

**BARAN ÇELİK**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**DOKTORA TEZİ**

**İSTANBUL-2014**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

İSTANBUL'DA SAĞLIKLI VE DİYARELİ KÖPEKLERDE  
*BRACHYSPİRA PİLOSİCOLİ* VARLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI

BARAN ÇELİK

DANIŞMAN  
PROF. DR. SEYYAL AK

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2014

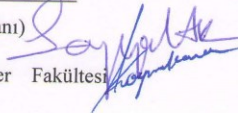
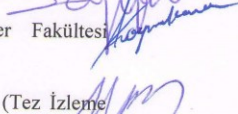
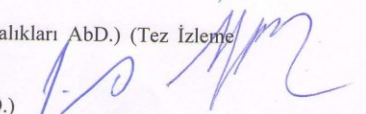
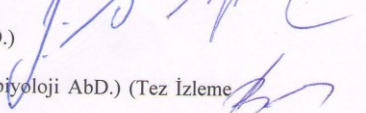
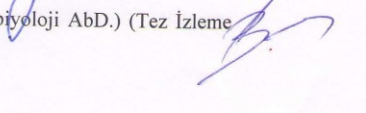


**TEZ ONAYI****TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programında Baran ÇELİK tarafından hazırlanan İstanbul'da sağlıklı ve diareli köpeklerde *Brachyspira pilosicoli* varlığının araştırılması başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

03 / 02 / 2014

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>                                      | <u>İmzası</u>   |
|--|---|
| 1.Prof. Dr. Seyyal AK (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.) (Tez Danışmanı)                    |   |
| 2.Prof. Dr. Banur BOYNUKARA (Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)          |  |
| 3.Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Abd.) (Tez İzleme Komitesi Üyesi) |  |
| 4.Doç. Dr. Serkan İKİZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)                                   |  |
| 5.Doç. Dr. A. Funda BAĞCIGİL (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji 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.

**BARAN ÇELİK**

## İTHAF

Bu tez çalışmamı, yetişmemde sonsuz emek ve özveri sahibi olan aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimiyle bize her zaman yol gösteren, benim için çok değerli olan, sonsuz saygı duyduğum Sayın Prof. Dr. Atilla ILGAZ' a,

Doktora çalışmam süresince tüm sabrı ile değerli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, destekleyen Anabilim Dalı Başkanımız danışman hocam Sayın Prof. Dr. Seyyal AK' a,

Bilgi birikimi ve deneyimi ile araştırmama katkıda bulunan, birçok konuda bilgisini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR' e, tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen, beni hep destekleyen ve yardımcı olan Doç. Dr. Serkan İKİZ' e, Doç. Dr. A. Funda BAĞCIGİL' e, Dr. Kemal METİNER' e, Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a, Dr. Belgi DİREN SİĞİRCİ'ya, Vet. Hek. Z. Seda MAVİLİ, Vet. Hek. Berna GÜMÜŞ, teknisyenimiz Gülten KARAKUZ ve istatistiksel hesaplamalardaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Bülent EKİZ'e, tüm desteği ile her zaman yanımda olan Zeynel Erce KULAKSIZ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 12329

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER .....	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİ
ÖZET .....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Spiroketler ve Brachyspira Cinsi .....	2
2.2. Brachyspira Cinsinin Tarihçesi .....	3
2.3. Etiyoloji.....	5
2.4. Epizootiyoloji.....	5
2.5. Semptom .....	9
2.6. Patogenez .....	10
2.7. Tanı .....	13
2.8. IS enfeksiyonunda tedavi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereç .....	23
3.1.1. Örnekler .....	23
3.1.1.1. Dışkı Örneklerinin Alınması: .....	30
3.1.2. Besiyerleri .....	30
3.1.2.1. Brachyspira Agar .....	30
3.1.2.2. Fastidious Anaerob Agar.....	31
3.1.2.3. Brain Heart Infusion Buyyon .....	31
3.1.3. Biyokimyasal Testler ve Ayıraçlar .....	31
3.1.3.1. Katalaz Testi.....	31

3.1.3.2. Oksidaz Testi.....	32
3.1.3.3. Hippurat Hidrolizi Testi .....	32
3.1.3.4. Ninhidrin Ayırıcı : .....	32
3.1.3.5. İndole Üretimi .....	32
3.1.3.6. APIZYM testi.....	32
3.1.4. <i>B. pilosicoli</i> Referans Suşu (ATCC 51139).....	32
3.1.5. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	32
3.1.5.1. Ekstraksiyon.....	32
3.1.5.2. Amplifikasyon.....	33
3.1.5.3. Agaroz Jelin Hazırlanmasında kullanılan gereçler .....	33
3.1.5.4. Diğer Gereçler.....	34
3.1.6. İstatistik Testleri.....	34
3.2. YÖNTEM .....	34
3.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon .....	34
3.2.1.1. Referans susun Üretilmesi.....	35
3.2.1.2. İndol Üretimi .....	35
3.2.1.3. Hippurat Hidrolizi Testi .....	35
3.2.1.4. APIZYM testi.....	35
3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	36
3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu .....	36
3.2.2.2. DNA Amplifikasyonu .....	36
3.2.2.3. Elektroforetik Separasyon ve DNA ' nın Saptanması.....	37
3.2.2.4. Sonuçların Yorumlanması.....	37
3.2.3. İstatistiki Analiz .....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. İstatistiksel analiz sonuçları .....	41
5. TARTIŞMA .....	42
KAYNAKLAR .....	46
ETİK KURUL KARARI .....	63
TELİF HAKKI İZİNİ.....	64
ÖZGEÇMİŞ .....	65

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2.1 Genel Brachyspira gruplarının fenotipik özellikleri.....	16
Tablo 3.1 Diyare bulunan köpeklere ait örnek bilgileri.....	23
Tablo 3.2 Diyare bulunmayan köpeklere ait örnek bilgileri.....	27
Tablo 4.1 Şüpheli izolatlara ait biyokimyasal aktivite ve enzim aktivite test sonuçları.	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1 B.pilosicoli şüpheli izolata ait mikroskopik görüntü. (Gram boyama, 123 nolu izolat, X1000) .....	38
Şekil 4-2 Referans suşa ait APIZYM test sonuçları .....	39
Şekil 4-3 123 nolu örneğe ait APIZYM test sonuçları .....	40
Şekil 4-4 Örneklerle ait tür-spesifik PCR testi jel elektroforez UV transilluminatör resmi .....	40

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrad derece
µm	Mikrometre
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AIS	Avian intestinal spirochaetosis
ATCC	American Type Culture Collection
BHIB	Brain Heart Infusion buyyon
bp	Base per
DNA	Deoksiribo nukleik asit
DTm	Diffrence between the melting points
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FAA	Fastidious anaerob agar
FCS	Fötal calf serum
FISH	Floresan in-situ hibridizasyon
HIS	Human İntestinal spirochaetosis
IFAT	İndirect flouresan antikor testi
IS	İntestinal spiroketo
KS	Kolonik spiroketo
kob	Koloni oluşturan birim
ml	Mililitre
MLEE	Multilokus enzim elektroforezi
Mm	Milimetre
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PIS	Porcine intestinal spirochaetosis
PCR	Polimerase chain reaction
PFGE	Pulsed field jel elektroforezi
pmol	Pikomol
rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonukleik asit
rpm	Revolutions per minute
rss	16S rRNA geni
TAE Buffer	Tris-acetate-EDTA buffer
TSA	Triptik soya agar
TSB	Triptik soya buyyon
UV	Ultraviolet
% v/v	volume per volume
% w/v	weight per volume
ZBHIS	Zayıf beta hemolitik intestinal spiroket

## ÖZET

Çelik, B. (2014). İstanbul'da sağlıklı ve Diyareli köpeklerde *Brachyspira pilosicoli* varlığının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kolonik spiroketoz (KS) ya da intestinal spiroketoz (İS) insan ve hayvanlarda *Brachyspira pilosicoli* (*B. pilosicoli*) tarafından oluşturulan, kolon ve sekum mukozası epitellerine invazyon sonucu kolit ve diyare gelişimi ile karakterize bir hastalıktır. Dünyanın pek çok ülkesinde *B. pilosicoli* ve oluşturduğu hastalıkla ilgili araştırmalar devam etmektedir. Ülkemizde bu konuda henüz herhangi bir araştırma mevcut değildir ve bu konuda ciddi bir bilgi açığı bulunmaktadır.

Bu çalışmada İstanbul'da pet shoplar ve evde beslenen 96 adet diyareli ve 96 adet sağlıklı köpeğe ait barsak içeriği steril svablar yardımıyla toplandı. Dışkı örneklerinden *Brachyspira* türlerine yönelik selektif anaerob kültür ile etken izolasyonu ve biyokimyasal testler ve PCR ile tür tayini yapıldı. PCR da *B. pilosicoli* spesifik 930 bp' lik DNA bandının varlığına göre pozitiflik saptandı.

Bu çalışmanın sonucu olarak, incelenen 192 intestinal içerikten 10 adetinde spiroketal üreme gözlemlendi. Şüpheli izolatlar uygulanan API ZYM sonucu 10 izolatın *B.pilosicoli* olabileceği belirlendi. Tür-spesifik PCR testi sonucunda 9 izolatın 930 bp'lik DNA bandına sahip olduğu gözlemlendi ve izolatlar *B.pilosicoli* olarak tanımlandı. İstanbul'da *B.pilosicoli*'nin varlığı ortaya konuldu.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda barsaklarda *B.pilosicoli* kolonizasyonunun diyare ile ilişkisi istatistiksel olarak önemli ( $p= 0,01$ ) bulundu.

Ayrıca, etkenin yayılmasında önemli bir risk faktörü olan köpeklerin diğer köpeklerle teması, *B.pilosicoli* kolonizasyonu açısından istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p=0,033$ ). Ancak kolonizasyon ile yaş grupları ve kolonizasyon ile cinsiyet arasında yapılan analizde bu parametrelerin kolonizasyon için önemli olmadığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: köpek, intestinal spiroketoz, *Brachyspira pilosicoli*, izolasyon, PCR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 12329

## ABSTRACT

CELİK, B. (2014). Investigation of the presence of *Brachyspira pilosicoli* in dogs with and without diarrhea in Istanbul. İstanbul University, Institute of Health Science, Microbiology Department. Doktora Tezi. İstanbul.

Colonic spirochaetosis (CS) or intestinal spirochaetosis (IS) is an emerging cause of colitis of humans and animals, characterized by spirochetal attachment and damage to epithelial cells and invasion of the cecal and colonic mucosae. Studies on this disease and about its causative agent are continuing, worldwide. There is no current research on this disease in Turkey and there is an important information missing in this area.

In this study, intestinal contents of 96 healthy dogs and 96 dogs with diarrhoea which were bred in Istanbul at home and pet shops were collected with sterile swabs. Swabs were isolated and identified by selective anaerobic culture, biochemical tests and PCR analysis. The samples with 930 bp bands were defined as *B. pilosicoli*.

As a result; 10 of the 192 intestinal contents which were examined spirochaetal growth were observed. After the biochemical tests were performed, 10 of them suspected as *B. pilosicoli*, and 9 of them positively confirmed by PCR analysis. *B. pilosicoli* presence was revealed in Istanbul.

A statistically significant association between the colonisation of *B. pilosicoli* and the presence of diarrhoea in dogs was demonstrated ( $P = 0.01$ ).

On the other hand, colonisation of *B. pilosicoli* and contact with other dogs which is the important risk factor of *B. pilosicoli* transmission was found statistically significant ( $p=0.033$ ). Although, Relationships between colonisation and age and colonisation and sex; were found statistically insignificant.

Key Words: dog, intestinal spirochaetosis, *Brachyspira pilosicoli*, isolation, PCR

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 12329

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolonik spiroketoz (KS) ya da intestinal spiroketoz (IS) insan ve hayvanlarda *Brachyspira pilosicoli* (*B. pilosicoli*) tarafından oluşturulan, kolon ve sekum mukozası epitellerine invazyon sonucu kolit ve diyare gelişimi ile karakterize bir hastalıktır. Köpeklerde intestinal spiroketozisin ilk kez tanımlanması Turek ve Mayer (1978) tarafından yapılmıştır (Stanton ve ark. 1997).

Etken ile infekte semptomatik köpeklerin genellikle bir yaşından küçük, geçmişlerinde kronik mukoid diyare ve aşırı kondisyon kaybı olduğu bildirilmiştir. Yetişkin köpeklerin ise asemptomatik olabileceği ve bu subklinik taşıyıcıların duyarlı hayvanlara hastalığın bulaşmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir (Duhamel G.E. 2001).

İnsanlarda ise, *B.pilosicoli* enfeksiyonu, genellikle diyare, karın ağrısı rektal kanama gibi gastrointestinal sistem bozuklukları ile karakterizedir. Daha ciddi vakalarda hepatit ve invaziv kolit ile ilişkisi olduğu, ayrıca immun sistemi baskılanmış hastalarda bakteriyemi sonucu kandan izole edildiği bildirilmiştir (Mikosza ve ark. 1999; Bait-Merabet ve ark. 2008).

Dünyada birçok ülkede hastalıkla ilgili araştırmalar devam etmesine rağmen ülkemizde henüz etkenin varlığını ortaya koymak ve prevalans oranları üzerine araştırma mevcut değildir. Bu konuda ciddi bir bilgi açığı bulunmaktadır.

Bu çalışmada köpeklerde *Brachyspira pilosicoli*'nin İstanbul ilindeki varlığının ve prevalansının ortaya konulması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Spiroketler ve *Brachyspira* Cinsi

Spiroketler sarmal kıvrımlı, sporsuz, kendine özgü anatomi ve morfoloji ile karakterize bakterilerdir (Paster ve Dewhirst 2000). Spiroketler, insan ve hayvanların sindirim sistemi, kan dolaşımı, genital ve subgingival dokuların bilinen patojenlerindedir (Paster ve ark. 1991). Gram boyama gibi anilin boyalarının kullanıldığı boyama yöntemleri ile sınırlı bir boyanma yeteneğine sahiptirler, ancak zayıf Gram negatif oldukları bilinmektedir. Karanlık saha ya da faz kontrast mikroskopisinde sarmal morfolojileri ve bükülme-dönme şeklindeki hareketleri ile muhtemel identifikasyonları mümkündür. Spiroketler aerob, mikroaerob, fakültatif anaerob ya da zorunlu anaerob türler içeren, ikiye bölünerek çoğalan ve serbest yaşayan, konakla ilişkili, patojen ya da saprofit mikroorganizmalardır (Holt ve ark. 1994). Birçok spiroket türü kültüre edilememiştir; kalanları ise güç üretilme koşullarına sahiptir (Baranton ve Old 1995).

Bakteriyel evrimin farklı bir dalı olan spiroketler, Spirochaetaceae, Leptospiraceae, Brachyspiraceae ve Brevinemataceae isimli dört familya içermektedir:

1. Spirochaetaceae familyası içinde bulunan bakteriler; 0,1–3 µm çaplı hücrelere sahiptirler. Bakteriler genellikle çengellenmeden sonlanır. Periplazmik flagella genellikle hücrenin orta kısmından bağlanır. Peptidoglikan tabakasının yapısında bulunan diamino asit L-ornitin'dir. Anaerob ya da fakültatif anaerobdurlar. Karbonhidrat ve amino şekerleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Familyada bulunan cinslerden patojen olanlar, *Borellia* ve *Treponema* türleridir. *Borellia* türleri insan ve diğer memeliler ile kanatlılarda vektör kaynaklı hastalıklara neden olur, örneğin Lyme hastalığı. *Treponema* türleri ise ağız boşluğu (dental plak oluşumu) intestinal ve genital dokularda (veneral sifilis) saptanmıştır.

2. Leptospiraceae familyası; genellikle çengel şeklinde sonlanan 0,1–0,3 µm çapta hücrelere sahiptirler. Periplazmik flagella bağlanması gözlenmez. Peptidoglikan tabakasının yapısında bulunan diamino asit, diaminopimelik asittir. Zorunlu anaerob veya mikroaerobdurlar. Uzun zincirli yağ asitlerini ve alkollerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Karbonhidrat ya da amino asitleri kullanmazlar. Patojen türleri duyarlı konaklarda Leptospiroz'a neden olurlar.

3. Brachyspiraceae familyası; *Brachyspira* isimli tek bir cins içermektedir. 0,2–0,4 µm çaplı hücrelere sahiptirler hücreler genellikle küt ya da sivrilerek, çengellenmeden sonlanır. Periplazmik flagella genellikle hücrenin orta kısmından bağlanır. Peptidoglikan tabakasının yapısında bulunan diamino asit L-ornitin'dir. Zorunlu anaerob ve aerotolerandırlar. Monosakkaritleri, disakkaritleri, trisakkaritlerden trehalozu ve amino şekerleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Polisakkaritleri kullanmazlar. Patogen türleri, duyarlı konaklarda intestinal sisteme yerleşerek, bozukluklara yol açar.

4. Brevinemataceae familyası; *Brevinema* isimli tek bir cins içermektedir. 0,2-0,3 / 4-5 µm boyutlarında helikal yapıda hücrelere sahiptir. Mikroorganizmalar bir ya da iki helikal dönüş gösterirler. Mikroaerobdurlar. Laboratuvar fareleri ve Suriye hemstırları için patojendirler (Holt ve ark. 1994).

*Brachyspira* türleri, helikal hücre yapısı ve internal periplazmik flagella, spiroket imza nükleotidlerini temel alan 16S rDNA sekansları, rifampine olan doğal antibiyotik direnci gibi ultrastruktürel hücre özellikleri ile diğer spiroketlerden ayrılırlar (Paster ve ark. 1991; Paster ve Dewhirst 2000).

## 2.2. *Brachyspira* Cinsinin Tarihçesi

Geçtiğimiz yıllarda *Brachyspira* cinsinde bulunan spiroketleri içeren birçok taksonomik değişiklik meydana gelmiştir. “*Traponema hyodysenteriae*” (*T.hyodysenteria*)’nın domuzlarda izole edildiği, hem patojen (kuvvetli hemolitik) hem de apatojen (zayıf hemolitik) suşları içerdiği belirtilmiştir. Miao ve ark. (1978), bu suşlara uyguladıkları DNA-DNA yakınlık reassosiasyon analizi sonucunda patojen ve apatojen suşların arasında % 28 sekans homolojisi bulduklarını bildirmişlerdir. Bu düşük sekans homolojisi sonucunda apatojen suşlar yeni bir tür “*Treponema innosens*” (*T. innocens*) olarak adlandırılmıştır (Kinyon ve Harris 1979). Stanton ve ark. (1991), DNA-DNA yakınlık reassosiation analizi (S1 nukleaz metodu), 16S rDNA sekans analizi, protein elektroforetik profilleri ve genomik DNA restriksiyon endonukleaz analizi sonucunda *T. hyodysenteria* ve *T. innocens*’in *Terponema* cinsinden ayrılarak yeni bir cins, “*Serpula*” olarak isimlendirilmesini önermişlerdir. Ancak bu ismin bir mantar cinsinde kullanıldığından anlaşılmasından sonra cins adı “*Serpulina*” olarak değiştirilmiştir (Stanton T.B. 1992).

İnsan rektal biyopsisinden elde edilen (Hovind-Hougen ve ark. 1982) ve *Brachyspira aalborgi* olarak isimlendirilen mikroorganizma ile *Serpulina* türleri arasında 16S rDNA dizi sekans analizi ile  $\geq 90\%$  benzerlik saptanmış ve sonuçta bu iki cinsin tek bir cins “*Brachyspira*” cinsi altında toplanması önerilmiştir (Ochiai ve ark. 1996). *Brachyspira* ismi ilk kez 1982 yılında insan intestinal izolatu olan *Brachyspira aalborgi* (*B. aalborgi*)’ ye verilmiştir (Hovind-Hougen ve ark. 1982). Lee, Hampson, Lymbery ve ark. (1993), domuzlardan izole edilmiş 90 adet zayıf  $\beta$ -hemolitik intestinal spirokete MLEE (multilokus enzim elektroforezi) analizi uygulamışlar ve bu izolatlardan 56 tanesinin daha önce domuzlardan tanımlanmış olan *B. hyodysenteria* ve *B. innocens*’ den morfolojik, biyokimyasal ve genetik yönden farklı olduğunu belirlemiş ve mikroorganizmaya yeni bir cins ve tür olan *Anguillina coli* (*A. coli*) adını vermişlerdir . DNA-DNA hibridizasyon analizi (Lee, Hampson, Combs ve ark. 1993) ve 16S rDNA (Stanton ve ark. 1996) dizi sekans analizi sonucunda *A. coli*’ nin farklı bir tür olduğu ancak *Serpulina* ve *Anguillina* türleri arasında 16S rDNA homolojisi bulunduğu saptanmış, bakterilerin tek bir cins altında toplanması ve mikroorganizmaya *Serpulina pilosicoli* ismi verilmesi önerilmiştir (Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996). *Serpulina* cinsi *Brachyspira* olarak yeniden tanımlanınca bakterinin ismi bugünkü hali olan “*Brachyspira pilosicoli*” olarak değiştirilmiştir.

