

İstanbul Yöresinde Sağlıklı ve Klinik Belirti Gösteren Köpeklerde *Helicobacter pylori* Varlığının Kültür, Polimerase Chain Reaction (PCR) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile Saptanması[#]

Sonay SAĞNAK^{1*}, N. Yakut ÖZGÜR²

¹SYN.Biyoteknoloji, ANKARA

²İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

* Sorumlu Yazar: Sonay SAĞNAK.SYN.Biyoteknoloji, ANKARA
e-posta:sonay@synbio.com.tr

Geliş Tarihi /Received: 02.03.2011

ÖZET

Günümüzde *Helicobacter pylori*'nin dünya nüfusunun neredeyse yarısını infekte eden bir patojen olması ve gün geçtikçe yayılması, kedi ve köpeklerin insanlar için infeksiyon kaynağı olabileceğini düşündürmekte, bu konuda araştırmalara yönelmeye gereksinim oluşturmaktadır. Bu çalışmada, köpeklerde de insanlardakine benzer infeksiyona neden olabileceği düşünülen *H. pylori*'nin varlığı köpek dışkı örneklerinde araştırılmıştır. Bu amaçla İstanbul'da bulunan toplam 96 adet pet ve sokak köpeğine ait dışkı örnekleri toplanmıştır. Dışkı örnekleri Polymerase Chain Reaction (PCR) ile incelenmiş, *Helicobacter* DNA'sı saptanan örneklerde *H. pylori*'de bulunan *CagA* geninin saptanması amacıyla Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile *H.pylori* spesifik bandlar araştırılmıştır. Ayrıca çalışmada PCR-RFLP ile *H. pylori* saptanan dışkı örneklerinden bakteriyolojik kültür yapılarak moleküler yöntemler ile kültür tekniği de karşılaştırılmıştır. *Helicobacter* cins spesifik primerler kullanarak yapılan PCR uygulaması sonucu 96 örneğin 65 (% 67,7) inden elde edilen 375 bp band sonuçlarını takiben *HinfI* enzim kesimi ile 12 (% 18,46) DNA örneğinde *H.pylori* spesifik bandlar (196 bp, 119 bp, 60 bp) saptanmıştır. *H. pylori* DNA'sı saptanan 12 köpeğin dışkı örneğinden yapılan bakteriyolojik inceleme sonucunda ise örneklerin hiçbirinden *H. pylori* izole edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Köpek, *Helicobacter pylori*, PCR, RFLP, kültür

ABSTRACT

DETECTION OF *HELICOBACTER PYLORI* IN HEALTHY DOGS AND DOGS WITH THE CLINICAL SEMPTOMS BY CULTURE, POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISIM (RFLP) IN ISTANBUL PROVINCE

Helicobacter pylori is one of the most widespread infections in human beings. It is estimated that approximately half of the human population is infected with this pathogen. It has been considered that dogs and cats may serve as a source for human infection, and therefore, further researches on this subject are needed. In this study, presence of *H.pylori* which is considered as a source of similar infection in dogs, was investigated in dogs' stool specimens. For

[#] Birinci yazarın Doktora tezinden özetlenmiştir.

this purpose, stool specimens were collected from 96 pet and sheltered dogs in Istanbul. Stool specimens were investigated by PCR and samples which contain *Helicobacter* DNA were objected to Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analyses to detect bands of *H.pylori* specific *CagA* gen. Also, samples found to be positive by PCR-RFLP were examined bacteriologically for comparison of culture and molecular methods. As a result of PCR investigation with *Helicobacter* genus specific primers, 375 bp bands were obtained for 65 (67.7 %) of the specimens. After that *H.pylori* specific bands (196 bp, 119 bp, 60 bp) were detected from 12 (18.46 %) of DNA samples by *Hinfl* enzim restriction. *H.pylori* was not isolated from fecal specimens of 12 *H.pylori* DNA positive dogs.

Key Words: Dog, *Helicobacter pylori*, PCR, RFLP, culture

Giriş

Helicobacter türlerinin, insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde özellikle sindirim sistemine yerleşerek, kronik aktif gastrit, peptik ülserler ve mide adenokarsinomuna neden olduğu saptanmıştır (Armstrong, 1996; Murray ve ark., 1995). *Helicobacter* cinsinin 28 tür içerdiği ve bu türlerin gastrik, intestinal ve hepatik dağılımları olduğu bildirilmiştir (Diker ve ark., 2002). Hayvanlarda en sık görülen *Helicobacter* türünün *H. heilmannii*, insanlarda ise *H. pylori* olduğu saptanmıştır (Holck ve ark., 1997; Windsor ve ark., 2000). *Helicobacter* benzeri bakteriler çalışmalar sırasında inceleme yapılan köpek midelerinde sıklıkla gözlenmiş ancak bu mikroorganizmalarla gastrik patoloji arasındaki ilişki net olarak adlandırılmamış, bu nedenle de izole edilen farklı türdeki *Helicobacter* 'lerin doğal yolla infekte olmuş köpeklerdeki spesifik prevalansları da saptanamamıştır (Eaton ve ark., 1996; Geyer ve ark., 1993).

H. pylori infeksiyonunun gastroduodenal hastalıklar ile bazı başka hastalıklarda göz önüne alınması gereken temel konulardan biri olduğunun anlaşılması, basit ve doğru tanı testlerine duyulan gereksinimi arttırmıştır. Tanı için kullanılan testler invaziv ve non-invaziv testler olarak iki grupta toplanmıştır. (Jalava ve ark., 1997).

İnvaziv testler, endoskopik olarak elde edilen biyopsi örneğinin bakteriyoloji, üreaz testi, histolojik testler ve moleküler teknikler ile incelenmesine dayalıdır (Altındiş ve ark., 2003; Köksal ve ark., 2002).

Tanıda "altın standard" olarak kabul edilmekte olan kültürün sensitivitesinin % 70-95, spesifitesinin % 100 olduğu bildirilmiştir (Hachem ve ark., 1995), ancak köpek ve

kedilerde gastrik *Helicobacter* 'lerin kültürünün güç ve yorucu olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca doku örneğinde bakteri sayısının az olduğu durumlarda üreme olmayabildiğine dikkat çekilmiştir (Lee ve ark., 1992).

