

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**İSTANBUL YÖRESİNDE SAĞLIKLI VE KLİNİK BELİRTİ
GÖSTEREN KÖPEKLERDE HELICOBACTER PYLORI
VARLIĞININ KÜLTÜR, POLİMERASE CHAIN
REACTION (PCR) VE RESTRICTION FRAGMENT
LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) İLE SAPTANMASI**

NAFİYE SONAY SAĞNAK

**DANIŞMAN
PROF. DR. N. YAKUT ÖZGÜR**

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

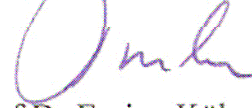
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

21/08/2007



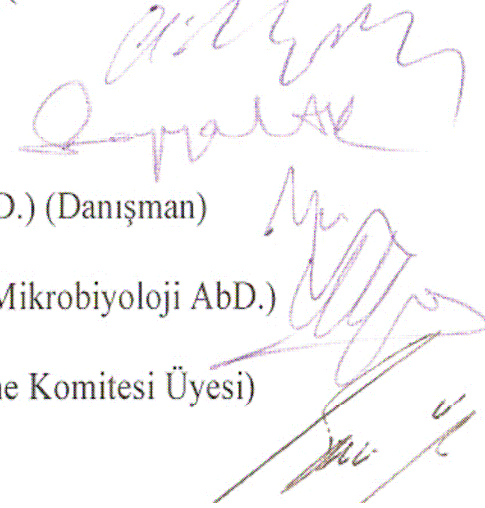
Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Mikrobiyoloji AbD.
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji AbD.
Tez Sahibi : Veteriner Hekim N.Sonay SAĞNAK
Tez Başlığı : İstanbul Yöresinde sağlıklı ve klinik belirti gösteren köpeklerde Helicobacter pylori varlığının kültür, Polimerase Chain Reaction (PCR) ve Restriction Fragment Length Polymorphisim (RFLP) ile saptanması.
Sınav Yeri : İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.
Sınav Tarihi : 06 / 08 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof. Dr. Atilla ILGAZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.) (Tez İzleme Komitesi Üyesi)
- 2.Prof. Dr. Seyyal AK (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.)
- 3.Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.) (Danışman)
4. Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN (Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD.)
- 5.Doç. Dr. Erman OR(İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dahiliye AbD.) (Tez İzleme Komitesi Üyesi)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nafiye Sonay Sağnak



İTHAF

Sevgili Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimiyle bize her zaman yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Atilla Ilgaz'a

Doktora çalışmalarım süresince ve tezimin gerçekleşmesinde değerli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, destekleyen, danışman hocam Sayın Prof. Dr. N. Yakut Özgür'e,

Bilgi birikimi ve deneyimi ile araştırmama katkıda bulunan Anabilim Dalımız öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Seyyal Ak'a,

Tez çalışmam süresince değerli yardımları nedeniyle Doç.Dr. Serkan İkiz'e

Anabilim Dalımız öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Mustafa Hasöksüz'e, asistan arkadaşlarım Dr. Funda Bağcıgil, Dr. Kemal Metiner,, Belgi Diren Sığırcı ve Beren Başaran'a, Biolog Nazan Ataoğlu'na, teknisyenimiz Gülten Karakuz'a

Katkılarından dolayı fakültemiz Biyokimya A.B.D öğretim üyesi Sayın Dr. Kemal Öztapak ve Zootekni A.B.D öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Bülent Ekiz'e,

Fatih Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Fatih Abasıyanık ve Yrd. Doç. Dr. İrem Uzonur'a,

Arkadaşlarım Vet.Hek. Demir Özdemir, Vet.Hek. Seval Toydemir, Vet.Hek. Güldal İnal, Vet.Hek. Kamber Demir ve Vet.Hek. Türker Çaldağ'a,

Tüm destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T- 563/02122004 no'lu proje olarak desteklemiştir.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| TEZ ONAYI | İİ |
| BEYAN | İİİ |
| İTHAF | İV |
| TEŞEKKÜR..... | V |
| İÇİNDEKİLER | VI |
| TABLolar LİSTESİ | Vİİ |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | İX |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ | X |
| ÖZET | Xİ |
| ABSTRACT..... | Xİİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 13 |
| 3.1. GEREÇ..... | 13 |
| 3.1.1. Örnekler..... | 13 |
| 3.1.2. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) | 16 |
| 3.1.2.1. Ekstraksiyon Kiti..... | 16 |
| 3.1.2.2. Amplifikasyonda kullanılan gereçler | 16 |
| 3.1.2.3. TBE buffer | 17 |
| 3.1.2.4. Agaroz jel..... | 17 |
| 3.1.2.5. Yükleme solusyonu | 18 |
| 3.1.2.6. DNA Marker | 18 |
| 3.1.2.7. Ethidium Bromide | 18 |
| 3.1.2.8. Diğer Gereçler..... | 18 |
| 3.1.3. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)..... | 19 |
| 3.1.3.1. Enzim..... | 19 |
| 3.1.3.2. Reaksiyon buffer | 19 |
| 3.1.3.3. Poliakrilamid Jel..... | 19 |
| 3.1.3.4. NuiSieve Agaroz Jel..... | 20 |
| 3.1.3.5. Diğer gereçler..... | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.1.4. KÜLTÜR..... | 20 |
| 3.1.4.1. İzolasyon..... | 20 |
| 3.1.4.2. İdentifikasyon..... | 21 |
| 3.1.4.3. Referans Suş..... | 21 |
| 3.2. YÖNTEM..... | 21 |
| 3.2.1. PCR..... | 21 |
| 3.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu | 21 |
| 3.2.1.2. DNA Amplifikasyonu | 22 |
| 3.2.1.3. Elektroforetik seperasyon ve DNA' nın saptanması | 22 |
| 3.2.1.4. Sonuçların Yorumlanması | 22 |
| 3.2.2. RFLP | 23 |
| 3.2.2.1. Enzim kesimi | 23 |
| 3.2.2.2. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE)..... | 23 |
| 3.2.2.3. NuiSieve agaroz jel elektroforetik seperasyonu..... | 23 |
| 3.2.2.4. Sonuçların Yorumlanması | 23 |
| 3.2.3. KÜLTÜR..... | 24 |
| 3.2.3.1. İzolasyon..... | 24 |
| 3.2.3.2. İdentifikasyon: | 24 |
| 3.2.4. İSTATİSTİKİ ANALİZ | 24 |
| 4. BULGULAR..... | 25 |
| 4.1. PCR Bulguları | 25 |
| 4.2. RFLP Bulguları | 26 |
| 4.3. Kültür Bulguları..... | 27 |
| 4.4. İstatistiki Bulgular | 28 |
| 5. TARTIŞMA | 31 |
| KAYNAKLAR | 39 |
| HAM VERİLER..... | 51 |
| FORMLAR | 52 |
| ETİK KURUL KARARI..... | 53 |
| PATENT HAKKI İZİNİ..... | 54 |
| TELİF HAKKI İZİNİ | 55 |
| ÖZGEÇMİŞ | 56 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 2.1: En sık gözlenen Helicobacter türleri ve izole edilen konaklara göre dağılımı | 5 |
| Tablo 3.1 Örnek alınan köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve klinik bilgileri..... | 14 |
| Tablo 4.1: Gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyen köpeklere ait PCR sonuçları ve istatistiksel analizi | 28 |
| Tablo 4.2: Sahipli ve sahihsiz köpeklere ait PCR sonuçları ve istatistiksel analizi..... | 28 |
| Tablo 4.3: Cinsiyete göre PCR sonuçları ve istatistiksel analizi | 29 |
| Tablo 4.4: Yaşa göre PCR sonuçları ve istatistiksel analizi | 29 |
| Tablo 4.5: Gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyen köpeklere ait RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi..... | 29 |
| Tablo 4.6: Sahipli ve sahihsiz köpeklere ait RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi | 30 |
| Tablo 4.7: Cinsiyete göre RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi | 30 |
| Tablo 4.8: Yaşa göre RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi | 30 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 4-1: Dışkı örneklerinin PCR bulguları..... | 25 |
| Şekil 4-2: PAGE Tekniği ile RFLP Bulguları | 26 |
| Şekil 4-3: NuiSieve Agaroz Elektroforetik Seperasyon Tekniği | 27 |

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---|---------------|
| Polymerase Chain Reaction | PCR |
| Restriction Fragment Length Polymorphism | RFLP |
| Cytotoxine A | <i>CagA</i> |
| Vacuolar Cytotoxine A | <i>VagA</i> |
| Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay | ELISA |
| Enzyme Immunoassay | EIA |
| International Agency for Research on Cancer | IARC |
| World Health Organisation | WHO |
| Non Hodgkin Lenfoma | NHL |
| Mucosa Associated Lenfoid Tissue | MALT |
| Brain Heart Infusion Agar | BHI |
| Dalton Anstrong | DA |
| Mikrometre | μm |
| Mikrolitre | μl |
| Megabaz | mb |
| Kilobaz | kb |
| Base-pare | bp |

ÖZET

SAĞNAK, N. S. (2007). İstanbul yöresinde sağlıklı ve klinik belirti gösteren köpeklerde *Helicobacter pylori* varlığının Kültür, Polimerase Chain Reaction (PCR) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyen köpeklerin dışkı örneklerinde *H. pylori* varlığı moleküler ve bakteriyolojik yöntemler kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla, İstanbul ilinde bulunan sahipli ve sahipsiz toplam 96 köpekten dışkı örnekleri toplandı. Dışkı örneklerinin *Helicobacter* cins spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmesi sonucunda, 65 (% 67.7) örnekte 375 bp' lik bantlar gözlemlendi. Gastrik klinik belirti gösteren 36 köpekten 27 (% 75)' sinde, gastrik klinik belirti göstermeyen 60 köpekten 38 (% 63.3)' inde *Helicobacter* DNA' sı saptandı. 40 sahipli köpekten 15 (% 37.5)' inde, 56 sahipsiz köpekten 50 (% 89.3)' sinde 375 bp' lik bantlar görüldü. Elli erkek köpekten 29 (% 58)' unun, 46 dişi köpekten 36 (% 78.3)' sının 375 bp' lik bantlar oluşturduğu belirlendi. Bir yaş ve altındaki 49 köpeğin 38 (% 77.6)' inde ve 1 yaş üstü 47 köpeğin 27 (% 57.4)' sinde *Helicobacter* spp DNA' sı saptandı. PCR tekniği ile incelenen 96 köpeğe ait dışkı örneklerinden elde edilen bulguların istatistiksel analizi sonucunda, dişi ve erkek köpekler arasındaki fark incelenen tüm köpeklerde istatistiksel olarak önemli ($p=0.034$) bulundu. Aynı şekilde sahipli ve sahipsiz köpekler arasındaki fark ($p=0.01$) ile, 1 yaş ve altındaki ve 1 yaş üzeri köpekler arasındaki fark da ($p=0.035$) önemli bulundu. PCR tekniği ile *Helicobacter* olduğu saptanan 65 DNA' nın *Hinf*I enzimi ile kesimi sonucunda ise, 12 (% 18,46) DNA örneğinde *H. pylori* saptandı. Gastrik klinik belirti gösteren 36 köpeğin 5 (% 13.9)' inde, gastrik klinik belirti göstermeyen 60 köpeğin ise 7 (% 11.7)' sinde *H. pylori* saptandı. 40 sahipli köpekten 3 (% 7.5)' ünde, 56 sahipsiz köpekten 9 (% 16.1)' unda *H. pylori* görüldü. 50 erkek köpekten 6 (% 12)' sının 46 dişi köpekten 6 (% 13)' sında *H. pylori* saptandı. 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. RFLP tekniği ile elde edilen bulguların istatistiksel analizi sonucunda ise; gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyenler arasındaki fark ($p=0.750$), dişi ve erkek köpekler arasındaki fark ($p=0.877$), sahipli ve sahipsiz köpekler arasındaki fark ($p=0.439$) ile 1 yaş ve altındaki ve 1 yaş üzeri köpekler arasındaki fark ($p=0.938$) önemsiz bulundu. PCR sonrası yapılan RFLP sonucunda *H. pylori* DNA' sı saptanan 12 köpeğin dışkı örneklerinden yapılan bakteriyolojik inceleme sonucunda, örneklerin hiçbirinden *H. pylori* izole edilmedi.

Anahtar Kelimeler: köpek, *Helicobacter* spp., *Helicobacter pylori*, dışkı örneği, PCR, RFLP, Kültür. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T- 563/02122004 no'lu proje olarak desteklemiştir.

ABSTRACT

SAGNAK, N. S. (2007). Detection of *Helicobacter pylori* in Healthy Dogs and Dogs with the Clinical Symptoms by Culture, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in Istanbul District. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology. Doctorate Thesis. İstanbul.

The presence of *H. pylori* in stool specimens of healthy dogs and dogs with gastrointestinal symptoms was investigated by using molecular and bacteriological techniques. For this purpose stool specimens were collected from 96 pet and sheltered dogs living in Istanbul province. As a result of PCR investigation with *Helicobacter* genus specific primers, 375 bp bands were obtained from 65 (67.7 %) of the specimens. Out of 36 dogs which had gastrointestinal symptoms 27 (75 %) and out of 60 healthy dogs 38 (63.3 %) were found positive. Fifteen (37.5 %) of 40 pet dogs, and 50 (89.3 %) of 56 sheltered dogs were found to be *Helicobacter* positive. From 29 (58 %) of 50 male dogs and 36 (78.3 %) of 46 females were found positive. When the dogs were classified by their ages, 38 (77.6 %) of 49 dogs one and less than one year old age and 27 (57.4 %) of 47 older dogs had *Helicobacter* spp. DNA. In all the examined groups, the rate of *Helicobacter* spp. in female dogs were higher than male dogs and the difference was found statistically significant ($p=0,034$). The positive results between sheltered dogs and pet dogs were statistically significant ($p=0.01$). The percentage of positive samples were also found to be significantly higher in the dogs that aged one and less compared with the elders ($p=0,035$). Although no statistical significance was found between dogs with gastrointestinal symptoms and healthy dogs, more positive results were obtained from healthy dogs. As a result of restriction of 65 *Helicobacter* spp. DNA by *Hinf*I, *H. pylori* specific bands (196 bp, 119 bp, 60 bp) were observed from 12 (18.46 %) of DNA samples. Out of 36, 5 (13.9 %) positive results were obtained from specimens of dogs with gastrointestinal symptoms and out of 60, 7 (11.7 %) positive were obtained from healthy dogs. Out of 40 pet dogs 3 (7.5 %) were found *H. pylori* positive while out of 56 sheltered dogs, 9 (16.1 %) found positive. From 6 (12 %) of 50 male dogs and from 6 (13 %) of 46 females were found to be positive. When the dogs were classified by their ages, 6 (12.2 %) of 49 one and less than one year of age and 6 (12.8 %) of 47 older aged dogs were detected positive. Those rates had no statistically importance in any of classified groups. The *H. pylori* positive 12 stool specimens were also examined bacteriologically and no positive result was obtained.