*Brachyspira* cinsinde sekiz adet tanımlanmış ve sekiz adet önerilmiş on altı tür vardır. Tanımlanmış türler; *Brachyspira aalborgi* (Hovind-Hougen ve ark. 1982), *Brachyspira pilosicoli* (Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996; Ochiai ve ark. 1996), *Brachyspira alvinipulli* (Stanton ve ark. 1998) , *Brachyspira hyodysenteriae* (Harris, Glock ve ark. 1972; Ochiai ve ark. 1996); *Brachyspira innocens* (Kinyon ve Harris 1979; Ochiai ve ark. 1996), *Brachyspira pulli* (Stephens ve Hampson 2001), *Brachyspira intermedia* (Stanton ve ark. 1997; Hampson ve La 2006) ve *Brachyspira murdochii*’dir (Stanton ve ark. 1997; Hampson ve La 2006).

Önerilmiş ve kabul edilmesi beklenen türler ise; *Brachyspira canis* (Oxberry ve Hampson 2003), *Brachyspira ibaraki* (Tachibana ve ark. 2003), *Brachyspira suanatina* (Råsbäck, Jansson ve ark. 2007), *Brachyspira corvi* (Jansson, Fellstöm ve Johansson 2008), *Brachyspira muridarum* (Backhans ve ark. 2011), *Brachyspira muris* (Backhans ve ark. 2011), *Brachyspira rattus* (Backhans ve ark. 2011) ve *Brachyspira hampsonii* dir (Chander ve ark. 2012).

*Brachyspira pilosicoli* (*B. pilosicoli*) insan ve hayvanlarda intestinal spiroketoza (domuzlarda kolonik spiroketoz olarak adlandırılmaktadır) neden olur. İntestinal spiroketoz (IS) kolon ve sekum mukozası epitellerine spiroketal invazyon sonucu kolit ve diyare gelişimi ile karakterize bir hastalıktır (Duhamel G.E. 2001).

### 2.3. Etiyoloji

*B. pilosicoli* tipik spiroketal morfolojide, gevşek kıvrımlı helikal ya da spiral şekilli, 4 -12 / 0,25 – 0,3 µm boyutlarında, oksidaz pozitif, katalaz negatif, Gram boyalı preparatlarda zayıf Gram negatif görülen bakterilerdir (Bait-Merabet ve ark. 2008). İki ucunda sayıları 4 ile 7 arasında değişen subterminal olarak bağlanmış periplazmik flagellaya sahiptir ve hareketi faz kontrast ya da karanlık saha mikroskopisinde yılanı yüzme ya da dönme şeklinde görünür (Phillips N.D. 2006). Kan içeren katı besi yerlerinde ürediğinde zayıf β-hemoliz oluşturur. Kolonilerin ilk izolasyonda 1 – 1,5 mm çaplı, kenarları düzensiz, mukoid, gri, şeffaf; ya da 1 mm'den küçük çapta, konveks, gri, şeffaf yapıda iki farklı tipte görülebileceği bildirilmiştir (Trivett-Moore ve ark. 1998). Pasajlarda ise düz, film şeridi şeklinde yaygın üremeler görülebildiği belirtilmiştir (Barrett S.P. 1990). Anaerob atmosferde 37 °C ve 42 °C üreme özelliğine sahiptir (Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996). Hippurat hidrolizi ve alfa-galaktozidaz aktivitesi pozitif, indol, beta-glukozidaz ve alfa-glukozidaz aktiviteleri negatif olarak saptanmıştır (Phillips N.D. 2006).

*B.pilosicoli* tetrasiklin, klindamisin ve amoksisiline dirençlidir. Amoksisilin-klavulonik asit kompleksine duyarlı olması amoksisiline karşı direncinde β-laktamazlarla ilişkisine delil olabileceği öne sürülmüştür (Phillips N.D. 2006).

### 2.4. Epizootiyoloji

Son yıllarda araştırma tekniklerinde gerçekleştirilen ilerlemeler intestinal spiroketoz hastalığının etkeni olan *B. pilosicoli*'nin patojen olduğu konak türlerini arttırmıştır. *B.pilosicoli*; insan (Ruane ve ark. 1989; Mikosza ve ark. 1999), primatlar (Takeuchi ve ark. 1974; Cowley ve Hill 1985), domuzlar (Duhamel, Muniappa, Gardner ve ark. 1995), köpekler (Duhamel ve ark. 1997; Turek ve Meyer 1978), keseli sığan (Turek ve Meyer 1979) tavuklar ve av kuşlarının da (Swayne ve McLaren 1997) dâhil olduğu geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir.

Etkenin bilinen ilk konaklarından biri olan domuzlarda, kolonik spiroketoz, büyüme geriliğine sebep olması nedeniyle, ekonomik olarak performans kaybına yol

açtığı için domuz endüstrisinde önemli bir hastalık olarak değerlendirilmektedir (Stephens ve Hampson 2001). Subklinik olarak infekte olabilen fare ve keseli sıçan haricinde IS mukoid diyare ve genç hayvanlarda zayıflamaya yol açar. Dünya genelinde immun sistemi baskılanmış hastalarda ve gelişmekte olan ülkelerde insanda prevalansın yüksek olması, IS hastalığının insanlarda gelişmekte olan bir infeksiyon olduğunu düşündürmektedir. İnsanlardan ve hayvanlardan izole edilen *B.pilosicoli* suşları yapısal, biyokimyasal ve genetik karakteristikleri bakımından benzerdir (Lee ve Hampson 1994; Muniappa ve Duhamel 1997; Trott, Atyeo ve ark. 1996). Türler arası bulaşmanın varlığı çeşitli çalışmalarla domuz, tavuk ve laboratuvar farelerine inokule edilen insan, domuz, köpek ve kuş izolatları ile kanıtlanmıştır (Muniappa ve ark. 1997; Trott, Huxtable ve ark. 1996; Trott ve Hampson 1998). Buna ek olarak aynı toplulukta yaşayan insan ve köpeklerden izole edilen *B.pilosicoli* suşlarının aynı genetik parmak izine sahip olduğu gösterilmiştir (Trott ve ark. 1998). Bu bulgulara dayanılarak insanlar ile hayvanlar arasında zoonotik bulaşmanın varlığı olası gözükmektedir. Keseli sıçan ve kuşlardan izole edilen bakterinin insanlarda infeksiyona yol açması bu hayvanların hastalığın doğal rezervuarları olabileceğini düşündürmektedir.

Kolit oluşumunda *B.pilosicoli*'nin rolü hakkında çeşitli hayvan modelleri ile yeni bulgular ortaya konmuştur. IS farklı hayvan türlerinde ve insanlarda patogenez mekanizması benzer gözükmektedir. Ancak *B.pilosicoli*'nin neden olduğu hastalıkta konak ve kalın barsak mikroçevresi arasında ki ilişki tam olarak aydınlatılmamıştır (Duhamel G.E. 2001).

*Brachispira* türlerinin yayılmasında en önemli kaynağın taşıyıcı domuzlar olduğu, bununla birlikte etkenin fareler, sıçanlar, köpekler ve kediler tarafından da bulaştırılabildiği bildirilmiştir (Fellström ve Holmgren 2005; Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996). Son yıllarda yaban ördeklerinin de bulaşmada rol oynayabileceğinin düşünüldüğü vurgulanmıştır (Råsbäck ve ark. 2005). Ayrıca dışkıyla kontamine ulaşım araçları, giysiler, çiftlik ekipmanları, toprak, durgun sular ya da barınakların da bakterinin bulaşmasında önemli rol oynadığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (Chia ve Taylor 1978; Olson L.D. 1995; Boye ve ark. 2001).

*B. pilosicoli* köpek ve kedilerden izole edilmiş ve yavru köpeklerde diyare oluşturabileceği saptanmıştır (Duhamel G.E. 2001). Etkenin domuzlar arasında bulaşması dışkıyla kontamine su ya da gıdaların alınması ile feko-oral yolla gerçekleştiği bildirilmiştir (Phillips N.D. 2006). Vertikal yolla bulaşma, infekte dişi

domuzlardan yavrularına doğumun hemen ardından saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, etkeni taşıyan ve antibiyotik tedavisi uygulanmayan domuzların iyileştikten sonra etkeni 70 güne kadar saçmaya devam ettikleri bildirilmiştir (Neef ve ark. 1994).

Köpeklerde intestinal örneklerde spiroketlerin varlığı neredeyse bir asırdır bilinmektedir; ancak hastalıklarla ilişkisi yakın zamana kadar tartışmalı durumdadır. Çünkü intestinal spiroketlerin varlığı hem sağlıklı köpeklerin dışkısında (Macfie J.W.S. 1916; Pindak ve ark. 1995) ve kolon biyopsi örneklerinde (Leach ve ark. 1973) hem de diyareli köpeklerin dışkısında (Craigie J.E. 1948; Kinyon ve Harris 1979) varlığı gösterilmiştir. Tanıda kullanılan moleküler tekniklerin gelişmesi doğrultusunda zayıf  $\beta$ -hemolizli intestinal spiroketler sağlıklı köpeklerden çok diyareli köpeklerde bulunmaya başlanmıştır (Lee ve Hampson 1996). Ancak bir başka çalışmada spiroketler sadece sağlıklı hayvanların dışkısında bulunmuştur (Weber ve Schramm 1989). Kataral enterit ile ilişkili iki köpek spiroket suşunun köpek yavrularına oral yolla inokulasyonunun ardından (Kinyon ve Harris 1979) klinik bulgu ve lezyon oluşturmaması; bu bakterilerin kommensal mikroorganizmalar olduğunu düşündürmüştür (Kinyon ve Harris 1979). Moleküler metodlar ile sağlıklı köpeklerden izole edilen spiroketlerin *B. innocens* veya *B. murdochii* (Stanton ve ark. 1997) gibi apatojen kommensal etkenler olduğu intestinal spiroketozlu hayvanlardan izole edilen etkenlerin ise *B. pilosicoli* olduğu 90'lı yılların ortasında (Duhamel, Muniappa, Mathiesen ve ark. 1995; Duhamel ve ark. 1998) bildirilmiştir. Sağlıklı köpeklerden izole edilen spiroketlerin yeni bir tür *B.canis* şeklinde adlandırılması önerilmiştir (Duhamel ve ark. 1998).

İnsanlarda *B. pilosicoli* prevalans yüksekliğinin özellikle gelişmekte olan ülkelerde (Trott, Jensen ve ark. 1997) ya da gelişmiş ülkelerde AIDS hastalarında ve homoseksüel erkeklerde saptandığı bildirilmiştir (Boye ve ark. 2001).

Etkenin dayanıklılığını saptamak amacıyla laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen deneysel bir çalışmada, 10 °C de saf toprakta etkenin 119 gün, 10/90 oranında dışkı toprak karışımında ve saf domuz dışkısında çok sayıda bakterinin ( $>10^9$  kob/ml) 210 gün canlı kaldığı ve kültüre edilebildiği saptanmış; topraktan direkt DNA saptanmasına yönelik yapılan PCR testi ile 330 gün sonra bile bakteriyel DNA'nın saptanabildiği bildirilmiştir (Boye ve ark. 2001).

Oxberry ve ark. (1998), yaptıkları bir deneysel çalışmada, su kuşlarının bulunduğu bir hayvanat bahçesinin göl suyunda ise 4 C°de 66 gün, 25 C°de 4 gün

yaşamını sürdürdüğünü saptamışlardır. Aynı çalışmada, izole edilen bir suş ile (Wes B) inokule edilen suyu içen gönüllü, sağlıklı bir insanda etkenin uzun süren bir inkübasyon periyodunun ardından kalın barsaklara kolonize olduğu, gönüllüde karın ağrısı ve baş ağrısı gibi semptomların görüldüğü bildirilmiştir. Laboratuvar ortamları dışında da bu etkenin benzer sürelerde infektivitesini korumasının, hayvanlar ve insanlar açısından infeksiyonun bulaşması yönünden risk oluşturabileceğine dikkat çekilmiştir.

Geniş konakçı spesifitesine sahip *B. pilosicoli*' nin türler arası bulaşma potansiyeli tanımlanmış ve bütün konakçı türlerinde tipik lezyonlara neden olduğu saptanmıştır (Trott ve ark. 1995).

Verlinden ve ark. (2012), 2009-2010 yılları arasında Belçika'da 11 ayrı süpermarketten topladıkları 110 dondurulmuş tavuk karkasında *Brachyspira* türlerinin varlığını araştırmışlardır. İnceledikleri tavuk karkaslarının %59'undan *Brachyspira* türlerini izole etmişler, identifikasyon amacıyla yaptıkları tür-spesifik PCR analizi sonucunda 10 karkasta *B.pilosicoli* varlığını saptadıklarını bildirmişlerdir. *Brachyspira* türlerinin kanatlıların barsaklarında sınırlı olduğu bilgisine göre, karkas kontaminasyonunun Kampilobakterlerde olduğu gibi kesimhanede fekal karkas kontaminasyonu şeklinde gerçekleştiğini düşündüklerini vurgulamışlardır.

Etkenin prevalansı ile ilgili dünyada birçok çalışma yapılmış, domuz sürülerinden *B.pilosicoli* prevalansı Brezilya'da %7,3 (Barcellos, Mathiesen ve ark. 2000), Danimarka'da %19 (Stegge ve ark. 2000), Macaristan'da %28,4 (Biksi ve ark. 2007), İsveç %6,3 (Jacobson ve ark. 2005), İngiltere'de %36,2 (Thomson ve ark. 2001) olarak belirlenmiştir.

Köpeklerde yapılan çalışmalarda *B.pilosicoli* prevalansı Papua Yeni Gine'de % 5,3 (Trott ve ark. 1997), İsveç'te %12 (Fellström, Petterson ve ark. 2001). Batı Avustralya'da % 14,2 (Oxberry ve Hampson 2003)., Hindistan'da %0,9 olarak saptanmıştır (Munshi ve ark. 2003).

Hidalgo ve ark. (2010) intestinal spiroketlerin köpeklerdeki prevalansını ve diyare ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında 311 köpekten dışkı örnekleri toplamış ve *B.pilosicoli* prevalansını %4,8 olarak bildirmişlerdir. *B.pilosicoli* kolonizasyonu ile diyare ilişkisini ise istatistiki olarak anlamlı bulmuşlardır ( $P < 0.001$ ). Aynı çalışmada fekal saçılma ve kolonizasyonun 1 yaş ve altı hayvanlarda erişkin hayvanlara göre 5 katı fazla olduğu bildirilmiştir.

Oxberry ve Hampson (2003) köpeklerde prevalansı kültürde %40,8; kültürlerle uyguladıkları PCR ile %14,2 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Türkiye’de etkenin prevalansı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

## 2.5. Semptom

*B.pilosicoli* tarafından oluşturulan intestinal spiroketoz, insan ve patojen olduğu bütün hayvanlarda; olgun kolonik epitellere apikal membrandan çok sayıda spiroketin bağlanması ile karakterizedir. Spiroketlerin rektum, kolon ya da sekum epiteline bağlanması sonucu, biyopsi örneklerinin hematoksilen-eozin ile boyanan preparatlarının incelenmesinde barsak lümeninde hücrelerin yüzeyinde açık mavi bir sınır şeklinde gözlenirler ve bu görüntü histopatologlar tarafından “sahte fırça sınırı” (False brush border) olarak tanımlanmaktadır (Harland ve Lee 1967, La ve Hampson 2001) ve hastalığın bütün konaklarda patognomik bulgusudur (Duhamel, Muniappa, Gardner ve ark. 1995).

Köpeklerde intestinal spiroketozisin ilk kez tanımlanması Turek ve Mayer (1978) tarafından yapılmıştır, ancak *B. pilosicoli* ile hastalık arasındaki bağlantı 90’lı yıllara kadar kesin olarak kurulamamıştır (Duhamel ve ark. 1996; 1998). *B.pilosicoli* ile infekte semptomatik köpeklerin genellikle bir yaşından küçük, geçmişlerinde kronik mukoid diyare ve aşırı kondisyon kaybı olduğu bildirilmiştir. Yetişkin köpeklerin ise asemptomatik olabileceği ve bu subklinik taşıyıcıların duyarlı havanlara etkenin bulaşmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir (Duhamel G.E. 2001). Semptomatik köpeklerde, diyare kronik mukoid yada muko-hemorajik diyare gözlenebilen tek bulgudur (Oxberry ve Hampson 2003).

Domuzlarda; hastalık domuz intestinal spiroketozu (porcine intestinal spirochaetosis- PIS), domuz kolonik spiroketoz ya da spiroketal diyare olarak isimlendirilmektedir. Özellikle, 4-20 haftalık yaştaki domuzların infeksiyondan daha çok etkilendiği gözlenmiştir. Hastalık orta şiddetli, persiste mukoid diyare ile karakterizedir. Ancak bu klinik bulgular teşhis için yeterli değildir. Rektal ısıda artış, yem alımında azalma, anoreksi, yemden yararlanmada düşüş, kondisyon kaybı ve büyümede gerileme gözlenir (Stephens ve Hampson, 2001).

İnsanlarda; klinik olarak, insan intestinal spiroketozu (human intestinal spirochaetosis- HIS) ilk kez Harland ve Lee tarafından 1967 yılında tanımlanmıştır. İnfeksiyon, asemptomatik (normal kolonik mukoza), psödoapendit, kanlı, mukoid yada

sulu karakterde olabilen kronik diyare, rektal kanama ve kolit gibi çeşitli alt gastrointestinal sistem semptomları ile karakterizedir. Daha ciddi vakalarda hepatit ve invaziv kolit ile ilişkisi olduğu da bildirilmiştir. Histopatolojik olarak bakteri kolon kanseri, metaplastik polip, hemoroid, kronik ülseratif kolit ve Chron's hastalığı ile birlikte gözlenmiştir ancak bu hastalıkların patogenezindeki rolü bilinmemektedir. Ayrıca immun sistemi baskılanmış hastalarda bakteriyemi sonucu kandan izole edildiği bildirilmiştir (Brooke ve ark. 2000, Mikosza ve Hampson, 2001, Stephens ve Hampson, 2001). İnsanlarda *B. pilosicoli* prevalans yüksekliğinin özellikle gelişmekte olan ülke topluluklarında (Trott, Jensen ve ark. 1997) ya da gelişmiş ülkelerde AIDS hastalarında ve homoseksüel erkeklerde saptandığı bildirilmiştir (Boye ve ark. 2001).

İntestinal spiroket infeksiyonları yumurtacı ve etçi tavuklarda avian intestinal spiroketoz (AIS) olarak tanımlanan klinik tabloya neden olduğu rapor edilmiştir (Swayne ve McLaren, 1997). AIS yetişkin kuşlarda diyare ve / veya gıda maddelerinin malabsorbsiyonu, büyüme hızında düşme, fekal içerikte sıvı artışına bağlı olarak sulu dışkı, yumurta kabuğunda dışkı bulaşması, dışkıda yağ miktarının artışı, yumurtlamaya geçişte gerileme, yumurtlamada gecikme, yumurta veriminde düşüş, mortalitede artış ve yemden yararlanmada azalma gibi çeşitli non-spesifik klinik bulgularla ve üretim problemleri ile kendini gösterir (Hampson, Stephens ve ark. 2006; Bano ve ark. 2008). Diyare yumurtalarda dışkı ile bulaşmaya, kafes kirliliğine, kötü kokuya ve sineklerin çekilmesine sebep olur. Klinik bulgular teşhise yardımcı değildir (Stephens ve Hampson, 2001).

