

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

Dilek Öztürk<sup>1</sup>@

Osman Erganiş<sup>2</sup>

### Detection of *Helicobacter pylori* by Dot-Immunobinding Assay and Polymerase Chain Reaction in Cats and Dogs

**Özet:** Bu çalışma ile kedi ve köpeklerin mide mukoza örneklerinde *Helicobacter pylori*'nin kültür, mikroskopi, direk üreaz testi, Dot-Immunobinding Assay (DIA) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile teşhisi amaçlandı. Bu amaçla endoskop yardımıyla 41 köpeğin antrum ve aynı köpeklerin 40'ının korpus ve kardiasından biyopsi örneği, nekropsi ile 9 köpek ve 2 kedi midenin antrum, korpus ve kardiasından mukoza örnekleri alındı. Ayrıca DIA testi için 39 köpekten kan örnekleri alındı. Kedi ve köpeklerden alınan 154 mide mukoza örneğinden *H. pylori* veya diğer *Helicobacter* türleri izole edilemedi. Ancak örneklerin 59'u (% 38) direk üreaz testi ile *Helicobacter* türleri yönünden pozitif bulundu. DIA ile incelenen 39 köpek serum örneğinin tümü *Helicobacter spp.* antikorları yönünden pozitif bulundu. PZR ile incelenen 148 köpek ve 6 kedi mide mukoza örneğinden, sadece bir köpeğe ait mide korpusunda *H. pylori* pozitifliği saptandı. Sonuç olarak bu çalışma ile, kedi ve köpeklerde gastrik *Helicobacter spp.* türlerinin bulunabileceği, ancak bunların çoğunlukla kültüre edilemeyen *Helicobacter* türleri olabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Helicobacter pylori*, kedi, köpek, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Dot-Immunobinding Assay.

**Summary:** By this study, the presence of *H. pylori* in the gastric mucosa samples of cats and dogs were investigated by culture, microscopy, direct urease test, Dot-Immunobinding Assay (DIA) and Polymerase Chain Reaction (PCR). For this reason, biopsy samples from antrum of 41 dogs and from corpus and cardia of 40 dogs by endoscopy and from antrum, corpus, cardia of 9 dogs and 2 cats by necropsy were taken three times. Blood samples from the 39 dogs were taken for serological examination by DIA test. Neither *H. pylori* nor any other *Helicobacter spp.* could be isolated from the animals used in the study. Positivity for *Helicobacter spp.* by the direct urease test were found in 59 (38 %) of 154 gastric mucosa samples. All serum samples of dogs were found to be positive by DIA. 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 corpus. In conclusion, this study reports that the gastric *Helicobacter spp.* which can be strains that cannot be cultured found in the stomach of dogs and cats.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, cat, dog, Polymerase Chain Reaction, Dot-Immunobinding Assay.

### Giriş

*Helicobacter* türleri, insan ve çeşitli hayvanların sindirim sistemine yerleşen spiral şekilli mikroorganizmalardır (Yıldırım, 1996; Diker, 1997; Fox ve Lee, 1997). Bu mikroorganizmalar insanlarda gastritis, peptik ülser ve mide adenokarsinomunun nedeni olarak gösterilmiştir (Tytgat ve ark., 1991; Strauss-Ayali ve Simpson, 1999). İnsanlarda *Helicobacter pylori* ile gastrik hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesi sonucu, benzer mikroaerofilik mikroorganizmalar hayvanlarda da araştırılmış ve hayvanlarda *Helicobacter* cinsi içinde birçok mikroorganizma türü tanımlanmıştır (Eaton ve ark.,

1996; Cattoli ve ark., 1999; Melito ve ark., 2001). Günümüze kadar insan ve hayvanlarda 29 *Helicobacter* türü belirlenmiştir (Melito ve ark., 2001; Gueneau ve Goer, 2002). Köpek midesinde bulunan *Helicobacter* türleri, *H. felis*, *H. heilmannii* (*Gastrospillum 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). *H. pylori*'nin sağlıklı ve enfekte köpeklerden izole edilemediği (Jalava ve ark., 1998; Cattoli ve ark., 1999; Strauss-Ayali ve ark., 1999), ancak deneysel olarak enfekte edilen köpeklerden