Üreaz testinin sensitivitesi % 90-98, spesifitesi % 97-100 olarak bildirilmiştir (Brea ve ark., 1997; Cutler ve ark., 1996). Doku örneğinde bakteri sayısının azlığına bağlı olarak yalancı negatif sonuçlar alınabileceğine dikkat çekilmiş, ayrıca antibiyotik ve anti asitlerin kullanımının üre testlerinin sonuçlarını etkilediği ortaya konulmuştur. Üreaz testleri genellikle hızlı incelemeler arasında sınıflandırılmasına karşın, sonuçların erken okunması durumunda duyarlılığının zayıf olduğu gözlenmiştir (McNulty ve ark., 1989).

Histolojik incelemelerde *H. pylori*'nin, mide mukozasında yaygın olarak yerleşmesine karşın hazırlanan preparatlarda homojen bir dağılım göstermediği saptanmış, bu nedenle endoskopik biopsi örneklerinin alındığı alanın ayrıca öneme sahip olduğuna dikkat çekilmiştir. Bu yöntemin sensitivitesi ve spesifitesi % 98 bulunmuştur (Hermanns ve ark., 1995; Holck ve ark., 1997).

Köpeklerde *H. pylori*'nin saptanmasına yönelik moleküler tiplendirme amacıyla kullanılan teknikler arasında yer alan PCR-RFLP, tekrarlı uygulamalar sonrasında elde edilen sonuçlardaki başarısı nedeni ile belki de en yararlılarından biri olarak gösterilmiştir (Brea ve ark., 1997; Enroth ve ark., 1995). Bu tekniğin köpeklerde gen dizi analizlerinin yetersizliğinin yanı sıra, *H. pylori*'nin tür spesifik primerlerinin ve amplifikasyonun olmayışı nedeniyle etkenin saptanabilmesi için kullanılacak en güvenilir yöntem olduğu belirtilmiştir (Shinozaki ve ark., 2002). PCR'ın

sensitivitesi ve spesifitesinin % 95'in üzerinde olduğu saptanmıştır (Clayton ve ark., 1992).

Köpeklerde serolojik testler henüz rutin kullanıma girmemesine karşın enfeksiyonun indirekt tanısı amacıyla ELISA testinin kullanılabilmesi saptanmıştır (Jalava ve ark., 1998). Ancak köpek midelerinde 5 farklı gastrik *Helicobacter* türü gözlemlenebilmesi ve köpeklerde çoğunlukla miks enfeksiyonların şekillenmesi nedeniyle sağlıklı bir serolojik değerlendirmenin yapılabilmesinin zor olduğu bildirilmiştir (Happonen ve ark., 1998).

Son yıllarda biyopsi örneğine göre daha kolay elde edilmesi, testlerin daha hızlı sonuç vermesi ve ucuz olması nedeniyle *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında dışkı örneği kullanılmaya başlanmıştır (Enroth ve ark., 1995). Dışkı örneklerinin taze veya dondurulmuş olarak kullanılabilmesi, örneklerin taşınması ve saklanması amacıyla özel bir ortama gerek olmadığı saptanmıştır (Ishihara ve ark., 2000). Alınan örneğin hemen incelenemeyeceği durumlarda, 2-8 °C de 3 gün ya da -20 °C ya da -80 °C de çalışılincaya kadar saklanabileceği, örneklerin en fazla iki kez dondurulup çözülebileceği bildirilmiştir (Kabir ve ark., 2001).

Dışkıda *H. pylori* antijenlerinin ELISA yöntemiyle aranması esasına dayalı tanı yönteminin, pahalı cihazlar ve uzman bir ekip gerektirmediğinden laboratuvarında kolayca uygulanabileceği ve semptomatik hastalarda *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı ve tedavi sonrası yanıtın izlenmesi amacıyla kullanılabilmesi saptanmıştır (Trevisani ve ark., 1999). Ancak tanı kitleri veteriner hastalarının kullanımına adapte edilmemiştir (Jalava ve ark., 1998).

İnsanlarda dışkıdan *H. pylori* DNA'sını saptayan PCR yönteminin sensitivitesinin ve spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Kabir ve ark., 2001). Dışkı örneklerinin PCR inhibitörleri içermesi nedeniyle, inhibitörlerin yok edilebilmesi için çeşitli PCR teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerin eradikasyon tedavisinin bitiminden 4 hafta sonra kullanıldığında yalancı pozitif sonuçlar elde edildiği, bu süre uzatıldığında ise testin

spesifitesinin arttığı çalışmalarla gösterilmiştir (Monteira ve ark., 2001).

Dışkıının yüksek oranda safra asitleri içermesi, aynı zamanda anaerob ve fakültatif anaerob bakterilerden oluşan zengin bir normal floraya sahip olması ve *H. pylori*'nin safraya duyarlı bir bakteri olması nedeniyle dışkıdan *H. pylori* izolasyonunun oldukça zor olduğu bildirilmiştir (Kabir ve ark., 2001).

Bu çalışmada köpek dışkı örneklerinde *H. pylori*'nin varlığının araştırılması planlanmıştır. Dışkı örneklerinden Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile *H. pylori*'de bulunan *CagA* geninin saptanması, *H. pylori* saptanan dışkı örneklerinden bakteriyolojik kültür yapılarak moleküler yöntemler ile bakteriyolojik incelemelerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Örnekleme

İstanbul yöresinde barınan 40'ı sahipli, 56'sı sahihsiz toplam 96 köpekten Ocak-Nisan 2007 tarihleri arasında dışkı örnekleri toplandı. Örnek sayısı enfeksiyonun yurdumuzdaki prevalansının henüz saptanmamış olması nedeni ile % 95 güven düzeyi ve % 10 absolut kesinliğe göre belirlendi.

Örnek alınan köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve klinik bilgileri kaydedildi. 96 köpekten 36'sı gastrik klinik belirti göstermekteydi. Köpeklerin 49'u 1 yaş ve altı, 47'si 1 yaşın üzerindeydi. 46'sı dişi, 50'si erkek köpeklerdi.