## 2.6. Patogenez

Spiroketlerin mütine olan kemotaksisi IS patogenezinde ilk basamak olarak gözükmektedir çünkü spiroketler viskoz ortamlarda yüksek hareket kapasitesine sahiptir (Charon ve ark. 2012) ve musin yapısında bulunan glikoproteinlerin *B. pilosicoli*'nin büyüme ve kemotaksisi üzerine substrat görevi yaptığı bilinmektedir (Trott, Stanton, Jensen, Duhamel ve ark. 1996 ;Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996). *B. pilosicoli* enterositlerin apikal membranlarına bağlanarak mikrovilluslarda emilimin bozulmasına ya da mikrovillus kaybına yol açar. Musin kemotaksisi ile düzenlenen hareketlilik, spiroketlerin mukozal epitelin yakınına subepitelyal tabakası içine bağlanma ve penetrasyonu için olanak sağlayabileceği düşünülmektedir (Taylor ve ark. 1980; Trott, Huxtable ve ark. 1996; Trivett-Moore ve ark. 1998).

*B. pilosicoli*'nin apikal membranda bulunan enterositlere paralel diziler halinde polar bağlanması mikrovilluslarda görevsel bozukluklara ya da oluşturduğu hasar sonucu kayba yol açabilir. Bu dizilerin, tek tek spiroketlerin bağlanması sonucunda ya da replikasyon esnasında gelişip gelişmediği açık değildir. Kültüre edilmiş hücreler ile hayvan modellerini karşılaştıran çalışmalar, epitelyal hücreye tutunması için, spesifik spiroket ligandı (adhesin) ve ev sahibi hücre reseptörü arasındaki etkileşimin gerektiğini düşündürmektedir (Muniappa ve ark. 1996; Muniappa ve ark. 1997).

*B. pilosicoli*'nin enterositlere bağlanması fırça sınır ile sınırlı değildir, İS bulunan insan (Takeuchi ve ark. 1974), domuz (Duhamel ve ark. 1997) ve köpeklerde (Duhamel ve ark. 1996) kalın bağırsak lamina propria'sına da bağlanma görüldüğü bildirilmiştir. *B. pilosicoli*'nin hücrelere bağlanması üzerinde yapılan araştırmalarda ekstraselüler matrikse bağlanmasının Lyme hastalığının etkeni olan *Borrelia burgdorferi*'nin dekorin-bağlayan adezin proteinlerinden farklı olduğu bulunmuştur (Phillips N.D. 2006).

*B. pilosicoli* infeksiyonunun yol açtığı ultrastrüktürel değişimler *Escherichia coli* gibi enterik patojenlerden çok (Moon ve ark. 1983) *Helicobacter pylori* infeksiyonlarının (Noach ve ark. 1994) gastrik epitellerde yarattığı değişimlere benzetilmektedir. *B. pilosicoli* kriptler arasındaki ekstrüzyon zonunda epitellere penetre olur ve hasara yol açar. İnvazyon faktörleri bilinmese de, *B. pilosicoli* tarafından oluşturulan epitelyal penetrasyon enterositler arasında (parasitosis) meydana gelmektedir. Spiroketler sık sık enterositler arasındaki interselüler kavşaklara bağlanmış görülür (Muniappa ve ark. 1996), *B. pilosicoli* bir dış membran serin proteazı ile (Muniappa ve Duhamel 1997) hücrelerarası kavşakların ayrışması ve epitel tabakasına penetrasyona yol açıyor olabileceği bildirilmiştir. *B. pilosicoli* tarafından epitel hücreleri arası köprülerde bozulma ve parasitosis mekanizması ile mukozal penetrasyon oluşumu patogenezinin, *H. pylori*'ye benzer olabileceğini düşündürmektedir (Noach ve ark. 1994).

*B. pilosicoli* insanlarda (Takeuchi ve ark. 1974; Gebbers ve ark. 1987; White ve ark., 1994; Padmanabhan ve ark. 1996), insan-olmayan primatlarda (Takeuchi ve ark. 1974), domuzlarda (Taylor ve ark. 1980), köpeklerde (Duhamel ve ark. 1996; Duhamel G.E. 1997); oppsumlarda (keseli sıçan) (Turek ve Meyer 1979; Duhamel ve ark. 1997) ve doğal olarak ya da deneysel olarak infekte olmuş tavuklarda (Muniappa ve ark. 1996;

Muniappa ve ark. 1997; Jensen ve ark. 2000) epitel hücrelerine translokasyonu sonucu hücreyi boyunca geçtikten sonra, lamina propriya'nın bağlayıcı dokuları arasında ekstraselüler olarak yayıldığı ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek submukozal kılcal damarlara geçtiği belirlenmiştir.

Bu gözlemler *B. pilosicoli*'nin domuzların lenf nodüllerinden sıklıkla izolasyonu ve ölümcül hasta insanlardan kandan izolasyonu (Trott, Jensen ve ark. 1997) ile tutarlıdır ve translokasyonun IS oluşumunda önemli bir özellik olabileceği düşünülmektedir. Epitel hücrelerinde bağlanma sonrasında *B. pilosicoli* sekum ve kolonda kript lümenlerinde ve intraselüler goblet hücreleri içinde ki varlığı belirlenmiştir (Jensen ve ark. 2000).

Diyare oluşumu kalın barsaklarda yoğun spiroketal bağlanma sonucunda absorpsiyonun bozulmasına bağlanmaktadır. Kript sayısında azalma, sekum ve kolon lamina propriyasında yangıya ve konak hücrenin spesifik amino şekerleri absorpsiyonunun bozulmasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Duhamel G.E. 2001).

Son dönemlerde araştırma metodlarında yaşanan gelişmeler *B. pilosicoli*'nin artan sayıda konakçıda majör bir patojen olarak tanınmasına yol açmıştır. Subklinik olarak infekte olabilen fare ve keseli sıçanlar haricinde IS mukoid diyare ve genç hayvanlarda zayıflamaya yol açar. IS büyümekte olan domuzlarda performans kaybına yol açtığı için domuz endistürisinde önemli bir hastalıktır. Dünya genelinde immün sistemi baskılanmış hastalarda (Jones ve ark. 1986; Lee ve Hampson 1994; Trott, Combs ve ark. 1997; Trott ve ark. 1998; Trivett-Moore ve ark. 1998) ve gelişmekte olan ülkelerde insanlarda prevalansının yüksekliği IS'in gelişmekte olan bir problem olduğunu ortaya koymaktadır. İnsanlardan ve hayvanlardan izole edilen *B. pilosicoli* suşları (Lee ve Hampson 1994; Duhamel, Muniappa, Mathiesen ve ark. 1995; Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996; Fisher ve ark. 1997; Muniappa ve Duhamel 1997) yapısal, biyokimyasal ve genetik olarak benzerdir. Türler arası bulaşma domuzlar, tavuklar ve laboratuvar hayvanlarına insan, domuz, köpek, maymun ve kuş (Muniappa ve ark. 1996 ve 1997; Trott, Huxtable ve ark. 1996; Trott ve Hampson 1998) izolatlarının inokule edilebilmesi ile gösterilmiştir.

Ek olarak, aynı toplulukta yaşayan insan ve hayvanlardan izole edilen *B. pilosicoli* izolatlarının aynı genetik parmakizini taşıdığı gösterilmiştir (Trott ve ark. 1998). Bu nedenlerle insanlarla hayvanlar arasında zoonotik bulaşmanın olası olduğu

düşünülmektedir. Keseli sıçan ve vahşi kuşlardan toplanan bakterilerin insanlarda IS'e neden olabilmesi bu hayvanların hastalığın doğal rezervuarları olabileceğini düşündürmektedir.

Kolit patogenezinde *B. pilosicoli*'nin rolü hakkında çeşitli hayvan modellerinden yararlanılarak yeni bulgular ortaya konmaktadır. IS farklı hayvan türlerinde ve insanlarda patogeneze mekanizması aynı gözükmemektedir. Ancak, *B. pilosicoli* neden olduğu hastalıkta konak ve kalın barsak mikroçevresi arasındaki etkileşim tam olarak aydınlatılmış değildir.

Hızla gelişmekte olan moleküler araçlar sayesinde IS'in patogenetik mekanizmaları ile ilişkili konak faktörleri ve *B. pilosicoli* virülens belirleyicileri hakkında anlayışımızın artması muhtemeldir. *B. pilosicoli*'nin kalın barsaklara kolonizasyonu, intestinal mukozaya bağlanma ve invazyonu, ve ekstraintestinal bölgelere translokasyonu gibi patogenezinin önemli yönleri tam olarak anlaşılamamıştır.

*B.pilosicoli*'nin virülens faktörleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak intestinal dokuya yoğun bağlanma sonucu mikrovilluslara zarar vererek intestinal absorpsiyon sürecini kesintiye uğratarak diyareye neden olabileceği düşünülmektedir (Duhamel G.E. 2001).

## 2.7. Tanı

*Brachyspira* türleri genellikle 4-12 µm uzunluğunda ve 0,25-0,3 µm eninde, her iki ucunda 4-7 periplazmik flagellaya sahiptir; hücrenin ucu konikleşerek sonlanır (Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996; Trott, Stanton, Jensen, Duhamel ve ark. 1996; Lee ve Hampson, 1994). Biyokimyasal olarak diğer *Brachyspira* türlerinden hippurat hidrolizi aktivitesi ve alfa-galaktosidaz aktivitesine sahip olması ve indol üretimi, alfa-glukosidaz ve beta-glukosidaz aktivitelerine sahip olmaması ile ayrılır (Fellström ve Gunnarson 1995). Son dönemlerde hippurat hidrolizi negatif izolatların bulunduğu rapor edilmektedir (De Smet ve ark. 1998; Thomson ve ark. 2001). Genel olarak *B.pilosicoli* indol üretmemektedir, ancak indol pozitif suşların varlığı bilinmektedir (Tompkins ve ark. 1986, Lee ve Hampson 1992). Hemolizin enzimini kodlayan *hlyA* genine sahiptir (Hsu ve ark. 2001), ancak bu gen ya eksprese edilmemekte, ya da azalmış bir hemoliz aktivitesine yol açacak şekilde eksprese edilmekte olduğu düşünülmektedir (Zuerner ve ark. 2004).

Farklı *Brachyspira* türlerine ait üreme özellikleri ve ihtiyaçları tam olarak bilinmemektedir. *Brachyspira* türleri kanlı besiyerlerinde üremek için 3-14 güne ihtiyaç duyan oksijen-toleran anaeroblardır. *Brachyspira* türlerinin anaerob olarak hazırlanmış sıvı besiyerlerinde az miktarda ( %1 v/v) oksijen bulunmazsa üremelerinin negatif yönde etkilendiği bildirilmiştir (Stanton ve Lebo 1988).

*Brachyspira* türlerinin üretimi için ilk sıvı besiyeri Kinyon ve Harris tarafından (1974) dizayn edilen % 10 v/v fetal buzağı serumu (FBS) katkılı Triptikaz soya brothdur (TSB) (Kinyon ve Harris 1974). 37 °C' de H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> içeren atmosferde inkübe edilmektedir. Lemke ve Burrows (1979) yılında gaz kompozisyonunu modifiye ederek H<sub>2</sub> yerine N<sub>2</sub> kullanmış, ve %0,001 rezazürin boyasını anaerob indikatör olarak eklemiştir. Buyyon otoklavlandıktan sonra, içerisine %1 steril tavşan serumu, % 0,4 sistein hidroklorid, % 0,25 glukoz, % 0,05 NaHCO<sub>3</sub> ve 400 µg/ml spektinomycin eklemiştir. Kunkle ve ark. ise (1986) yaptıkları modifikasyonlar sonucu TSB, % 2 FBS, % 1 yeast ekstrakt, % 0,5 glukoz, % 0,02 Na HCO<sub>3</sub>, % 0,05 sistein hidroklorid veya % 1,5 etanolik kolestrol ya da %5 domuz fekal ekstraktından birini içeren ve Kunkle's medium olarak isimlendirilen besiyerini kullanmışlardır. Bu besiyerinin avantajı bütün malzemeler eklendikten sonra otoklavlanması ve bu sayede sterilitenin daha kolay elde edilmesidir. Kullanılan bir diğer sıvı besiyeri ise %10 FCS, %0,1 rezazürin ve % 0,1 sistein hidroklorid içeren Brain Heart Infusion buyyon'dur (BHIB) (Stanton ve Cornell 1987; Stanton ve Lebo 1988). *Brachyspira* türleri genellikle %1 O<sub>2</sub> içeren anaerob atmosferde inkübe edilirler, hatta bazı türlerin %7 O<sub>2</sub> kadar oksijeni tolere ettiği bildirilmiştir (Trott, Stanton, Jensen, Hampson ve ark. 1996; Trott, Stanton, Jensen, Duhamel ve ark. 1996).

Klinik örneklerden izolasyon için, diğer bakterilerin üremesini inhibe eden özgün selektif besiyerlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *Brachyspira* türlerinin kültür metodu için kullanılan en eski teknikler seri sulandırmaları ya da 0,45 µm por çapına sahip filtrelerden süzülme içerdiği bildirilmiştir (Harris ve Kinyon 1972; Kinyon ve Harris 1979). Örneklerin defibrine sığır ya da koyun kanlı Nutrient Agar besiyerine ekilerek 37 - 42 °C' ler arasında anaerob atmosferik koşullarda 3 gün inkübe edildiği belirtilmiştir.

Dizayn edilen ilk selektif besiyeri, Songer ve arkadaşları (1978) tarafından oluşturulan %5 defibrine koyun, sığır ya da at kanı ve 400 µg/ml spektinomisin içeren TSB'dir. Ne yazık ki spektinomisin katkısı bazı yarışmacı bakterileri engellemiş ancak

birçok kontaminantı engellemeyi başaramayarak spiroketler için değerli olan gıda maddelerini tükenmesine neden olmuştur. Ardından Blood Agar Base No:2 veya Triptik soya agar (TSA) temelli, çeşitli antibiyotikleri içeren selektif besi yerleri dizayn edilmiştir. Bunlar; S400 (spectinomycin), CVS (colistin, vancomysin, spectiomysin), BJ (colistin, vancomysin, spectiomysin, rifampin, domuz fekal ekstraktı), BAM-SR (rifampin, spectinomysin) besiyerleridir. *B.pilosicoli* rifampinin besiyerlerine eklenen 50µg/ml dozuna duyarlıdır. Bu nedenle, *B.pilosicoli* izolasyonu amaçlandığında besiyerine bu antibiyotiğin daha az konsantrasyonda katılması (15 µg/ml) ya da bu antibiyotiği içermeyen bir besiyeri seçilmesi önerilmektedir (Kunkle ve Kinyon, 1988; Achacha ve Messier 1992; Calderero ve ark. 2005; Phillips N.D. 2006).

İntestinal spiroketlerin izolasyonu için kullanılan en yaygın metod fekal svab ya da kolon/sekum epitel sürüntüsünün selektif besi yerlerinin yüzeyine sürülmesidir. İlk ekim hattından steril bir öze yardımıyla alınan örnek agara yayılır ve yüzeye batırılır. Yüzeye batırma sonucu β-hemolizin kuvvetlendiği bildirilmiştir (Muniappa ve ark. 1997). Kan içeren besiyerinde spiroketal üremenin agar yüzeyinde film şeklinde yaygın bir bulanıklık olarak görüldüğü ancak nadiren de olsa koloni gözlenebildiği (Hudson ve ark. 1976), koloni formasyonunun Fastidious anaerob agar (FAA) kullanımı ile artırılabilineceği bildirilmiştir (Muniappa ve ark. 1997).

Calderaro ve ark. (2005) yaptıkları çalışmalarla, geliştirdikleri ön zenginleştirme metodu ile *B.hyodysenteriae* ve *B.pilosicoli*'nin ilk ekimlerde 48 saat içinde izole edilebildiğini, ve bu metodun hızlı ve güvenilir bir metod olduğunu bildirmişlerdir (Calderaro ve ark. 2001; Calderaro ve ark. 2005). İzolasyon için bildirilen inkübasyon ısıları 36 °C, 37 °C, 38,5 °C, 39 °C ve 42 °C'lerdir. İnkübasyon için genellikle %5-10 CO<sub>2</sub> ile N<sub>2</sub> ve/veya H<sub>2</sub> içeren anaerob atmosfer koşulları kullanıldığı belirtilmiştir (Lee ve Hampson 1992; Trott, Jensen ve ark 1997; Trott ve Hampson 1998).

İntestinal spiroketler Gram boyama ile iyi görüntülenemeseler de Gram negatif olarak kabul edilirler. Rutinde dışkı ya da sıvı kültürlerde karanlık saha ya da faz kontrast mikroskopisi ile 400 büyütmede gözlenirler. Spiroketlerin rektum, kolon ya da sekum epiteline bağlanması sonucu, biyopsi örneklerinin hematoksilen-eozin ile boyanan preparatlarının incelenmesinde barsak lümeninde hücrelerin yüzeyinde açık mavi bir sınır şeklinde gözlenirler ve bu görüntü histopatologlar tarafından "sahte fırça sınırı (False brush border) olarak tanımlanmaktadır (La ve Hampson 2001). Ayrıca

gümüş boyaması spiroketlerde sıklıkla kullanılmakta ve bu bakterileri diğer barsak bakterilerinden ayırmaya yarayan bir boyama metodu olarak bildirilmektedir (Faine S. 1965).

*Brachyspira* türlerinin ayırımında kullanılan birçok kilit biyokimyasal özellik vardır. Bu özellikler; indol üretimi, hippurat hidrolizi,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\alpha$ -glukosidaz ve  $\beta$ -glukosidaz aktivitesidir. İndol üretimi, *B.intermedia* ve *B.hyodysenteriae* için karakteristik bir testtir. Ancak, indol negatif *B.hyodysenteriae* ve indol pozitif *B.pilosicoli* suşlarının varlığı rapor edilmiştir. Hippurat hidrolizi *B.pilosicoli* ve *B.alvinipulli* için karakteristik bir testtir ancak, hippurat hidrolizi negatif *B.pilosicoli* suşlarının varlığı bilinmektedir (Fossi ve ark. 2004; Fossi ve ark. 2005).

API-ZYM ticari olarak satılan 19 enzimin aktivitesini belirleyen bir kittir. Bir test kiti ile Alkalın fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukosidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukosaminidaz,  $\alpha$ -mannosidaz,  $\alpha$ -fukosidaz enzim aktivitelerinin varlığı değerlendirilir. Ancak, test sonuçlarının zayıf  $\beta$ -hemolitik intestinal spiroketler için tutarsız olabileceği bilinmektedir (De Smet ve ark. 1998). *Brachyspira* cinsi içinde birçok tür;  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\alpha$ -glukosidaz ve  $\beta$ -glukosidaz aktiviteleri değerlendirilerek ayırlabilir ve bu testlerin tür ayırımında daha tutarlı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (Fellström ve Gunnarson 1995).

Fellström ve Gunnarson (1995) yaptıkları çalışmada, zayıf  $\beta$ -hemolitik intestinal spiroketleri  $\beta$ -hemolizin derecesi, indol üretimi, hippurat hidrolizi,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase ve  $\beta$ -glukosidaz aktivitesi varlığına göre 4 fenotipik gruba ayırmıştır. Bu gruplar önceki yıllarda gerçekleştirilen Multi lokus enzim elektroforezi (MLEE) sonuçları ile tutarlılık göstermektedir (Lee, Hampson, Lymbery ve ark. 1993). Ancak, bu biyokimyasal testler hızlı ve uygulama açısından kolay olsa da tek başına identifikasyon için yeterli olmadıkları ve sadece identifikasyonda bir rehber görevi yapabilecekleri bildirilmiştir (Hommeze ve ark. 1998).

### **Tablo 2.1 Genel *Brachyspira* gruplarının fenotipik özellikleri**

	Fenotipik grup	Hemoliz	İndol oluşumu	Hippürat hidrolizi	Alfa-galaktosidaz	Beta-glukosidaz
<i>B.hyodysenteria</i>	I <sup>1</sup>	K <sup>2</sup>	+/-	-	-	+
<i>B.intermedia</i>	II	Z <sup>3</sup>	+	-	-	+
<i>B.murdochii</i>	IIIa	Z	-	-	-	+
<i>B.innocens</i>	IIIbc	Z	-	-	+	+
<i>B.pilosicoli</i>	IV	Z	-	+/-	+/-	-
<i>B.alvinipulli</i>		Z	-	+	+/-	+
<i>B.canis</i>	IIIa	Z	-	-	-	+
<i>B.suatiana</i>	I	K	+	-	-	+
<i>B.pulli</i>	IIIbc	Z	-	-	+	+

<sup>1</sup> Fellström ve ark. 1995 tarafından tasarlanan ana dört fenotipik grup

<sup>2</sup> K kuvvetli

<sup>3</sup> Z zayıf

Mikrotitre aglutinasyon testi, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ve indirect flouresan antikor testi (IFAT) (Achacha ve Mittal 1995; Egan ve ark. 1983; Diarra ve ark. 1995) gibi birçok serolojik test semptomatik ve asemptomatik hayvanların tesbiti için kullanılmış ancak bu testlerden hiçbirinin hastalığın teşhisi için yeterince duyarlı ve spesifik bulunmadığı bildirilmiştir (La ve Hampson 2001). Şu ana kadar *B. pilosicoli* ve diğer *Brachyspira* türlerinin rutin serolojik tanısı için bir test geliştirilmemiştir.