Geliş Tarihi: 14.03.2006

@: sedilek@yahoo.com

\*Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1833) tarafından desteklenen aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

1. Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, BURDUR

2. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

izole edilebildiği bildirilmiştir (Rossi ve ark., 1999). İnsanlardaki önemi bilinmesine rağmen, kedi ve köpeklerde *Helicobacter* türleri ile gastrik hastalıklar arasındaki ilişki hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

*H. pylori* dışı, salya, dental plak ve sudan izole edilmiş, bulaşmanın fekal-oral, oral-oral yolla olduğu ve bu nedenle 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). Bununla birlikte *H. pylori*'nin kedi ve köpek gibi hayvanlardan insanlara nasıl bulaştığı henüz kesinlik kazanmamıştır (El-Zaatar ve ark., 1997; Jenkins ve Basset, 1997; Vandenplass, 1999).

Bu çalışma ile kedi ve köpeklerin antrum, korpus ve kardias mide mukozalarından kültür, mikroskopi, direk üreaz testi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *H. pylori*'nin izolasyonu ve köpek kan serumlarından da Dot-ImmunoBinding Assay (DIA) ile *H. pylori*'ye karşı oluşan antikorların tesbit edilmesi amaçlanmıştır.

#### Materyal ve Metot

**Materyal:** Çalışma materyalini 50 sokak köpeği ve 2 sokak kedisi oluşturdu. Endoskop yardımıyla 41 köpeğin antrum ve aynı köpeklerin 40'ının korpus ve kardiasından biyopsi örneği, nekropsi ile de 9 köpek ve 2 kedinin midesinin antrum, korpus ve kardiasından mide mukoza örnekleri alındı. DIA için 39 köpekten kan alındı (Tablo 1). *H. pylori*'ye karşı antiserum hazırlanmasında yetişkin Yeni Zelanda ırkı 5 beyaz tavşan kullanıldı. Antijen hazırlanmasında ve testlerde pozitif kontrol olarak *H. pylori* ATCC 11637 suşu kullanıldı.

**Kan:** Anestezi öncesi köpeklerden kan örnekleri alınarak, serumları çıkarıldı ve serumlar kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

**Endoskopi:** Endoskopi öncesi kedi ve köpekler bir gün aç bırakıldı. Biyopsi örneklerinin alınmasında Olympus GIF/CF/JF TYPE E (Olympus Optical Co., Japonya) beşeri endikasyon amaçlı endoskop kullanıldı. Hayvanların midelerinin antrum, korpus ve

kardia bölgelerinden 3'er örnek alındı. Örneklerden biri PZR'da kullanılmak üzere fizyolojik tuzlu su içeren ependorf tüplerine konarak -80°C'de muhafaza edildi. Diğer örnekler ise çabuk üreaz testi için üreli buyyona ve ekim için brain heart infusion broth (BHIB)'a konuldu. Nekropsi ile alınan mideler steril pens ve makaslar yardımıyla açıldı. Steril distile su ile yıkanarak mide içeriği uzaklaştırıldı ve midenin antrum, korpus ve kardias bölgelerinden 3'er örnek aynı işlemler için alındı.

**Direk Üreaz Testi:** Son konsantrasyonu % 0.01 olacak şekilde fenol kırmızısı ilave edilmiş % 10'luk üreli buyyon içine mide örnekleri konuldu. Oda ısısında 15-30 dakika içinde sarıdan pembeye renk değişikliği "pozitif", rengin değişmemesi "negatif" olarak değerlendirildi (Happonen, 1999; Jalava, 1999; Erdeğer ve ark., 2001).

**Direk Mikroskopik Muayene:** Kedi ve köpeklerden alınan mide örneklerinden froti yapılarak alkolle tespit edildi ve Gram yöntemi ile boyandı. Preparatlarda ışık mikroskobu (X1000) ile spiral ve Gram negatif bakteriler araştırıldı (Happonen, 1999).