PCR/ *Helicobacter* DNA'sının saptanması

Üretici firmanın direktiflerine göre QIAamp q Stool Mini Kit (Qiagen-51504) kullanılarak *Helicobacter* DNA'sının ekstraksiyonunun sonrasında *Helicobacter* spesifik primerler, H276f (CTA TGA CGG GTA TCC GGC) ve H676r (ATT CCA CCT ACC TCT CCC A) kullanılarak 375 bp uzunluğunda 16 S ribosomal RNA bölgesi saptanmıştır. 45 µl master miks (10 X buffer, 5µl; MgCl₂ (25 mM) 5 µl; dNTP Miks (10 mM) 3 µl; Primer FORWARD 2 µl Primer REVERSE 2 µl; Taq DNA Polimeraz (5nlü/µ) 0.5 µl; dH₂O 26.5µl; % 0.1 sığır serum albumin 1 µl ve 5 µl DNA

ekstraksiyonu thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. 94 °C de 3 dakika ön denatürasyonun ardından, toplam 30 sikluluk 95 °C de 30 saniye denaturasyon, 58 °C de 30 saniye primer bağlanması, 72 °C de 30 saniye sentez aşamaları gerçekleştirildi. 72 °C de 7 dakika final sentez aşamasından sonra + 4 °C ye kadar soğutulurak elektroforetik seperasyon yapıncaya kadar thermocycler'da bekletildi (Shinozaki ve ark., 2002). 375 bp moleküler ağırlığında bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

1U *Hinf*I enzimi, 1 µl reaksiyon buffer ve PCR sonucu *Helicobacter*'e ait olduğu belirlenen DNA örneklerinden 15'er µl alınarak tüplere aktarıldı, 37°C'lik su banyosunda 1 saat bekletilerek enzim kesimi gerçekleştirildi (Shinozaki ve ark., 2002). DNA fragmentlerinin seperasyonu poliakrilamid jel (PAGE) ve NuiSieve Agaroz Elektroforez teknikleri ile yapılmıştır (Buczolits ve ark., 2003).

Kültür

PCR-RFLP sonucunda, *H. pylori* pozitif kabul edilen dışkı örneklerinin % 5 at kanı ve DENT Supplement (10 mg/l Vankomycin, 5 mg/l trimethoprim, 5 mg/ cefsulodin ve 5 mg/l amphotericin B) katkılı Colombia Blood Agara ekimleri yapıldı ve kültürler 37°C'de 10 gün %7,5 CO₂ ortamda inkübe edildi (İngiliz *Helicobacter* Çalışma Birliği, 2003; Russel ve ark., 1993).

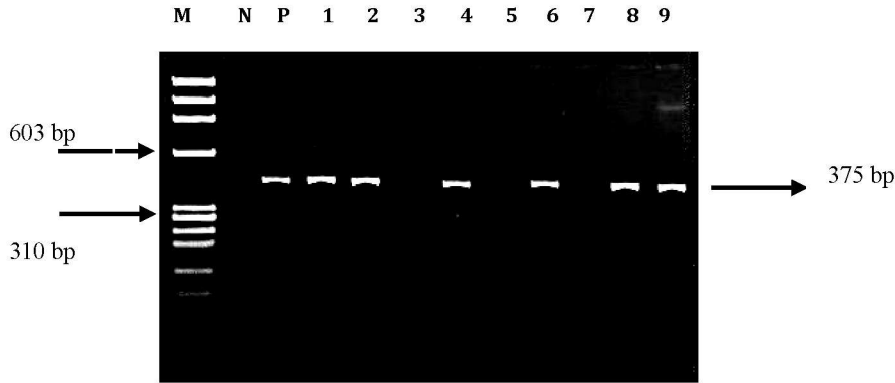
İstatistik analiz

Bulguların istatistiki önemlerinin belirlenmesi amacıyla 'Khi-Kare (x²) Testi' kullanıldı (Özdamar ve ark., 1999) ve istatistiki inceleme için köpeklerin sahip bilgisi, yaş, cinsiyet ve gastrik klinik belirti gösterme durumları baz alındı.

Bulgular

PCR

Dışkı örneklerinin *Helicobacter* cins spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmesi sonucunda, 65 (% 67,7) örnekte 375 bp'lik bantlar saptandı (Şekil 1).



M= Marker, N= Negatif Kontrol, P= Pozitif Kontrol, 1,2,4,6,8,9= Pozitif örnekler 3,5,7= Negatif örnekler

Şekil 1. Dışkı örneklerinin PCR bulguları.

Figure 1. PCR products from fecal spacements.

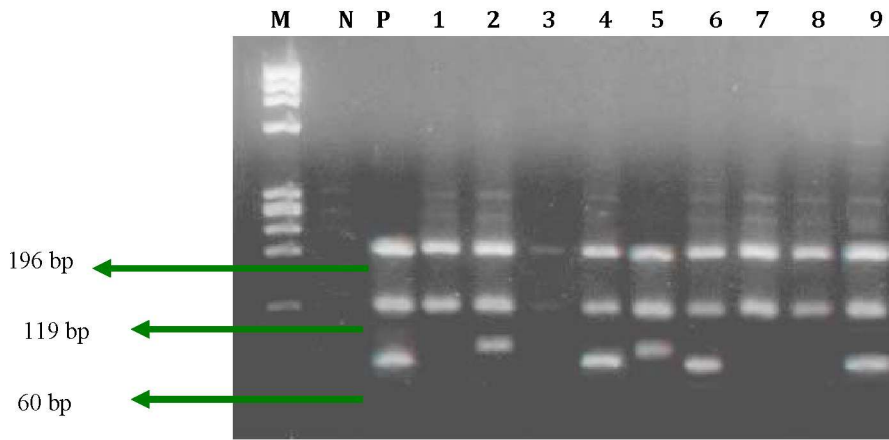
Gastrik klinik belirti gösteren 36 köpeğe ait dışkı örneklerinin 27 (% 75)'sinde, gastrik klinik belirti göstermeyen 60 köpeğe ait dışkı örneklerinin 38 (% 63,3)'inde *Helicobacter* DNA'sı saptandı. 40 sahipli köpekten alınan örneklerin 15 (% 37,5)'inde, 56 sahihsiz

köpekten alınan örneklerin 50 (% 89,3)'sinde 375 bp'lik bantlar görüldü. Köpeklerin cinsiyetine göre yapılan değerlendirmede; 50 erkek köpekten alınan örneklerin 29 (% 58)'unun, 46 dişi köpekten alınan örneklerin 36 (% 78,3)'sının 375 bp'lik bantlar oluşturduğu

belirlendi. Köpeklerin yaşları göz önüne alınarak yapılan değerlendirmeye göre; 1 yaş ve altındaki 49 köpeğin 38 (% 77,6)'inde 375 bp'lik bantlar gözlenirken, 1 yaş üstü 47 köpeğin 27 (% 57,4)'sinde *Helicobacter* spp DNA'sı saptandı.