Lee ve Hampson isimli araştırmacılar 1995 yılında yaptıkları bir çalışmada, *B.pilosicoli*'ye ait 29 kDa lipoproteine karşı oluşturulan monoklonal antikorun, fekal sürüntülerde IFAT ile kullanımının *B.pilosicoli* varlığının tespit edebildiğini göstermişlerdir. Aynı şekilde, 80 kDa ağırlığındaki yüzey proteinine karşı oluşan monoklonal antikorların *B.pilosicoli* varlığını hayvanlar ve insanlarda tespit edebildiği

belirtilmiştir ancak bu moleküller diyagnostik amaçla kullanılmamaktadır (Tenaya ve ark 1998). Corona-Barrera ve ark. (2004) tarafından yapılan daha yakın tarihli bir çalışmada ise, bu iki monoklonal antikör kullanılarak dışkıdan *B.pilosicoli* ve *B.hyodysenteriae* için yapılan immunomagnetik seperasyon işleminin standart kültür ardından PCR şeklinde yapılan identifikasyonun sensitivitesini arttırmadığı bildirilmiştir (Corona-Barrera ve ark. 2004).

Etkenin tanısında moleküler tanı yöntemleri önemli yer tutmaktadır. PCR analizi, kolon dokusundan (Mikosza ve ark. 1999; Calderaro ve ark. 2003), kültürden (Leser ve ark. 1997; Fellström, Zimmerman ve ark. 2001) ya da direkt dışkıdan (Mikosza ve ark. 2001; La ve ark. 2003) *Brachyspira* türlerinin identifikasyonu için kullanılmaktadır. PCR metodunun saf kültürlerle uygulandığında çok yüksek sensitivite gösterdiğini ancak direkt olarak fekal örneklerde bu metod uygulandığında sensitivitenin iki, üç katı azaldığını rapor etmişlerdir (Råsbäck T. 2007). 16S rRNA geninin özgün “imza sekansını” temel alan bir çok *B.pilosicoli* spesifik primer dizayn edilmiştir. Bu reaksiyonların çoğunda forward primer olarak ilk kez Park ve arkadaşları (1995) tarafından tanımlanan “Acoli 1” kullanılmaktadır, ancak reverse primerin birçok varyasyonu (Stanton ve ark. 1996; Fellström ve ark. 1997; Leser ve ark. 1997; Mikosza ve ark. 1999; Mikosza ve Hampson 2001; La ve ark. 2003) bulunmaktadır. *B.pilosicoli*'nin identifikasyonu için *nox* genini temel alan PCR reaksiyonları da dizayn edilmiştir (Mikosza ve ark. 1999; La ve ark. 2003). *Brachyspira* türleri arasında moleküler identifikasyon ve ayırım için; türler arası minimum sekans benzerliği bulunduran *nox* geninin 16S ya da 23S rDNA'dan daha uygun olduğu bildirilmiştir (Atyeo ve ark. 1999).

NADH oksidaz ve 16S rDNA genlerini hedefleyen PCR testleri *B.aalborgi* ve *B.pilosicoli*'nin insan biyopsi örneklerinden teşhisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Atyeo ve ark. 1999; Mikosza ve ark. 1999; 2001). 23S rDNA gen bölgesini hedef alan PCR testleri *B.hyodysenteria*, *B.intermedia* (grup II) ve *B.pilosicoli* (grup IV) domuz izolatlarını ayırma amacıyla dizayn edilmiştir (Leser ve ark. 1997). NADH oksidaz ya da 23S rDNA gen bölgelerini hedefleyen RFLP-PCR testleri de *Brachyspira* türlerini ayırmak amacıyla geliştirilmiştir (Barcellos, de Uzeda ve ark. 2000, Rohde ve ark. 2002). *Brachyspira* türlerinin identifikasyonu için bilinen ve *B.canis* gibi kısmen karakterize edilmiş *Brachyspira* türlerinin analizlere katılması PCR-temelli analizlerin yeterliliğini belirlemek için gereklidir.

16S rDNA (rrs geni) sekansının karşılaştırmalı analizinin, spiroketlerin filogeni-bazlı sınıflandırmasında esansiyel rol oynadığı ve *Brachyspira* cinsinin üyelerinin tanımlanabilmesi için önemli bir test metodu olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Olsen ve ark. 2000; Paster ve Dewhirst 2000). Birçok hayvan türü ve insanların barsaklarından izole edilen intestinal spiroketlerin kısmi rrs gen sekans analizi çeşitli çalışmalarla incelenmiştir (Fellström ve ark. 1995; Pettersson ve ark. 1996; Stanton ve ark. 1996; De Smet ve ark. 1998; Kraatz ve ark. 2001). *Brachyspira* türleri arasında varolan rrs gen benzerliği önemli olduğu, ancak yeni türlerin bilinen *Brachyspira* türleri ile ilişkisinin ek testlerle tanımlaması sonucunda adlandırılması önerilmektedir (Stanton ve ark. 1996). Ek testlerden biri Multilokus enzim elektroforez (MLEE) analizidir. MLEE analizi ayırt etmek, identifiye etmek ve taksonomik olarak ilişkili bakterilerin filogenetik ilişkilerini belirlemek için kullanışlı bir moleküler tiplendirme tekniğidir (Selander ve ark. 1986). Onbeş asli enzimin MLEE analizine dayanarak yüzlerce intestinal spiroket MLEE grubuna toplamıştır (Lee, Hampson, Lymbery ve ark. 1993; Lee, Hampson, Combs ve ark., 1993 ; Lee ve Hampson 1994; Swayne ve ark. 1995; Trott ve Atyeo ve ark. 1996; Stanton ve ark., 1996; Duhamel ve ark. 1998) . Farklı MLEE grupları arasındaki DNA homolojileri % 21 ile 64 arasında, aynı MLEE grubu içinde ise % 78 ve daha üzerinde bulunduğu bildirilmiştir (Stanton ve ark., 1991; 1997; 1998).

*Brachyspira* türleri için tiplendirmede altın standart teknik DNA sekans homoloji değerlendirmesidir. DNA sekans homolojisini belirlemek için S1 nükleaz metodu ile DTm ölçümü önerilmektedir (Grimont ve ark. 1980; Stanton T.B. 2006).

Restriksiyon enzim analizi de tiplendirme ve identifikasyonda kullanılan metodlardan biridir. Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizinde, bütün bakteri genomu restriksiyon enzimleri ile kesilir ve 0,5-50 kb ağırlığında ürünler elde edilir. Ardından agaroz jel elektroforezi uygulanarak, yüzlerce DNA bandı içeren bir profil elde edilir (Singleton ve Sainsbury 2006). Sonuçları yorumlamak özellikle *B.hyodysenteriae* ve *B.innocens* izolatları heterojen yapıda profillere sahip oldukları için bu iki bakteri açısından zordur.

Amplified fragment length polymorphism (Ampilifiye Fragment Uzunluk Polimorfizmi , AFLP) analizi tüm genomik DNA'nın kesilmesinin ardından restriksiyon parçalarının selektif PCR amplifikasyonudur (Vos ve ark. 1995). Çok duyarlı ve kolay

uygulanan bir yöntemdir, bu nedenle *B.pilosicoli*'nin ileri alt-spesifikasyon çalışmalarında kullanılması önerilmektedir (Møller ve ark. 1999).

Pulsed field jel elektroforezi (PFGE) ilk kez *B.pilosicoli*'nin domuz, kuş ve insan izolatlarında *MluI* restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Atyeo ve ark. 1996). Sonuçlar değerlendirildiğinde PFGE analizinin, genetik parmak izi oluşturmada MLEE analizinden daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. İncelenen insan ve kanatlı izolatlarında, domuz izolatlarına göre daha büyük bir çeşitlilik gözlenmiş, aynı profilin sadece aynı domuz çiftliği ya da aynı toplulukta yaşayan bireylere ait izolatlarda gözlemlendiği bildirilmiştir (Trott ve ark., 1998). Pringle ve ark. (2006), Tiamulin dirençli 13 izolatı PFGE analizi ile incelenmiş ve 10 farklı profil tanımladıklarını bildirmişlerdir. Aynı çiftliklerden toplanan izolatlarda görülen farklı direnç profillerinin, *B.pilosicoli*'de tiamuline dirençli süşun çiftlikler arası transferi ile değil, farklı kaynaklardan geliştiğinin göstergesi olduğunu rapor etmişlerdir.

Nükleik asit problemleri bir enzim, floresan molekülleri, radyoizotop veya antijenik kemiluminesan ile işaretlenmiş cins ya da tür spesifik DNA ya da RNA bölümleridir (Singleton ve Sainsbury 2006). Hedef nükleik asit sekansı ile işaretlenmiş probun hibridizasyonunun ardından probun spesifik tesbiti hedef bölgenin identifikasyonuna olanak verir. *Brachyspira* türleri için geliştirilen katı faz problemlerinin tür-spesifitesi ideal değildir ve yeterince geliştirilmemişlerdir, kullanımı sınırlıdır ve analiz metodu rutin tanı için yeterince basit ya da duyarlı olmadığı bildirilmiştir (Hampson ve Trott 1995). Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) nükleik asit prob teknolojisinin dokulardan infeksiyöz ajanları tesbiti için kullanılmakta olan bir yöntemdir (Singleton ve Sainsbury 2006). Bu tekniğin avantajları, doku biyopsi örneklerinden organizmaları tanımlama ve ayırt edebilmesidir. Bu güne kadar *Brachyspira* cins, *B.hyodysenteriae* ve *B.pilosicoli* tür spesifik FISH problemleri geliştirilmiştir (Jensen ve ark. 2001).

## 2.8. IS infeksiyonunda tedavi

Tedavide en çok kullanılan antibiyotikler; tylosin, lincomysin, carbadox, tiamulin ve metronidazole dur. Bazı durumlarda, tedaviden sonra insanlarda infeksiyonun tekrarladığı gözlenmiştir, ancak ikinci kür tedaviden sonra re-infeksiyona rastlanmadığı bildirilmiştir (Stephens ve Hampson, 2001).

Semptomatik *B.pilosicoli* infeksiyonlarının tedavisinde metronidazol tercih edilmektedir. Ancak, beta-laktam antibiyotikler spiroketisidal oldukları halde,

*B.pilosicoli*'nin bazı suşlarının beta-laktamaz üretimi nedeniyle bu grup antibiyotiklere dirençli olabileceğine dikkat çekilmiştir (Kanavaki ve ark. 2002).

Brooke ve ark. (2003), *B.pilosicoli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için yaptıkları çalışmada, insan ve domuzlardan izole edilmiş 139 izolatu incelemiştir. *B.pilosicoli* suşlarının NCCLS agar dilüsyon metodu (Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards) ile antibiyotik duyarlılıklarının güvenli bir şekilde ortaya konabileceğini öne sürmüşlerdir. Yöntemde yaptıkları tek modifikasyon ise, Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual'in önerisi doğrultusunda, Wilkins-Chalgren agara % 5 at serumu eklemek ve bu yavaş üreyen mikroorganizmalar için inkübasyon süresini uzatmak olmuştur. İzolatların beta-laktamaz üretimini BBL Cefinase nitrocefim diski ile ölçmüşlerdir. İzolatların %51,1'i nitrocefim pozitif bulunmuştur. %45,3' amoxicillin'e; % 13,7'si ise Clindamycin'e dirençli olarak saptanmıştır. Erythromycin tamamen etkisiz bulunmuş, Erythromycin ile Clindamycin arasında çapraz direnç gelişimi bulunduğu saptanmıştır. Erythromycin'e dirençli olan tüm izolatların Clindamycin'e de dirençli bulunduğu bildirilmiştir.

Kanatlılardan izole edilen *B.pilosicoli* suşlarında tylosin direnci ile sıklıkla karşılaşıldığı bildirilmiştir. Tylosin bazı durumlarda kanatlılarda Mycoplasma infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır ve bu kullanımın direnç gelişiminde yaratıcı bir faktör olabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, daha önce insan ve domuz izolatlarında da karşılaşıldığı üzere kanatlı *B.pilosicoli* izolatlarında da amoxicilline karşı dirençli suşların varlığı bildirilmiştir. Bu direnç gelişiminin, beta-laktamaz genlerinin diğer bakterilerden horizontal gen transferi yolu ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Brooke ve ark. 2003).

Pringle ve ark. (2006) İsveç'te 13 farklı domuz çiftliğinden 2002-2003 yılları arasında izole edilen *B.pilosicoli* suşları üzerinde gerçekleştirdikleri antibiyotik duyarlılık çalışmalarında, 94 izolatın 13'ünün (%11), tiamuline dirençli (MIC: > 4 µg/ml) olduğunu saptadıklarını bildirmişlerdir. Tiamulin cut-off değeri > 2 µg/ml olarak alındığında ise dirençli suş oranını %14 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada; 86 izolattan 43'ünün tylosin'e dirençli (>16µg/ml) olduğunu saptamışlardır. Tiamulin

dirençli izolatlar üzerinde gerçekleştirdikleri PFGE analizi sonucunda 10 farklı elektroforetik tip oluştuğunu ve bu bulgunun direnç gelişiminin bağımsız çiftliklerde ayrı odaklar şeklinde oluşmasına bağlı olarak şekillendiğinin kanıtı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yeni bir sınıf olan sınıf D beta-laktamaz (OXA-63) *B.pilosicoli*'nin BM4442 suşunda Bait-Marabet ve ark. (2008) tarafından kromozomal olarak tanımlanmıştır. Ancak bu genin *B.pilosicoli* izolatlarında prevalansı hakkında yeterli veri yoktur. Bu çalışmada, 139 *B.pilosicoli* izolatı üzerinde yapılan in vitro antibiyotik duyarlılık testi sonucunda amoxicilline duyarlılığın % 54,7 olarak bulunması beta-laktam antibiyotiklere direncin yaygın olduğunu göstermektedir.

Avustralya ve Papua Yeni Gine'den izole edilmiş 18 insan ve domuz *B.pilosicoli* izolatını ampisilin ve oksasilin duyarlılığı yönünden test edilmiş ve *blaOXA-63* sınıf D beta-laktamaz geninin varlığı PCR analizi ile araştırılmıştır. Yedi izolat penisiline dirençli bulunmuş ve bu izolatlara gerçekleştirilen tam genom sekans analizi sonucunda dirençli suşların kendi aralarında küçük nükleotid farklılıkları gösterirken, *blaOXA-63* ile kıyaslandıklarında oldukça farklı oldukları ortaya koyulmuştur. OXA-63 ile karşılaştırıldığında yeni iki varyant OXA-136 (artı bir amino asit ve 12 farklı aminoasit substitüsyonu) ve OXA-137 (OXA-136'da bulunan farklılıklara ilaveten pozisyon 16'da farklı aminoasit substitüsyonu) direnç genlerinin Avustralya izolatlarında beta-laktam antibiyotiklere dirençten sorumlu olduğu sonucunu ortaya koymuşlardır (Mortimer-Jones ve ark. 2008).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Örnekler

İstanbul ilinde evde barındırılan köpeklerde *Brachyspira pilosicoli* izolasyonu ve DNA'sının saptanması amacıyla İ.Ü. Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastahanesi, özel klinikler ve köpek pansiyonlarından 96 diyareli ve 96 diyaresi olmayan köpeğe ait toplam 192 barsak içeriği incelendi (Tablo 3.1 ve 3.2). Örnek alımları 2012 yılı ocak ayı ile, 2013 yılı mart ayları arasında gerçekleştirildi. Örnek sayısı, gerek İstanbul ilinde gerekse Türkiye' de etkenin prevalansının henüz saptanmamış olması nedeni ile tahmini prevalans % 50 kabul edilerek % 95 güven düzeyi ve % 10 absolut kesinliğe göre belirlendi (Diker K.S. 1994).

**Tablo 3.1 Diyare bulunan köpeklere ait örnek bilgileri**

ÖRNEK NO	KAYNAK	YAŞ (yıl)	BAŞKA KÖPEKLERLE TEMAS VARLIĞI	CİNSİYET	KLİNİĞE GELİŞ NEDENİ
1	KAYNAK 1 Özel klinik Başakşehir	4	+	♂	KONTROL
2		4	+	♂	KONTROL
3		4	+	♂	KONTROL
11	KAYNAK 2 Özel klinik Beşiktaş	4	+	♀	ALIŞVERİŞ
12		4 ay	+	♂	KONTROL
13		6 ay	+	♀	KONTROL
14		8 ay	+	♀	KONTROL
18		5	+	♀	KONTROL
21	KAYNAK 3 İ.Ü. Fakülte Hastahanesi	<1	+	♂	PARVOVİRAL ENTERİT
24		<1	-	♀	ENTERİT
25		<1	+	♀	KONTROL
26		8	-	♀	KONTROL
28		2,5ay	-	♀	PARVOVİRAL ENTERİT

29		3 ay	+	♀	PARVOVİRAL ENTERİT
30	KAYNAK 3 Üniversite hastahanesi	3 ay	+	♀	AŞI
31		>1	-	♀	AŞI
33		11	+	♀	ENTERİT
35	KAYNAK 4	12	-	♂	AŞI
36	Özel klinik	9	-	♀	KONTROL
39	Maltepe	5	-	♀	KONTROL
44	KAYNAK 5	>1	+	♂	PANSİYON
47	Jandarma İl Komutanlığı	>1	+	♀	PANSİYON
68	KAYNAK 7	3	+	♀	KONTROL
69	Özel Klinik Ataşehir	2	+	♂	KONTROL
87	KAYNAK 4 Özel klinik Maltepe	3 ay	+	♀	ENTERİT
96		2 ay	+	♀	PARAZİT İLACI
99		2	+	♀	KONTROL
100	KAYNAK 9 Özel Klinik Bahçeşehir	2 ay	+	♂	PANSİYON
101		2 ay	+	♂	PARVOVİRAL ENTERİT
102		5 ay	+	♂	AŞI
103		2 ay	+	♀	PARVOVİRAL ENTERİT
105	KAYNAK 10 Özel Klinik Koşuyolu	16	+	♂	ARTİRİT
110		3	-	♂	KONTROL
112		4 ay	-	♂	KONTROL
114	KAYNAK 11 Özel Klinik Kadıköy	>1	-	♀	KONTROL
115		8	-	♂	KONTROL
116		3 ay	+	♀	KONTROL
117		3	+	♂	KONTROL

118		3 ay	+	♀	PANSİYON	
119		4 ay	+	♀	PANSİYON	
121		4	+	♂	PANSİYON	
122		3	+	♂	PANSİYON	
123		4 ay	+	♂	PANSİYON	
124		3	+	♀	PANSİYON	
125		4	+	♀	PANSİYON	
127		4 ay	+	♀	PANSİYON	
128		9	+	♂	PANSİYON	
129		3 ay	+	♀	PANSİYON	
130		>1	+	♂	PANSİYON	
131	KAYNAK 12 Köpek Pansiyonu Bahçeşehir	>1	+	♀	PANSİYON	
132		10	+	♀	PANSİYON	
133		>1	+	♂	PANSİYON	
134		4 ay	+	♂	PANSİYON	
135		4 ay	+	♂	PANSİYON	
136		5	+	♀	PANSİYON	
137		6 ay	+	♀	PANSİYON	
139		4	+	♀	PANSİYON	
140		3 ay	+	♂	PANSİYON	
141		5	+	♂	PANSİYON	
142		5	+	♂	PANSİYON	
143		1	+	♀	PANSİYON	
144		4 ay	+	♀	PANSİYON	
146		2	+	♂	PANSİYON	
153		KAYNAK 13 Özel Klinik Beyoğlu	2 ay	*	♂	KONTROL
154			2 ay	*	♂	KONTROL
155	5 ay		*	♀	KONTROL	
156	3		*	♀	KONTROL	
157	4 ay		*	♀	KONTROL	
158	4		*	♀	KONTROL	
159	4 ay		*	♂	KONTROL	