**Gastrik *Helicobacter* Türlerinin İzolasyonu:** BHIB içine alınan örneklerin, taze hazırlanmış %7 defibrine at kanlı skirrow supplementli blood agar base (Oxoid), brain-heart Infusion agar (Oxoid) ve Colombia agar (Oxoid)'a ekimleri yapıldı. Petri anaerobik (Anaerobik Gas Generating Kit, Oxoid BR 38) ve mikroaerofilik (Campygen, Oxoid CN 025) ortamlarda katalizator bulunmayan jar içerisinde 37°C'de 8-12 gün inkübasyona bırakıldı (Happonen ve ark., 1998; Jalava, 1999). Üreyen bakterilerin koloni morfolojileri *Helicobacter spp.* yönünden incelendi. Şüpheli koloniler Gram yöntemi ile boyandı. Gram negatif spiral bakterilerin gözlemlendiği kolonilerden supplementli ve at kanlı BHIA'a pasaj yapılarak 37°C'de 6-10 gün inkübe edildi. Üreyen bakterilerin biyokimyasal testleri (oksidaz, katalaz ve üreaz) yapıldı (Happonen ve ark., 1998; Jalava ve ark., 1999; Bulut ve ark., 2001).

**Hiperimmun Serum Hazırlanması:** *H. pylori* ATCC 11637 suşu antijen kaynağı olarak kullanıldı. Bakteri %7 defibrine at kanlı ve Skirrow supp-

Tablo 1. Kedi ve köpeklerden endoskopi ve nekropsi ile alınan mide mukoza ve kan örnekleri

	Endoskopi				Nekropsi		
	Kan	Antrum	Korpus	Kardia	Antrum	Korpus	Kardia
Köpek	39	41	40	40	9	9	9
Kedi	-	-	-	-	2	2	2
Toplam	39	41	40	40	11	11	11

lementli 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 (Poxton ve Blackwell, 1986).

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 antijen, 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. LAT ile pozitif serumların 1/10, 1/20, 1/40.....1/5120, 1/10240 olacak şekilde iki katlı sulandırılmaları yapıldı ve mSAT ile antikor titreleri ölçüldü (Drasser, 1986).

Dot Immunobinding Assay (DIA): *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  $1 \times 10^7$  (Total Protein değeri 0.37g/ml) olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonuna % 0.3 olacak şekilde formol ilave edildi ve 2500 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı antijen olarak kullanıldı (Erganiş ve ark., 2002). Antijen, antiserum ve konjugatın (rabbit anti-dog IgG) optimal sulandırılmalarının standardizasyonu yapıldı. Tavşanlarda hazırlanan antiserumun DIA ile en yüksek dilüsyonu 1/12800 olarak belirlendi. Katı faz olarak 0.22 µm pora sahip Nitroselüloz membran (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, % 0.005 Tween 20 içeren phosphate buffer solüsyonu (PBS-T) 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 dakika inkübe edildikten sonra NCM' ler 5 kez PBS-T (her yıkamada 10 dakika) ile yıkandı. NCM oda ısısında kurutuldu (Erganiş ve ark., 2002). PBS-T ile 1/6000 oranında sulandırılan konjugat (Alkalen fosfataz, anti-dog IgG, Sigma, A-6042) ilave edilerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. PBS-T ile 5 kez yıkandı ve üzerine taze hazırlanmış substrat olarak 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium, Sigma, B-