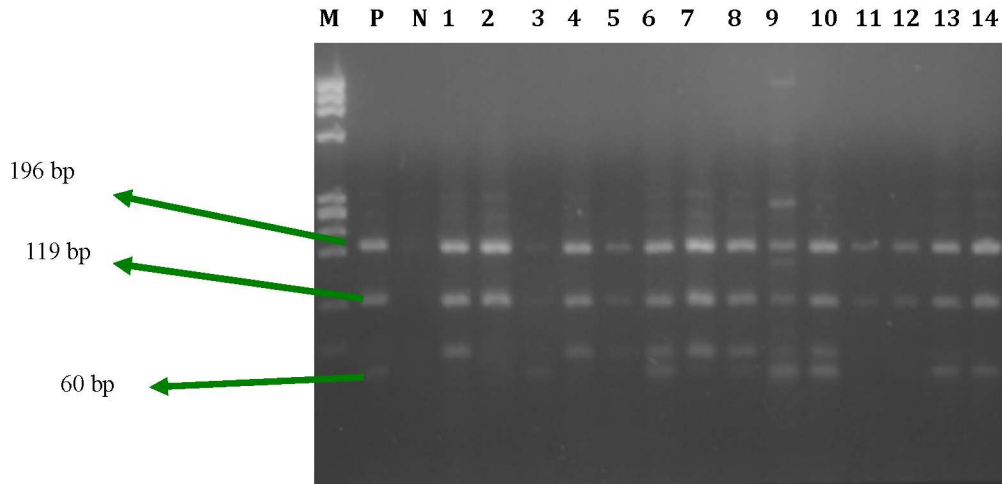
RFLP

PCR tekniği ile *Helicobacter* spp. olduğu saptanan 65 DNA'nın *Hinf*I enzimi ile kesimi ve elde edilen fragmanların PAGE tekniği ile incelenmesi sonucunda, 12 (% 18,46) DNA örneğinde *H. pylori*'ye spesifik 60 bp, 119 bp ve 196 bp'lik bantlar gözlemlendi. NuiSive agaroz jel seperasyon tekniği ile de aynı bulgular elde edildi (Şekil 2, Şekil 3).



M= Marker, N=Negatif Kontrol, P=Pozitif Kontrol, 4,6,9= Pozitif örnekler; 1,2,3,5,7,8=Negatif örnekler

Şekil 2. PAGE tekniği ile RFLP bulguları
Figure 2. RFLP products by PAGE technique



M=Marker, P=Pozitif Kontrol, N=Negatif Kontrol, 3,13,14=Pozitif örnekler, 1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12= Negatif örnekler

Şekil 3. NuiSive Agaroz Elektroforetik Seperasyon Tekniği ile RFLP Bulguları.
Figure 3. NuiSive Agarose electroforetic separation of RFLP products.

Sonuç olarak PCR ve RFLP teknikleri ile incelenen 96 köpek dışkı örneğinin 12 (% 12,5)'sinde *H. pylori* DNA'sı saptandı. Gastrik klinik belirti gösteren 36 köpeğe ait dışkı örneklerinin 5 (% 13,9)'inde, gastrik klinik belirti göstermeyen 60 köpeğe ait dışkı örneklerinin 7 (% 11,7)'sinde *H. pylori* saptandı. 40 sahipli köpekten 3 (% 7,5)'ünde, 56 sahipsiz köpekten 9 (% 16,1)'unda 196, 119 ve 60 bp'lik bantlar görüldü. 50 erkek köpekten alınan örneklerin 6 (% 12)'sının, 46 dişi köpekten alınan örneklerin 6 (% 13)'sının 196, 119 ve 60 bp'lik bantlar oluşturduğu gözlemlendi. 1 yaş ve altındaki 49 köpeğe ait dışkı örneklerinin 6 (% 12,2)'sında, 1 yaş üstü 47 köpeğe ait dışkı örneklerinin 6 (% 12,8)'sında *H. pylori* DNA'sı saptandı.

Kültür

PCR ve RFLP sonucunda *H. pylori* DNA'sı saptanan dışkı örneklerinden yapılan bakteriyolojik inceleme sonucunda, örneklerin hiçbirinden *H. pylori* izole edilmedi.

İstatistik analiz

PCR - RFLP sonuçlarına göre *H. pylori* pozitif örneklerin istatistiki olarak önemsiz olduğu saptanmıştır.

Tartışma

Helicobacter türlerinin identifikasyonu amacıyla PCR-RFLP yönteminin kullanılabilirliği ve rutin laboratuvar çalışmalarında kesin ve güvenli sonuçların alınabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Camargo ve ark., 2003; Shinozaki ve ark., 2002).

Bu araştırmada, dışkı örneklerinde cins spesifik primerler kullanarak yapılan PCR ile *Helicobacter* spp. varlığı ortaya konulmuş RFLP yöntemi ile *Helicobacter* olduğu belirlenen DNA'larda *H. pylori* varlığı saptanmıştır. Bu yöntemin kullanılabilirliği ortaya konmuştur.