163		3	+	♀	PANSİYON
168	KAYNAK 14	2 ay	*	♀	PANSİYON
169	Köpek Pansiyonu	1	*	♂	PANSİYON
170	Silivri	8 ay	*	♀	PANSİYON
171		7 ay	-	♂	PANSİYON
172		7 ay	-	♀	KONTROL
173		5 ay	*	♀	KONTROL
174		4 ay	*	♂	KONTROL
175		6 ay	*	♀	KONTROL
176	KAYNAK 15	8 ay	*	♂	KONTROL
177	Özel Klinik	7 ay	*	♂	KONTROL
178	Yeşilköy	3 ay	*	♂	KONTROL
179		3 ay	*	♀	KONTROL
180		4	*	♀	KONTROL
181		6 ay	*	♂	KONTROL
182		3 ay	*	♂	KONTROL
183		1	*	♂	KONTROL
184		1	-	♀	KONTROL
185		4 ay	-	♂	KONTROL
186	KAYNAK 16	1	*	♀	KONTROL
187	Özel Klinik	8 ay	*	♂	KONTROL
188	Ataköy	7 ay	*	♀	KONTROL
189		7 ay	-	♀	KONTROL
190		2	-	♀	KONTROL
191		3	-	♂	KONTROL
192		4	-	♂	KONTROL

\* Bilgi edinilemedi

Tablo 3.2 Diyare bulunmayan köpeklere ait örnek bilgileri

ÖRNEK NO	KAYNAK	YAŞ	BAŞKA		KLİNİĞE GELİŞ NEDENİ	
			KÖPEKLERLE TEMAS	CİNSİYET		
4	KAYNAK 1 Özel klinik Başakşehir	1	+	♂	AŞI	
5		1	+	♀	AŞI	
6		3	+	♂	KONTROL	
7		3	+	♀	KONTROL	
8		3	+	♀	KONTROL	
9		<1	+	♀	KONTROL	
10		1	+	♂	KASTRASYON	
15		KAYNAK 2 Özel klinik Beşiktaş	3	+	♀	KONTROL
16			4 ay	+	♂	KONTROL
17			6	+	♂	KONTROL
19	7 ay		+	♀	KONTROL	
20	4 ay		+	♂	KONTROL	
22	KAYNAK 3 İ.Ü. Fakülte Hastahanesi		1	+	♂	OTİTİS
23		4 ay	-	♀	ARİTMİ	
27		<1	+	♂	ARTRİT	
32		8 ay	-	♀	AŞI	
34	KAYNAK 4 Özel klinik Maltepe	1	*	♂	DERMATİT	
37		1	*	♂	MAMA	
40		9	*	♀	KONTROL	
41		4	*	♂	KASTRASYON	
42		2	*	♀	KONTROL	
43		>1	+	♂	PANSİYON	
45		KAYNAK 5 Jandarma İl Komutanlığı	>1	+	♂	PANSİYON
46			>1	+	♀	PANSİYON
48	>1		+	♂	PANSİYON	
49	>1		+	♀	PANSİYON	

50	KAYNAK 5 Jandarma İl Komutanlığı	>1	+	♀	PANSİYON
51		>1	+	♂	PANSİYON
52		>1	+	♂	PANSİYON
53		>1	+	♂	PANSİYON
54		>1	+	♂	PANSİYON
55		>1	+	♂	PANSİYON
56		>1	+	♂	PANSİYON
57		>1	+	♂	PANSİYON
58		>1	+	♂	PANSİYON
59	KAYNAK 6 Özel Klinik Ümraniye	2	+	♀	KONTROL
60		7 ay	+	♀	KONTROL
61		7 ay	+	♀	KONTROL
62		4 ay	+	♂	KONTROL
63		3	+	♂	KONTROL
64		8 ay	+	♂	KONTROL
65		7 ay	+	♀	KONTROL
66		7 ay	+	♂	KONTROL
67		KAYNAK 7 Özel Klinik Ataşehir	5 ay	+	♀
70	6 ay		+	♀	KONTROL
71	3		+	♀	KONTROL
72	6 ay		+	♂	KONTROL
73	5		+	♂	KONTROL
74	3 ay		+	♂	KONTROL
75	3		+	♀	KONTROL
76	8 ay		+	♂	KONTROL
77	KAYNAK 8 Özel Klinik Beyoğlu		6 ay	+	♀
78		2	+	♀	KONTROL
79		1	+	♀	KONTROL
80		4	+	♂	KONTROL
81		6 ay	+	♂	KONTROL
82		9 ay	+	♂	KONTROL

83		5	+	♀	KONTROL
84	KAYNAK 8	3	+	♂	KONTROL
85	Özel Klinik	1	+	♀	KONTROL
86	Beyoğlu	7 ay	+	♀	KONTROL
88		3 ay	+	♂	AŞI
89		4	-	♀	AŞI
90	KAYNAK 4	8	-	♂	OTİTİS
91	Özel klinik	13	-	♀	KONTROL
92	Maltepe	3 ay	+	♂	KONTROL
93		8	-	♂	DERMATİT
94		6	-	♂	KONTROL
95	KAYNAK 9	>1	+	♂	PANSİYON
97	Özel Klinik	8 ay	+	♀	PANSİYON
98	Bahçeşehir	<1	+	♂	PANSİYON
	KAYNAK 10				
104	Özel Klinik	1	+	♀	KONTROL
	Koşuyolu				
106		1	+	♀	KONTROL
107		2	+	♀	KONTROL
108	KAYNAK 11	13	+	♂	KONTROL
109	Özel Klinik	3	+	♂	KONTROL
111	Kadıköy	8	*	♂	KONTROL
113		>1	*	♂	KONTROL
120	KAYNAK 12	3	+	♀	PANSİYON
126	Köpek	1	+	♀	PANSİYON
138	Pansiyonu	2 ay	+	♂	PANSİYON
145	Bahçeşehir	3	+	♂	PANSİYON
147		5	+	♀	KONTROL
148	KAYNAK 13	1	+	♂	KONTROL
149	Özel Klinik	1	+	♀	KONTROL
150	Beyoğlu	1	+	♀	KONTROL
151		2	+	♂	KONTROL
152		10 ay	+	♀	KONTROL

160		7 ay	+	♀	PANSİYON
161		3 ay	+	♀	PANSİYON
162	KAYNAK 14	1	+	♂	PANSİYON
164	Köpek Pansiyonu	2	+	♀	PANSİYON
165	Silivri	4 ay	+	♂	PANSİYON
166		7 ay	+	♂	PANSİYON
167		4 ay	+	♀	PANSİYON

\* Bilgi edinilemedi

### 3.1.1.1. Dışkı Örneklerinin Alınması:

Dışkı örnekleri Amies Charcoal Transport Medium içeren steril besiyerli svablarla (Copan Ventury Transystem, 114C, Copan Diagnostic Inc., ABD) direkt olarak rektumdan alındı. Dışkı örneği svablar oda sıcaklığında tutularak 2 saat içinde İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı. Etkin izolasyonu amacıyla ekimleri hemen gerçekleştirildi.

### 3.1.2. Besiyerleri

*Brachyspira pilosicoli*'nin izolasyonu için selektif *Brachyspira* agar ve Fastidious Anaerob Agar (FAA) kullanıldı. Ayrıca referans suşun üretilmesi için % 10 v/v fetal buzağı serumu katkılı Brain Heart Infusion Buyyon kullanıldı (Fellström ve ark. 1997; Fellström, Petterson ve ark. 2001).

#### 3.1.2.1. *Brachyspira* Agar

Blood Agar Base No: 2 (Fluka, B1676) 21, 25 gr

Distile su 500 ml

121°C de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi

50°C ye kadar soğutulduktan sonra

Koyun kanı %5 v/v 25 ml

Sodyum ribonükleat (sodyum nükleinat) (Sigma, 71790) %1 w/v 5 gr

Spektinomisin (Sigma, 59007) 800 µg/µl

Vankomisin (Sigma, 94747) 25 µg/µl

Colistin (Sigma, C4461) 25 µg/µl

Petri kutularına 25' er ml olacak şekilde dağıtıldı 25° C de oda ısısında tutularak taze olarak kullanıldı.

### 3.1.2.2. Fastidious Anaerob Agar

FAA (LAB090, Lab M Limited) 45,7 gr

Distile su 1000 ml

121°C de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi.

50°C ye kadar soğutulduktan sonra

Defibrine at kanı % 10 v/v 100 ml

Petri kutularına 25' er ml olacak şekilde dağıtıldı 25° C de oda ısısında tutularak taze olarak kullanıldı.

### 3.1.2.3. Brain Heart Infusion Buyyon

Brain Heart Infusion Buyyon (Oxoid, CM1135) 37 gr

Distile su 900 ml

121°C de 15 dakika süreyle sterilize edildi

Yaklaşık olarak 50°C ye kadar soğutuldu

Fötal buzağı serumu (Sigma, F4135) %10 v/v 100 ml

Glukoz (Sigma, G 7021) 2 gr

5' er ml olacak şekilde tüplere dağıtıldı, tüpler 25° C de oda ısısında tutularak taze olarak kullanıldı.

### 3.1.3. Biyokimyasal Testler ve Ayıraçlar

#### 3.1.3.1. Katalaz Testi

Katalaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde % 3' lük Hidrojen Peroksit (Sigma-H3410) kullanıldı.

### 3.1.3.2. Oksidaz Testi

Sitokrom C oksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde oksidaz identifikasyon stikleri (Oxoid-BR 64A) kullanıldı.

### 3.1.3.3. Hippurat Hidrolizi Testi

Hippurat hidroliz aktivitesinin belirlenmesinde Diatab diagnostik tabletleri (Rosco Diagnostica, 56711) kullanıldı.

### 3.1.3.4. Ninhidrin Ayırıcı :

Hippurat hidroliz aktivitesinin belirlenmesinde %3,5 luk solusyon olarak (Rosco Diagnostica, 91731) kullanıldı.

### 3.1.3.5. İndole Üretimi

İndol üretiminin belirlenmesinde Diatab diagnostik tabletleri (Rosco Diagnostica, 58411) kullanıldı.

### 3.1.3.6. APIZYM testi

$\alpha$ -Galaktosidaz,  $\alpha$ -Glukosidaz ve  $\beta$ -Glukosidaz aktivitesinin saptanması için API ZYM test kiti (Biomerioux, 25200) kullanıldı. API-ZYM ticari test kitinde, alkalın fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin,  $\alpha$ -kemotripsin, asit fosfataz, Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukosidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz,  $\alpha$ -mannozidaz,  $\alpha$ -fukosidaz aktivitesi belirlendi. Kit steril sulandırma sıvısı, APIZYM test şeridi, ZYM A ve ZYM B ayıraçlarından oluşmaktadır.

### 3.1.4. *B. pilosicoli* Referans Suşu (ATCC 51139)

İzolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin kontrolü amacıyla American Type Culture Collection'dan sağlanan *B. pilosicoli* suşu (ATCC 51139) kullanıldı.

### 3.1.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### 3.1.5.1. Ekstraksiyon

Saf kültürlerden *B.pilosicoli* DNA'sının eldesi amacıyla ile ultrasaf su, mikrosantrifüj tüpü, benmari ve santrifüj kullanıldı.

### 3.1.5.2. Amplifikasyon

16S rDNA (rrs geni) geninden derive edilen,

Primer FORWARD (Sentromer DNA Teknolojileri LTD. ŞTİ.)

5'-CTA CAT AAG TAG AGT AGA GGA AAG TTT TT- T-C GCT TTC CG-3'

Primer REVERSE (Sentromer DNA Teknolojileri LTD. ŞTİ.)

5'-CCT CAC CCT CTG TTG CTA CCG AGT AAT GTC GAG CAC TCT T-3'

Taq DNA Polymerase (Sigma, D1806)

10X PCR Buffer (Sigma, P2192)

10 mM dATP (Sigma, D6920)

10 mM dCTP (Sigma, D7045)

10 mM dGTP (Sigma, D7170)

10 mM TTP (Sigma, D7791)

25 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma, M8787)

Pozitif kontrol: *B. pilosicoli*' nin ATCC 51139 suşuna ait DNA ekstrakte ve amplifiye edilerek kullanıldı.

Negatif kontrol: : RNaz ve DNaz' dan arındırılmış ultra saf, steril distile su (Sigma, 95284)

### 3.1.5.3. Agaroz Jelin Hazırlanmasında kullanılan gereçler

Amplifiye edilmiş ürünlerin elektroforezinde kullanılmak üzere % 1.5 oranında agaroz (Sigma, A9539) içeren jel hazırlandı.

Agaroz 1.2 g

1X TAE Buffer 80 ml

TAE Buffer: Agaroz jelin hazırlanması, elektroforez ve DNA bantlarının boyanması için sulandırıcı olarak 10X TAE buffer (Sigma, T6025) 1/10 oranında steril distile su ile 1X yoğunluğa sulandırılarak kullanıldı.

Belirtilen miktarda agaroz ve TAE buffer homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi. Oda ısısında 60°C nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.

Eriyik haldeki agaroz içerisine 0,5 µg/ml oranında ethidium bromide (Sigma, E1510) eklendi. Hazırlanan agaroz jel, tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisine döküldü. Oda sıcaklığında bekletilerek jelin katılaşması sağlandı ve taraklar çıkarıldı.

Jel kalıbı 1X TAE doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi.

Etidyum bromür (Sigma, E1510)

Yükleme Solüsyonu (6X) (Promega, G1881)

DNA Marker (Promega, G2101).

#### **3.1.5.4. Diğer Gereçler**

- Anaerobik jar (Oxoid AG0035)
- Anaerogen (Oxoid, AN0035)
- Thermal cyclers (Axygen Maxygen)
- 1.5 ml kapaklı mikrosantrifüj tüpleri (Axygen)
- Mikrosantrifüj (Hettich)
- 0.2 ml' lik ince çeperli DNaz, RNaz' dan arındırılmış PCR tüpleri (Axygen)
- Pipetler (0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl otomatik pipetler, Thermo Scientific)
- DNaz, RNaz' dan arındırılmış filtreli pipet uçları (Axygen )
- Vorteks (Biosan)
- Agaroz jel elektroforez sistemi (Agagel Mini-Wide)
- Güç kaynağı (Biometra-Power pack P25)
- UV Transilluminator (Infinity, Vilber Lourmat)

#### **3.1.6. İstatistik Testleri**

Tüm hesaplamalar ve istatistiksel analizler Windows için Sosyal Bilimler İstatistik Paketi - SPSS versiyon 21.0 (IBM, SPSS Inc, Chicago, IL) İstatistiksel analiz ve çözüm yazılımı programın kullanılarak Pearson's Ki-kare testi ile gerçekleştirildi (Özdamar K. 1999).

### **3.2. YÖNTEM**

#### **3.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon**

Dışkı örnekli svablar Selektif Brachyspira Agara ekildi ve 42 °C de anaerob atmosferik koşullar altında 6 gün inkübe edildi. Kültürler üçüncü günden sonra kontaminasyon varlığı ve üremeler yönünden kontrol edildi. İnkübasyon sonunda; şeffaf, gri, 1,5 mm çaplı, zayıf beta-hemoliz oluşturan yada yaygın film şeriti tarzında üreme gösteren şüpheli kolonilerden Gram boyalı preparatlar hazırlandı. Mikroskopik bakıda Gram negatif spiral şekilli bakteri kolonilerine katalaz ve oksidaz testi yapıldı. Gram negatif, katalaz negatif, oksidaz pozitif spiral şekilli mikroorganizmalara ait kolonilerden çoğaltmak amacıyla FAA'lara pasaj yapıldı. FAA'lar 42 °C de anaerob

atmosferik koşullar altında 2 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde üreyen şüpheli izolatlara Gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi ve biyokimyasal aktivite testleri (indol üretimi, hippurat hidrolizi, alfa galaktosidaz aktivitesi, alfa glukosidaz aktivitesi) yapılarak tür tayinine gidildi. (Fellström ve ark. 1999; Råsbäck ve ark. 2006).

### 3.2.1.1. Referans susun Üretilmesi

*B. pilosicoli* ATCC 51139 referans suşu, fetal buzağı serumu katkılı Brain Heart Infusion buyyona besiyerine ekildi ve 42 °C de anaerob şartlarda 3 gün inkübe edildi. (ATCC, <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/6961826D153043B3A8D59D0D37CEF5C8.ashx>, son güncelleme tarihi: 19.01.2014)

### 3.2.1.2. İndol Üretimi

Kolonilerden 0,25 ml steril fizyolojik tuzlu su içine 4 McFarland bulanıklık standardı yoğunlukta süspansiyonlar hazırlandı. Süspansiyona bir diagnostik tablet ilave edildi ve üzeri sıvı parafin ile kapatılarak anaerob ortam sağlandı. 42 °C de 24 saat anaerob olarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültüre 3 damla Kovacs' ayırıcı damlatıldı ve yüzeyde kırmızı indol halkasının görülmesi durumunda test pozitif olarak değerlendirildi (Fellström ve ark. 1999).

### 3.2.1.3. Hippurat Hidrolizi Testi

Kolonilerden 0,25 ml steril fizyolojik tuzlu su içine 4 McFarland bulanıklık standardı yoğunlukta süspansiyonlar hazırlandı. Süspansiyona bir diagnostik tablet ilave edildi. 42 °C de 24 saat aerobik şartlarda inkübe edildi. Beş damla %3.5'lük Ninhydrin solüsyonu damlatılarak 10 dakika yeniden inkübe edildi. İnkübasyonun ardından test sonuçları en geç beş dakika içinde, koyu mor-mavi renk pozitif, açık mavi - renksiz negatif olarak değerlendirildi (Fellström ve Gunnarsson 1995)

### 3.2.1.4. APIZYM testi

APIZYM test kitinde bulunan uygulama talimatları doğrultusunda yapıldı. API Süspansiyon Solüsyonu (2 ml) kullanılarak, 5 McFarland standardı yoğunlukta süspansiyonlar hazırlandı. 65 µl süspansiyon, şeridin her bir kuyucuğuna dağıtıldı. 4 - 4 ½ saat 37°C'de aerob atmosferik koşullarda inkübasyonun ardından, her kuyucuğa 1'er damla ZYM A ve ZYM B reaktifi eklendi ve renk oluşumunun gözlenmesi için 5-10 dk

beklendi. Enzim testlerinde oluşan renk değışiklikleri 0-5 dereceleri arasında değerlendirildi: 0 negatif reaksiyon, 5 maksimum yoğun bir reaksiyon ve 1, 2, 3 veya 4 değeri yoğunluğa bağlı olarak ara reaksiyonlar olarak yorumlandı (3, 4 veya 5 pozitif reaksiyon olarak kabul edildi). Sonuçlar kayıt edilerek örneğin enzim profili belirlendi (Fellström ve Gunnarsson 1995; Fellström, Petterson ve ark. 2001).

### **3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

#### **3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu**

Şüpheli izolatlara ait kolonilerden 1 öze dolusu alınarak 50 µl ultra saf su içinde süspanse edildi. Süspanسیونlar ağzı kapaklı bir mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve 100 °C'de 10 dakika bekletildi. Ardından 6000 rpm de 4 dakika santrifuje edildi. Süpernatant PCR' da kalıp DNA olarak kullanıldı (Fellström ve ark. 1997; Fellström, Zimmerman ve ark. 2001).

#### **3.2.2.2. DNA Amplifikasyonu**

Primerlerin hazırlanması:

Üretici firmanın belirttiği doğrultuda Reverse primer 438 µl, Forward primer 367 µl ultra saf, Dnase ve RNase ari steril distile su ile sulandırılarak 100 pmol/µl konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlandı. Stok primerler kullanılıncaya kadar -20°C de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyonu 7 pmol/µl olacak şekilde ultra saf, DNase, RNase ari steril distile su ile sulandırıldı. 0,2 mM her bir dNTP, 7 pikomol her bir primer (R ve F), 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, %0,1 Tween 20, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ünite Taq içeren Master mix DEPC-Treated DNase, RNase ari steril distile su ile 49 µl toplam hacimde olacak şekilde hazırlandı.

Amplifikasyon:

Her bir şüpheli izolata ait ekstrakttan alınan 1 µl kalıp DNA, 49 µl PCR karışımına ilave edildi. DNA amplifikasyonu için PCR tüpleri thermal cyclers'a yerleştirildi ve amplifikasyon hemen başlatıldı. 95°C' de 6 dakika ön denatürasyon yapıldı. Ön denatürasyonu takiben toplam 30 siklus 95°C 30 sn denatürasyon, 56 °C 30 sn primer bağlanması, 72 °C 60 sn sentez aşamaları gerçekleştirildi. Çoğaltılmış amplifiye ürünler agaroz jelde yürütölünceye kadar +4°C de bekletildi (Råsbäck ve ark. 2006).