5655) ilave edildi. Oda ısısında karanlık yerde 20 dakika 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).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Mide mukoza örnekleri derin dondurucudan çıkarıldı ve çözülüp yeni ependorf tüplerine alındı. Örnekler üzerine 200µl lizis buffer konuldu. 56°C' de 3 saat bekletildi. Daha sonra üzerine 200µl fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) (Sigma, P-3803) ilave edildi ve 4°C 14000 rpm'de 10 dakika 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 ve 14000 rpm'de 20 dakika 4°C' de santrifüj edilerek üst kısım atıldı. Üzerine 500 µl %70'lik soğuk etanol ilave edildi ve tekrar 4°C ve 14000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Dipteki DNA peleti iyice kuruyana kadar 37°C'de bekletildi. DNA peleti üzerine 50µl ultra saf su ilave edildi ve DNA ekstraksiyonları PZR yapılarına kadar -20°C'de muhafaza edildi (Valentine ve ark., 1991; Bulut ve ark., 2001). Amplifikasyon her bir oligonükleotid primerinden (CAM-2 (5'-TAA CAA ACC GAT AAT GGC GC-3') ve CAM-4 (5'-CAT CTT GTT AGA GGG ATT GG-3')) 0.5µM içeren 40µl PZR karışımında uygulandı. PZR karışımı olarak 5µl 10X tepkime tamponundan (10mM Tris-HCl (pH:9.0), 50mM KCl, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, %0.1 Triton X-100), 1µl her bir primerden (0.5µM), 28.7µl steril distile su, 0.3µl Taq DNA Polimeraz (5U/ µl), 4µl dNTP (250µM) ve 10µl kalıp DNA kullanıldı. 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 ethidyum bromid ve %2'lik agaroz içeren jel ortamında elektroforez edildi. Marker olarak 100 bp'lık marker kullanıldı. Pozitif kontrol olarak *H. pylori* ATCC 11637 suşu ilave edilmiş mide dokusunun ekstraksiyonu (doku+bakteri) veya saf bakteri ekstraksiyonu kullanıldı. 203 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak değerlendirildi (Valentine ve ark., 1991).

### Bulgular

Kedi ve köpek mide mukozalarından alınan 154 örneğin kültüründe üreme tespit edilmedi. Köpek midelerinden hazırlanan ve Gram boyama yapılan 148 sürme preparatın 145'inde kısa veya uzun, gevşek veya sık spiral bakteriler gözlemlendi (Tablo 2). Köpeklerin 3'ünde 10-12 kıvrımlı uzun spiraller dikkati

Tablo 2. Kedi ve köpeklerde 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)
Korpus	49	2	48	1	2	0	17( %35)	2(%100)
Kardia	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 gözleendiği mide mukozası örnek sayısı

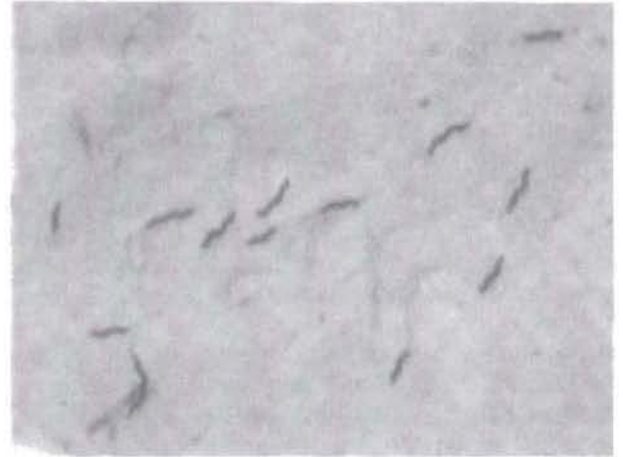
\*\* Üreli buyyonda 30 dakika içinde renk değişiminin tespit edildiği örnek sayısı

Tablo 3. *Helicobacter* türlerinin kültür, direk üreaz testi, mikroskopik muayene, DIA ve PZR sonuçlarının karşılaştırılması.

	Materyal sayısı		Pozitif (%)		Negatif (%)	
	Köpek	Kedi	Köpek	Kedi	Köpek	Kedi
Kültür	148	6	-	-	148	6(%100)
Direk üreaz test	148	6	53 (%36)	6(%100)	95 ( %64)	-
Mikroskopik muayene	148	6	145 (%98)	6(%100)	3 ( %2)	-
PZR	148	6	1 (%0.68)	-	147( %99.32)	6(%100)
DIA	39	-	39 (%100)	-	-	-



Şekil 1 Köpekde direk mikroskopide sık ve uzun, gram negatif spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama).



Şekil 2. Köpekde direk mikroskopide gevşek ve kısa, gram negatif spiral mikroorganizmaların görünümü (Gram boyama).