Key words: dog, *Helicobacter* spp., *Helicobacter pylori*, stool specimen, PCR, RFLP, culture. This present work was supported by Research Fund of Istanbul University. Project No T-563/02122004.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Spiral şekilli bakteriler köpek mide mukozalarında ilk olarak Rappin ve arkadaşları tarafından 19. yüzyılın sonlarında gözlenmiştir. İnsanlarda *Helicobacter pylori*' nin saptanmasından ve bu etkenin gastrit, peptik ülser ve gastrik neoplazilerle olan ilişkisi ortaya çıkarıldıktan sonra hem insanlarda hem de kedi ve köpeklerde spiral şekilli bakterilere karşı olan ilgi gittikçe artmıştır. Evcil hayvanların insanlar için infeksiyon kaynağı olabileceği düşünülerek araştırmalar öncelikle bu konu üzerine yoğunlaştırılmıştır. Aynı zamanda kedi ve köpeklerde infeksiyonun prevalansı, gastrik Helicobacterler' in klinik belirtileri ve insan hastalıklarına hayvan modelleri geliştirmek için de araştırmalara başlanmıştır.

Helicobacterler ilk olarak Spirillum veya Spirochete, daha sonra Campylobacter olarak sınıflandırılmışlardır. Karakteristik morfolojileri, kılıflı flagellaları, nonfermentatif metabolizmaları, özel üreme gereksinimleri ve 16S rRNA dizileri ile Campylobacterlerden ayırmaları yapılmıştır. Helicobacterler Gram- negatif, virgül, 'S' veya sarmal şekilli, flagellalı, sporsuz, kapsülsüz, mikroaerobik ve aside dirençli olmayan mikroorganizmalar olarak tarif edilmişlerdir. Hücre yerleşimleri ekstraselüler olan Helicobacterler' in türleri arasında morfolojik farklılıklar bulunmuştur. Helicobacter cinsinin 28 tür içerdiği ve türlerin gastrik, intestinal ve hepatik dağılımları olduğu gözlenmiştir. Köpeklerde gastrik infeksiyonla ilişkili Helicobacter türleri, *H. felis*, *H. bizzeroni*, *H. salomonis*, *H. heilmannii*, *Flexispira rappini* ve *H. bilis*, intestinal kolonizasyon gösteren Helicobacter türleri *H. fennelliae*, *H. cinaedi*, *H. canis* ve *F. rappini* ve hepatik Helicobacter olarak ise *H. canis* bildirilmiştir.

Gastrik Helicobacter infeksiyonlarının prevalansını saptamak amacıyla yapılan araştırmalar, hem görünüşte sağlıklı olan köpeklerde, hem de klinik olarak gastrik hastalık belirtisi gösteren köpeklerde infeksiyonun yaygın olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak doğal infekte köpeklerde yukarıda adı verilen Helicobacter türlerinden herhangi birinin prevalansı bilinmediği çünkü günümüzde dahi çoğu Helicobacter türlerinin izolasyonunda güçlüklerle karşılaşmakta olduğu bildirilmiştir. Köpeklerde miks infeksiyonlar çok yaygın olmasına karşın insanların predominant olarak *H. pylori* ile infekte oldukları saptanmıştır. *H. pylori*' nin insan nüfusunun % 50' sine yakınında kronik infeksiyon oluşturduğu araştırmalarla ortaya konulmuşken, köpeklerde gözlenen

gastrointestinal *Helicobacter* infeksiyonlarının klinik belirtileri ve etyolojisi üzerine yeterli çalışmalar yapılmamıştır.

Sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir teknik olan PCR ile infeksiyona neden olan bakterinin varlığının ortaya konulması, sonrasında bakteriye ait virulens faktörlerinin saptanmasına dayalı olarak infeksiyona neden olan türün saptanması, hem patogeneze yönelik soruların yanıtlanmasına hem de hızla tedaviye başlanmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca inceleme yapılacak örneğin kolay elde edilmesi de yarar sağlayacaktır.

Bu araştırmada, *H. pylori*' nin köpeklerde de insanlardakine benzer infeksiyona neden olabileceği düşünülerek ve henüz rutin inceleme örnekleri arasına girmeyen dışkı örneklerinin Polymerase Chain Reaction (PCR) ile incelenerek *Helicobacter* DNA' sını saptanan örneklerde Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile *H. pylori*' de bulunan *CagA* geninin saptanması, *H. pylori* saptanan dışkı örneklerinden bakteriyolojik kültür yapılarak moleküler yöntemler ile kültür tekniğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunlarla birlikte köpeklerde *H. pylori* sıklığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Helicobacter türlerinin, insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde özellikle sindirim sistemine yerleşerek, kronik aktif gastrit, peptik ülserler ve mide adenokarsinomuna neden olduğu saptanmıştır (2,4,95).

H. pylori' nin insan ve hayvan midelerinden izolasyonu öncesi mide mukozasında *Spirillum* ya da Spiroket (25) benzeri organizmalar gözlenmiş, etken ilk olarak köpek midelerinde 1881 yılında Rappin tarafından spiral kıvrık ya da heliks yapıda, hareketli mikroorganizma olarak tanımlanmış, *Spirillum rappini* olarak adlandırılmıştır (68). Daha sonraları kedi ve köpek midelerindeki spiral organizmalar için *Spirillum stomachii*, *Spirochaete regaudi*, *Spirella canis*, *Spirella regaudi* gibi isimler de kullanılmıştır (97). Bizzozero' nun 1893 yılında köpek midesinde spiral bir mikroorganizma gözlemlemesinden sonra (53), 1906'da Krienitz' ın benzer bir bakteriyi mide kanserli bir insan midesinden izole ettiği bildirilmiş, yapılan Gram boyama sonucunda etken, Gram negatif olarak tanımlanmış, çoğunlukla midede ve özellikle de fundus bölgesinde kolonize olduğu saptanmıştır (66). Salomon ve ark., kedi ve köpek midelerinde morfolojik yapıları farklı üç spiral şekilli bakteri saptamışlar, ayrıca bu bakterileri sıçan midelerinde de gözlemlediklerini bildirmişlerdir (45). Bundan sonra 1900' lü yıllarda köpek ve kedilerde gastrik spiral organizmalar üzerine birçok çalışma yapılmıştır. 1939 yılında makak maymunlarında ve insanlarda büyük, hafif spiral gastrik bakteriler gözlenmiş ancak bu çalışma çok uzun yıllar boyunca dikkatlerden kaçmıştır (66). 1948 yılında yayınlanmış olan Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology' nin 6. cı baskısında Pseudomonaceae ailesi içinde *Spirillum* cinsinde üç farklı gastrik *Spirillum* türü listelenmiştir ancak bir sonraki baskısında hiçbiri yer almamıştır (68). Elektron mikroskopunun keşfinden sonra köpek gastrik mukozasında üç farklı morfolojiye sahip spiral yapıda bakteri tanımlanmıştır (53).

Yukarıda adı geçen birçok çalışmaya karşın mide 1982 yılına kadar asitli ortamı nedeniyle steril kabul edilmiştir (109). İlk olarak 1983' de Warren ve Marshall gastritli insan midelerinden izole ettikleri spiral yapıdaki mikroorganizmaları, *Campylobacter* cinsi içine dahil ederek *Campylobacter pyloridis* olarak isimlendirmişlerdir (81,82,83,85,121). Marshall ve Goldwin (45), 1987 yılında insan gastrik biyopsi örneklerinden izole ettikleri mikroorganizmaları *Campylobacter pylori* olarak

adlandırmışlardır. 1989 yılında Goodwin ve ark., bu mikroorganizmayı *Campylobacter* genusundan tamamen ayırmış; helikal yapısı ve sıklıkla midenin pilor bölgesinden izole edildiği için *Helicobacter pylori* adını vermişlerdir (46).

Aynı yıl insan gastrik mukozalarında daha önce evcil köpeklerde gözlenen *H. pylori* dışında kültüre edilemeyen büyük, helikal yapıda bakteriler bulunmuş, bu organizmalar başlangıçta "*Gastrospirillum hominis*" olarak adlandırılmışlardır (86). Daha sonraları yapılan 16S rRNA dizi analizleri bu organizmaların "*H. heilmannii*" olarak adlandırılmasına neden olmuştur (45,59,96,97,114). Kedi ve köpeklerde büyük, helikal yapıda bakteriler ilk olarak 1988 yılında Avustralya' da gözlenmiş ancak izole edilememiştir (71). Paster ve ark.(100), 1991 yılında yapmış oldukları 16S rRNA dizi analizleriyle bu bakterileri izole etmiş ve *Helicobacter* cinsi içinde *H. felis* olarak adlandırmışlardır. Gastrik kanser ve *H. pylori* enfeksiyonu arasındaki ilişki ilk kez 1991 yılında dört çalışma ile gösterilmiştir (7,8,29,41). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün bir kolu olan Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC), verileri yeniden gözden geçirmiş ve *H. pylori* insanlarda kanserojen olarak kabul edilmiştir (3,93). *H. pylori* enfeksiyonunun gastrik Non Hodgkin Lenfoma (NHL), diğer lenfoproliferatif hastalıklar ve Mukozal Lenfoid Doku (MALT) lenfoma gelişmesiyle de ilişkisi bulunmuştur (99). İnsanlarda *H. pylori* varlığının saptanmasından sonra hayvan gastrik mukozalarında gözlenen spiral organizmalar üzerindeki ilgi artmıştır. Yapılan araştırmalar dört spesifik noktada yoğunlaşmıştır. Bunlar kedi ve köpeklerde enfeksiyonun prevalansı, insanlarda gözlenen zoonotik *Helicobacter*' lerin kaynağı olabilecek bu evcil hayvanların araştırılması, kedi ve köpeklerde gözlenen gastrik *Helicobacter*' lerin klinik belirtileri ve insan hastalıklarına hayvan modelleri geliştirmek olarak tanımlanmıştır (42,56,86).

Helicobacter cinsinin 28 tür içerdiği ve bu türlerin gastrik, intestinal ve hepatik dağılımları olduğu bildirilmiştir (24). Hayvanlarda en sık görülen *Helicobacter* türünün *H. heilmannii*, insanlarda ise *H. pylori* olduğu saptanmıştır (59,96,119,123). Tablo 2.1' de en sık gözlenen *Helicobacter* türlerine ait konak ve orijin dağılımları gösterilmiştir (66).

Tablo 2.1: En sık gözlenen Helicobacter türleri ve izole edilen konaklara göre dağılımı

| Helicobacter Türleri | Esas Konak | Orijin |
|------------------------|---------------------------|------------|
| <i>H. pylori</i> | İnsan | Gastrik |
| <i>H. mustelae</i> | Yaban Gelinciği | Gastrik |
| <i>H. nemestrinne</i> | Makak maymunu | Gastrik |
| <i>H. acinonychis</i> | Kedi, köpek | Gastrik |
| <i>H. bizzozeronii</i> | Köpek | Gastrik |
| <i>H. salomonis</i> | Köpek | Gastrik |
| <i>H. heilmannii</i> | İnsan, kedi, köpek, domuz | Gastrik |
| <i>H. cinaedi</i> | İnsan, hamster | İntestinal |
| <i>H. fennelliae</i> | İnsan, hamster | İntestinal |
| <i>H. muridarum</i> | Tavşan, fare | İntestinal |
| <i>H. canis</i> | Köpek | İntestinal |
| <i>H. pullorum</i> | Kanatlılar | İntestinal |
| <i>H. pametensis</i> | Deniz kırlangıcı | İntestinal |
| <i>H. hepaticus</i> | Fare | İntestinal |
| <i>H. bilis</i> | Fare | İntestinal |
| <i>H. cholecytus</i> | Hamster | İntestinal |
| <i>H. trogontum</i> | Tavşan | İntestinal |
| <i>H. rodentium</i> | Fare | İntestinal |

H. pylori, Gram negatif, 0.5-1 µm genişliğinde 2,5-4 µm uzunluğunda, spiral veya kıvrımlı, hareketli bir bakteri olarak tanımlanmıştır (68). Campylobacter'lerin tersine Helicobacter'lerin flagellasının kılıflı olduğu ve uç kısımlarında Campylobacter'lerde görülmeyen terminal yapılara ve disklere sahip olduğu saptanmıştır. Bu yapının, bakterinin gastrik mukus gibi viskoz ortamlarda tirbişon tarzı hareketi için gerekli olduğu belirtilmiştir (2,45,68,123). *H. pylori*'nin Campylobacter genusundan farklı olan diğer özelliklerinin ise; kılıflı polar demetler halinde 4-6 flagellasının bulunması, aksial flamentinin olmaması, optimal hareketini viskoz bir ortamda göstermesi, hücre duvarının düzgün olması, üreaz ve katalaz üretmesi olduğu belirlenmiştir (84). *H. pylori*'nin yaşaması için gerekli olan enerjiyi aminoasit ve yağ metabolizmasından sağladığı düşünülmüştür (29). Dış yüzünde kalın bir glikokaliks tabakasının bulunduğu, hücre duvarının 12-15 nm çapında alt ünitelerden oluştuğu bildirilmiştir (45).

Helicobacterler sıvı ve katı besiyerlerinde güç üredikleri için, izolasyonda selektif besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir. İzolasyon amacıyla % 5-10 koyun ya da at kanı katkılı Brain Heart Infusion (BHI) agar, Tryptic Soy agar, Colombia agar ya da Brucella agar kullanılmaktadır (51). Bu besiyerlerine diğer bakterilerin ve mantarların üremesini önlemek için de trimethoprim, vancomycin, polymyxin B ve

amphotericin B antibiyotiklerinin katılması gerekliliği vurgulanmıştır. *H. pylori*'nin zenginleştirilmiş besi yerlerinde, % 5 O₂, %7 CO₂, % 8 H₂ ve % 80 N₂ içeren mikroaerobik ortamda, 37°C de, optimal üreme gösterdikleri saptanmıştır (2,68). Etken ilk izolasyonda 5-7 gün, subkültürlerde ise 3-5 günlük inkubasyon süresinden sonra, 1-2 mm çapında şeffaf, konveks, düzgün kenarlı S-tip koloniler oluşturur (72). *H. pylori*'nin identifikasyonu biyokimyasal özelliklerine göre yapılmaktadır (29,45). Bu mikroorganizmalar genellikle hareket, oksidaz, katalaz ve üreaz pozitif, hippurat ve nitrit reaksiyonları negatiftir. Reaktif özelliğe sahip olmamaları nedeniyle identifikasyonlarında karbonhidrat fermentasyon testleri kullanılmamaktadır. İdentifikasyonları için, indoksil asetat testi, alkalın fosfataz testi, nalidiksik asit ve sefalotin duyarlılık testleri de yapılmaktadır (123).