### 3.2.2.3. Elektroforetik Separasyon ve DNA' nın Saptanması

Elde edilen PCR ürünlerine agaroz jelde elektroforez uygulandı. Agaroz jeldeki ilk kuyucuğa DNA marker (5 µl DNA marker ve 1 µl yükleme solüsyonu), ikinci kuyucuktan başlayarak örneklere ait PCR ürünleri (10 µl amplikon + 2 µl yükleme solüsyonu), pozitif kontrol ve negatif kontrol yüklendi. Elektroforez işlemi 120 Voltta 30 dakika sürdürüldü. İşlemin sonunda jel tanktan alınarak UV transillüminatörde gözlemlendi ve jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi.

### 3.2.2.4. Sonuçların Yorumlanması

Agaroz jel elektroforetik seperasyonun sonucunda, pozitif kontrolde 930 bp moleküler ağırlığında spesifik bantın oluşumu, negatif kontrolde ise bantın olmaması yapılan PCR testinin doğruluğunu gösterdi. Şüpheli izolatların *B. pilosicoli* spesifik DNA pozitif olarak değerlendirilmesi, 930 bp' lik DNA bandının varlığına göre yapıldı (Fellström ve ark. 1997).

### 3.2.3. İstatistiki Analiz

Köpek barsaklarında *B.pilosicoli* kolonizasyonunun diyare ile arasındaki ilişki ayrıca, *B.pilosicoli* kolonizasyonunun oluşumunda yaş, cinsiyet ve diğer köpeklerle temasın önemi araştırıldı.

Yaş değişkeni; bir yaş ve üzeri hayvanlar ile bir yaşından küçük hayvanlar olarak iki kategori şeklinde belirlendi. Diğer değişken kategorileri ise; dişi veya erkek olmak; diğer köpeklerle temas varlığı yada yokluğu şeklinde planlandı. Bu kategori çiftlerinin her biri için, *B. pilosicoli* izolatın varlığı veya yokluğu şeklinde karşılaştırılarak yapıldı ve istatistiki olarak değerlendirildi.

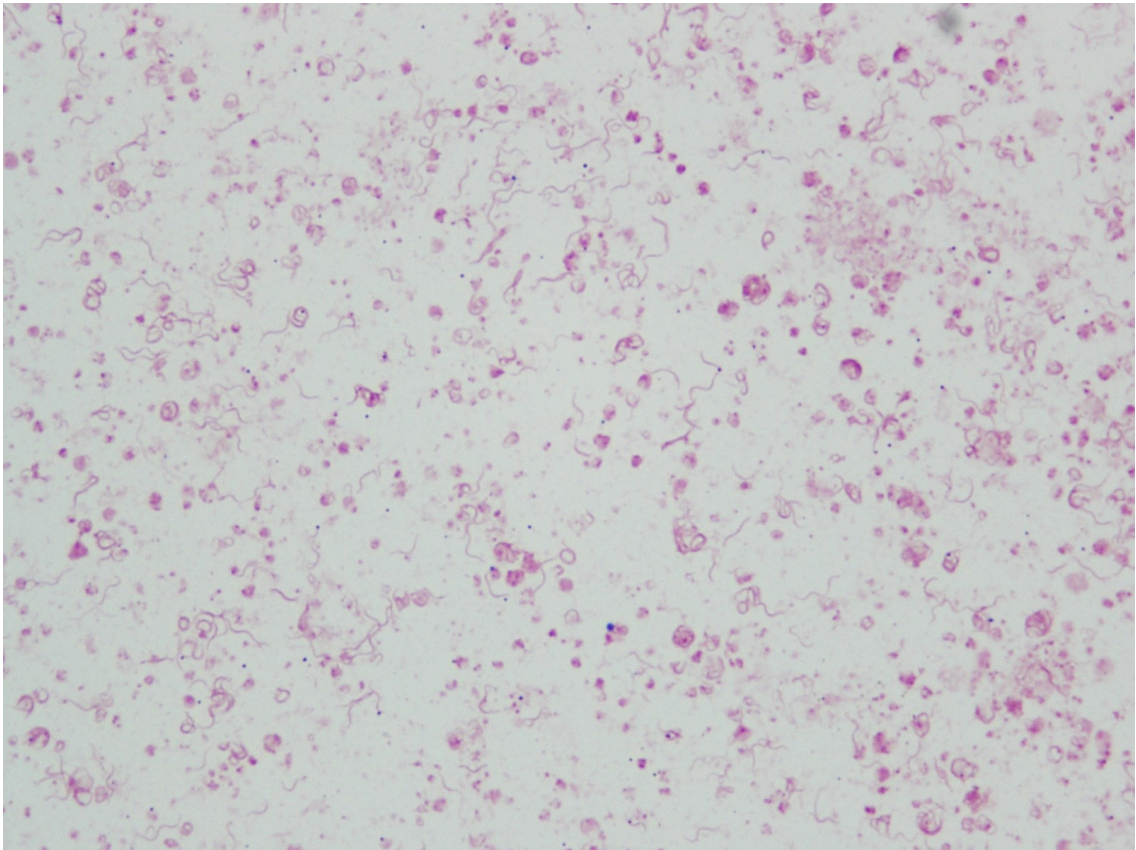
Çalışmada, 95 dişi ve 97 erkek, diğer köpeklerle temas eden 134 ve temas etmeyen 58, 1 yaş ve üstü 111 ve 1 yaş altı 81, diyare bulunan 96 ve diyare bulunmayan 96 hayvan; kolonizasyon yönünden değerlendirmeye alındı.

#### 4. BULGULAR

Diyareli 96 köpekten alınan dışkı örneklerinin 8' inden *Brachyspira* spp. şüpheli koloniler izole edildi.

Şüpheli izolatlar uygulanan Gram boyama, katalaz, oksidaz, indol üretimi, hippurat hidrolizi ve API ZYM testleri sonucu 8 izolatın (118, 119, 123, 125, 127, 131, 133, 135 no.lu örnek) *B.pilosicoli* olabileceği belirlendi (Tablo 4.1, Şekil 4-1, 4-2ve 4-3). Bu sekiz örneğin alındığı köpeklerin beşi 1 yaşın altında, üçü bir yaş üstü köpeklerdi.

**Şekil 4-1 B.pilosicoli şüpheli izolata ait mikroskopik görüntü. (Gram boyama, 123 nolu izolat, X1000)**



**Tablo 4.1 Şüpheli izolatlara ait biyokimyasal aktivite ve enzim aktivite test sonuçları**

örnek no	katalaz	oksidaz	indol	hippurat hidrolizi	alkalin fosfataz	esteraz	esteraz lipaz	lipaz	lösin arilamidaz	valin arilamidaz	sistin arilamidaz	tripsin	alfa-kimotripsin	asit fosfataz	naftol-az-bi-fosfataz	alfa-galaktosidaz	beta-galaktosidaz	beta-glukoronidaz	alfa-glukosidaz	beta-glukosidaz	n-asetil-beta-glukozamimidaz	alfa-mannozidaz	alfa-fukosidaz
43	-	+	-	+	2	4	5	0	0	0	0	0	3	1	0	3	0	0	1	4	0	0	0
118	-	+	-	+	1	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1	5	5	0	0	0	0	0	0
119	-	+	-	+	2	3	2	0	0	0	0	0	0	2	1	5	5	0	0	0	0	0	0
123	-	+	-	+	2	4	5	0	0	0	1	0	0	1	0	5	5	0	0	0	0	0	0
125	-	+	-	+	3	3	4	0	1	0	0	0	0	4	2	5	5	0	0	0	0	0	0
126	-	+	-	+	3	3	2	0	0	0	0	0	0	3	1	5	5	0	0	0	0	0	0
127	-	+	-	+	3	3	2	0	0	0	0	0	0	3	2	4	5	0	0	0	0	0	0
131	-	+	-	+	2	3	2	0	0	0	0	0	0	2	1	5	5	0	0	0	0	0	0
133	-	+	-	+	2	3	2	0	1	1	0	0	0	2	1	5	5	0	2	0	0	0	0
135	-	+	-	+	2	3	2	0	1	1	0	0	0	3	1	5	5	0	0	0	0	0	0
R	-	+	-	+	3	1	3	0	0	0	0	0	0	1	1	5	4	0	0	0	0	0	0

**Şekil 4-2 Referans suşa ait APIZYM test sonuçları**

Şekil 4-3 123 nolu örneğe ait APIZYM test sonuçları



Tür-spesifik PCR testi sonucunda 8 izolatin da 930 bp'lik DNA bandına sahip olduğu gözlemlendi ve izolatların tümü *B.pilosicoli* olarak tanımlandı (Şekil 4-4).

Şekil 4-4 Örneklerle ait tür-spesifik PCR testi jel elektroforez UV transilluminatör resmi



Bu sekiz örneğin alındığı köpeklerin beşi 1 yaşın altında, üçü bir yaş üstü köpeklerdi.

Diyaresiz, 96 köpeğe ait dışkı örneklerinin; 2'sinde (43 ve 126 no.lu örnek) spiroketal üreme saptandı. Uygulanan katalaz, oksidaz, indol üretimi, hippurat hidrolizi

ve API ZYM testleri sonucu, 126 no.lu örneğin fenotipik olarak *B.pilosicoli* referans suş ile aynı özelliklere sahip olduğu ancak; 43 no.lu örneğin negatif alfa-galaktosidaz ve pozitif beta-glukosidaz aktivitesi ile tip suştan farklılık gösterdiği saptandı. Bu izolatlar *B.pilosicoli* şüpheli olarak değerlendirildi. Gerçekleştirilen tür-spesifik PCR analizi sonucunda 126 nolu örnekten elde edilen sadece 1 adet izolatin ( %1,04) 930 bp'lik DNA bandına sahip olduğu gözlemlendi ve *B.pilosicoli* olarak tanımlandı. Bu örnek 1 yaşında bir köpeğe aitti (Şekil 4-4).

Sonuç olarak incelenen 192 barsak içeriğinin 10 adetinde spiroketal üreme gözlemlendi. Uygulanan biyokimyasal testler sonucunda 10 adet *B.pilosicoli* şüpheli izolat saptandı . PCR sonucunda şüpheli izolatların 9 tanesi *B.pilosicoli* (% 4,68) olarak tanımlandı.

Örnek alımının yapıldığı 16 kaynağın sadece birinden (kaynak 12) *B.pilosicoli* (n=9) izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı.

#### **4.1. İstatistiksel analiz sonuçları**

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda barsaklarda *B.pilosicoli* kolonizasyonu ile diyare ilişkisi köpeklerde istatistiksel olarak önemli ( $p= 0,01$ ) bulundu.

*B.pilosicoli* kolonizasyonu ile köpeklerin diğer köpeklerle teması istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p=0,033$ ).

Ancak kolonizasyon ile yaş grupları arasında yapılan analizde yaşın kolonizasyon için önemli olmadığı ( $p=0,655$ ) belirlendi.

Cinsiyet ve kolonizasyon arasındaki ilişki değerlendirildiğinde bu parametrenin bir önem ifade etmedikleri ( $p=0,121$ ) saptandı.

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda başta köpekler, domuzlar, tavuklar ve insanlar olmak üzere birçok sıcak kanlı canlıda saptanan *B.pilosicoli* giderek önem kazanmış ve konaklarında çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. *B.pilosicoli*'nin gerek insanlardan gerekse köpek domuz ve tavuklardan izolasyonu ve dolayısıyla ilişkilendirildiği enfeksiyonlar birçok ülkede bildirilmiştir (Muniappa, Gardner ve ark. 1995; Duhamel ve ark. 1997; Swayne ve McLaren 1997; Mikosza ve ark. 1999). Yeni bir etken olması nedeni ile çalışmalar daha çok etken izolasyonu ve özellikle insanlarda oluşturduğu enfeksiyonlara yoğunlaşmıştır.

Etkenin köpeklerdeki prevalansı ile ilgili yapılan araştırmalarda Papua Yeni Gine'de % 5,3 (Trott ve ark. 1997), İsveç'te %9,37 (Fellström, Petterson ve ark. 2001), Hindistan'ın Assam eyaletinde % 0,9 (Munshi ve ark. 2003), batı Avustralya'da % 14,2 (Oxberry ve Hampson 2003), İspanya'da % 4,8 olarak bildirilmiştir. (Hidalgo ve ark. 2010).

Bu çalışmada İstanbul' da köpeklerde diyare faktörü dikkate alınmadan etkenin prevalansı % 4,68 olarak bulunmuştur. Diyare gözlenen köpeklerde prevalans % 8,3 (n=8) diyare gözlenmeyen köpeklerde is % 1,04 (n=1) olarak saptanmıştır. Yukarıda bildirilen çalışmalarda da görüldüğü gibi etkenin prevalansı değişik ülkelerde değişik değerlere sahip olarak bulunmuştur. Diyare dikkate alındığında prevalansın yükseldiği, genel olarak prevalansa bakıldığında ise değerlerin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

*B.pilosicoli* kolonizasyonunun köpeklerde diyare ile ilişkili olup olmadığı üzerinde fazla araştırmaya rastlanmıştır. Yapılan iki çalışmada araştırmacılar farklı sonuçlara varmışlardır (Oxberry ve Hampson 2003; Hidalgo ve ark. 2010).

Oxberry ve Hampson 2003, gerçekleştirdikleri çalışmada bakteri kolonizasyonunun diyare ile ilişkili bulunmadığını bildirmişlerdir.

Buna karşın, Hidalgo ve ark. 2010, *B.pilosicoli* kolonizasyonu ile diyare arasındaki ilişkiyi köpeklerde ilk kez istatistiki olarak ortaya koymuşlar ve daha önce bu ilişkinin ortaya konulamamasını çalışmalarda örnek sayısının düşük tutulması nedeniyle olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bu çalışmada da diyare bulunan hayvanlardan elde edilen sonuçlar ile diyare bulunmayan hayvanlardan elde edilen etken prevalansına ilişkin sonuçlar arasında büyük fark saptanmıştır. Bu sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu elde

edilen değer ( $p=0,01$ ) ile *B.pilosicoli* kolonizasyonu ile diyare arasındaki ilişki ortaya konmuştur ve Hidalgo ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Margawani ve ark. (2004) Bali, Endonezya'da yaptıkları bir çalışmada, *B.pilosicoli* kolonizasyonu ile hayvan teması, yaş ve cinsiyet faktörleri arasındaki ilişkinin önemini araştırmışlar, bu faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını bildirmişlerdir.

Araştırmacıların bu sonuçlarına karşın bu çalışmada, köpeklerin başka köpeklerle teması *B.pilosicoli* kolonizasyon açısından istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $p=0,033$ ). Önemli olmasının belirlenebilmesinde, örnek alım yerlerinin ve birlikte yaşayan hayvan topluluklarının varlığının bu çalışmada bu sonucu saptamaya olanak sağladığını düşündürmüştür. Bu çalışmada etken identifikasyonunun (% 4,68; n=9) olmasından ziyade yapıldığı tek kaynağın hayvanların belli bir süre zarfında birlikte yaşamak zorunda buldukları, pansiyon amaçlı kullanılan bir köpek çiftliğinden alınan örneklerden olması nedeniyle dikkati çekicidir. Bu durumun oluşumunda en önemli faktörlerden biri olarak köpeklerin tuvalet ihtiyaçlarını gidermek amacıyla belli bir alanın kullanılmasının olduğu düşünülmüştür.

Ancak cinsiyet ve yaş faktörleri istatistiki olarak *B.pilosicoli* kolonizasyonu açısından önemsiz bulunmuştur.

Araştırmacılar *Brachyspira* türlerinin identifikasyonu için kültür ve fenotipik testlerin yeterliliği, ayrıca bunlara ilaveten moleküler yöntemlerin gerekliliği üzerine tartışmışlardır (Fellström, Petterson ve ark. 1997; Stanton ve ark. 1997; Hommez ve ark. 1998; Mikosza ve ark. 2003; Fossi ve ark. 2004; Fossi ve Skrzypczak, 2006).

Fellström, Petterson ve ark. (1997) tarafından indol üretimi ve hippurat hidrolizasyon testlerinin *Brachyspira* türlerinin identifikasyonunda kullanılan en önemli testler olduğu vurgulanmıştır.  $\alpha$ -galaktosidaz ve  $\beta$ -glukosidaz testleri ise identifikasyonu tamamlayıcı testler olarak önerilmiştir. Hommez ve ark. (1998) ise *Brachyspira* türleri değerlendirilirken türler içinde bazı varyant bakteriler olabileceğini ve sadece fenotipik testlere dayalı identifikasyonun hatalı sonuçlar doğurabileceğini bildirmişlerdir. Fellström, Petterson ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, yapılan PFGE ve 16S rRNA sekans analizi sonucunda indol reaksiyonu kuvvetli derecede pozitif olan A3077 izolatını *B.pilosicoli* olarak sınıflandırmışlardır. Bu atipik izolat, *B.intermedia* izolatları dışında ZBHIS'ler arasında pozitif indol reaksiyonu veren ilk köpek izolatı olarak bildirilmiştir. Fossi ve ark. (2004) yılında gerçekleştirdikleri çalışma ile hippurat

negatif *B.pilosicoli*-benzeri izolatların, *B.pilosicoli* olarak tanımlanabileceğini göstermişlerdir. Fellström, Petterson ve ark.(1997) fenotipik tanımlamaya yönelik şeması takip edildiğinde bu atipik hipp<sup>-</sup> *B.pilosicoli* suşlarının *B.murdochii* ile karışabileceğini; tür-spesifik PCR analizinin kesin tanı için kullanılmasının gerekliliğini vurgulamışlardır. Ancak, moleküler teknikler için yeterli olmayan laboratuvarlarda hippurat hidrolizi ve beta-glukosidaz aktivitesi negatif olarak belirlenen izolatların *B.pilosicoli* olarak tanımlanabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca kültürün tespit edilebilir bakteri sayısı dikkate alındığında PCR analizine göre daha duyarlı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Fellström, Petterson ve ark. 1997; Stege ve ark. 2000; Fellström, Zimmerman ve ark. 2001). Buna karşın; dışkı örneklerinin olabilecek en optimize koşullarda uygun transport besiyerleri içinde, anaerob taşıma sistemleri ile kısa sürelerde taşınması sağlansa bile, bu narin bakterilerin canlılığının korunamadığı durumlar olabileceği ve *Brachyspira* türlerinin kültürel tiplendirmesinde sorunlarla karşılaşılabilineceği bildirilmiştir (Råsbäck ve ark. 2006). Ayrıca antimikrobiyal tedavi gören bireylerden alınan örneklerde bakterinin canlılığının kaybolmuş olabileceği de bilinmektedir (Nathues ve ark. 2007). Bu nedenlerle *B.pilosicoli* izolasyon ve tanımlanmasında kültür, biyokimyasal testler ve moleküler tekniklerin bir bütün olarak değerlendirilmesi gereklidir.

Bu çalışmada da bir izolat (kaynak /örnek no: 5/43) tipik spiroketal morfolojisi, Gram boyanma, katalaz, oksidaz ve hemoliz özellikleri ile fenotipik sınıflandırma için uygulanan biyokimyasal testler ve API ZYM testi sonucu *Brachyspira* şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Yapılan testler sonucunda Fellström ve ark. (1997) tarafından belirlenen ana fenotipik gruplardan hiçbirine uygun olmadığı saptanmıştır. Örneğin; zayıf beta hemoliz, negatif indol üretimi, pozitif hippurat hidrolizi, negatif alfa-galaktosidaz ve pozitif beta-glukosidaz aktivitesi ile *B.alvinipulli*'ye ait fenotipik özelliklerle örtüştüğü belirlenmiştir. Literatür çalışması sırasında karşılaşılan, Duhamel ve ark. tarafından 1998 yılında yaptıkları çalışmada elde edilen *B.pilosicoli* Dog17 izolatının da pozitif beta-glukosidaz aktivitesine sahip olduğu bilgisi nedeni ile; bu bakteri izolatının atipik bir biyovaryant olabileceği düşünülerek, *B.pilosicoli* tür-spesifik PCR analizi ile incelenmesi ve moleküler olarak tanımlanmasının gerektiği düşünülmüştür. Ancak tür-spesifik PCR testi sonucunda izolat *B.pilosicoli* yönünden negatif bulunmuştur. Bu nedenle *B.pilosicoli*'nin tanımlanması için kullanılan fenotipik değerlendirme tablosu yararlı bir tanımlama aracı olsa da, tanımlanmasında

fenotipik değerlendirmeyi moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiği sonucu araştırıcıların sonuçlarına uyum göstermiştir.

