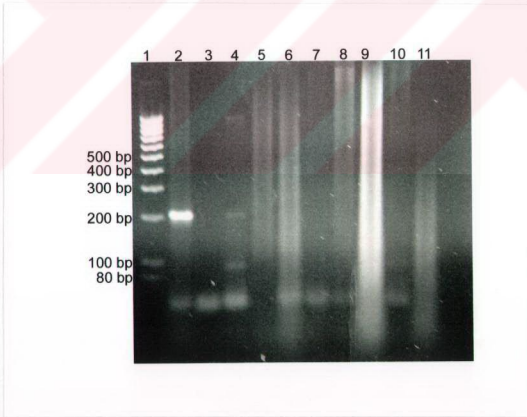


**Resim 6.** Biyopsi örneklerinin Direk Üreaz Testi'ne uygulanması (antrum ve cardia üreaz negatif, corpus pozitif).

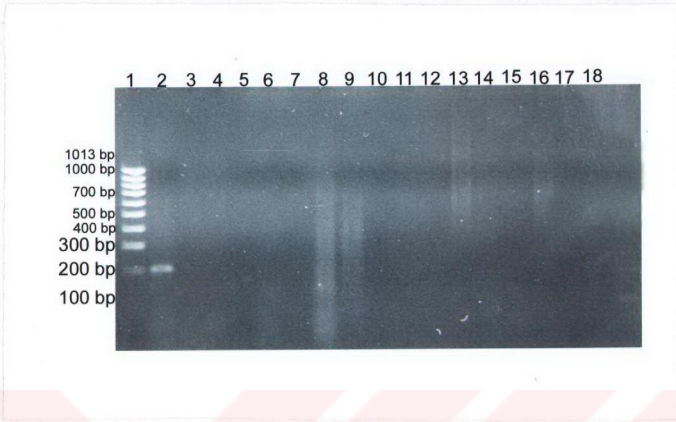
Kan serumları	DIA	Renk değişimi	Kan serumları	DIA	Renk değişimi	Kan serumları	DIA	Renk değişimi
NK*		-	12		+	27		+
NK		-	13		+	28		+
PK*		+	14		+	29		+
PK		+	15		+	30		+
1		+	16		+	31		+
2		+	17		+	32		+
3		+	18		+	33		+
4		+	19		+	34		+
5		+	20		+	35		+
6		+	21		+	36		+
7		+	22		+	37		+
8		+	23		+	38		+
9		+	24		+	39		+
10		+	25		+			
11		+	26		+			

\*NK: Negatif Kontrol  
\*PK: Pozitif Kontrol

**Resim 7.** Köpek serum örneklerinin nitrosellüloz membranda DIA Testi ile test edilmesi (1-Negatif kontrol, 2-Negatif kontrol, 3-Pozitif kontrol, 4-Pozitif kontrol, 5-39-Kan serum örnekleri).



**Resim 8.** Köpek mide biyopsi örneklerinden elde edilen PZR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi ile oluşan bantların görünümü. 1-100 bp'lık marker, 2-pozitif kontrol (bakteri+doku ekstraksiyonu), 3-negatif kontrol, 4-pozitif örnek (4 no'lu köpeğe ait korpus biyopsi örneğinin PZR ürünü), 5-11-negatif örnekler.



**Resim 9.** Kedi ve köpek midelerine ait PZR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi ile oluşan bantların görünümü (1-marker, 2-pozitif kontrol, 3-negatif kontrol, 4-18-negatif örnekler).