H. pylori'nin tüm genom dizi analizi Tomb ve ark. tarafından 1997 yılında açıklanmıştır (118). Araştırmacılar *H. pylori*'nin 26695 no'lu suşunun G+C oranı % 39 mol olan, 1,667,867 baz çiftine sahip tek bir sirküler yapıda kromozom içerdiğini ve toplam gen sayısının 1590 olup her birinin ortalama 1091 baz çifti taşıdığını belirtmiş, ayrıca *H. pylori* suşunun hareket, Fe⁺⁺ iyonlarını yakalama ve gelişmiş bir DNA restriksiyon enzim sistemine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalar, patojen *H. pylori* suşlarının büyüklüğünün 1,681,73 mb arasında değişen ve G+C oranı % 34,1-37,5 mol (ortalama % 35,2) olan bir genoma sahip olduklarını göstermiştir. 16S, 23S ve 5S ribozomal RNA (rRNA) genlerinin, DNA replikasyonunda görev alan *GyrA*, homolog DNA rekombinasyonundan sorumlu *RecA* ve hücre canlılığı için önemli *FtsH* genlerinin *H. pylori* için önemli genler olduğu belirlenmiştir (47,79). Birçok gen bölgesinin virulensle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlar arasında dış membran proteinleri ve lipopolisakarit moleküllerini kodlayan genler, vakuolizasyon sitotoksin geni (*VacA*), sitotoksin ile ilişkili gen (*CagA*), adhesin geni (*H.pyloriaA*), flagellin genleri (*FlaA* ve *FlaB*) ve üreaz gen kümesinin (yapısal alt birimleri kodlayan *UreA* ve *UreB* geni, fonksiyonu bilinmeyen *UreC* ve *UreD* genleri ile üreaz aktivitesi için gerekli olan *UreE*, *UreF*, *UreG*, *UreH* ve *UreI* genleri) bulunduğu belirlenmiştir (16,26,95). *H. pylori* suşlarının yaklaşık % 50' sinin büyüklükleri 1,5-40 kb arasında değişen plazmid içerdiği, ancak bu plazmidlerin herhangi bir virulens faktörü taşıyıp taşımadıklarının henüz belirlenmediği bildirilmiştir (20). Bu plazmidlerin pasajlarla kaybolabildikleri saptanmıştır (22). Yapılan çalışmalarda, antibiyotiklere dirençli suşların plazmid profillerinin diğer suşlardan farklı

olmadığı saptanmıştır (5,6,13). *H. pylori*' de antibiyotik direnç genlerinin kromozomlarda lokalize olduğu bulunmuştur (68). Gen haritasında çoklu genlerin değişken lokalizasyonları *H. pylori* genomunda etkin bir yeniden düzenlemenin gerekli olduğunu göstermiştir (38,47,79).

İnsanlarda gözlenen *H. pylori* infeksiyonlarının yaklaşık % 60' ında saptanmış 87 Dalton Angstrom (DA) ağırlığında bir protein olan vakuolizasyon yapan sitotoksin (*VagA*), elektron mikroskopi ile *invivo* olarak görülebilmüş, *invitro* şekli ise hücre kültürlerinin inkubasyonu ile gösterilebilmiştir (38). 128 kDA ağırlığında saptanmış diğer proteine ise gene bağlı *sitotoksinA* (*CagA*) denilmiştir. *CagA* proteini taşıyan suşların daha virulent olduğu saptanmıştır. (101,125). Gelecekte *H. pylori* genotiplerinin bilinmesinin farklı hastalık gruplarında risk altında bulunan kişilerin saptanmasına olanak sağlayacağı belirtilmiştir (17,91). Elektron mikroskobisi ile yapılan çalışmalarda bakterinin hücreler arası alana penetre olabildiği gözlenmiştir (37,111,120).

H. pylori özellikle insanlarda infeksiyona neden olan bir patojendir, bilinen diğer doğal rezervuarları ise primatlardır. Ayrıca etkenin doğal mekanizmasının anlaşılması ve hastalığa karşı tedavi geliştirilmesi amacıyla hayvan modelleri üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (2,7,8,26,39,54). *H. pylori*' nin doğal kaynağı henüz bulunamamıştır. Veteriner Hekim ve mezbaha işçilerinde prevalansın yüksek olması nedeniyle öncelikle zoonotik bir rezervuar olabileceği düşünülmüştür. Ancak evcil hayvan besleyenlerde prevalans düşük saptanmıştır. Bazı hayvanlarda *H. pylori*' den farklı *Helicobacter* türleri saptanmış olmasına karşın (96,113,114), *H. pylori* için doğal hayvan rezervuarı henüz ortaya konulamamıştır (36). İnfeksiyonun çocukluk çağlarında olduğu ve uzun yıllar devam ettiği saptanmıştır (46). Günümüzde *H. pylori*' ye bağlı gelişen infeksiyonun insanlarda en hızlı yayılan infeksiyon olduğu belirtilmiş, etkenin dünya çapında bir yayılımla, dünya nüfusunun neredeyse yarısını infekte etmekte olan bir patojen olduğuna dikkat çekilmiştir (28,32). İnfeksiyonun insidensi gelişmekte olan ülkelerde % 70-90, gelişmiş ülkelerde ise % 40-50 civarında saptanmıştır (20,48,108).

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 (31,44). Yetişkin sağlıklı kedi ve köpeklerin gastrik mukozalarında *H. felis*, *H. bizzozeronii* ve *H. salomonis* başta olmak üzere spiral *Helicobacter*' leri

taşıdıkları (52,55,71,72,73,75), ancak köpeklerde miks infeksiyonlar oldukça sık gözlemlendiğinden *Helicobacter* türlerinden hangisinin daha patojen olduğu açıklığa kavuşmamıştır (53,55,66). Köpeklerin insan *H. pylori* etkeni ile infekte olup olmayacağı ilk olarak deneysel infeksiyon modeli ile araştırılmıştır (103,107). Strauss-Ayali ve ark. 1999 yılında (116) yaptıkları çalışmada elde ettikleri antijenik ürünlerin *H. pylori* antijenleri ile homologluk gösterdiğini belirtmişlerdir. Ardından Buczolics ve ark. (10) tarafından yapılan çalışmada, köpeklerden alınan gastrik biyopsi örneklerinden yapılan PCR sonucu elde edilen ürünlerin restriksiyon enzim analizleri ve DNA dizi analizleri sonucu köpeklerde *H. pylori* saptandığı bildirilmiştir.

Bakterinin patojenik özellikleri, konakçıda yerleşmesini sağlayan kolonizasyon faktörleri, kolonizasyonun devamını ve bakterinin yaşamını sağlayan süreklilik faktörleri ve gastrik mukozada hasara yol açan hastalık oluşturan faktörler olarak sınıflandırılmıştır (7,22). Etkenin spiral şekli ve flagellası ile mukusta hareketini, spesifik fosfolipidlere bağlanma yeteneği ile mide epiteline kolonizasyonunu sağladığı bildirilmiştir (110). Üreaz enzimi ile midede yaşam koşullarını uygun hale getirirken, katalaz enzimi sayesinde mide mukozasında ve fagosit vakuolündeki H_2O_2 ' den korunduğu saptanmıştır (63). Fosfolipaz ve proteaz salgılaması ile mukus ve epitel hücre metabolizmasını bozarak, vakuolize eden sitotoksinleri ile de epitel hücre hasarına yol açtığı ve lümene madde geçişini kolaylaştırdığı belirlenmiştir (32,38). *H. pylori*' nin, midenin yanısıra, özefagus, duodenum, meckel divertikülü gibi metaplazik yerleşimli mide epiteli bulunan herhangi bir yerde ve mukus tabakasının altında mide epiteline bitişik konumda yerleşebildiği saptanmıştır. Böylece nötrale yakın bir ortamda yaşayarak bakterisidal nitelikte olan mide sıvısından korundukları belirtilmiştir (32,54,111). Yine hücre dışı süperoksit dismutaz ve katalazın nötrofillerin fagositoz etkilerine karşı mikroorganizmanın canlılığını sürdürmesine yardım ettiği düşünülmüştür (38,93). *Escherichia coli*' ye benzeyen pilusları ve adezyon proteinleri ile epitel hücre zarına yapışabildiği ve bu yolla hücre ayrışmasına yol açan mekanik etkisinin olduğu saptanmıştır. Son yıllarda mekanik etkiler ve salgılanan toksinlerden çok, infeksiyon sırasında ortaya çıkan yangı ve yangı mediatörlerinin hücresel hasara neden olduğu görüşü ağırlık kazanmıştır (40,93). *H. pylori*' nin insanlarda farklı fenotiplere sahip çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. Suşlar, aynı patojenik özellikleri taşımamaktadır. Suşlar arasındaki patojenik özellikler ve konakçıya ait immunolojik

faktörler taşıyıcılık ile hastalık arasındaki klinik sonucu belirlemede kullanılmıştır (22,43,54,63,77).

H. pylori insanlarda gastrite, gastrik ve duodenal ülserle neden olan en önemli etken olarak bildirilmiş ve IARC tarafından birinci sınıf kanser etkeni olarak tanımlanmıştır (3,93). Fiberoptik gastroskopi teknolojisinin gelişmesi, bu yöntemin gastrit ve peptik ülserli hastalara kolaylıkla uygulanabilmesi, günümüzde *H. pylori*'nin bu hastalıkların etiolojisinde % 30-50 oranında rol oynadığını göstermiştir. Peptik ülser etiolojisinde genetik yatkınlık, çevresel ve stres faktörleri, asit sekresyonu, mukozal direnç bozukluğu gibi zemin hazırlayıcı faktörlerin yanı sıra mide mukozasında *H. pylori*'nin varlığı da önemli bir faktör olarak sayılmıştır. Ancak, hastalar kadar asemptomatik bireylerin kanlarında da anti-*H. pylori* antikorlarının bulunması, bu mikroorganizmanın varlığında her zaman peptik ülserin de bulunabileceği düşüncesine uymamıştır (1,2). *H. pylori*'nin üst gastrointestinal sistemle ilgili pek çok patolojiden sorumlu tutulmasının yanında, demir eksikliği anemisi, migren, koroner kalp ve damar hastalıklarıyla da ilişkisi olduğu yolunda çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (13, 14, 20,75). Köpeklerde klinik belirtilerin *Helicobacter* tür ve suşlarının patojenitesi, konakçı ve çevre faktörlerine bağlı olarak şekillendiği bildirilmiştir (63,66). Etken oral-oral ya da fekal-oral yolla bulaşmaktadır (37,76,120). İnsanlarda *H. pylori* enfeksiyonuna bağlı şekillenen akut ya da kronik kusma, diare, konstipasyon gibi gastrik klinik belirtilerinin köpeklerde de şekillendiği belirlenmiştir (53,70).

H. pylori enfeksiyonunun 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. (65).

İnvaziv testler, endoskopik olarak elde edilen biyopsi örneğinin bakteriyoloji, üreaz testi, histolojik testler ve moleküler teknikler ile incelenmesine dayalıdır (2,68).

Bakteriyolojik kültür tanıda "altın standard" olarak kabul edilmektedir. Kültürün sensitivitesinin % 70-95, spesifitesinin % 100 olduğu bildirilmiştir (51,89). 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 (72).

Bakterinin üreaz aktivitesini ortaya koymak amacıyla geliştirilen üreaz testi, doku örneğinin, içinde pH' yı gösteren bir belirteç bulunan katı veya sıvı bir besiyerine konulması, üreaz enzimi ile üreden amonyak oluşumu ve çevredeki hidrojen iyonlarının varlığı ile NH_4^{++} e dönüşerek ortamın pH' sını yükseltmesi esasına dayandırılmıştır. Testin sensitivitesi % 90-98, spesifitesi % 97-100 olarak bildirilmiştir (9,18,87,90). 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 (87,104). Üreaz testleri genellikle hızlı incelemeler arasında sınıflandırılmasına karşın, sonuçların erken okunması durumunda duyarlılığının zayıf olduğu gözlenmiştir. Agar esaslı üreaz testlerinin tersine strip esaslı üreaz testlerinin daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (2,87).

Histolojik inceleme, antrumdan alınan iki ya da daha fazla sayıda biyopsi örneğinin Hemotoxilen-Eozin boyası ile incelenmesine dayanan bir uygulamadır. Ancak intestinal metaplazi ya da atrofi gibi tanıyı zorlaştırıcı bir takım patolojik faktörlerin varlığında Genta, Giemsa ve Warthin-Stany gibi özel boya teknikleri ile tanıyı kesinleştirmek gerektiği bildirilmiştir (97). *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 (59). Son dönemde yapılan bazı çalışmalarda biopsilerin korpus ve antrumun ortaları ile bu iki alanın küçük ve büyük kurvatura yakın bölümlerinden alınması gerekliliği üzerinde durulmuştur (9). Bu yöntemin sensitivitesi ve spesifitesi % 98 bulunmuştur (2,18,57,104,122).

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 (9,34,117). Bu tekniğin köpeklerde gen dizi analizlerinin yetersizliğinin yanısıra, *H. pylori'* nin tür spesifik primerlerinin ve amplifikasyonun olmayışı nedeniyle etkenin saptanabilmesi için kullanılacak en güvenilir yöntem olduğu belirtilmiştir (112,117). RFLP sonrası oluşan baz aralıklarının gözlenmesi amacıyla çoğunlukla dikey elektroforetik seperasyon tekniğinden yararlanılmasına karşın (35), DNA fragmanlarının seperasyonu amacıyla yatay elektroforez sisteminin kullanımının daha kullanışlı olduğu bildirilmiştir (10,27). PCR'ın sensitivitesi ve spesifitesinin % 95' in üzerinde olduğu saptanmıştır (14).

Non-invaziv testler, *H. pylori*' ye ait kanda bulunan antikorların araştırılması ya da henüz pratiğe girmemiş dışkı örneklerinden etkenin incelenmesine yönelik olarak geliştirilmiştir (58).

İnsanlarda *H. pylori* enfeksiyonunun serolojik tanısına yönelik olarak komplement fiksasyon, aglütinasyon, pasif hemaglutinasyon, indirekt immunflouresans, enzim immunoassay (EIA), ve immunblot teknikleri kullanılmaktadır. (122). Köpeklerde ise serolojik testler henüz rutin kullanıma girmemesine karşın enfeksiyonun indirekt tanısı amacıyla ELISA testinin kullanılabilceği saptanmıştır (66). Ancak köpek midelerinde 5 farklı gastrik *Helicobacter* türü gözlemlenebilmesi ve köpeklerde çoğunlukla miks enfeksiyonların şekillenmesi nedeniyle sağlıklı bir serolojik değerlendirmenin yapılabilmesinin zor olduğu bildirilmiştir (53).