çekerken (Şekil 1), diğerlerinde gevşek veya sık kısa spiraller gözleendi (Şekil 2). İki kediye ait tüm mide mukoza örneklerinde de spiral, Gram negatif bak-

teriler gözleendi. Elli köpek antrumunun 24 (%48)'ünde, 49 köpek korpusunun 17 (%35)'sinde ve kardiasının ise 12 (%24)'sinde direk üreaz testi ile

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

Şekil 3. Köpek serum örneklerinin nitrosetüloz membranda DIA ile test edilmesi (1-negatif kontrol, 2- negatif kontrol, 3-pozitif kontrol, 4-pozitif kontrol, 5-39-kan serum örnekleri).

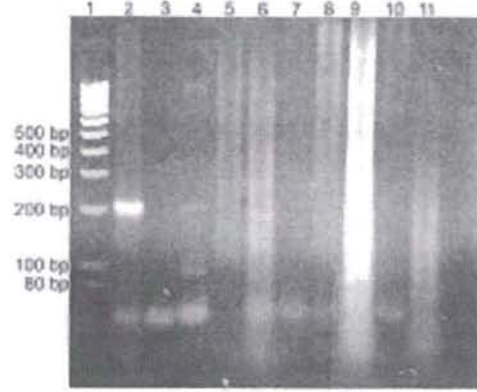
pozitiflik saptandı. Aynı test ile kedi materyallerinin ise tümünde pozitiflik saptandı (Tablo 2).

Köpek kan serumlarının tümü DIA testi ile pozitif bulundu (Şekil 3). CAM-2 ve CAM-4 primerleri ile yapılan PZR' da sadece bir köpeğin korpusunda *H. pylori* yönünden pozitiflik bulundu (Tablo 3, Şekil 4).

Çalışmada kullanılan yöntemler karşılaştırıldığında, köpeklerden alınan 148 mide mukoza örneğinden *Helicobacter* izole edilemezken, direk üreaz testi ile örneklerin 53'ünde (%36) pozitiflik, 95'inde (%64) negatiflik tespit edildi. Mikroskopik incelemede ise örneklerin %98'inde Gram negatif spiral bakteriler gözlenirken, %2'sinde görülmedi. Kedilerden alınan 6 mide mukoza örneğinde izolasyon yapılamazken, mikroskopi ve direk üreaz testi ile örneklerin tümü pozitif olarak belirlendi. Bir köpekte PZR ile *H. pylori* yönünden pozitiflik saptanırken, kedi mide mukoza örneklerinde tespit edilemedi (Tablo 3).

### Tartışma ve Sonuç

Çalışmada 50 köpek ve 2 kediye ait 154 mide mukoza örneğinden yapılan ekimlerde "*H. pylori*" veya "*Helicobacter benzeri mikroorganizmalar*" izole edilemedi. Kedi midelerinden *H. pylori* izolasyonu



Şekil 4. Köpek mide mukoza 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 örneğinin PZR ürünü), 5-11-negatif örnekler.

bildirilmiş olmasına rağmen (Perkins ve ark., 1996; Handt ve ark., 1994), köpeklerde izolasyon bildirilmemiştir (Happonen ve ark., 1996; Jalava ve ark., 1998; Jalava ve ark., 1999; Buczolits ve ark., 2003). Köpeklerde *H. pylori* izolasyonu yapılamamasının, köpek midasının *H. pylori* için uygun olmaması nedeniyle *H. pylori*'nin spiral formdan kültüre edilemeyen ancak canlı olan kokoid forma geçmesine veya insan ve köpeklerde mide ortamlarının farklı olması nedeniyle köpeklerde *H. pylori* bulunsa bile mevcut *H. pylori*'yi üretmek için gerekli ortamın (besiyeri, suplement, pH vs) sağlanamamasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Buczolits ve ark., 2003). Diker ve ark. (2002), köpek midelerinde *Helicobacter* türlerinin varlığını ortaya koymak amacıyla 122 köpek midasını kültür, mikroskopi, üreaz testi ve histolojik muayene ile incelediklerinde, 103 köpekten yapılan boyalı preparatlarda spiral bakteri belirlediklerini, ancak midelerin sadece 6'sından izole ettikleri spiral bakterileri *H. felis* olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir. Yıldırım (1996), direk mikroskopik muayenede 75 köpeğin 46'sında Gram negatif, spiral bakterilerin varlığını belirlediğini, ancak 2 *H. felis* suşu izole ve tanımladığını bildirmiştir. Bu çalışmada *Helicobacter* izolasyonu yapılamamıştır. Ancak mikroskopik muayenede 148 köpeğin 145'inde ve 6 kedinin tümünde Gram negatif, spiral

bakteriler tespit edilmiştir. Nitekim *Helicobacter* türlerinin boyalı preparatlarda tipik şekillerinin görülmesi nedeniyle, direk mikroskopinin spesifite ve sensitivitesinin % 100 olduğu bildirilmiştir (Happonen ve ark., 1996; Happonen ve ark., 1998).