PCR ile *Helicobacter* DNA'sının saptanması amacıyla Buczolics ve ark. (2003), Riley ve ark. (1997), Shinozaki ve ark. (2002), H267f ve H267r cins spesifik primerleri kullanmışlardır. Clayton ve ark. (1992), ilk olarak *H. pylori* saptanması amacıyla *CagA* geninin varlığını

gösteren *HinI* enzim kesimini kullanmış, daha sonra Camargo ve ark. (2003), 38 hastada yaptıkları *HinI* enzim kesimi sonucu 32 (% 91) hastada *H. pylori* saptadıklarını rapor etmişlerdir. Şimşek ve ark. (2000), *H. pylori* saptanması amacıyla *HinI* enzimi kullanmışlar, toplam 35 insan mide biyopsi örneğinden 31 (% 91)'inde *H. pylori* saptamışlardır.

Bu çalışmada RFLP tekniği uygulanmış ve *CagA* geninin saptanması amacıyla *HinI* enzim kesimi yapılmış, *H. pylori* saptanmasında uygun bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Daz-Regan ve ark. (2006), *H. pylori* üremesini önleyen başta *Staphylococcus* türleri olmak üzere diğer hızlı üreyen bakterilerin üremelerinin önlenmesi için, örneklerin besiyerlerine ekimleri yapılmadan önce 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirilmesini önermişlerdir. İngiliz Helicobacter Çalışma Birliği (2003), *H. pylori* izolasyonu için, selektif bir özellik taşıması ve zenginleştirilmiş bir ortam olması nedeniyle DENT supplement içeren % 5 at kanlı Colombia Agarı önermiştir.

Bu önerilerin ışığında bu çalışmada *H. pylori* olduğu PCR-RFLP ile saptanan dışkı örneklerinden *H. pylori* izolasyonu amacıyla, süspansedilen örnekler öncelikle 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirilmiş ve daha sonra DENT supplement katılmış at kanlı Colombia Agara ekimleri yapılmıştır. Daha çabuk üreyen bakterilerin üremelerinin önlenmesi, yöntemin uygulanması gerekliliği sonucuna varılmıştır.

Dünyada köpeklerde yapılan ve *Helicobacter* infeksiyonunun prevalansını gösteren çalışmalar, etkenin köpeklerde % 67-100 oranında bulunduğunu kanıtlamıştır (Cattoli ve ark., 1999; Diker ve ark., 2002; Eaton ve ark., 1993; Happonen ve ark., 1998; Jalava ve ark., 1997).

Köpeklerden *H. pylori* saptanmasına yönelik birçok araştırma yapılmasına karşın, *H. pylori* saptandığını bildiren araştırma sayısı oldukça azdır (Buczolics ve ark., 2003; Rossi ve ark., 1999; Strauss-Ayali ve ark., 1999). Buczolics ve ark. (2003), klinik olarak şüpheli köpek mide biyopsi örneklerinden PCR-RFLP ile *H. pylori* varlığını ortaya koymuşlardır. Dört köpekten alınan örnekler önce *Helicobacter* spp. cins

spesifik primerleri kullanılarak yapılan PCR ile incelenmiş, daha sonra *HhaI* enzimi ile kesimi yapılan dört DNA'dan ikisinde *H. pylori*'ye ait 270 ve 100 bp ağırlığında bantlar gözlenmiştir. Strauss-Ayali ve ark. (1999), 101 köpekten aldıkları serum ve biyopsi örneklerinin ELISA ve immunoblotting yöntemi ile incelenmesi sonucunda 2 köpeğin serum örneklerinde *H. pylori*'ye ait 58 ila 60 kDa ağırlığında protein bantları saptadıklarını bildirmişlerdir.

Diker ve ark. (2002), Türkiye'de köpeklerde *Helicobacter* spp. varlığına yönelik 122 köpeğin mide biyopsi örneğinden kültür, üreaz testi, mukozal kazıntı sitolojisi ve histolojik incelemeleri içeren çalışmalarında *Helicobacter* spp. prevalansını % 84,4 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar köpeklerin % 55,6'sında *H. bizzozeronii*, % 22,2'sinde *H. felis*, % 22,2'sinde *H. salomonis* ve % 4,4'ünde *H. rappini* saptamışlardır. Araştırmacılar aynı çalışmada *H. pylori* izole edilmediğini bildirmişlerdir.

Bu araştırmanın ilk basamağı olan dışkı örneklerinin *Helicobacter* cins spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmesi sonucunda, 65 örnekte *Helicobacter* spp. DNA'sı saptanarak, *Helicobacter* spp. prevalansı İstanbul ilinde % 67,7 olarak belirlenmiştir. Saptanan prevalans dünyada ve Türkiye'den bildirilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada İstanbul ilindeki köpeklerde *H. pylori*'nin prevalansı % 12,5 olarak belirlenmiştir. Bu oran yurt dışında gerçekleştirilen *H. pylori* saptanmasına yönelik sınırlı sayıdaki diğer çalışmalara göre yüksektir. Bu araştırma Türkiye'de köpeklerde *H. pylori* varlığının saptandığı ilk çalışma olması nedeniyle bu yönden bir karşılaştırma yapılamamıştır. İstanbul'da saptanan yüksek prevalansın yöntemin duyarlılığı, sokaklarda yaşayan köpeklerin diğer gelişmiş ülkelere oranla fazlalığı ve coğrafi konum farklılıklarından kaynaklanabileceğini düşünülmüştür.

Happonen ve ark. (1998), köpek ve kedilerde *Helicobacter* spp. tanısına yönelik yaptıkları çalışmada, gastrik klinik belirti gösteren 21 köpeğin 20 (% 95)'sinde, gastrik

klinik belirti göstermeyen 25 köpeğin ise tamamında (% 100) *Helicobacter* spp. saptamıştır. Hwang ve ark. (2002), gastrik belirti gösteren köpeklerin % 77,5'inde, gastrik belirti göstermeyenlerin % 67,5'inde *Helicobacter* varlığını ortaya koymuşlardır. Diker ve ark. (2002), *Helicobacter* spp. oranının, gastrik klinik belirti gösteren köpeklerde % 86,6 gastrik klinik belirti göstermeyenlerde ise % 81,8 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların tümü prevalans oranlarının gastrik belirti gösteren ve göstermeyen köpeklerdeki yakınlığının, etkenin normal gastrik floranın bir parçası olabileceğini gösterdiğini vurgulamışlardır.