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 (34,62,80). Dışkı örneklerinin taze veya dondurulmuş olarak kullanılabilceği, örneklerin taşınması ve saklanması amacıyla özel bir ortama gerek olmadığı saptanmıştır (62). Alınan örneğin hemen incelenemeyeceği durumlarda, 2-8⁰C de 3 gün ya da -20⁰C ya da -80⁰C de çalışılınca kadar saklanabileceği, örneklerin en fazla iki kez dondurulup çözülebileceği bildirilmiştir (2,67).

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 kullanılabilceği saptanmıştır (88,89,119). Ancak tanı kitleri veteriner hastalarının kullanımına adapte edilmemiştir (66).

İnsanlarda dışkıdan *H. pylori* DNA' sını saptayan PCR yönteminin sensitivitesini ve spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (67). 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 (92).

Dışkının 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 (67).

H. pylori' nin neden olduğu infeksiyonun tedavisinde penisilin, ampisilin, amoksisilin, eritromisin, gentamisin, sefalosporinler, tetrasiklin, klaritromisin, florokinolonlar, imipenem ve metronidazol' un etkili olduğu saptanmıştır (21,69,74,108). Köpek ve kedilerin tedavilerine yönelik çalışmalar sonucunda, insanlarda infeksiyonun tedavisi amacıyla kullanılan iki antibiyotik ve bir H₂ reseptör antagonistinden oluşan üçlü kombinasyonun kullanımı önerilmiş, bu amaçla amoksisilin (20 mg/kg BID), klaritromisin (30 mg/kg BID) ve famotidin (0.5 mg/kg BID) ya da omeprazol (0.7 mg/kg SID) veya amoksisilin (20 mg/kg BID), metronidazol (15-30 mg/kg PO, BID) ve famotidin (0.5 mg/kg BID) ya da omeprazol (0.7 mg/kg SID) üçlü kombinasyonunun 2-4 hafta süreyle kullanılabilceği belirtilmiştir (15,23,74,102).

İnsanlarda *H. pylori* eradikasyonu için gelecekte üzerinde en çok durulacak konu olan aşının hayvan deneylerinin tamamlanmak üzere olduğu, çok yakın zamanda kullanıma sunulacağı bildirilmiştir (2,60,115). Koruyucu antijenler olarak *HspA*, *VacA*' nin aşı üretimi için kullanılması hedeflenmiştir (49,50,109). Fare çalışmaları, üreaz ya da iki alt biriminden (*UreA* ve *UreB*) birisi ile birlikte uygun bir mukozal adjuvant kullanılarak yapılan aşılamanın *H. pylori* infeksiyonuna karşı korunma sağlayabileceğini göstermiştir (26,60). Bu korumanın, hem enzimin doğal biçimde verildiği, hem de katalitik yolla inaktive edilen rekombinant biçiminde verildiği durumlar için geçerli olacağı bildirilmiştir (39,115). Üreaz preparatlarının güvenilirlik ve etkinliğinin denenmesinde hayvan modelleri olarak tavşan, kedi ve maymunların yararlı oldukları gözlenmiştir (49,50). Farelerde aşılama sonrası gelişen gastritin zamanla iyileşip iyileşmediğinin henüz bilinmediği bildirilmiş, terapotik aşılama çalışmalarında, *UreB* aşılmasıyla ilişkili gastrit belirtisi ya da belirgin yan etki gözlenmemiştir (26). Hayvanlarda oluşan infeksiyonun koruma ve kontrolüne yönelik yapılmış bir çalışmanın bulunmadığı belirtilmiştir (65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Örnekler

İstanbul yöresinde barınan 40' ı sahipli, 56' sı sahipsiz 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.

Dışkı örnekleri çift kat saklama poşetleri içerisine alındıktan sonra soğuk zincir altında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. PCR ve gerektiğinde izolasyonda kullanılmaya kadar -20° C' de saklandı.

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 (Tablo 3-1)

Tablo 3.1 Örnek alınan köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve klinik bilgileri

| No | Örnek alınan kaynak | Yaş | Cinsiyet | İrk | Klinik belirti |
|----|---------------------|---------|----------|-------------------|----------------|
| 1 | Sahipli | 3 aylık | Dişi | Golden Retriever | Diare |
| 2 | Sahipli | 1 yaş | Dişi | Golden Retriever | Diare |
| 3 | Sahipli | 3 aylık | Dişi | German Shepherds | Diare |
| 4 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | Melez | Diare |
| 5 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | Melez | Diare |
| 6 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | Rottweiler | Diare |
| 7 | Sahipli | 2 yaş | Dişi | Husky | Diare |
| 8 | Sahipli | 5 aylık | Erkek | Kavaye | Yok |
| 9 | Sahipli | 3 aylık | Dişi | Amerikan Cocker | Yok |
| 10 | Sahipli | 3 aylık | Dişi | Amerikan Cocker | Yok |
| 11 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | Samoyed | Yok |
| 12 | Sahipli | 5 aylık | Erkek | Amerikan Cocker | Yok |
| 13 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | Pug | Yok |
| 14 | Sahipli | 2 yaş | Dişi | Beagle | Yok |
| 15 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | Golden Retriever | Diare |
| 16 | Sahipli | 10 yaş | Erkek | Terrier | Konstipasyon |
| 17 | Sahipli | 12 yaş | Dişi | Pekingese | Yok |
| 18 | Sahipli | 2 yaş | Dişi | Terrier | Yok |
| 19 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | German Shepherds | Yok |
| 20 | Sahipli | 11 yaş | Erkek | Cocker | Yok |
| 21 | Sahipli | 1 yaş | Erkek | Terrier | Yok |
| 22 | Sahipli | 1 yaş | Erkek | Cocker | Yok |
| 23 | Sahipli | 2 yaş | Erkek | Chihuahua | Yok |
| 24 | Sahipli | 3 yaş | Dişi | Terrier | Yok |
| 25 | Sahipli | 7 yaş | Erkek | Terrier | Yok |
| 26 | Sahipsiz | 6 yaş | Erkek | Sivas Kangal | Yok |
| 27 | Sahipsiz | 3 yaş | Erkek | Sivas Kangal | Yok |
| 28 | Sahipsiz | 5 yaş | Erkek | Sivas Kangal | Kusma |
| 29 | Sahipsiz | 4 yaş | Erkek | Sivas Kangal | Yok |
| 30 | Sahipsiz | 4 yaş | Erkek | Sivas Kangal | Yok |
| 31 | Sahipsiz | 5 yaş | Erkek | Sivas Kangal | Yok |
| 32 | Sahipsiz | 1 yaş | Erkek | Melez | Diare |
| 33 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Melez | Yok |
| 34 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Melez | Yok |
| 35 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Kangal Melezi | Yok |
| 36 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Melez | Yok |
| 37 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Melez | Kusma |
| 38 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Kangal Melezi | Yok |
| 39 | Sahipli | 6 aylık | Erkek | Labrador | Diare-Kusma |
| 40 | Sahipli | 6 aylık | Erkek | German Shepherds | Diare |
| 41 | Sahipli | 1 yaş | Erkek | Cocker | Diare |
| 42 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Dalmaçyalı Melezi | Yok |
| 43 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Melez | Yok |
| 44 | Sahipli | 6 aylık | Erkek | Kangal Melezi | Yok |
| 45 | Sahipsiz | 4 aylık | Dişi | Melez | Diare |
| 46 | Sahipli | 14 yaş | Dişi | Pincher | Yok |
| 47 | Sahipsiz | 4 aylık | Erkek | Melez | Diare |

| No | Örnek alınan kaynak | Yaş | Cinsiyet | İrk | Klinik belirti |
|----|---------------------|---------|----------|------------------|----------------|
| 48 | Sahipli | 1 yaş | Erkek | Chov Chov | Yok |
| 49 | Sahipsiz | 3 yaş | Erkek | Melez | Diare |
| 50 | Sahipli | 12 yaş | Dişi | Terrier | Yok |
| 51 | Sahipli | 4 yaş | Erkek | Cocker | Yok |
| 52 | Sahipli | 5 yaş | Dişi | German Shepherds | Yok |
| 53 | Sahipsiz | 4 aylık | Dişi | Melez | Kusma |
| 54 | Sahipsiz | 6 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 55 | Sahipsiz | 1 yaş | Erkek | Melez | Yok |
| 56 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 57 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 58 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 59 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 60 | Sahipli | 2 yaş | Dişi | Cocker | Diare |
| 61 | Sahipli | 8 aylık | Dişi | Cocker | Diare |
| 62 | Sahipli | 8 aylık | Erkek | Terrier | Diare |
| 63 | Sahipli | 8 aylık | Erkek | Cocker | Diare |
| 64 | Sahipsiz | 3 yaş | Erkek | Melez | Diare |
| 65 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 66 | Sahipsiz | 5 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 67 | Sahipsiz | 6 aylık | Dişi | Melez | Diare |
| 68 | Sahipsiz | 6 aylık | Erkek | Melez | Diare |
| 69 | Sahipsiz | 6 aylık | Dişi | Melez | Diare |
| 70 | Sahipsiz | 2 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 71 | Sahipsiz | 2 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 72 | Sahipsiz | 7 aylık | Erkek | Melez | Yok |
| 73 | Sahipsiz | 7 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 74 | Sahipsiz | 7 aylık | Erkek | Melez | Yok |
| 75 | Sahipsiz | 2 yaş | Erkek | Melez | Yok |
| 76 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 77 | Sahipsiz | 6 aylık | Erkek | Melez | Yok |
| 78 | Sahipsiz | 6 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 79 | Sahipsiz | 8 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 80 | Sahipsiz | 7 aylık | Erkek | Melez | Yok |
| 81 | Sahipsiz | 8 aylık | Dişi | Melez | Diare-uyuz |
| 82 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 83 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 84 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 85 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Diare |
| 86 | Sahipsiz | 9 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 87 | Sahipsiz | 9 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 88 | Sahipsiz | 5 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 89 | Sahipsiz | 2 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 90 | Sahipsiz | 3 yaş | Dişi | German Shepherds | Yok |
| 91 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 92 | Sahipsiz | 1 yaş | Dişi | Melez | Yok |
| 93 | Sahipsiz | 8 aylık | Dişi | Melez | Yok |
| 94 | Sahipsiz | 4 yaş | Erkek | Melez | Yok |
| 95 | Sahipli | 8 yaş | Erkek | Amerikan Cocker | Yok |
| 96 | Sahipli | 10 yaş | Dişi | Sivas Kangal | Yok |

3.1.2. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

3.1.2.1. Ekstraksiyon Kiti

Dışkı örneklerinden *Helicobacter* cinsine ait total DNA'nın elde edilmesi amacıyla QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen-51504) kullanıldı.

QIAamp DNA Stool Mini Kitin içeriği:

- InhibitEX tabletleri
- ASL Buffer (stool lizis buffer)
- AL Buffer (lizis buffer)
- AW1 Buffer (wash buffer I)
- AW2 Buffer (wash buffer II)
- AE Buffer (elution buffer)
- Proteinaz K
- Toplama tüpleri
- Spin kolonları

3.1.2.2. Amplifikasyonda kullanılan gereçler

- Primer FORWARD (BioBasic Inc.)
CTA TGA CGG GTA TCC GGC
- Primer REVERSE (BioBasic Inc.)
ATT CCA CCT ACC TCT CCC A
- Taq DNA Polymerase (Fermentas- EP0402)
- 10 X Taq buffer (NH₄)₂SO₄ (Fermentas - B33)
(750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20)
- MgCl₂ (25 mM, Fermentas - R0971)
- dNTP Mix (Fermentas- R0181)
- Bovine serum albumin (Sigma-A4503)
- Pozitif kontrol: İnsan gastrik örneğinden izole edilmiş *H. pylori* suşu

dNTP Mix hazırlanması:

Dietilpirokarbonat (DEPC) ile işlem görmüş distile su (Ambion-AM9920) ile 25 mM konsantrasyonda A, T, C, G dNTP içeren toplam 200 µl stok solüsyon hazırlandı.

Primer hazırlanması:

DEPC'li distile su ile 20 pmol/ μ l konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlandı.

Master Miks hazırlanması:

| | |
|---------------------------------|--------------|
| 10 X buffer | 5 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5 μ l |
| dNTP Mix (10 mM) | 3 μ l |
| Primer FORWARD | 2 μ l |
| Primer REVERSE | 2 μ l |
| Taq DNA Polymerase (5u/ μ) | 0.5 μ l |
| dH ₂ O | 26.5 μ l |
| % 0.1 bovine serum albumin | 1 μ l |
| Hedef DNA | 5 μ l |
| TOPLAM | 50 μ l |

3.1.2.3. TBE buffer

Agaroz jelin hazırlanması, elektroforez, poliakrilamid jel elektroforez (PAGE), ve DNA bantlarının boyanması sırasında sulandırıcı olarak 1X TBE buffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH 8.0) hazırlandı. Bu amaçla bir hacim 10X TBE buffer (SIGMA D30926), 9 hacim steril distile su ile karıştırıldı.

3.1.2.4. Agaroz jel

Amplifiye edilmiş ürünlerin elektroforezinde kullanılmak üzere % 1.8 oranında hazırlandı.

| | |
|-----------------------|---------|
| Agaroz (Sigma A 0576) | 0.540 g |
| 1X TBE buffer | 30 ml |

Belirtilen miktarda agaroz ve TBE buffer ısıtılarak çözündürüldü. Agaroz 50°C'ye kadar soğutulmuş olarak jel kalıbına döküldü, tarak yerleştirildi. Jel formunu alıncaya kadar beklendi ve tarak çıkarıldı. Agaroz jel tanka aktarılarak üzeri 1XTBE buffer ile kaplandı.

3.1.2.5. Yükleme solusyonu

PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi için kullanıldı. Bu amaçla 2 µl 6X yükleme solusyonu (Fermentas- R0611), 10 µl PCR ürünü ile karıştırılarak kullanıldı.

3.1.2.6. DNA Marker

Elektroforezde DNA' ların ağırlıklarının saptanması için kullanıldı. 1 µl DNA Marker (Fermentas, QX174 DNA/BsuRI), 1µl yükleme solusyonu, 4 µl deiyonize su karıştırıldı.

3.1.2.7. Ethidium Bromide

Elektroforetik seperasyon sonrası oluşan DNA bantlarının boyanması için % 0.5 oranında hazırlandı. Bu amaçla 100 ml 1X TBE buffer içine 30 µl ethidyum bromide (Sigma- E-8751) eklendi.