Bu çalışmada *H. pylori* yanısıra diğer gastrik *Helicobacter* türlerinin de izole edilememesi, çalışmada kullanılan kedi ve köpeklerin sağlıklı olmasına veya kültüre edilemeyen gastrik *Helicobacter* türlerinin çokluğuna bağlanabilir. *H. heilmannii*'nin kültüre edilen veya edilemeyen iki formu bildirilmiş olup, bazı araştırmacılar (Cattoli ve ark., 1999; Diker ve ark., 2002) tarafından direk mikroskopide görülen ancak izole edilemeyen spiral mikroorganizmalar *H. heilmannii* veya *Gastrospirillum ssp.* olarak isimlendirilmiştir.

Bu çalışmada, köpek mide mukozaları mikroskopi ile incelendiğinde, insanlardakine benzer olarak mide antrumunda bakteri yoğunluğunun fazla olduğu belirlenmiştir. Köpeklerde yapılan diğer çalışmalarda (Jalava ve ark., 1998; Cattoli ve ark., 1999; Jalava, 1999; Diker ve ark., 2002) ise fundus ve korpus'da, antruma göre daha yoğun bakteri kolonizasyonu tespit edilmiş ve bu durum *Helicobacter* türlerinin ilk yerleşim yerinin fundus ve korpus olmasına bağlanmıştır. Bu çalışmada direk üreaz testi ile antrumdan elde edilen pozitiflik ile mikroskopi benzerlik göstermiş ve pozitiflik oranı korpus ve kardiadan elde edilen orandan daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığa köpeklerin yaş, ırk, sağlık durumu ile enfekte olduğu *Helicobacter* türünün neden olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada mide mukoza örneklerinden yapılan direk üreaz testinde kedilerin tümünde pozitiflik saptanırken, köpeklerin antrum, korpus ve kardial bölgelelerinden sırasıyla 24 (%48), 17 (%35) ve 12 (%24) pozitiflik tespit 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 (korpus örneklerinin %100, fundus örneklerinin %95 ve antrum örneklerinin %62' sinde) pozitiflik tespit etmişlerdir. Happonen ve ark. (1998), 25 sağlıklı ve 21 gastritli köpekte yaptıkları çalışmada mide örneklerinin tümünde direk mikroskopi ve direk üreaz testi ile pozitiflik saptamış, ancak antrumda, korpus 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. Bu çalışmada direk üreaz testinde köpeklerden alınan 148 örneğin 53'ünde, kedilerin ise tümünde pozitifliğin görülmesi; örnekler üreli buyyona atıldıktan 30 dakika sonra sonucun okunmasına veya köpeklerin sağlıklı olması nedeniyle bakteri sayısının az olmasına bağlı olabilir. Nitekim gastrik *Helicobacter* türlerinin kuvvetli üreaz enzimi nedeniyle 15-30 dakika içinde üreyi parçaladıkları, negatif olarak değerlendirilen tüplerin süre uzadıkça pozitif reaksiyon verdiği belirtilmektedir (Happonen ve ark., 1996; Jalava, 1999; Strauss-Ayali ve Simpson, 1999). Köpek midelerinde ilk kez Buczolits ve ark. (2003), *Helicobacter* spesifik H276f/H676r primerleri kullanarak PZR ile *H. pylori*'nin varlığını göstermişlerdir. Çalışmada bu örnek dahil olmak üzere örneklerin hiçbirinde izolasyon yapılamamıştır.