Bu çalışmada, gastrik klinik belirti gösteren 36 köpeğe ait dışkı örneklerinin 27 (% 75)'sinde, gastrik klinik belirti göstermeyen 60 köpeğe ait dışkı örneklerinin 38 (% 63,3)'inde *Helicobacter* DNA'sı saptanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiki analizi sonucunda, gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyenler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($P=0,237$) bulunmuştur.

Köpeklerde *H. pylori* ile klinik belirti ve prevalans üzerine bir çalışma bulunmamasına karşın, insanlarda gastritli hastalarda *H. pylori* prevalansının % 80'e ve gastrit ve duodenal ülserlilerde ise % 90-100'e ulaşabildiği bildirilmiştir (Alim ve ark., 2002). Bu çalışmada, gastrik klinik belirti gösteren 36 köpeğe ait dışkı örneklerinin 5 (% 13,9)'inde, gastrik klinik belirti göstermeyen 60 köpeğe ait dışkı örneklerinin 7 (% 11,7)'sinde *H. pylori* saptanmıştır. Elde edilen bulguların istatistiki analizi sonucunda, gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyenler arasındaki fark, insanlarda yapılan çalışmaların aksine, istatistiksel olarak önemsiz ($P=0,750$) bulunmuştur.

Eaton ve ark. (1996), inceledikleri 31 sokak köpeğinin tümünde (% 100), 15 sahipli köpeğin ise 10 (% 67)'unda *Helicobacter* spp. varlığı saptamışlardır. Happonen ve ark. (1998), sahipsiz köpeklerde *Helicobacter* spp. prevalansının sahipli köpeklere oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, örnek alınan 40 sahipli köpeğin 15 (% 37,5)'inde, 56 sahipsiz köpeğin ise 50 (%

89,3)'sinde *Helicobacter* spp. DNA'sı saptanmıştır. Sahipli ve sahihsiz köpekler arasındaki *Helicobacter* spp. saptanması arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($P=0,01$) bulunmuştur.

Literatür taraması sonucunda, köpeklerde *H. pylori* üzerine sahiplilik ve prevalansın etkinliğinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, 40 sahipli köpekten 3 (% 7,5)'ünde, 56 sahihsiz köpekten 9 (% 16,1)'unda *H. pylori* saptanmıştır. Sahipsiz köpeklerde daha fazla pozitiflik saptanmakla birlikte aradaki fark önemsiz ($P=0,439$) bulunmuştur. Köpeklerde sahiplilik ve *H. pylori* prevalansı üzerine yapılmış çalışma bulunmamasına karşın, insanlarda *H. pylori* prevalansının az gelişmiş ülkelerde sosyo-ekonomik durumdaki kötüleşmeye bağlı olarak % 60-80'lere ulaştığı, gelişmiş ülkelerde ise bu oranın beslenme, hijyen ve antibiyotik kullanımına bağlı olarak % 5-10'a kadar düşebildiği bildirilmiştir (Köksal ve ark., 2002).

Köpeklerde *Helicobacter* spp. ve *H. pylori* üzerine cinsiyetin prevalansa etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. İran'da insanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada, depresyon olgularının çokluğu, iklime bağlı sıcaklığın ve nispi nemin değişmesine paralel olarak ev tozu miktarının artışı nedeniyle kadınlarda erkeklere oranla daha yüksek miktarda *H. pylori* saptandığı bildirilmiştir (Jafarzadeh ve ark., 2007). Türkiye'de Yılmaz ve ark., (2002), kadınlarda % 85,4 ve erkeklerde de % 76,3 *H. pylori* sero-pozitifliği saptamışlardır. Alim ve ark. (2002), ise kadınlarda % 73, erkeklerde % 63,3 oranında *H. pylori* saptamışlar, sero-pozitiflik oranının kadınlarda erkeklere göre istatistiksel yönden anlamlı ölçüde daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada, köpeklerin cinsiyetine göre yapılan değerlendirmede, 50 erkek köpekten alınan örneklerin % 58'inde, 46 dişi köpekten alınan örneklerin % 78,3'ünde *Helicobacter* spp. DNA'sı saptanmış, dişi ve erkek köpekler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli ($P=0,034$) bulunmuştur. *H. pylori* yönünden ise, erkek köpeklerin % 12'sinde, dişi köpeklerin %

13'ünde *H. pylori*'ye spesifik bantlar gözlenmiş, dişi ve erkek köpekler arasındaki fark ($P=0,877$) istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Dişilerde *Helicobacter* spp. oranının erkek köpeklere göre daha yüksek olmasının olası nedenlerinden birinin, dişi köpeklerde kızgınlığa bağlı şekillenen depresyondan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Diker ve ark. (2002), 1 yaş üzeri 100 köpeğin 93 (% 93)'ünde, 2 ay-1 yaş arası 16 köpeğin ise 9 (% 56,3)'unda *Helicobacter* spp. saptamışlardır. Ancak elde edilen verilerin istatistiki analizleri, genç köpeklerin sayısının az olması nedeniyle yapılmamıştır. Hänninen ve ark. (1996) ise, genç köpeklerde *Helicobacter* spp. varlığının daha yüksek oranda olduğunu vurgulamışlardır. Buna karşın Happonen ve ark. (1998), *Helicobacter* prevalansının saptanmasına yönelik çalışmalarında genç ve yaşlı hayvanlarda eşit oranda *Helicobacter* spp. saptadıklarını belirtmişlerdir.

Köpeklerde bu konudaki bulguların sınırlı sayıda olmasına ve yaşa göre prevalans oranları hakkında kesin bilgiler olmamasına karşın, insanlarda yaşın etkinliği üzerine birçok çalışma vardır.