3.1.2.8. Diğer Gereçler

- % 95'lik Ethanol (Riedel-deHaen 32221)
- Mineral yağ (Sigma- M8410)
- 1.5 ml ve 2 ml kapaklı mikrosantrifüj tüpleri
- 0.5 ml'lik ince çeperli DNase, RNase free PCR tüpleri
- Pipetler (0.5-10µl, 10-100µl,100-1000µl otomatik pipetler)
- 10 µl DNase, RNase free filtreli pipet uçları
- 100 µl DNase, RNase free filtreli pipet uçları
- 1000 µl DNase, RNase free filtreli pipet uçları
- Thermocycler (Biometra Uno-thermoblock)
- Mikrosantrifüj (Hettich- Mikro22)
- Vorteks (Biosan- V1)
- Agaroz jel elektroforez tankı (Agagel Mini) ve güç kaynağı (Biometra-Power pack P25)
- UV Transmilatör (Biometra-TI 1)

3.1.3. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Helicobacter cins spesifik primerlerle PCR sonucu pozitif saptanan DNA' ların *H. pylori*' ye ait olup olmadıklarının saptanması amacıyla uygulandı.

3.1.3.1. Enzim

*Hinf*I (*cag A*) (Fermentas-ER0801) enzimi kullanıldı

3.1.3.2. Reaksiyon buffer

Enzim aktivitesinin gerçekleşmesi için Buffer R (Fermentas- ER0801) kullanıldı.

3.1.3.3. Poliakrilamid Jel

Helicobacter DNA fragmanlarının dikey elektroforetik seperasyonu amacıyla kullanıldı.

A- Poliakrilamid jel hazırlanmadan önce içeriğinde yer alan çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

5X TBE buffer: Bir hacim 10X TBE buffer 4 hacim steril distile su ile karıştırıldı.

Akrilamid Çözeltisi: 30 g akrilamid (Merck-10784) ve 1g bisacrylamide (Merck-161-0201) steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı ile çözüldürüldü. Filtre kağıdından süzüldü. Koyu renkli şişede kullanılıncaya kadar + 4°C' de saklandı.

APS çözeltisi :100 mg APS (Merck-01201) 1ml steril distile suda çözüldürüldü. Kullanılıncaya kadar -20°C' de saklandı.

B- % 8' lik Poliakrilamid jelin hazırlanışı:

| | |
|--|---------|
| Deiyonize su | 4,56 ml |
| 5X TBE | 2 ml |
| Akrilamid çözeltisi | 3.36 ml |
| % 10'luk amonyum persülfat (APS) | 90 µl |
| Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Merck-10732) | 12 µl |

Karışım TEMED eklendikten hemen sonra, dikey jel elektroforez sistemindeki iki cam arasına döküldü, tarak yerleştirildi. Jel formunu alınca tarak çıkarıldı, tanka yerleştirildi ve üzeri 1X TBE buffer ile kaplandı.

3.1.3.4. NuiSieve Agaroz Jel

Helicobacter DNA fragmanlarının yatay elektroforetik seperasyonu amacıyla % 2 oranında hazırlandı.

| | |
|---------------------------|-------|
| Agaroz (Sigma –A- 0576) | 0,6 g |
| NuiSieve (Prona-061416PR) | 1.8 g |
| 1X TBE buffer | 30 ml |

3.1.3.5. Diğer gereçler

- Vertikal elektroforez tankı (BioRad- Mini-Protean 3)
- Güç kaynağı (BioRad-PowerPac Universal Power Supply)
- UV Transmilatör (Biometra-TI 1)

Belirtilen miktarda agaroz ve TBE buffer ısıtılarak çözündürüldü. Agaroz 50°C' ye kadar soğutularak jel kalıbına döküldü, tarak yerleştirildi. Jel formunu alıncaya kadar beklendi ve tarak çıkarıldı. Agaroz jel tanka aktarılarak üzeri 1XTBE buffer ile kaplandı.

3.1.4. KÜLTÜR

3.1.4.1. İzolasyon

PCR ve RFLP sonucunda, *H. pylori* DNA' sı saptanan dışkı örneklerinden *H. pylori* izolasyonu amacıyla % 5 at kanı ve DENT Supplement (Oxoid-SR- 147E) katkılı Colombia Blood Agar (Fluka- 27688) kullanıldı .

Besiyerinin İçeriği ve Hazırlanışı

| | |
|--------------------------|---------|
| Colombia Blood Agar Base | 44 g |
| At kanı | 50 ml |
| DENT Suplement | 25 mg |
| Distile su | 1000 ml |

Colombia Blood Agar Base belirtilen miktarda tartıldı ve 1000 ml distile suda eritildi. 121°C de 15 dakika süreyle sterilize edildi. 50°C ye kadar soğutulduktan sonra at kanı ve DENT suplement (vancomycin, trimethoprim, cefsulodin ve amphotericin) ilave edildi. Petri kutularına 25'er ml olacak şekilde dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar + 4°C de saklandı..

3.1.4.2. İdentifikasyon

Referans suş ve şüpheli izolatların; üreaz aktivitesini saptamak için üre agar, nitratı redükte etme özelliklerinin belirlenmesi için nitrat agar, indoksil asetatı hidrolize etme özelliklerinin belirlenmesi için indoksil asetat diskleri, sodyum hippuratı hidrolize etme özelliklerinin belirlenmesi için sodyum hippurat ve ninhidrin çözeltileri, sitokrom oksidaz özelliklerinin saptanması için oksidaz çubukları, katalaz oluşturma özelliklerinin belirlenmesi için % 3' lük H₂O₂ çözeltisi kullanıldı. Ayrıca nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılıklarının saptanması amacıyla Nailidiksik asit ve Sefalotin diskleri kullanıldı.

3.1.4.3. Referans Suş

İzolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin kontrolü amacıyla, insan gastrik örneğinden izole edilen ve Fatih Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü'nden sağlanan *H. pylori* suşu kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. PCR

3.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu

Dışkı örneklerinden DNA'ların ekstraksiyonu, kit içeriğinde üretici firma tarafından belirtilen yöntemle yapıldı. Dışkı örneklerinden 200' er mg tartılarak 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve tüpler buz kalıpları üzerine yerleştirildi. Her tüpe 1,4 ml Buffer ASL eklendi, homojenize olana kadar vortekslenildi. Homojenatlar 70°C lik su banyosunda 5 dakika bekletildi, 15 saniye vortekslenip 1 dakika süreyle 14000 rpm' de santrifüje edildi. Süpernatantlardan 1.2' şer ml alınarak 2 ml'lik tüplere aktarıldı. Her tüpe birer adet InhibitEX tablet atıldı, süspansiyon şekilleninceye kadar vortekslenildi, 1 dakika oda ısısında inkube edildi, 14000 rpm'de 3 dakika santrifüje edildi. Süpernatantlar 1.5 ml' lik santrifüj tüplerine aktarıldı, tekrar 14000 rpm'de 3 dakika santrifüje edildi. Süpernatantlardan 200' er µl alınarak 15'er µl Proteinaz K solüsyonu eklenmiş 1.5 ml' lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 200' er µl AL buffer eklenerek 15 saniye vortekslenildi. 70° C lik su banyosunda 10 dakika bekletildi. Lizatlara 200' er µl etanol eklendi ve vortekslenildi. 2' şer ml' lik toplama tüpleri üzerine spin kolonlar yerleştirildikten sonra lizatlar mikropipetler ile kolonlara aktarıldı. 1

dakika süreyle 14000 rpm' de santrifüje edildi. Filtratları içeren tüpler atıldı. Kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Kolonlara 500' er µl AW1 buffer eklendi ve 1 dakika süreyle 14000 rpm' de santrifüje edildi. Filtratları içeren tüpler atıldı. Kolonlar 2' şer ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Kolonlara 500' er µl AW2 buffer eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüje edildi. Filtratı içeren tüpler boşaltıldı. Kolonlar 1,5' şer ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 200' er µl AE buffer eklendi, 1 dakika oda ısısında bekletildi, 14000 rpm' de 1 dakika santrifüje edildi. Elde edilen DNA' lar kullanıncaya kadar -20° C de saklandı. Pozitif kontrol amacıyla kullanılan *H. pylori* suşunun DNA' sı da aynı yöntemle ekstrakte edildi.

3.2.1.2. DNA Amplifikasyonu

Shinozaki. ve ark. (112) tarafından bildirilen yönteme göre uygulandı. 45' er µl master mix ve 5' er µl DNA ekstraktları, 0.5 ml' lik PCR tüplerine konuldu, hafifçe vortekslendi, 5 saniye süreyle santrifüje edildi, üzerleri 50' şer µl mineral yağ ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak 5 µl *Helicobacter* suşu ekstraktı, negatif kontrol olarak 5 µl DEPC'li su 45' er µl master mix ile karıştırılarak kullanıldı.

PCR tüpleri thermocycler'a yerleştirildi. 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 soğutularak elektroforetik seperasyon yapıncaya kadar termocycler' da bekletildi .

3.2.1.3. Elektroforetik seperasyon ve DNA' nın saptanması

Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinden 10' ar µl alınarak üzerlerine 2' şer µl yükleme solusyonu eklendi. Bu karışımlardan 10' ar µl agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk sıraya 6 µl DNA marker, ikinci sıraya 10 µl negatif kontrol, üçüncü sıraya 10 µl pozitif kontrol, diğer sıralara amplifiye edilmiş PCR ürünleri konuldu. Elektroforez işlemi 100 voltta bir saat süreyle gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda agaroz jel ethidium bromide solüsyonunda 45 dakika süreyle bekletildi. DNA bantlarının oluşumu UV transilatör üzerinde gözlemlendi (112).

3.2.1.4. Sonuçların Yorumlanması

375 bp moleküler ağırlığında bant oluşumu pozitif, herhangi bir bant gözlenmemesi negatif olarak değerlendirildi (112).

3.2.2. RFLP

3.2.2.1. Enzim kesimi

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. Enzim kesim aşaması tüplere 2' şer µl miktarlarında 6X yükleme solüsyonu katılarak durduruldu (112,117).

3.2.2.2. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE)

Spesifik *Helicobacter* DNA fragmanlarını içeren enzim kesim ürünleri poliakrilamid jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk sıraya 6 µl DNA marker, ikinci sıraya 20 µl negatif kontrol, üçüncü sıraya 20 µl pozitif kontrol, diğer sıralara enzim kesim ürünlerinden 20' şer µl konuldu. Elektroforez işlemi 100 voltta iki saat süreyle gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda agaroz jel ethidium bromide solüsyonunda 45 dakika bekletildi. DNA fragman bantlarının oluşumu UV transilatör üzerinde gözlemlendi (112).

3.2.2.3. NuiSieve agaroz jel elektroforetik seperasyonu

Kesim sonrası oluşan DNA fragmanlarının seperasyonu için PAGE tekniğinin yanı sıra NuiSieve Agaroz jel elektroforez tekniği de kullanıldı.

Enzim kesim ürünleri NuiSieve agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk sıraya 6 µl DNA marker, ikinci sıraya 20 µl negatif kontrol, üçüncü sıraya 20 µl pozitif kontrol, diğer sıralara *Helicobacter* DNA' larından 20' şer µl konuldu. Elektroforez işlemi 100 voltta bir saat süreyle gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda agaroz jel ethidium bromide solüsyonunda 45 dakika bekletildi. DNA fragman bantlarının oluşumu UV transilatör üzerinde gözlemlendi (10,27)

3.2.2.4. Sonuçların Yorumlanması

Hem PAGE hem de NuiSieve agaroz jel elektroforetik seperasyonu sonucunda 196,119 ve 60 bp moleküler ağırlığında üç bant oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (112,117).

3.2.3. KÜLTÜR

3.2.3.1. İzolasyon

PCR ve RFLP sonucunda, *H. pylori* DNA' sı saptanan dışkı örnekleri 1 ml PBS ile sulandırıldı. Homojenatlar 0.45 µm' lik membran filtrelerden geçirildi. Elde edilen filtratlardan, % 5 at kanı ve DENT Supplement katkılı Columbia Blood Agara ekimler yapıldı. Besiyerleri % 7.5 CO₂' li ortamda 37°C de 10 gün süreyle inkube edildi, 3., 5., 7. ve 10. günlerde üreme yönünden kontrolleri yapıldı.

3.2.3.2. İdentifikasyon:

Üreme kontrolleri yapılan kolonilerin makroskopik ve Gram boyama ile mikroskopik morfolojileri incelendi. Şüpheli izolatlardan oksidaz, katalaz, üreaz, nitrat redüksiyonu, indoksil asetat ve sodyum hippurat hidrolizasyonu testleri yapıldı. Nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile incelendi (33).

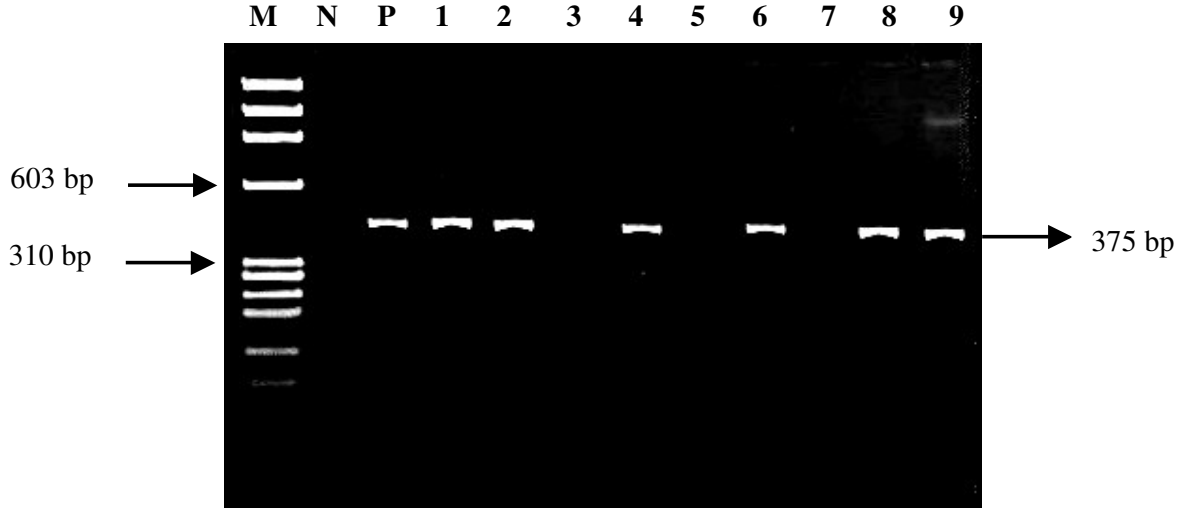
3.2.4. İSTATİSTİKİ ANALİZ

Bulguların istatistikî önemlerinin belirlenmesi amacıyla 'Khi-Kare (χ^2) Testi' kullanıldı (98). İstatistikî inceleme için köpeklerin sahip bilgisi, yaş, cinsiyet ve gastrik klinik belirti gösterme durumları baz alındı.