Bu çalışmada da, 154 mide mukoza örneğinin PZR'ında sadece bir köpeğin korpusunda *H. pylori* yönünden pozitiflik saptanmış ve bu durum köpeklerde *H. pylori*'nin midenin korpus bölgesinde bulunabileceğini göstermiştir. Nitekim Buczolits ve ark. (2003) da PZR ile pozitiflik saptamalarına karşın, *H. pylori* izolasyonu yapamadıklarını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışma ile, köpeklerde *H. pylori* ve diğer gastrik *Helicobacter* türlerinin izolasyonunun oldukça zor olduğu; teşhis için, direk üreaz testi ile mikroskopik muayenenin kullanılabilmesi, DIA ile yanlış pozitiflik saptanabileceğinden birden fazla serolojik testin gerekli olabileceği ve izolasyon yapılamayan örneklerde PZR'in kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

### Kaynaklar

- 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.
- 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 Bül*, 35, 345-350.
- Cattoli G, Vugt R, Zanoni RG, Sanguinetti V, Chiocchetti 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.
- 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* için Yeni Bir Rezervuar mı? Gastroenterol, 3: 4.
- Drasser DW (1986) Immunization of Experimental Animals. "Handbook of Experimental Immunology in Four Volumes", Ed. by Weir M, 4th, Alden Press, 8.1-8.21, Oxford.
- Eaton KA, Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman BE, Paola J and Sherding R (1996) Prevalance and Varieties of *Helicobacter* species in Dogs from Random Sources and Pet Dogs: Animal and Public Health Implications. J Clin Microbiol 34 (12), 3165-3170.
- 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.
- 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 Agglutination Test and Serum Agglutination Test. Avian Pathol, 31, 201-214.
- 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.
- 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
- Gueneau P and Goër LD (2002) *Helicobacter*: Molecular Phylogeny and Origin of Gastric Colonization in the Genus. Infect Gen Evol, 1, 215-223.
- Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, Rozmiarek H, Stalis IH (1994) *Helicobacter pylori* Isolated from the Domestic Cat: Public Health Implications. Infect Immun, 62; 2367-2374, Abstract.
- Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hanninen ML, Westermarck E (1996) Comparison of Diagnostic Methods for Detecting Gastric *Helicobacter-like* Organisms in Dogs and Cats. J Comp Path, 115, 117-127.
- 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 (1999) Canine and Feline Gastric *Helicobacters*: Diagnosis and Significance in Chronic Gastritis. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/klin/vk/happonen/caninean.html>. (Erişim tarihi:18.02.2004)
- Hulten K, Han SK, Enroth H, Kleein 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.
- 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>. (Erişim tarihi: 23.01.2004)
- 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.
- Jenkins CC and Basset JR (1997) *Helicobacter* Infection. S. Animal Gast, 19(3), March, 267-279.
- 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.
- 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.
- Melito PL, Munro C, Chipman PR, Woodward DL, Booth TF, and Rodgers FG (2001) *Helicobacter winghamensis spp. Nov.*, a Novel *Helicobacter spp.* Isolated from Patients with Gastroenteritis. J Clin Microbiol, July, 39 (7), 2412-2417.
- Park SR, Mackay WG and Reid DC (2001) *Helicobacter spp.* Recovered from Drinking Water Biofilm Sampled from a Water Distribution System. Wat Res, 35 (6), 1624-1626.
- 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 Antimicrobiol Therapy. Antimic Agents and Chem, June, 40 (6),1486-1490.
- 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.
- Rossi G, Rossi M, Vitali CG, Fortuna D, Burrioni D, Pancotto L, Capecci 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.
- Simpson KW and Burrows CF (1997) Gastritis, ulcers and *Helicobacter spp* in Humans, Dogs and Cats. Waltham Focus, 7, 2-6.
- Strauss-Ayali D and Simpson KW (1999) Gastric *He-*

*licobacter* Infection in dogs. Prog Gastroent, 29 (10), 397-413.

Strauss-Ayalı 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.

Tytgat GNJ, Noach L and Rauws EAJ (1991) *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol, 26 Suppl, 187, 1-8.

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.

Yıldırım M (1996) Hayvanlardan *Helicobacter Türlerinin* İzolasyonu. A.Ü. Sağlık Bil Enst, Doktora tezi.