Rocha ve ark. (1998), *H. pylori* prevalansını çocuklarda % 62,1 ve erişkinlerde % 34,1 olarak bildirmişlerdir. Yine Megraud ve ark. (1996), gelişmiş ülkelerde yaşayan insanlarda *H. pylori* sero-prevalansının genç bireylerde % 70, yetişkin bireylerde % 40 olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar, genç bireylerin hijyene gerekli önemi vermemelerine bağlı olarak fekal-oral yolla etkene maruz kaldıklarını ve bunun sonucunda enfeksiyonunun yüksek oranda şekillendiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, 1 yaş ve altındaki 49 köpeğin % 77,6'sında *Helicobacter* spp. spesifik 375 bp'lik bantlar gözlenirken, 1 yaş üstü 47 köpeğin % 57,4'ünde *Helicobacter* spp. DNA'sı saptanmış, yaşa göre fark istatistiki olarak önemli ($P=0,035$) bulunmuştur. *H. pylori* yönünden incelenen 1 yaş ve altındaki 49 köpeğe ait dışkı örneklerinin % 12,2'sinde, 1 yaş üstü 47 köpeğe ait dışkı örneklerinin % 12,8'inde *H. pylori* DNA'sı saptanmış, 1 yaş ve

altındaki ve 1 yaş üzeri köpekler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($P= 0,938$) bulunmuştur. Çalışmada genç köpeklerde *Helicobacter* spp. DNA'sının daha fazla saptanmasının nedenlerinin, yavru köpeklerin laktasyon periyodu boyunca anneleriyle ve birbirleriyle olan sıkı ilişkisinden ve immün sistemlerinin tam gelişmemiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Eaton ve ark. (1996), 54 köpek mide biyopsi örneğinden Skirrow supplement içeren kanlı agara ekim yapmış, 12 (% 22) örnekten *Helicobacter* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Cins spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda ise, 22 (% 40) örnekte *Helicobacter* spp. saptamışlardır. Başka bir çalışmada Cattolia ve ark. (1999), 25 mide biyopsi örneğinin kültürü için Skirrow supplement içeren BHI Agar kullanmış ve 5 (% 20) örnekten izolasyon gerçekleştirmişlerdir. Cins spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda ise 25 örneğin 18 (% 72)'inde *Helicobacter* spp. saptamışlardır. Hwang ve ark. (2002), köpeklerdeki gastrik *Helicobacter* infeksiyonun prevalansının saptanması amacıyla köpeklerin mide biyopsi örneklerinden DENT supplement içeren % 5 kanlı tryptic soy agara ekim yapmışlar ancak izolasyon gerçekleştirememişken, cins spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda 15 örnekten 11 (% 78,4)'inde *Helicobacter* DNA'sı saptamışlardır. Araştırmacılar izolasyon oranının azlığını ya da olmayışını rutin laboratuvar yöntemleriyle gastrik Helikobakterlerin izolasyonunun zorluğuna, her *Helicobacter* türünün kültüre edilebilir olmayışına ve örnekleme öncesi çeşitli nedenlerle antibiyotik tedavisi uygulanmış olmasına bağlamışlardır (Cattolia ve ark., 1999; Eaton ve ark., 1996; Hwang ve ark., 2002).

Dışkıdan *H. pylori* izolasyonu üzerine sınırlı sayıda çalışma vardır. Daz-Regan ve ark. (2006), dışkıda hızla üreyerek *H. pylori*'nin üremesini önleyen bakterilerin varlığını belirtirken; Mai ve ark. (1992), etkenin dışkıdan kültürü sırasında üretilmeyen kokoid form almasını izolasyonu zorlaştıran nedenler arasında göstermişlerdir.

Bu çalışmada, PCR ve RFLP sonucunda *H. pylori* DNA'sı saptanan 12 dışkı örneğinden yapılan bakteriyolojik inceleme sonucunda, örneklerin hiçbirinden *H. pylori* izole edilememesinin yukarıda söz edilen nedenlerden kaynaklandığı kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, köpeklerde non-invaziv bir yöntemle *Helicobacter* spp. ve *H. pylori* varlığının saptanabileceği, bu amaçla kullanılabilir olan köpek dışkılarının PCR-RFLP analizleri için uygun örnekler olduğu düşünülmüştür. Çalışma ile Türkiye'de köpeklerde *H. pylori* varlığı ilk kez ortaya konulmuş ve *H. pylori* prevalansı İstanbul'da % 12,5 olarak saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Alim, A., 2002.** Sivas İl Merkezinde, Semptomatik ve Asemptomatik Yetişkin Bireylerde *Helicobacter pylori* Seroprevalansı. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 26, 75-80.
- Altındış, M., Özdemir, M., 2003.** *Helicobacter pylori* ve Tanısı. The Medical Journal of Kocatepe 2, 1-12.
- Armstrong, D., 1996.** *Helicobacter pylori* Infection and Dyspepsia. Scandinavian Journal of Gastroenterology 31, 38-47.
- Brea, M.L., Alarcon, T., Megraud, F., 1997.** Diagnosis in *Helicobacter pylori* Current Opinion in Gastroenterology 13, 13-19.
- Buczolits, S., Hirt, R., Busse, H.J., 2003.** PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa, Veterinary Microbiology, 95, 259-270.
- Camargo, P.L., Alfieri, A.A., Bracarense, A.P.F.R.L., Menoli, R., Spinosa S.R., Hagiwara, M.K., 2003.** Use of Polymerase Chain Reaction and Enzymatic Cleavage in the Identification of *Helicobacter* spp. in Gastric Mucosa of Human Beings from North Paraná, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98, 265-268.
- Cattolia, G., Vugt, van R, Zanonic, R. G., Sanguinetti, V., R. Chiochetti, M. Gualtieri, C. M. J. E., Vandenbroucke-Grauls, W., Gaastrea, Kusters, J. G., 1999.** Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter*