4. BULGULAR

4.1. PCR Bulguları

Dışkı örneklerinin *Helicobacter* cins spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmesi sonucunda, 65 (% 67.7) örnekte 375 bp' lik bantlar gözlemlendi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Dışkı örneklerinin PCR bulguları

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

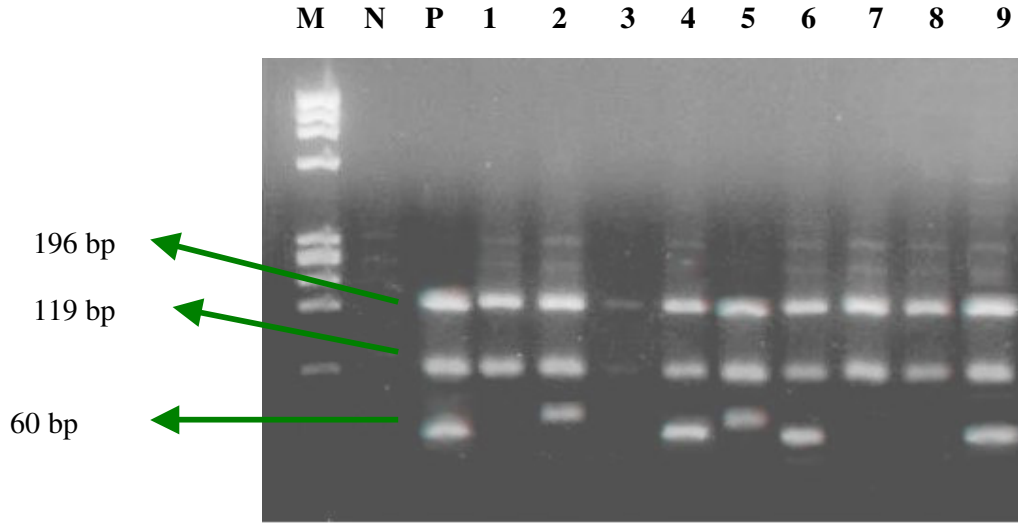
Gastrik klinik belirti gösteren 36 köpeğe ait dışkı örneklerinin 27 (% 75)' sinde, gastrik klinik belirti göstermeyen 60 köpeğe ait dışkı örneklerinin 38 (% 63.3)' inde *Helicobacter* DNA' sı saptandı (Tablo 4.1). 40 sahipli köpekten alınan örneklerin 15 (% 37.5)' inde, 56 sahihsiz köpekten alınan örneklerin 50 (% 89.3)' sinde 375 bp' lik bantlar görüldü (Tablo 4-2).

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. (Tablo 4.3).

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 (Tablo 4.4).

4.2. RFLP Bulguları

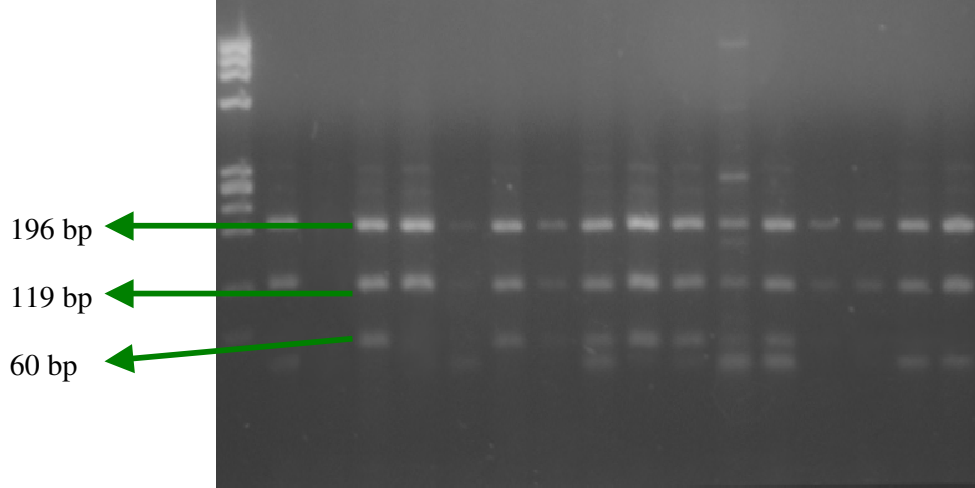
PCR tekniği ile *Helicobacter* olduğu saptanan 65 DNA' nın *HinfI* enzimi ile kesimi ve elde edilen fragmanların PAGE tekniği ile incelenmesi sonucunda, 12 (% 18,46) DNA örneğinde *H. pylori*' ye spesifik 60 bp,119 bp ve 196 bp'lik bantlar gözlemlendi. NuiSive agaroz jel seperasyon tekniği ile de aynı bulgular elde edildi (Şekil 4-2, Şekil 4-3).



Şekil 4-2: PAGE Tekniği ile RFLP Bulguları

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

M P N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Şekil 4-3: NuiSieve Agaroz Elektroforetik Seperasyon Tekniği ile RFLP Bulguları

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

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 (Tablo 4-5). 40 sahipli köpekten 3 (% 7.5)' ünde, 56 sahihsiz köpekten 9 (% 16.1)' unda 196, 119 ve 60 bp' lik bantlar görüldü (Tablo 4-6).

Köpeklerin cinsiyetine göre yapılan değerlendirmede; 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 (Tablo 4-7).

Köpeklerin yaşları göz önüne alınarak yapılan değerlendirmeye göre; 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 (Tablo 4-8).

4.3. Kültür Bulguları

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

4.4. İstatistiki Bulgular

PCR tekniği ile incelenen 96 köpeğe ait dışkı örneklerinden elde edilen bulguların Khi Kare testi ile yapılan istatistiki analizi sonucunda, gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyenler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($p=0.237$) bulunurken, dişi ve erkek köpekler arasındaki fark incelenen tüm köpeklerde istatistiksel olarak önemli ($p=0.034$) bulundu (Tablo 4.1, Tablo 4.3). Aynı şekilde sahipli ve sahipsiz köpekler arasındaki fark önemli ($p=0.01$), yine 1 yaş ve altındaki ve 1 yaş üzeri köpekler arasındaki fark da önemli ($p=0.035$) bulundu (Tablo 4.2, Tablo 4.4).

Tablo 4.1: Gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyen köpeklere ait PCR sonuçları ve istatistiksel analizi

| <i>Gastrik klinik belirti</i> | <i>Köpek sayısı</i> | <i>Helicobacter DNA' sı saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Helicobacter DNA' sı saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Khi Kare</i> | <i>p değeri</i> |
|-------------------------------|---------------------|---|--|-----------------|-----------------|
| Var | 36 | 27 (% 75) | 9 (% 25) | 1.401 | 0.237 |
| Yok | 60 | 38 (% 63.3) | 22 (% 36.7) | | |
| Toplam | 96 | 65 (% 67.7) | 31 (% 32.3) | | |

* $p<0.05$ istatistiki olarak önemli

Tablo 4.2: Sahipli ve sahipsiz köpeklere ait PCR sonuçları ve istatistiksel analizi

| <i>Sahiplilik</i> | <i>Köpek sayısı</i> | <i>Helicobacter DNA' sı saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Helicobacter DNA' sı saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Khi Kare</i> | <i>p değeri</i> |
|-------------------|---------------------|---|--|-----------------|-----------------|
| Sahipli | 40 | 15 (% 37.5) | 25 (% 62.5) | 28.620 | 0.01* |
| Sahipsiz | 56 | 50 (% 89.3) | 6 (% 10.7) | | |
| Toplam | 96 | 65 (% 67.7) | 31 (% 32.3) | | |

* $p<0.05$ istatistiki olarak önemli

Tablo 4.3: Cinsiyete göre PCR sonuçları ve istatistiksel analizi

| Cinsiyet | Köpek sayısı | <i>Helicobacter DNA' sı saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Helicobacter DNA' sı saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | Khi Kare | <i>p değeri</i> |
|----------|--------------|---|--|----------|-----------------|
| Erkek | 50 | 29 (% 58) | 21 (% 42) | 4.498 | 0.034* |
| Dişi | 46 | 36 (% 78.3) | 10 (% 21.7) | | |
| Toplam | 96 | 65 (% 67.7) | 31 (% 32.3) | | |

*p<0.05 istatistiki olarak önemli

Tablo 4.4: Yaşa göre PCR sonuçları ve istatistiksel analizi

| Yaş | Köpek sayısı | <i>Helicobacter DNA' sı saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Helicobacter DNA' sı saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | Khi Kare | <i>p değeri</i> |
|---------|--------------|---|--|----------|-----------------|
| ≤ 1 yaş | 49 | 38 (% 77.5) | 11 (% 22.4) | 4.435 | 0.035* |
| > 1 yaş | 47 | 27 (% 57.4) | 20 (% 42.6) | | |
| Toplam | 96 | 65 (% 67.7) | 31 (% 32.3) | | |

*p<0.05 istatistiki olarak önemli

RFLP tekniği ile elde edilen bulguların istatistiki analizi sonucunda ise; gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyenler arasındaki fark (p=0.750), dişi ve erkek köpekler arasındaki fark (p=0.877), sahipli ve sahipsiz köpekler arasındaki fark (p=0.439) ile 1 yaş ve altındaki ve 1 yaş üzeri köpekler arasındaki fark (p=0.938) önemsiz bulundu (Tablo 4-5, Tablo 4-7, Tablo 4-6, Tablo 4-8).

Tablo 4.5: Gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyen köpeklere ait RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi

| Gastrik klinik belirti | Köpek sayısı | <i>H. pylori saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>H. pylori saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | Khi Kare | <i>p değeri</i> |
|------------------------|--------------|--|---|----------|-----------------|
| Var | 36 | 5 (% 13.9) | 31 (% 86.1) | 0.102 | 0.750 |
| Yok | 60 | 7 (% 11.7) | 53 (% 88.3) | | |
| Toplam | 96 | 12 (% 12.5) | 84 (% 87.5) | | |

*p<0.05 istatistiki olarak önemli

Tablo 4.6: Sahipli ve sahipsiz köpeklere ait RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi

| <i>Sahiplilik</i> | <i>Köpek sayısı</i> | <i>H. pylori saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>H. pylori saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Khi Kare</i> | <i>p değeri</i> |
|-------------------|---------------------|--|---|-----------------|-----------------|
| Sahipli | 40 | 3 (% 7.5) | 37 (% 92.5) | 0.600 | 0.439 |
| Sahipsiz | 56 | 9 (% 16.1) | 47 (% 83.9) | | |
| Toplam | 96 | 12 (% 12.5) | 84 (% 87.5) | | |

*p<0.05 istatistiki olarak önemli

Tablo 4.7: Cinsiyete göre RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi

| <i>Cinsiyet</i> | <i>Köpek sayısı</i> | <i>H. pylori saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>H. pylori saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Khi Kare</i> | <i>p değeri</i> |
|-----------------|---------------------|--|---|-----------------|-----------------|
| Erkek | 50 | 6 (% 12) | 44 (% 88) | 0.024 | 0.877 |
| Dişi | 46 | 6 (% 13) | 40 (% 87) | | |
| Toplam | 96 | 12 (% 12.5) | 84 (% 87.5) | | |

*p<0.05 istatistiki olarak önemli

Tablo 4.8: Yaşa göre RFLP sonuçları ve istatistiksel analizi

| <i>Yaş</i> | <i>Köpek sayısı</i> | <i>H. pylori saptanan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>H. pylori saptanmayan köpek sayısı ve % oranları</i> | <i>Khi Kare</i> | <i>p değeri</i> |
|------------|---------------------|--|---|-----------------|-----------------|
| ≤ 1 yaş | 49 | 6 (% 12.2) | 42 (% 87.8) | 0.006 | 0.938 |
| > 1 yaş | 47 | 6 (% 12.8) | 41 (% 87.2) | | |
| Toplam | 96 | 12 (% 12.5) | 84 (% 87.5) | | |

*p<0.05 istatistiki olarak önemli

5. TARTIŞMA

Helicobacter türleri, insan ve çeşitli hayvanlarda gastrik, intestinal ve hepatik hastalıklardan sorumlu tutulmaktadır (2). Bu tür içerisinde yer alan ve insanlarda birinci sınıf kanser etkeni olarak tanımlanan *H. pylori*, dünya nüfusunun neredeyse yarısını infekte etmekte olan bir patojendir (20,28,29,124). *H. pylori'* nin neden olduğu infeksiyonun, patojenik ve zoonotik önemi üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (65,66). Özellikle büyük şehirlerde yaşayan insanların yaşamlarını paylaştıkları kedi ve köpeklerin infeksiyon kaynağı olabileceği düşünülerek, araştırmalar öncelikle bulaşmada rol oynayabilecek bu hayvanlar üzerine yoğunlaştırılmıştır (26,30,31). Köpeklerde *Helicobacter* spp. varlığının ortaya konulduğu bir çok çalışma sonucunda, köpeklerde % 67 ile % 100 oranında gastrik *Helicobacter* varlığının saptanmış olması, insanlardaki *Helicobacter* infeksiyonları gibi köpeklerdeki infeksiyonların da ciddi boyutlarda olduğunu göstermektedir (24,30,31,53,65,66).

İnsan ve hayvanlarda gastrik infeksiyona neden olan *Helicobacter* spp. varlığının saptanması amacıyla çoğunlukla mide biyopsi örneklerinden yararlanılmaktadır. Alınan örnekler üre testi, histolojik ve bakteriyolojik ya da moleküler incelemeler için kullanılmaktadır. Mide biyopsi örneklerinin toplanması için endoskopi ya da cerrahi yöntemler gibi invaziv yaklaşımların gerektiği bildirilmiştir. Son yıllarda hastadan elde edilmesi sırasında büyük streslerle neden olan biyopsi örneğine göre daha kolay elde edildiği, non-invaziv olduğu, testlerin daha hızlı sonuç verdiği ve ucuz olduğu için insanlarda rutin laboratuvar incelemelerinde *Helicobacter* spp. varlığının saptanması için dışkı örneği kullanılmaya başlanmıştır (67).

H. pylori tanısında histopatolojik ve bakteriyolojik yöntemler yerine günümüzde sıklıkla moleküler tanı yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler arasında PCR-RFLP analizlerinin tanı, tiplendirme ve tedavinin izlenmesi açısından en duyarlı yöntemler olduğu yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (11,14,117).

Köpeklerde de *Helicobacter* infeksiyonlarının non-invaziv, kolay, hızlı sonuç vererek zaman kaybetmeden tedaviye başlanılmasına yardımcı olan, hayvana cerrahi bir girişim gerektirmediğinden strese yol açmayan, hayvan sahibine ekstra maliyetler yüklemeyen bir materyal ile yapılmasının büyük yarar sağlayacağını düşünerek

Shinozaki ve ark. (112), ilk kez köpeklerde dışkı örnekleri kullanarak PCR-RFLP testini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda araştırmacılar, gastrik ve intestinal *Helicobacter* türleri arasında yüksek derecedeki benzerliğe ve türler arasındaki gen dizi farklılıklarına dikkat çekmiş, dışkıdan *Helicobacter* türlerinin saptanması, PCR' ın spesifitesinin artırılması ve tedavinin hızla şekillenebilmesi amacıyla PCR-RFLP tekniğinin yararlı olacağını belirtmişlerdir. Camargo ve ark. (11)' da, rutin laboratuvar çalışmalarında kesin ve güvenli sonuçların alınabilmesi ve türlerin identifikasyonu amacıyla PCR-RFLP yönteminin yararından söz etmişlerdir.