*B.pilosicoli*'nin insanlar ve köpekler arasında potansiyel zoonotik yayılımına çeşitli çalışmalarla dikkat çekilmiştir (Lee ve Hampson 1994; Trott ve ark. 1998; Oxberry ve Hampson 2003).

Ayrıca, HIV hastası bir insandan izole edilen *B.pilosicoli* (HIV3AB2) suşu ile kanatlılarda deneysel infeksiyon oluşturulmuştur. Çalışmada ergin tavukların insan *B.pilosicoli* izolatu ile kolonize olabileceği gösterilmiş ve bu spiroketin tür bariyerini aşarak infeksiyon oluşturabileceği kanıtlanmıştır (Jamshidi ve Hampson 2005).

Verlinden ve ark. (2012), 2009-2010 yılları arasında Belçika'da süpermarketten topladıkları 4°C'de saklanan tavuk karkasında *B.pilosicoli* varlığını bildirilmişlerdir.

HIV hastası bir insandan izole edilen *B.pilosicoli* suşu ile kanatlılarda deneysel infeksiyon oluşturulması, *B.pilosicoli*'nin paketlenmiş kanatlı karkaslarından izole edilmesi, dış ortamlarda uzun süre hayatta kalabilen bu bakterinin duyarlı konakçılara bulaşma riskini arttırmaktadır.

Oldukça geniş bir konakçı spektrumuna sahip olan *B.pilosicoli*'nin mutfaklarda hijyenik olmayan şekillerde işlendiğinde ya da yeterli ısı işlemine maruz kalmadan tüketildiğinde insanlar ve hayvanlarda gıda kaynaklı zoonoz infeksiyonlara yol açması olasıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada İstanbul'da *B.piosicoli*'nin varlığı ortaya konulmuştur. İstatistiki açıdan diyare bulunan köpeklerde etkenin kolonizasyonunun daha anlamlı olduğu ve köpeklerde temasın kolonizasyon için bir risk faktörü olduğu saptanmıştır. Çok geniş bir konak yelpazesine sahip olan, septisemi vakalarında kandan izole edilebilen ve gıda kaynaklı zoonotik infeksiyonlara yol açması muhtemel görünen bu enterik anaerob patojen ile ilgili birçok bilinmeyen nokta mevcuttur. Bu nedenle konu ile ilgili araştırmaların sürdürülmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Achacha, M., & Messier, S. (1992). Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol*, 30(1), 249-251.
- Atyeo, R. F., Oxberry, S. L., & Hampson, D. J. (1996). Pulsed-field gel electrophoresis for sub-specific differentiation of *Serpulina pilosicoli* (formerly 'Anguillina coli'). *FEMS Microbiol Lett*, 141(1), 77-81.
- Atyeo, R. F., Stanton, T. B., Jensen, N. S., Suriyaarachichi, D. S., & Hampson, D. J. (1999). Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. *Vet Microbiol*, 67(1), 47-60.
- Backhans, A., Jansson, D. S., Aspán, A., & Fellström, C. (2011). Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Vet Microbiol*, 153(1), 156-162.
- Bait-Merabet, L., Thille, A., Legrand, P., Brun-Buisson, C., Cattoir, V. (2008). *Brachyspira pilosicoli* bloodstream infections: case report and review of the literature. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 7: 19. doi:10.1186/1476-0711-7-19
- Bano, L., Merialdi, G. , Bonilauri, P. , Dall'Anese, G. , Capello, K. , Comin, D. , Cattoli, G. , Sanguinetti, V. , Hampson, D. J. and Agnoletti, F. (2008) 'Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy', *Avian Pathol*, 37: 3, 281 —286. DOI: 10.1080/03079450802043726
- Baranton, G., & Old, I. G. (1995). The Spirochaetes: a different way of life. *B I Pasteur*, 93(2), 63-95.
- Barcellos, D. E., de Uzeda, M., Ikuta, N., Lunge, V. R., Fonseca, A. S. K., Kader, I. I. T. A., & Duhamel, G. E. (2000). Identification of porcine intestinal spirochetes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. *Vet Microbiol*, 75(2), 189-198.
- Barcellos, D. E., Mathiesen, M. R., de Uzeda, M., Kader, I. I., Duhamel, G. E. (2000). Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet Rec* 146:398-403

- Barrett, S. P. (1990). Intestinal spirochaetes in a Gulf Arab population. *Epidemiol Infect*, 104(2), 261-266. doi:10.2307/3863357
- Biksi, I., Lőrincz, M., Molnár, B., Kecskés, T., Takács, N., Mirt, D., Cizek, A., Pejsak, Z., Martineau, G. P., Sevin, J. L. & Szenci, O. (2007). Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Acta Vet Hung.* 55: 219-227
- Boye, M., Baloda, S. B., Leser, T. D. & Moller, K. (2001). Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet. Microbiol.* 81: 33–40
- Brooke, C. J., Margawani, K. R., Pearson, A. K., Riley, T. V., Robertson, I. D., & Hampson, D. J. (2000). Evaluation of blood culture systems for detection of the intestinal spirochaete *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* in human blood. *J Med Microbiol* 49: 1031-1036
- Brooke, C. J., Riley, T. V., & Hampson, D. J. (2006). Comparison of Prevalence and Risk Factors for Faecal Carriage of the Intestinal Spirochaetes *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in Four Australian Populations. *Epidemiol Infect*, (3), 627. doi:10.2307/3865883
- Brooke, C., Hampson, D., & Riley, T. (2003). In vitro antimicrobial susceptibility of *Brachyspira pilosicoli* isolates from humans. *Antimicrob Agents Ch*, 47(7), 2354-2357. doi:10.1128/AAC.47.7.2354-2357.2003
- Calderaro, A., Bommezzadri, S., Piccolo, G., Zuelli, C., Dettori, G., & Chezzi, C. (2005). Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. *Vet Microbiol*, 105(3-4), 229-234.
- Calderaro, A., Merialdi, G., Perini, S., Ragni, P., Guegan, R., Dettori, G., & Chezzi, C. (2001). A novel method for isolation of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Vet Microbiol*, 80(1), 47-52.
- Calderaro, A., Villanacci, V., Conter, M., Ragni, P., Piccolo, G., Zuelli, C., ... & Chezzi, C. (2003). Rapid detection and identification of *Brachyspira aalborgi* from rectal biopsies and faeces of a patient. *Res Microbiol*, 154(2), 145-153.
- Chander, Y., Primus, A., Oliveira, S., & Gebhart, C. J. (2012). Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species,

provisionally designated “*Brachyspira hampsonii*”. *J Vet Diagn Invest*, 24(5), 903-910.

- Chia, S. P., & Taylor, D. J. (1978). Factors affecting the survival of *Treponema hyodysenteriae* in dysenteric pig faeces. *Vet Rec*, 103(4), 68-70.
- Corona-Barrera, E., Smith, D., La, T., Hampson, D., & Thomson, J. (2004). Immunomagnetic separation of the intestinal spirochaetes *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hyodysenteriae* from porcine faeces. *J Med Microbiol*, 53(4), 301-307.
- Cowley, H. M. & Hill, R. R. (1985). ‘Intestinal spirochaetosis’ of the vervet monkey. *Onderstepoort J Vet* 52: 47–50
- Craige, J. E. (1948). Spirochetes associated with dysentery in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 113: 247–249
- De Smet, K. A.L., Worth, D. E., & Barrett, S. P. (1998). Variation amongst human isolates of *Brachyspira* (Serpulina) *pilosicoli* based on biochemical characterization and 16S rRNA gene sequencing. *Int J Sys Bacteriol*, 48(4), 1257-1263.
- Diarra, A. T., Achacha, M., & Mittal, K. R. (1995). Evaluation of different serological tests for detection of antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* in pig sera. *Comp Immunol Microb*, 18(3), 215-221.
- Diker, KS. *Epidemiyolojik Araştırma Aşamaları. I. Amaç ve Veri Toplama. Epidemiyoloji*. A.Ü. Veteriner Fakültesi Öğrenci Ders Notu, Ankara, 1994; 96-116
- Duhamel, G. E. (1997). Intestinal spirochaetes in non-production animals. In: Hampson DJ and Stanton TB (eds), *Intestinal Spirochaetosis in Domestic Animals and Humans*. Wallingford, UK: CAB International, pp. 301–320.
- Duhamel, G. E. (2001). Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis. *Animal Health Research Reviews*, 2(1), 3. doi:10.1079/AHRR200128
- Duhamel, G. E., Elder, R., Muniappa, N., Mathiesen, M. R., Wong, V. J., & Tarara, R. P. (1997). Colonic spirochetel infections in nonhuman primates that were associated with *Brachyspira aalborgi*, *Serpulina pilosicoli*, and unclassified flagellated bacteria. *Clin Infect Dis*, S186-S188.

- Duhamel, G. E., Hunsaker, B. D., Mathiesen, M. R. & Moxley, R. A. (1996). Intestinal spirochetosis and giardiasis in a Beagle pup with diarrhea. *Vet Pathol* 33: 360–362
- Duhamel, G. E., Muniappa, N., Gardner, I., Anderson, M. A., Blanchard, P. C., DeBey, B. M., Mathiesen, M. R. & Walker, R. L. (1995). Porcine colonic spirochaetosis: A diarrhoeal disease associated with a newly recognized species of intestinal spirochaetes. *Pig Journal* 35: 101–110
- Duhamel, G. E., Muniappa, N., Mathiesen, M. R., Johnson, J. L., Toth, J., Elder, R. O. & Doster, A. R. (1995). Certain canine weakly beta-hemolytic intestinal spirochetes are phenotypically and genotypically related to spirochetes associated with human and porcine intestinal spirochetosis. *J Clin Microbiol* 33: 2211–2215
- Duhamel, G. E., Trott, D. J., Muniappa, N., Mathiesen, M. R., Tarasiuk, K., Lee, J. I. & Hampson, D. J. (1998). Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a newly identified group provisionally designated ‘*Serpulina canis*’ sp. nov. *J Clin Microbiol* 36: 2264–2270
- Egan, I. T., Harris, D. L., & Joens, L. A. (1983). Comparison of the microtitration agglutination test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herds affected with swine dysentery. *Am J Vet Res*, 44(7), 1323.
- Faine, S. (1965). Silver staining of spirochaetes in single tissue sections. *J Clin Pathol*, 18(3), 381.
- Feberwee, A., Van Der Heijden, H., Wellenberg, G., Landman, W., Hampson, D., Phillips, N., & ... Dwars, R. (2008). Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced production or both. *J Clin Microbiol*, 46(2), 593-600. doi:10.1128/JCM.01829-07
- Fellström, C., & Gunnarsson, A. (1995). Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res Vet Sci*, 59(1), 1-4.
- Fellström, C., & Holmgren N. (2005). Mice as reservoirs for swine dysentery in a fattening herd. *Svensk Veterinartidning* 57: 19–21.
- Fellström, C., Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., & Aspan, A. (1999). Emended descriptions of indole negative and indole positive

isolates of *Brachyspira* (Serpulina) *hyodysenteriae*. *Vet Microbiol*, 70(3-4), 225-238. doi:10.1016/S0378-1135(99)00146-7

- Fellström, C., Pettersson, B., Thomson, J., Gunnarsson, A., Persson, M., & Johansson, K. E. (1997). Identification of Serpulina species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J Clin Microbiol*, 35(2), 462-467.
- Fellström, C., Pettersson, B., Uhlén, M., Gunnarsson, A., & Johansson, K. E. (1995). Phylogeny of Serpulina based on sequence analyses of the 16S rRNA gene and comparison with a scheme involving biochemical classification. *Res Vet Sci*, 59(1), 5-9.
- Fellström, C., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., & Feinstein, R. (2001). Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs. *Animal Health Research Reviews / Conference Of Research Workers In Animal Diseases*, 2(1), 75-82.
- Fellström, C., Zimmerman, U., Aspan, A., & Gunnarsson, A. (2001). The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Animal Health Research Reviews*, 2, 37-44.
- Fossi, M., & Skrzypczak, T. (2006). D-ribose utilisation differentiates porcine *Brachyspira pilosicoli* from other porcine *Brachyspira* species. *Anaerobe*, 12(2), 110-113. doi:10.1016/j.anaerobe.2005.06.004
- Fossi, M., Ahlsten, K., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S., Anttila, M., Kokkonen, T., & ... Pelkola, K. (2005). Neither hippurate-negative *Brachyspira pilosicoli* nor *Brachyspira pilosicoli* type strain caused diarrhoea in early-weaned pigs by experimental infection. *Acta Vet Scand*, 46(4), 257-267.
- Fossi, M., Pohjanvirta, T., Heinikainen, S., Pelkonen, S., Sukura, A., & Lindecróna, R. (2004). Molecular and ultrastructural characterization of porcine hippurate-negative *Brachyspira pilosicoli*. *J Clin Microbiol*, 42(7), 3153-3158. doi:10.1128/JCM.42.7.3153-3158.2004
- Gebbers, J. O., Ferguson, D. J., Mason, C., Kelly, P., & Jewell, D. P. (1987). Spirochaetosis of the human rectum associated with an intraepithelial mast cell and IgE plasma cell response. *Gut*, 28(5), 588-593.

- Grimont, P. A., Popoff, M. Y., Grimont, F., Coynault, C., & Lemelin, M. (1980). Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr Microbiol*, 4(6), 325-330.
- Hampson, D. J., & La, T. (2006). Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia* comb. nov. and *Brachyspira murdochii* comb. nov. *Int J Syst Evol Micr*, 56(5), 1009-1012.
- Hampson, D. J., & Trott DJ. (1995). Intestinal spirochaete infections of pigs: an overview with an Australia perspective. In D. P. Hennessy & P. D. Cranwell (Eds.), *Manipulating Pig Production*. pp. 139-169 . Werribee, Vic., Australia: Australasian Pig Science Association.
- Hampson, D. J., Oxberry, S. L., & La, T. (2006). Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. *Emerg Infect Dis*, 12(5), 869.
- Hampson, D. J., Stephens, C. P., & Oxberry, S. L. (2006). Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens. *Avian Pathol*, 35(1), 12-16. doi:10.1080/03079450500465643
- Harland, W. A., & Lee, F. D. (1967). Intestinal spirochaetosis. *Brit Med J*, 3(5567), 718.
- Harris, D. L., Glock, R. D., Christensen, C. R., & Kinyon, J. M. (1972). Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC*, 67(1), 61-64.
- Harris, D. L., Kinyon, J. M., Mullin, M. T. & Glock, R. D. (1972). Isolation and propagation of spirochetes from the colon of swine dysentery affected pigs. *Can. J. Comp. Med.* 36: 74-76.
- Hidalgo, Á., Rubio, P., Osorio, J., & Carvajal, A. (2010). Prevalence of *Brachyspira pilosicoli* and "*Brachyspira canis*" in dogs and their association with diarrhoea. *Vet Microbiol*, 146(3-4), 356-360. doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.016
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual Of Determinative Microbiology*. Williams and Wilkins, Maryland.

- Homme, J., Castryck, F., Haesebrouck, F., & Devriese, L. A. (1998). Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Vet microbiol*, 62(2), 163-169.
- Hovind-Hougen, K., Birch-Andersen, A., Henrik-Nielsen, R., Orholm, M., Pedersen, J. O., Teglbjærg, P. S., & Thaysen, E. H. (1982). Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol*, 16 (6), 1127-1136.
- Hsu, T., Hutto, D. L., Minion, F. C., Zuerner, R. L., & Wannemuehler, M. J. (2001). Cloning of a Beta-Hemolysin Gene of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* and Its Expression in *Escherichia coli*. *Infect immun*, 69(2), 706-711.
- Hudson, M. J., Alexander, T. J., & Lysons, R. J. (1976). Diagnosis of swine dysentery: spirochaetes which may be confused with *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec*, 99(25-26), 498-500.
- Jacobson, M., Gerth Löfstedt, M., Holmgren, N., Lundeheim, N. & Fellström, C. (2005). The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. *Journal of Veterinary Medicine Series B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 52: 386-391
- Jamshidi, A.; Hampson D.,J. (2005). The eggs from laying hens infected with *Brachyspira pilosicoli* may not be a potential source of infection for human. *Iranian Journal of Veterinary Research*. University of Shiraz, 6(1), 28-34.
- Jansson, D. S., Fellström, C., & Johansson, K. E. (2008). Intestinal spirochetes isolated from wild-living jackdaws, hooded crows and rooks (genus *Corvus*): Provisionally designated “ *Brachyspira corvi*” sp. nov. *Anaerobe*, 14(5), 287-295.
- Jensen, T. K., Boye, M., Ahrens, P., Korsager, B., Teglbjærg, P. S., Lindboe, C. F., & Møller, K. (2001). Diagnostic examination of human intestinal spirochetosis by fluorescent in situ hybridization for *Brachyspira aalborgi*, *Brachyspira pilosicoli*, and other species of the genus *Brachyspira* (*Serpulina*). *J Clin Microbiol*, 39(11),
- Jensen, T., Møller, K., Boye, M., Leser, T., & Jorsal, S. (2000). Scanning Electron Microscopy and Fluorescent in Situ Hybridization of Experimental

*Brachyspira* (Serpulina) *pilosicoli* Infection in Growing Pigs. *Vet Pathol*, 37(1), 22-32.

- Johansson, K., Duhamel, G., Bergsjö, B., Engvall, E., Persson, M., Pettersson, B., & Fellström, C. (2004). Identification of three clusters of canine intestinal spirochaetes by biochemical and 16S rDNA sequence analysis. *J Med Microbiol*, 53(Pt 4), 345-350.
- Jones, M. J., Miller, J. N., & George, W. L. (1986). Microbiological and biochemical characterization of spirochetes isolated from the feces of homosexual males. *J Clin Microbiol*, 24(6), 1071-1074.
- Kanavaki, S., Mantadakis, E., Thomakos, N., Pefanis, A., Matsiota-Bernard, P., Karabela, S., & Samonis, G. (2002). *Brachyspira* (Serpulina) *pilosicoli* spirochetemia in an immunocompromised patient. *Infection*, 30(3), 175-177.
- Kinyon, J. M. & Harris, D. L. (1979). *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. *Int J Syst Bacteriol* 29: 102–10
- Kinyon, J. M., & Harris, D. L. (1974). Growth in *Treponema hyodysenteriae* in liquid medium. *Vet Rec*, 95(10), 219-220.
- Komarek, V., Maderner, A., Weissenböck, H., & Spargser, J. (2009). Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. *Vet Microbiol*, 134(3-4), 311-317. doi:10.1016/j.vetmic.2008.08.01
- Koopman, M. H., Kasbohrer, A. A., Beckmann, G. G., Van der Zeijst, B. M., & Kusters, J. G. (1993). Genetic similarity of intestinal spirochetes from humans and various animal species. *J Clin Microbiol*, 31(3), 711-716.
- Kraatz, W., Thunberg, U., Pettersson, B., & Fellström, C. (2001). Human intestinal spirochetosis diagnosed with colonoscopy and analysis of partial 16S rDNA sequences of involved spirochetes. *Animal Health Research Reviews / Conference Of Research Workers In Animal Diseases*, 2(1), 111-116.
- Kunkle, R. A., & Kinyon, J. M. (1988). Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol*, 26(11), 2357-2360.
- Kunkle, R. A., Harris, D. L., & Kinyon, J. M. (1986). Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol*, 24(4), 669-671.
- La, T. , Phillips, N. D., & Hampson, D. J. (2003). Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in

pig feces. *J Clin Microbiol*, 41(7), 3372-3375. doi:10.1128/JCM.41.7.3372-3375.2003