- spp. in naturally infected dogs. *Veterinary Microbiology* 70, 239-250.
- Clayton, C.L., Kleanthous, H., Coates, P.J., 1992.** Sensitivity Detection of *Helicobacter pylori* by Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 192-200.
- Cutler, A.F., 1996.** Testing for *Helicobacter pylori* in clinical practice. *American Journal of Medicine* 100, 35-41.
- Daz-Regan, J., Alaren, T., Aznar, E., Domingo, D., Lopez-Brea, M., 2006.** Time-killing of viable *Staphylococcus* spp. against *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Acta Physiologica* 188, 23.
- Diker, S., Hazıroğlu, R., Akan, M., Çelik, S., Kabakçı, N., 2002.** The prevalence, colonization sites and pathological effects of gastric helicobacters in dogs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 26, 345-351.
- Doughbeh, C., Welch, A.R., 2004.** Development of a noninvasive method for detecting and monitoring the time course of *Helicobacter pylori* infection. *Infection and Immunity* 72, 5358-5364.
- Eaton, K.A., Dewhirst, F.E., Radin, M.J., Fox, J.G., Paster, B.J., Krakowka, S. And Morgan, D.R., 1993.** *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *International Journal of Systemic Bacteriology* 43, 99-106.
- Eaton, K.A., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Tzellas, N., Coleman, B.E., Paola, J. And Sherding, R., 1996.** Prevalence and varieties of helicobacter species in dogs from random sources and pet dogs. Animal and public health implications. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 3165-3170.
- English Health Protection Agency, 2003.** Identification of *Helicobacter pylori* Issue no. 1, Issued by. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, 1-9.
- Enroth, H, Engstrand, L., 1995.** Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2162-65.
- Geyer, C., Colbatzky, F., Lechner, J., Hermanns, W.; 1993.** Occurrence of spiral shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. *Veterinary Record* 133, 18-19.
- Hachem, C.Y., Clarridge, J.E., Evans, D.G., Graham, D.Y., 1995.** Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Pathology* 48, 714-16.
- Hanninen, M.L., Happonen, I., Saari, S., 1996.** Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* spp. *International Journal of Systemic Bacteriology* 46, 160-166.
- Happonen, I., Linden, J., Saari, S., Karjalainen, M., Hanninen, M. L., Jalava, K., 1998.** Detection and Effects of Helicobacters in Healthy Dogs and Dogs With Signs of Gastritis. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 213, 1767-1774.
- Hermanns, W., Kregel, K., Breuer, W., Lechner J., 1995.** Helicobacter like organisms. histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 112, 307-318.
- Holck, S., Ingeholm, P., Blom, J., Nargaard, A., Elsborg, L., Adamsen, S., Andersen, L.P.; 1997.** The histopathology of human gastric mucosa inhabited by *Helicobacter heilmannii*-like (*Gastrospirillum hominis*) organisms, including the first culturable case. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 105, 746-756.
- Hwang, C.Y., Han, H.R., 2002.** Prevalence and clinical characterization of gastric helicobacter species infection of dogs and cats in Korea. *Journal of Veterinary Science* 3, 123-133.
- Ishihara, S., Kaji, T., Kawamura, A., Rumi, A. K., 2000.** Diagnostic accuracy of a new non-invasive enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in stools after eradication therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14, 611-614.
- Jafarzadeh, A., 2007.** Specific serum immunoglobulin G to *H. pylori* and *CagA* in healthy children and adults (south-east of Iran) *World Journal of Gastroenterology* 13 (22), 3117-3121.
- Jalava, K., Kaartinen, M., Utriainen, M., Happonen, I. And Hänninen, M.-L., 1997.** *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *International Journal of Systemic Bacteriology* 48, 975-982.
- Jalava, K., On, S.L.W., Vandamme, P.A.R., Happonen, I., Sukura, A. ve Hänninen, M.-L., 1998.** Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3998-4006.

- Kabir, S., 2001.** Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *Journal of Medical Microbiology* 50, 1021-1029.
- Köksal, F. ve ark., 2002.** İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1643-1647.
- Lee, A., Phillips, M.W., O'Rourke, J.L., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Fraser, G.J., Fox, J.G., Sly, L.I., Romaniuk, P.J., Trust, T.J., Kouprach, S., 1992.** *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *International Journal of Systemic Bacteriology* 42, 27-36.
- Mai, U.E., Perez-Perez, G.I., Allen, J.B., Wahl, S.M., Blaser, M.J., Smith, P.D., 1992.** Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *Journal of Experimental Medicine* 175, 517-525.
- McNulty, C.A.M., Dent, J.C., Uff, J.S., Gear, M.W.L., Wilkinson, S.P., 1989.** Detection of *Campylobacter pylori* by the biopsy urease test. an assessment in 1445 patients. *Gut* 30, 1058-1062.
- Mégraud, F., 1996.** Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 31,57-62.
- Monteira, L.Gras, N., Megraud, F., 2001.** Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3778-80.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, R.H., 1995.** *Manual of Clinical Microbiology*. 6th Edition, ASM Press, Washington D.C.,USD, 1247-1256.
- Özdamar, K., 1999.** SPSS ile Biyostatik. (3. baskı), Kaan Kitabevi Eskişehir. 341-349.
- Riley, L.K., 1997.** Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1620-1623.
- Rocha, G.A., 1998.** Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in a Rural Area of the State of Mato Grosso, Brazil, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 171-174.
- Rossi, G., Rossi, Michela., 1999.** A Conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori* Infection and Immunity 67, 3112-3120.
- Russel, H., 1993.** Role of infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease. a meta-analysis. *The Lancet* 359, 14-22.
- Shinozaki, K.J., Sellon, R.K., 2002.** Fecal Polymerase Chain Reaction with 16S ribosomal RNA primers can detect the presence of gastrointestinal helicobacters in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16,426-432.
- Strauss-Ayali, D., Simpson, K.W., Schein, A.H., McDonough, P.L., Jacobson, R.H., Valentine, B.A., Peacock, J., 1999.** Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* spp. and uninfected dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1280-1287.
- Şimşek, İ., Menevşe, S., 2000.** PCR and RFLP analysing and identification of *H. pylori* Strains isolated from gastric specimens. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 190, 213-222.
- Trevisani, L., Sartori, S., Galvani, F., Rossi, M. R., 1999.** Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in faeces. A Prospective Pilot Study *American Journal of Gastroenterology* 94, 1830-1833.
- Windsor, H. M., O'Rourke, J.; 2000.** Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America* 29 (3), 633-649.
- Yılmaz, E., Doğan, Y., Gürgöze, M.K., Unal, S., 2002.** Seroprevalance of *Helicobacter pylori* infection among children and their parents in eastern Turkey. *Journal of Paediatrics and Child Health* 38, 183-186.