Bu araştırmada, İstanbul ilinde gastrik klinik belirti gösteren ve göstermeyen toplam 96 köpekten alınan dışkı örneğinden öncelikle cins spesifik primerler kullanarak yapılan PCR ile *Helicobacter* spp. varlığı ortaya konulduktan sonra, RFLP yöntemi ile *Helicobacter* olduğu belirlenen DNA' larda *H. pylori* varlığı saptanmıştır.

PCR ile *Helicobacter* DNA' sının saptanması amacıyla Riley ve ark. (105), Buczolits ve ark. (10), Shinozaki ve ark. (112), H267f ve H267r cins spesifik primerleri kullanmışlardır. Clayton ve ark. (14), ilk olarak *H. pylori* saptanması amacıyla *CagA* geninin varlığını gösteren *HinfI* enzim kesimini kullanmış, daha sonra Camargo ve ark. (11), 38 hastada yaptıkları *HinfI* enzim kesimi sonucu 32 (% 91) hastada *H. pylori* saptadıklarını rapor etmişlerdir. Şimşek ve ark. (117), *H. pylori* saptanması amacıyla *HinfI* enzimi kullanmışlar, toplam 35 insan mide biyopsi örneğinden 31 (% 91)' inde *H. pylori* saptamışlardır.

Bu araştırmada da dışkı örnekleri *Helicobacter* DNA' sının varlığı yönünden PCR ile incelendikten sonra, *Helicobacter* olduğu belirlenen DNA' lardan *H. pylori* varlığının ortaya konulması için RFLP tekniği uygulanmış ve *CagA* geninin saptanması amacıyla *HinfI* enzim kesimi yapılmıştır.

RFLP sonucu DNA fragmanlarının incelenmesi için en iyi yöntemin dikey elektroforetik seperasyon amacıyla PAGE tekniği olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte jelin hazırlanmasında, yürütülmesinde ve görüntülenmesinde yaşanan sorunlar yüzünden Buczolits ve ark. (10), köpeklerde *H. pylori* saptadıkları çalışmalarında ve Dougbeh ve ark. (27), insanlarda yaptıkları çalışmada NuiSieve agaroz yatay elektroforetik seperasyon tekniğini kullanmışlardır. Bu tez çalışmasında, örnekler dikey elektroforetik seperasyonun (PAGE) yanı sıra yatay elektroforetik seperasyon (NuiSieve agaroz) tekniği ile de incelenmiştir. *H. pylori*' nin *HinfI* enzimi ile kesimi

sonrası oluşan fragmanların uzunluklarının birbirine yakın olmaması nedeniyle bantlar birbirlerinden belirgin şekilde ayrı gözlenebilmektedir. Bu nedenle dikey elektroforetik seperasyon gibi hazırlanması, yürütülmesi ve görüntülenmesi oldukça zahmetli olan bir teknik yerine, hızlı ve kolay olan yatay elektroforetik seperasyon kullanımının özellikle çoklu örnek çalışmalarında büyük kolaylık sağladığı düşünülmektedir.

Daz-Regan ve ark. (19), *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 (33), *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, süspanse edilen örnekler öncelikle 0.45 µm' lik membran filtrelerden geçirilmiş ve daha sonra DENT supplement katılmış at kanlı Colombia Agara ekimleri yapılmıştır.

Dünyada köpeklerde yapılan ve Helicobacter infeksiyonunun prevalansını gösteren çalışmalar, etkenin köpeklerde % 67-100 oranında bulunduğunu kanıtlamıştır (24,30,53,65). Happonen ve ark. (53), köpeklerin mide biyopsi örneklerinin histolojik incelemesi sonucunda örneklerin tamamında Helicobacter saptamışlar buna karşın bakteriyolojik incelemeler sonucunda ise örneklerin % 40' ından Helicobacter türlerini izole etmişlerdir. Benzer bir çalışmada Cattoli ve ark. (12), histolojik olarak inceledikleri 23 köpekten 18 (% 78)' inde Helicobacter saptarken, bakteriyolojik inceleme sonucunda 23 köpeğin 5 (% 21.8)' inden Helicobacter spp. izole etmişlerdir. Shinozaki ve ark. (112), bakteriyolojik olarak inceledikleri biyopsi örneklerinin % 51'inden Helicobacter spp. izole etmişlerdir. Hwang ve ark. (61), köpeklerde Helicobacter prevalansını üreaz testiyle % 78.4, PCR ile % 82.3 olarak belirlemişlerdir. Eaton ve ark. (31), PCR ile inceledikleri 54 köpekten 49 (% 90)' unda Helicobacter DNA' sını saptamışlar.

Köpeklerden *H. pylori* saptanmasına yönelik birçok araştırma yapılmasına karşın, *H. pylori* saptandığını bildiren araştırma sayısı oldukça azdır (10,107,116). Buczolits ve ark. (10), 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. (116), 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. (24), Türkiye'de köpeklerde *Helicobacter* spp. varlığına yönelik 122 köpeğin mide biyopsi örneğinden kültür, üreaz testi, mukozal kazıntı sitolojisi ve histolojik incelemeleri içeren çalışmalarında *Helicobacter* 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.

RFLP sonucunda 65 *Helicobacter* DNA' sından 12' sinin *H. pylori* olarak saptanması nedeniyle İstanbul ilindeki köpeklerde *H. pylori*' nin prevalansı % 12.5 olarak belirlendi. 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. Tez çalışmasında İstanbul'da saptanan yüksek prevalansın yöntemin duyarlılığı, sokaklarda yaşayan köpeklerin diğer gelişmiş ülkelere oranla fazlalığı ve coğrafi konum farklılıklarından kaynaklanabileceğini düşünülmüştür.

Happonen ve ark. (53), köpek ve kedilerde *Helicobacter* spp. tanısına yönelik yaptıkları araştırmada, gastrik klinik belirti gösteren 21 köpeğin 20 (% 95)' sinde, gastrik klinik belirti göstermeyen 25 köpeğin ise tamamında (% 100) *Helicobacter* spp. saptamıştır. Hwang ve ark. (61), gastrik belirti gösteren köpeklerin % 77.5' inde, gastrik belirti göstermeyenlerin % 67.5' inde *Helicobacter* varlığını ortaya koymuşlardır. Diker ve ark. (24), *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 (1). Bu araştırmada, 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. (31), inceledikleri 31 sokak köpeğinin tümünde (% 100), 15 sahipli köpeğin ise 10 (% 67) 'unda *Helicobacter* spp varlığı saptamışlardır. Happonen ve ark. (53), sahihsiz köpeklerde *Helicobacter* spp. prevalansının sahipli köpeklere oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmada, örnek alınan 40 sahipli köpeğin 15 (% 37.5)' inde, 56 sahihsiz 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 araştırmada, 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 (68).

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 (64). Türkiye’de Yılmaz ve ark. (126), kadınlarda % 85.4 ve erkeklerde de % 76.3 *H. pylori* sero-pozitifliği saptamışlardır. Alim ve ark. (1), 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 araştırmada, köpeklerin cinsiyetine göre yapılan değerlendirmede, 50 erkek köpekten alınan örneklerin 29 (% 58)’ unda, 46 dişi köpekten alınan örneklerin 36 (% 78.3)’ sında *Helicobacter* spp DNA’ sı saptandı. Dişi ve erkek köpekler arasındaki fark, incelenen tüm köpeklerde istatistiksel olarak önemli ($p=0.034$) bulundu. *H. pylori* yönünden ise, incelenen 50 erkek köpekten 6 (% 12)’ sında, 46 dişi köpekten 6 (% 13)’ sında *H. pylori*’ ye spesifik bantlar gözlemlendi. Dişi ve erkek köpekler arasındaki fark ($p=0.877$) istatistiki olarak önemsiz bulundu. Dişilerde *Helicobacter* spp. oranının erkek köpeklere göre daha yüksek olmasının olası nedenlerinden birinin, dişi köpeklerde kızgınlığa bağlı şekillenen depresyondan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Diker ve ark. (24), 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. (52) ise, genç köpeklerde *Helicobacter* spp. varlığının daha yüksek oranda olduğunu vurgulamışlardır. Buna karşın Happonen ve ark. (53), *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 (88,89,94,108). Rocha ve ark. (106), *H. pylori* prevalansını çocuklarda % 62.1 ve erişkinlerde % 34.1 olarak bildirmişlerdir. Yine Megraud ve ark. (89), 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 infeksiyonunun yüksek oranda şekillendiğini belirtmişlerdir.

Bu araştırmada, 1 yaş ve altındaki 49 köpeğin 38 (% 77.6)' inde *Helicobacter* spp. spesifik 375 bp'lik bantlar gözlenirken, 1 yaş üstü 47 köpeğin 27 (% 57.4)' sinde *Helicobacter* spp DNA' sı saptandı. Yaşa göre fark istatistiki olarak önemli ($p=0.035$) bulundu. *H. pylori* yönünden incelenen 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. 1 yaş ve altındaki ve 1 yaş üzeri köpekler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($p= 0.938$) bulundu. Çalışmada genç köpeklerde *Helicobacter* spp. DNA' sının daha fazla saptanmasının nedenlerinin, yavru köpeklerin laktasyon periyodu boyunca anneleriyle ve birbirleriyle olan sıkı ilişkisinden ve immun sistemlerinin tam gelişmemiş olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Eaton ve ark. (31), 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* saptamışlardır. Başka bir çalışmada Cattoli ve ark. (12), 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. (61), köpeklerdeki gastrik *Helicobacter* infeksiyonunun 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 *Helicobacter*lerin izolasyonunun zorluğuna, her *Helicobacter* türünün kültüre edilebilir olmayışına ve örnekleme öncesi çeşitli nedenlerle antibiyotik tedavisi uygulanmış olmasına bağlamışlardır (12,31,61).

Dışkıdan *H. pylori* izolasyonu üzerine sınırlı sayıda çalışma vardır. Daz-Regan ve ark. (19), dışkıda hızla üreyerek *H. pylori*' nin üremesini önleyen bakterilerin varlığını belirtirken, Mai ve ark. (78), etkenin dışkıdan kültürü sırasında üretilmeyen kokkoid form almasını izolasyonu zorlaştıran nedenler arasında göstermişlerdir.

Bu araştırmada, PCR ve RFLP sonucunda *H. pylori* DNA' sı saptanan 12 dışkı örneğinden yapılan bakteriyolojik inceleme sonucunda, rnekerin hiçbirinden *H. pylori* izole edilmemesinin yukarıda sözedilen nedenlerden kaynaklandığı kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, köpeklerde non-invaziv bir yöntemle *Helicobacter* spp. ve *H. pylori* varlığının saptanabileceği, bu amaçla kullanılacak olan köpek dışkılarının PCR-RFLP analizleri için uygun rneker olduğu düşünülmüştür. Çalışma ile Türkiye' de köpeklerde *H. pylori* varlığı ilk kez ortaya konulmuş ve *H. pylori* prevalansı % 12.5 olarak saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Alim, A.(2002): Sivas İl Merkezinde, Semptomatik ve Asemptomatik Yetişkin Bireylerde *Helicobacter pylori* Seroprevalansı. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **26**, 75-80
- 2- Altındış, M., Özdemir, M.(2003): *Helicobacter pylori* ve Tamısı. *The Medical Journal of Kocatepe*, **2**, 1-12
- 3- Anonymous (1994): Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **61**, 1-241.
- 4- Armstrong, D.(1996): *Helicobacter pylori* Infection and Dyspepsia. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **31**, 38-47.
- 5- Axon, A.T.R.(1994): The Role Of Omeprazole And Antibiotic Combination in The Eradication of *Helicobacter pylori* An Update, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **29**, 31-37.
- 6- Axon, A.T.R., Moayyedi, P.(1996): Eradication of *Helicobacter pylori*. Omeprazole in Combination With Antibiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **91**, 82-89.
- 7- Blaser, M.J.(1994): *Helicobacter pylori* Phenotypes Associated With Peptic Ulceration. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*; **29** (205), 1-5.
- 8- Blaser, M.J.(1995): Medical significance of *Helicobacter pylori* *Methods in Molecular Medicine*, Mobley Humana Press Inc , Totowa, NJ,USD
- 9- Brea, M.L., Alarcon, T., Megraud, F.(1997): Diagnosis in *Helicobacter pylori* *Current Opinion in Gastroenterology*, **13**, 13-19.
- 10- 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.
- 11- 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.
- 12- Cattolia, G., Vugt, van R, Zanonic, R. G., Sanguinetti, V., R. Chiocchetti, M. Gualtieri, C. M. J. E., Vandenbroucke-Grauls, W., Gaastraa, Kusters, J.

- G.(1999): Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. *Veterinary Microbiology*, **70**, 239-250.
- 13- Chiba, N., Rao, B.V., Rademaker, J. W., Hunt, R.H.(1992): Meta-Analysis of The Efficacy of Antibiotic Therapy in Eradicating *Helicobacter pylori*. *American Journal of Gastroenterology*, **87**, 1716-1727.
- 14- Clayton, C.L., Kleanthous, H., Coates, P.J.(1992): Sensitivite Detection of *Helicobacter pylori* by Using Polimerase Chain Reaction. *Journal of Clinical MicrobioIogy*, **30**, 192-200.
- 15- Cornetta, A., Simpson, K.W., Strauss-Ayali, D., McDonough, P.L., Glead, R.D.(1998): Use of a [13 C]-urea breath test for the detection of gastric infection with *Helicobacter* spp. in dogs. *American Journal of. Veterinary. Research*, **59**, 1364-1369.
- 16- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G.(1999): *Helicobacter pylori* Virulence and Genetics Geography. *Science*, **284**, 1328-1333.
- 17- Cover, T.L., Glupczynski, Y., Lage, A.P., Burette, A.(1995): Serologic detection of infection with *CagA+* *H.pylori* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 1496-1500.
- 18- Cutler, A.F.(1996): Testing For *Helicobacter pylori* In Clinical Practice. *American Journal of Medicine*, **100**, 35-41.
- 19- Daz-Regan, J., Alarcn, T., Aznar, E., Domingo, D., Lopez-Brea, M.(2006):Time-Killing of Viable *Staphylococcus* Spp. Against *Helicobacter Pylori* Clinical Isolates. *Acta Physiologica*, **188**, 23.
- 20- De Bemard, M., Papini, E., De Filippio, V.(1995): Low pH Activates The Vacuolating Toxin of *Helicobacter pylori* Which Becomes Acid and Pepsin Resistant. *Journal of Biological Chemistry*, **70**, 37-40.
- 21- De Boer, W. A., Tygat, G.N.J.(1995): The Best Therapy for *Helicobacter pylori* Infection. Should Efficacy Or Side Effect Profile Determine Our Choice? *Scandinavian Journal of GastroenteroIogy*, **30**, 401-407.
- 22- Dekiqai, H., Murakami, M., Kita, T.(1995): Mecanism of *Helicobacter pylori* associated gastric mucosa injury. *Journal of Digestive Disease Sciences*, **40**, 1332-1339.