- La, T., & Hampson, D. J. (2001). Serologic detection of Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae infections. *Animal Health Research Reviews*, 2, 45-52.
- Leach, W. D., Lee, A., & Stubbs, R. P. (1973). Localization of bacteria in the gastrointestinal tract: A possible explanation of intestinal spirochaetosis. *Infect Immun*, 7(6), 961-972.
- Lee J. I. & Hampson D. J. (1996). The prevalence of intestinal spirochaetes in dogs. *Aust Vet J* 74: 25–26
- Lee, B. J., & Hampson, D. J. (1995). A monoclonal antibody reacting with the cell envelope of spirochaetes isolated from cases of intestinal spirochaetosis in pigs and humans. *FEMS Microbiol Lett*, 131(2), 179-184.
- Lee, J. I., & Hampson, D. J. (1992). Intestinal spirochaetes colonizing aborigines from communities in the remote north of Western Australia. *Epidemiol Infect*, 109(1), 133.
- Lee, J. I., & Hampson, D. J. (1994). Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. *J med microbiol*, 40(5), 365-371.
- Lee, J. I., Hampson, D. J., Combs, B. G., & Lymbery, A. J. (1993). Genetic relationships between isolates of Serpulina (Treponema) hyodysenteriae, and comparison of methods for their subspecific differentiation. *Vet microbiol*, 34(1), 35-46.
- Lee, J. I., Hampson, D. J., Lymbery, A. J., & Harders, S. J. (1993). The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. *Vet Microbiol*, 34(3), 273-285.
- Lemcke, R. M., Bew, J., Burrows, M. R., & Lysons, R. J. (1979). The growth of Treponema hyodysenteriae and other porcine intestinal spirochaetes in a liquid medium. *Res Vet Sci*, 26(3), 315.
- Leser, T. D., Møller, K. K., Jensen, T. K., & Jorsal, S. E. (1997). Specific detection of Serpulina hyodysenteriae and potentially pathogenic weakly  $\beta$ -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Prob*, 11(5), 363-372. doi:10.1006/mcpr.1997.0129
- Macfie, J.W.S. (1916). The morphology of certain spirochaetes of man and other animals. *Ann Trop Med Parasit* 10: 305–343

- Margawani, K. R., Robertson, I. D., Brooke, C. J., & Hampson, D. J. (2004). Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of *Brachyspira pilosicoli* in humans on the island of Bali, Indonesia. *J Med Microbiol*, 53(4), 325-332.
- Miao, R. M., Fieldsteel, A. H., & Harris, D. L. (1978). Genetics of *Treponema*: characterization of *Treponema hyodysenteriae* and its relationship to *Treponema pallidum*. *Infect Immun*, 22(3), 736-739.
- Mikosza A. S., La T, Brooke CJ, Lindboe CF, Ward PB, Heine RG, Guccion JG, de Boer WB and Hampson DJ. (1999). PCR amplification from fixed tissue indicates frequent involvement of *Brachyspira aalborgi* in human intestinal spirochetosis. *J Clin Microbiol* 37: 2093–2098
- Mikosza, A. S. & Hampson, D. (2001). Human intestinal spirochetosis: *Brachyspira aalborgi* and/or *Brachyspira pilosicoli*? *Animal Health Research Reviews / Conference Of Research Workers In Animal Diseases*, 2(1), 101-110.
- Mikosza, A. S., La, T., de Boer, W. B., & Hampson, D. J. (2001). Comparative prevalences of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* as etiologic agents of histologically identified intestinal spirochetosis in Australia. *J Clin Microbiol*, 39(1), 347-350.
- Mikosza, A. S., La, T., Margawani, K. R., Brooke, C. J., & Hampson, D. J. (2001). PCR detection of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in human faeces. *FEMS Microbiol Lett*, 197(2), 167-170.
- Mikosza, A., Hampson, D., Koopmans, M., & Van Duynhoven, Y. (2003). Presence of *Brachyspira aalborgi* and *B. pilosicoli* in feces of patients with diarrhea [4]. *J Clin Microbiol*, 41(9), 4492. doi:10.1128/JCM.41.9.4492.2003
- Møller, K., Jensen, T. K., Boye, M., Leser, T. D., & Ahrens, P. (1999). Amplified Fragment Length Polymorphism and Pulsed Field Gel Electrophoresis for Subspecies Differentiation of *Serpulina pilosicoli*. *Anaerobe*, 5(3), 313-315.
- Moon, H. W., Whipp, S. C., & Argenzio, R. A. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun*, 41(3), 1340-1351.
- Mortimer-Jones, S. M., Phillips, N. D., La, T. T., Naresh, R. R., & Hampson, D. J. (2008). Penicillin resistance in the intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli* associated with OXA-136 and OXA-137, two new variants of the class D  $\beta$ -

lactamase OXA-63. *J Clin Microbiol*, 57(9), 1122-1128.  
doi:10.1099/jmm.0.2008/001552-0

- Muniappa, N., & Duhamel, G. E. (1997). Outer membrane-associated serine protease of intestinal spirochetes. *FEMS Microbiol Lett*, 154(1), 159-164.
- Muniappa, N., Duhamel, G., Mathiesen, M., & Bargar, T. (1996). Light microscopic and ultrastructural changes in the ceca of chicks inoculated with human and canine *Serpulina pilosicoli*. *Vet Pathol*, 33(5), 542-550.
- Muniappa, N., Mathiesen, M. R., & Duhamel, G. E. (1997). Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J Vet Diagn Invest*, 9(2), 165-171.
- Munshi, M. A., Traub, R. J., Robertson, I. D., Mikosza, A. J., & Hampson, D. J. (2003). Colonization and Risk Factors for *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in Humans and Dogs on Tea Estates in Assam, India. *Epidemiol Infect*, 132 (1), 137-144. doi: 10.1017/S095026880300116X
- Nathues, H., Oliveira, C. B., Wurm, M., Beilage, E., & Givisiez, P. N. (2007). Simultaneous Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in Porcine Faeces and Tissue Samples by Multiplex-PCR.(Author abstract)(Report). *J Vet Med A*, (9), 532. doi:10.1111/j.1439-0442.2007.00995.x
- Neef, N. A., Lysons, R. J., Trott, D. J., Hampson, D. J., Jones, P. W., & Morgan, J. H. (1994). Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. *Infect Immun*, 62(6), 2395-2403.
- Noach, L. A., Rolf, T. M., & Tytgat, G. N. (1994). Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol*, 47(8), 699-704.
- Ochiai, S., Adachi, Y., & Mori, K. (1996). Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comb. nov. *Microbiol Immunol*, 41(6), 445-452.
- Olsen, I., Paster, B. J., & Dewhirst, F. E. (2000). Taxonomy of spirochetes. *Anaerobe*, 6(1), 39-57.
- Olson, L. D. (1995). Survival of *Serpulina hyodysenteriae* in an effluent lagoon. *J Am Vet Med Assoc* 207: 1470-1472

- Oxberry, S. L., & Hampson, D. J. (2003). Colonisation of pet shop puppies with *Brachyspira pilosicoli*. *Vet Microbiol*, 93(2), 167-174. doi:10.1016/S0378-1135(03)00017-8
- Oxberry, S. L., Trott, D. J., Hampson, D. J. (1998). *Serpulina pilosicoli*, waterbirds and water: potential sources of infection for humans and other animals. *Epidemiol Infect* 121: 219–225
- Özdamar, K. *Paket programlar ile istatistiksel veri analizi I*. Eskişehir: Kaan kitapevi; 1999.
- Padmanabhan, V., Dahlstrom, J., Maxwell, L., Kaye, G., Clarke, A., & Barratt, P. J. (1996). Invasive intestinal spirochetosis: a report of three cases. *Pathology*, 28(3), 283-286.
- Park, N. Y., Chung, C. Y., McLaren, A. J., Atyeo, R. F., & Hampson, D. J. (1995). Polymerase chain reaction for identification of human and porcine spirochaetes recovered from cases of intestinal spirochaetosis. *FEMS Microbiol Lett*, 125(2-3), 225-229.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E. (2000). Phylogenetic foundation of spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol.*;2(4):341–344
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Weisburg, W. G., Tordoff, L. A., Fraser, G. J., Hespell, R. B., ... & Woese, C. R. (1991). Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol*, 173(19), 6101-6109.
- Pettersson, B., Fellström, C., Andersson, A., Uhlen, M., Gunnarsson, A., & Johansson, K. E. (1996). The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. *J Bacteriol*, 178(14), 4189-4199.
- Phillips, N. D. (2006). Diagnosis, molecular epidemiology and control of avian intestinal spirochaetosis (Doctoral dissertation, Murdoch University).
- Pindak, F. F., Clapper, W. E. & Sherrod, J. H. (1995). Incidence and distribution of spirochetes in the digestive tract of dogs. *Am J Vet Res* 26: 1391–1402
- Pringle, M. , Landén, A., & Franklin, A. (2006). Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates. *Res Vet Sci*, 80(1), 1-4. doi:10.1016/j.rvsc.2005.02.004

- Råsbäck T, Jansson DS, Johansson KE & Fellström C. (2005). New isolates of strongly haemolytic porcine spirochaetes dissimilar to *Brachyspira hyodysenteriae*. The Third International Conference on Colonic Spirocheatal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy. Abstract 9.
- Råsbäck T. (2007). Laboratory Diagnostics of *Brachyspira* species. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala
- Råsbäck, T., Fellström, C., Gunnarsson, A., & Aspán, A. (2006). Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J Microbiol Meth*, 66(2), 347-353. doi:10.1016/j.mimet.2005.12.008
- Råsbäck, T., Jansson, D. S., Johansson, K. E., & Fellström, C. (2007). A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ Microbiol*, 9(4), 983-991.
- Rohde, J., Rothkamp, A., & Gerlach, G. F. (2002). Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel nox-PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 40(7), 2598-2600.
- Ruane, P. J., Nakata, M. M., Reinhardt, J. F., & George, W. L. (1989). Spirochete-like organisms in the human gastrointestinal tract. *Rev Infect Dis*, 11(2), 184-196.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., & Whittam, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microb*, 51(5), 873.
- Singleton, P. & Sainsbury, D. (2006). Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, (Third Ed.) John Wiley & Sons Ltd. West Sussex , England. ISBN: 0-470-03545-5
- Songer, J. G., Glock, R. D., Schwartz, K. J., & Harris, D. L. (1978). Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from sources other than swine. *J Am Vet Med Assoc*, 172(4), 464-466.
- Songer, J. G., Kinyon, J. M., & Harris, D. L. (1976). Selective medium for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol*, 4(1), 57-60.

- Stanton, T. B. (1992). Proposal To Change the Genus Designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. Containing the Species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 42(1), 189-190.
- Stanton, T. B., & Cornell, C. P. (1987). Erythrocytes as a source of essential lipids for *Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun*, 55(2), 304-308.
- Stanton, T. B., & Lebo, D. F. (1988). *Treponema hyodysenteriae* growth under various culture conditions. *Vet Microbiol*, 18(2), 177-190.
- Stanton, T. B., Fournie-Amazouz, E., Postic, D., Trott, D. J., Grimont, P. A. D., Baranton, G., ... & Saint Girons, I. (1997). Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4), 1007-1012.
- Stanton, T. B., Jensen, N. S., Casey, T. A., Tordoff, L. A., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (1991). Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a New Genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innocens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 41(1), 50-58.
- Stanton, T. B., Postic, D., & Jensen, N. S. (1998). *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. *Int J Syst Bacteriol*, 48(3), 669-676.
- Stanton, T. B., Trott, D. J., Lee, J. I., McLaren, A. J., Hampson, D. J., Paster, B. J., & Jensen, N. S. (1996). Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons. *FEMS Microbiol Lett*, 136(2), 181-186.
- Stege, H., Jensen, T. K., Møller, K., Baekbo, P., & Jorsal, S. E. (2000). Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med*, 46(4), 279-292.
- Stephens, C. P., & Hampson, D. J. (1999). Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. *Avian Pathol*, 28(5), 447-454. doi:10.1080/03079459994461
- Stephens, C. P., & Hampson, D. J. (2001). Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Animal Health Research Reviews*, 2, 83-92.

- Swayne DE and McLaren AJ. (1997). Avian intestinal spirochaetes and avian intestinal spirochaetosis. In: Hampson DJ and Stanton TB (eds), *Intestinal Spirochaetosis in Domestic Animals and Humans*. Wallingford, UK: CAB International, pp. 267–300
- Swayne, D. E., Eaton, K. A., Stoutenburg, J., Trott, D. J., Hampson, D. J., & Jensen, N. S. (1995). Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity for chickens. *Infect Immun*, 63(2), 430-436.
- Tachibana, H., Nakamura, S., & Adachi, Y. (2003). Proposal of *Brachyspira ibaraki* sp. nov. for Japanese human intestinal spirochetes closely related to *Brachyspira aalborgi*. In *The Second International Conference on Colonic Spirocheatal Infections in Animals and Humans*.
- Takeuchi, A., Jervis, H. R., Nakazawa, H., & Robinson, D. M. (1974). Spiral-shaped organisms on the surface colonic epithelium of the monkey and man. *Am J Clin Nutr*, 27(11), 1287-1296.
- Tanahashi, J., Daa, T., Gamachi, A., Kashima, K., Kondoh, Y., Yada, N., & Yokoyama, S. (2008). Human intestinal spirochetosis in Japan; its incidence, clinicopathologic features, and genotypic identification. *Modern Pathology: An Official Journal Of The United States And Canadian Academy Of Pathology, Inc*, 21(2), 76-84.
- Taylor, D. J., Simmons, J. R. & Lair, H. M. (1980). Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec* 106: 326-332
- Thomson, J. R., Smith, W. J., Murray, B. P., Murray, D., Dick, J. E., & Sumption, K. J. (2001). Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. *Animal Health Research Reviews*, 2, 31-36.
- Tompkins, D. S., Foulkes, S. J., Godwin, P. G., & West, A. P. (1986). Isolation and characterisation of intestinal spirochaetes. *J Clin Pathol*, 39(5), 535-541.
- Trivett-Moore, N. L., Gilbert, G. L., Law, C. L. H., Trott, D. J., & Hampson, D. J. (1998). Isolation of *Serpulina pilosicoli* from rectal biopsy specimens showing evidence of intestinal spirochetosis. *J Clin Microbiol.* 36: 261-265

- Trott, D. J., & Hampson, D. J. (1998). Evaluation of day-old specific pathogen-free chicks as an experimental model for pathogenicity testing of intestinal spirochaete species. *J Comp Pathol*, 118(4), 365-381.
- Trott, D. J., Atyeo, R. F., Lee, J. I., Swayne, D. A., Stoutenburg, J. W. and Hampson, D. J. (1996), Genetic relatedness amongst intestinal spirochaetes isolated from rats and birds. *Lett Appl Microbiol*, 23: 431-436. doi: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb01352.x
- Trott, D. J., Combs, B. G., Mikosza, A. S. J., Oxberry, S. L., Robertson, I. D., Passey, M., ... & Hampson, D. J. (1997). The prevalence of *Serpulina pilosicoli* in humans and domestic animals in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol Infect*, 119(03), 369-379.
- Trott, D. J., Huxtable, C. R., & Hampson, D. J. (1996). Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infect Immun*, 64(11), 4648-4654.
- Trott, D. J., Jensen, N. S., Saint Girons, I., Oxberry, S. L., Stanton, T. B., Lindquist, D., & Hampson, D. J. (1997). Identification and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients. *J Clin Microbiol*, 35(2), 482-485.
- Trott, D. J., Mikosza, A. S., Combs, B. G., Oxberry, S. L., & Hampson, D. J. (1998). Population genetic analysis of *Serpulina pilosicoli* and its molecular epidemiology in villages in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Int J Syst Bacteriol*, 48(3), 659-668.
- Trott, D. J., Stanton, T. B., Jensen, N. S., & Hampson, D. J. (1996). Phenotypic characteristics of *Serpulina pilosicoli* the agent of intestinal spirochaetosis. *FEMS Microbiol Lett*, 142(2-3), 209-214.
- Trott, D. J., Stanton, T. B., Jensen, N. S., Duhamel, G. E., Johnson, J. L., & Hampson, D. J. (1996). *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Bacteriol*, 46(1), 206-215.
- Turek, J. J., & Meyer, R. C. (1978). Studies on a canine intestinal spirochete: scanning electron microscopy of canine colonic mucosa. *Infect Immun*, 20(3), 853-855.
- Turek, J. J., & Meyer, R. C. (1979). An intestinal spirochete infestation in the opossum. *Curr Microbiol*, 3(1), 27-31.

- Verlinden, M., Pasmans, F., Garmyn, A., Haesebrouck, F., Martel, A., & De Zutter, L. (2012). Occurrence of viable *Brachyspira* spp. on carcasses of spent laying hens from supermarkets. *Food Microbiol*, 32(2), 321-324. doi:10.1016/j.fm.2012.07.005
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van De Lee, T., Hornes, M., ... & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23(21), 4407-4414.
- White, A. K., Hansen-Lardy, L., Brodersen, B. W., Kelling, C. L., Hesse, R. A., & Duhamel, G. E. (1998). Enhanced immunohistochemical detection of infectious agents in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues following heat-mediated antigen retrieval. *J Vet Diagn Invest*, 10(2), 214-217.
- Zuerner, R. L., Stanton, T. B., Minion, F. C., Li, C., Charon, N. W., Trott, D. J., & Hampson, D. J. (2004). Genetic variation in *Brachyspira*: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish *B. pilosicoli* from *B. hyodysenteriae*. *Anaerobe*, 10(4), 229-237.

## ETİK KURUL KARARI



T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 155

29/07/2010

Sn. Prof. Dr. Seyyal AK  
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No: 155  
Başvuru Tarihi: 06/07/2010

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Vet. Hek. Baran ÇELİK'e ait "İstanbul'da sağlıklı ve diareli köpeklerde *Brachyspira pilosicoli* varlığının araştırılması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ  
İ. Ü. HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Müjdat UYSAL  
Üye

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN  
Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV  
Üye

Prof. Dr. Alper YILMAZ  
Üye

Prof. Dr. Mehmet YALTIK  
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ  
Üye

Avukat Safiye ALTUN  
Üye

Mak. Müh. Seyfettin AVCI  
Üye

İstanbul Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı  
İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü 34119 Beyazıt-İSTANBUL  
TEL : (0 212) 440 00 00/ 10013  
E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

## TELİF HAKKI İZİNİ

### İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü TEZLERİN ÇOĞALTILMASI VE YAYIMI İÇİN İZİN BELGESİ

#### Tez Yazarının

Soyadı : ...ÇELİK..... Adı: ...BARAN.....

Uyruğu : TC  T.C. Kimlik No: 71392029238

Diğer  Belirtiniz.....

Sürekli Adresi: ..Sakızağacı Mahallesi.. Taşhan caddesi Dedebey apt. No:9/6 Bakırköy/ İST

Telefon No:05334172971..... Faks: ..... E-Posta: [baran.celik@istanbul.edu.tr](mailto:baran.celik@istanbul.edu.tr)

**Tezin yapıldığı Kurum:** İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Tez Türü:** Doktora  Yüksek Lisans

**Mezuniyet Tarihi:** .....03,02,2014.....  
(Gün/Ay/Yıl)

**Tezin Başlığı:** ..İstanbul'da sağlıklı ve diyareli köpeklerde Brachyspira pilosicoli varlığının araştırılması


**Tez Desteklenmişse Araştırma Projesi No:** .....BAP 12329

**Tez yazarı aşağıdaki seçeneklerden birini işaretleyerek imzalamalıdır.**

..a)Yukarıda başlığı yazılı olan tezinin, ilgilenenlerin incelemesine sunulmak üzere **İstanbul Üniversitesi ve bağlı alt kurumları** tarafından arşivlenmesi, kağıt, mikroform veya elektronik formatta, İnternet dahil olmak üzere her türlü ortamda tamamen veya kısmen çoğaltılması, ödünç verilmesi dağıtımı ve yayımı için, tezimize ilgili fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere hiçbir ücret (royalty) ve erteleme talep etmeksizin izin verdiğimi beyan ederim.

Tez Yazarı İmza

Tarih

.....  


.....  
05.02.2014

..b)Tezinin İstanbul Üniversitesi ve/veya bağlı alt kurumları tarafından çoğaltılması veya yayımının ..... tarihine kadar ertelenmesini talep ediyorum. Bu tarihten sonra (a) maddesindeki koşulların geçerli olacağını kabul ve beyan ederim. (Erteleme süresi formun imzalandığı tarihten itibaren en fazla 3 (üç) yıldır.) (Tezin kopyalanması endişesi, tezin erişime açılmasının engellenmesi için bir gerekçe olarak kabul edilemez.)

Tez Yazarı İmza

Tarih

.....

.....

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	BARAN	<b>Soyadı</b>	ÇELİK
<b>Doğ.Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğ.Tar.</b>	22/06/1981
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	71392029238
<b>Email</b>	baran.celik@istanbul.edu.tr	<b>Tel</b>	02124737070/17061

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	İ.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ	2003
<b>Lise</b>	ATAKÖY CUMHURİYET LİSESİ	1998

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. ARAŞ.GÖR.	İ.Ü.	2012-
2.		-
3.		-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ	67	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
OFFICE	İYİ
COREL DRAW	İYİ

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):