- 23- DeNovo R.C., Magne M.L.(1995): Current concepts in the management of Helicobacter-associated gastritis. *Proceedings of the 13th American College of Veterinary Internal Medicine Forum*, Orlando, Fl, 57-61.
- 24- 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 Animal Science*; **26**, 345-351.
- 25- Dooley, C.P.(1993): Background and Historical Considerations of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, **22**, 1-19.
- 26- Dore-Davin, C., Michetti, P., Saraga, E., Blum, A.L.(1996): A 37 kDaf Tagment of UreB is Sufficient To Confer Against *Helicobacter pylori felis* infection (abstr). *Gastroenterology*, **110**, A97.
- 27- Dougbeh, 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.
- 28- Dunn, B.E.(1993): Pathogenec Mechanisms of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, **22**, 43-57.
- 29- Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J.(1997): *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*, **2**, 720-741.
- 30- 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.
- 31- 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.
- 32- Emst, P.B., Jin, Y., Reyes, V.E., Crowe, S.E.(1994): The role of local immuno response in the pathogenesis of peptic ulcer formation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **29**, 22-28.
- 33- English Health Protection Agency (2003):Identification of *Helicobacter pylori* Issue no: 1, Issued by: Standards Unit, *Evaluations and Standards Laboratory*, 1- 9.

- 34- 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.
- 35- Evans, D.G., Evans, D.J., Lampert, H.C., Graham, D.Y.(1995): Restriction Fragment Length Polymorphism In The Adhesin Gene *H.pyloriaA* of *Helicobacter pylori*. *American Journal of Gastroenterology*, **90**,1282-88.
- 36- Everhart, J.E.(2000): Recent Developments in The Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*; **29**, 559-579.
- 37- Feldman, R.A., Eccersley, J.P., Hardie, J.M.(1997): Transmission of *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Gastroenterology*, **8**, 8-12.
- 38- Fennertry, M.B.(1994): *Helicobacter pylori*. *Review Article Arch. Item Med.*; **153**:721-27.
- 39- Ferrero, R.L., Thiberge, J.M., Kansou, I., Wuscher, N.(1995): The GroES Homolog of *Helicobacter pylori* Confers Protective Immunity Against Mucosa Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , **92**, 6499-6503.
- 40- Figura, N.(1996): *Helicobacter pylori* Exotoxins And Gastroduodenal Diseases Associated With Cytotoxic Strain Infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **10**, 79-96.
- 41- Forman, D.(1995): The Prevalance Of *Helicobacter pylori* Infection in Gastric Cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **9**,71-76.
- 42- Fujioka, T, Kodama, R, Honda, S, Guei-Hua, G, Nishizono, A., Nasu, M.(1997): Long-term sequelae of experimental gastritis with *Helicobacter pylori*: a 5-year follow-up study. *Journal of Clinical Gastroenterology*, **25**, 8- 12
- 43- Fujiwara, Y., Wyle, F., Arakawa, T., Kobayaski, K.(1995): *Helicobacter pylori* Toxin Reduces EGF Binding to its Receptor and Proliferative Response of Human Gastric Kato III Cells to EGF Stimulation. Important Mechanism for *H. Pylori* Interference With The Ulcer Healing. *Gastroenterology*, **108**, A97.
- 44- Geyer, C., Colbatzky, F., Lechner, J., Hermanns, W.(1993); Occurance of Spiral Shaped Bacteria in Gastric Biopsies of Dogs and Cats. *Veterinary Record*, **133**, 18-19.
- 45- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McDonnell, W. and Sharper, W.E.S.(1989): Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori*

- comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systemic Bacteriology*, **39**, 397-405.
- 46- Goodwin, C.S., Worsley, B.W.(1993): Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, **22**, 15-19.
- 47- Go, M.F., Chen, K.Y., Versalovic, J.(1995): Cluster analysis of *Helicobacter* genomic DNA fingerprints suggest gastroduodenal disease specific associations. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **30**, 640-46.
- 48- Go, M.F., Crowe, S.E.(2000): Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, **29**, 649-671.
- 49- Graham, D.Y., Klein, P.D.(2000): Accurate Diagnosis of *Helicobacter pylori*: 13C-Urea breath test. *Gastroenterology Clinics of North America*, **29**, 885-895.
- 50- Graham, D.Y.(2000): Therapy of *Helicobacter pylori*: Current status and issues. *Gastroenterology*, **118**, 2-5.
- 51- 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.
- 52- 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.
- 53- 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.
- 54- Hazell, S.L., Lee, A., Borody, L., Hennessy, W.(1986): *Campylobacter pyloridis* and gastritis associated with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus important factors in colonization of the gastric epithelium. *Journal of Infectious Disease*, **153**, 658.
- 55- Heatley, R.V.(1995): Gastritis and duodenitis. *Bohrus Gastroenterology*, **1**, 635-651.
- 56- Henry G.A., Long P.H., Burns J.L., Charbonneau D.L.(1987): Gastric spirillosis in Beagles. *American Journal of Veterinary Research*, **48**, 831-836.

- 57- 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
- 58- Ho, B., Marshall, B. J.(2000): Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*: Serologic testing. *Gastroenterology Clinics of North America*, **29**, 853-863
- 59- Holck, S., Ingeholm, P., Blom, J., Nørgaard, 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.
- 60- Hunt, R.H., Moharned, A.H.(1995): The current role of *Helicobacter pylori* eradication in clinical practice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **30**, 4752.
- 61- 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
- 62- 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.
- 63- Israel, D.A., Peek, R.M.(2001): Review article pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **15**, 1271-90.
- 64- 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.
- 65- 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.
- 66- 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.
- 67- Kabir, S.(2001): Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture. PCR and enzyme immunoassay. *Journal of Medical Microbiology*, **50**, 1021-1029.
- 68- Köksal, F. ve ark.(2002): *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1643–1647.
- 69- Labenz, J., Gyenes, E., Ruhi, G.H., Borsch, G.(1993): Role of *Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer bleeding. *Gastroenterology*, **104**, A126.
- 70- Lambert, J.R.(1993): The role of *Helicobacter pylori* in nonulcer dyspepsia. *Gastroenterology Clinics of North America*, **22**, 141-151.
- 71- Lee, A., Hazell, S.L., O'Rourke, J. and Kouprach, S.(1988): Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infection and Immunology*, **56**, 2843-2850.
- 72- 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. and 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.
- 73- Lee, A., O'Rourke, J.(1993): Gastric bacteria other than *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, **22**, 21-42.
- 74- Lerang, F., Moum, B., Mowinckel, P., Haug, J.B., Ragnhildstveit, E., Berge, T., Bjørneklett, A.(1998): Accuracy of seven different tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the impact of H2-receptor antagonists on the test results. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **33**, 364-369.
- 75- Logan, R.P.H, Walker, M.M.(2001): Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Journal*, **323**, 920-922.
- 76- Madinier, I.M., Fosse, T.M. and Monteil, R.A.(1997): Oral carriage of *Helicobacter pylori*. *Journal of Periontology*, **68**, 2-6.
- 77- Magne, B.(2007): *Helicobacter pylori* Stimulates a Mixed Adaptive Immune Response with a Strong T-Regulatory Component in Human Gastric Mucosa, *Helicobacter*, **12**, 185–192.

- 78- 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.
- 79- Majewski, S.I.H., Goodwin, C.S.(1988): Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *Journal.of Infectious Disease*, **157**, 465-471.
- 80- Makristathis, A., Barrousch, W., Pasching, E., Binder, C., Kuderna, C.(2000): Two enzyme immunoassay and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. *American Society for Microbiology*, **36**, 3710-3714.
- 81- Marshall, B.J., Warren, J.R.(1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*, **1**, 1273-75.
- 82- Marshall, B.J., Royce, H., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Pearmen, J.W., Warren, J.R., Armstrong, J.A.(1984): Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letters*, **24**, 83-88.
- 83- Marshall, B.J., Warren, J.R.(1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, **48**,1311-1314.
- 84- Marshall, B.J.(1994): *Helicobacter pylori*. *American Journal of Gastroenterology*, **89**, 116-119
- 85- Marshall, J.R.(1993): Treatment stratagies *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, **22**, 183-198
- 86- McNulty, C.A.M., Dent, J.C., Curry, A., Uff, J.S., Ford, G.A., Gear, M.W.L. and Wilkinson, S.P.(1989): New spiral bacterium in the gastric mucosa. *Journal.of Clinical. Pathology*, **42**, 585-591.
- 87- McNulty, C.A.M., Dent, J.C., Uff, J.S., Gear, M.W.L., Wilkinson, S.P.(1989b): Detection of *Campylobacter pylori* by the biopsy urease test: an assessment in 1445 patients. *Gut*, **30**, 1058-1062.
- 88- Mégraud, F., Brassens-Rabbe, M.P., Denis, F., Belbouri, A., Hoa, D.Q.(1989): Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 1870-1873.

- 101- Perez, G.I.P., Salomaa, A., Kosunen, T. U., Daverman, B.(2002): Evidence that *cagA+* *Helicobacter pylori* strains are disappearing more rapidly than *cagA-* strains. *Gut*; **50**, 295-298.
- 102- Perkins, S.E., Yan, L.L., Shen, Z., Hayward, A., Murphy, J.C., Fox, J.G.(1996): Use of PCR and culture to detect *Helicobacter pylori* in naturally infected cats following triple antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 1486-1490.
- 103- Radin, M.J., Eaton, K. A., Krakowka, S., Morgan, D. R., Lee, A., Otto, G., Fox, J.(1990):*Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infection and Immunity*, **58**, 2606-2612
- 104- Ramirez, F.(1995): A new more specific test to diagnose *Helicobacter pylori* gastritis.*Gastroenterology*, **108**, 2730.
- 105- Riley, L.K.(1997):Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *Journal of Clinical Microbiology*; **35**, 1620–1623
- 106- 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.
- 107- Rossi, G., Rossi, Michela.(1999): A Conventional Beagle Dog Model for Acute and Chronic Infection with *Helicobacter pylori* *Infection and Immunity*; **67**, 3112-3120,
- 108- Russel, H.(1993): Role of infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *The Lancet*, **359**, 14-22
- 109- Sandıkçı, M.Ü. ve ark.(1996): Helikobakter enfeksiyonları.; *Enfeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s:1005-1009.
- 110- Schmitz, A., Josenhans, C., Suerbaum, S.(1995): The *Helicobacter pylori* flagellar biosynthesis regulatory protein *FibA* affects the expression of flagellar components on the transcriptional level and is probably a membrane protein. *Gut*; **37**, A245.
- 111- Sharma, S.A., Tumrnuru, M.K.R., Miller, G.G., Blaser, M.J.(1995): Interleukin-8 response of gastric epithel cell lines to *H. pylori* stimulation *in vitro*. *Infection and Immunity*, **63**, 1681-87.

- 112- 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.
- 113- Simpson, K., Neiger, R., DeNovo, R.(2000): The relationship of Helicobacter spp. infection to gastric disease in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **14**, 223-227.
- 114- Solnick, Jay V.(2003): Clinical Significance of *Helicobacter* Species Other than *Helicobacter pylori*. *Clinical Infectious Diseases*; **36**:349–54.
- 115- Stolte, M., Eidth, S.(1993):Healing gastric MALT lymphoma by eradicating *Helicobacter pylori*? *The Lancet*, **342**, 568.
- 116- 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.
- 117- Şimşek, İ., Menevşe, S.(2000): PCR and RFLP analysing and identification of *H. pylori* Strains Isolated from gastric specimens. *Tohuko Journal of Experimental Medicine*, **190**, 213-222.
- 118- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fizegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C. (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *H. pylori*. *Nature*, **388**, 539-547.
- 119- 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.
- 120- Vaira, D., Holton, J., Ricci, C., Menegatti, M., Reviewartele.(2000): The transmission of *Helicobacter pylori* from stomach to stomach. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **15**, 33-42.
- 121- Warren, B.J. and Marshall, J.R.(1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*, **1**,1273-1275.

- 122- Weston, A.P., Campbell, D.R.(1995): Bortholomew W.Urine *IgG* serology to detect gastric *Helicobacter pylori*: comparison to serum *IgG* and *IgA* serology and Giemsa stained gastric biopsies. *Gastroenterology*, **108**, 958.
- 123- Windsor, H. M., O'Rourke, J.(2000): Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*; **29** (3), 633-649.
- 124- Xia, H., Keane, C.T.(1994):Transportation of *Helicobacter pylori* culture by optimal systems. *Journal of Clinical Microbiology*; **32**, 3075-77.
- 125- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P.F., Telferd, J.L.(1995): Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *H. pylori* reveals that the clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating toxin. *Infection and Immunity*, **63**, 94-98.
- 126- 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.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|-----------------|-------------------------------|------------------|-----------------|
| Adı | Nafiye Sonay | Soyadı | SAĞNAK |
| Doğ.Yeri | İstanbul | Doğ.Tar. | 30.03.1977 |
| Uyruğu | TC | TC Kim No | 48148296664 |
| Email | sonaysagnak77@superonline.com | Tel | 0 533 310 87 29 |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mez. Yılı |
|-----------------|--------------------------|-----------|
| Doktora | | |
| Yük.Lis. | İ.Ü. Veteriner Fakültesi | 2001 |
| Lisans | | |
| Lise | Özel Bilgi Lisesi | 1995 |

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| | Görevi | Kurum | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|--------------|---------------------|------------------|
| 1. | Bölge Müdürü | Metis Biyoteknoloji | 2007- |
| 2. | Bölge Müdürü | Hücre Teknolojileri | 2004- 2006 |
| 3. | Grup Müdürü | RTA Laboratuvarları | 2002- 2003 |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | KPDS/ÜDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|------------------|-------------------|----------|---------|----------------|---------------|
| İngilizce | Çok iyi | Çok iyi | Çok iyi | 84 | |
| Almanca | Zayıf | Zayıf | Zayıf | | |

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|----------------------|---------|--------------|-------|
| LES Puanı | 54 | | |
| (Diğer) Puanı | | | |

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanma becerisi |
|------------------|-------------------|
| Microsoft Office | Çok iyi |
| | |
| | |

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Voleybol, basketbol, tenis ve yüzme