

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
DOKTORA PROGRAMI
DR-2024-0006

EGE BÖLGESİ RUHSATLI DENEY HAYVANI
TESİSLERİNDEKİ FARE, RAT VE GERBİLLERDE
Helicobacter TÜRLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

NECDET İLKER İÇİL
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Göksel ERBAŞ

AYDIN-2024

TEŞEKKÜR

Laboratuvar hayvanı üreten veya kullanan tesislerde enfeksiyöz ajanların ortaya çıkmasının deneysel değişkenliğe bağlı olarak bilimsel araştırma projelerini doğrudan etkilemesinin yanı sıra hayvan refahını da etkilemesi nedeniyle söz konusu tesislerin mikrobiyolojik kalitesini dikkate alma ihtiyacı gözetilerek bu çalışma planlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarının ileriye dönük projeksiyon ihtiva etmesi çalışmada kullanılan hayvan materyali ve tesis çeşitliliği ile yakından ilgilidir. Söz konusu bu çeşitliliğin oluşmasının sağlanmasında desteklerinden dolayı Ege Bölgesinde faaliyet gösteren tüm deney hayvanı tesislerinin yöneticilerine teşekkür ederim. Çalışma konusundaki yardımlarından dolayı Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Sayın Dr. Özhan TÜRKYILMAZ ve Teknik Koordinatör Dr. Gülnur KALAYCI başta olmak üzere toplanan örneklerin analiz öncesi hazırlıkları konusunda beni yalnız bırakmayan Deney Hayvanları Birimi personeli Veteriner Hekim Zülal TAVLI YILDIRIR'a, analiz sürecindeki iş ve işlemlerin yürütülmesindeki destekleri için Bakterioloji Bölüm Sorumlusu Dr. Mehmet ÖZDEN'e ve bölüm personeli Veteriner Hekim Çağatay NUHAY'a şükranlarımı sunarım. Bu proje kapsamında materyal ve ekipman sağlanması konusundaki yardımları ve projenin olgunlaşmasını sağlayan fikirleri için Sayın Prof. Dr. Şükrü KIRKAN ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine sonsuz şükranlarımı sunarım. Tüm çalışma boyunca hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan, çalışma içinde oluşan darboğazları pratik önerileriyle aşmamı sağlayan sadece bilgisini değil dostluğunu da yudumladığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Göksel ERBAŞ'a minnettarlığımı ise özellikle belirtmek isterim.

Tüm çalışma boyunca yoğun çalışma koşulları nedeniyle zaman zaman ihmal ettiğimden dolayı özür borcum olan sevgili eşim Veteriner Hekim Demet İÇİL'e sonsuz minnetimi sunuyor ve bu çalışmayı evlatlarım Gökçe Nisa ve Asaf 'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. <i>Helicobacter</i> spp.....	6
2.1.1. Tarihçe	6
2.1.2. Taksonomi	8
2.1.3. Mikrobiyolojik Özellikler.....	10
2.1.3.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	10
2.1.3.2. Kültür Özellikleri	10
2.1.3.3. Biyokimyasal Özellikleri.....	12
2.1.4. Çalışmaya Konu Olan <i>Helicobacter</i> Türleri.....	13
2.1.4.1. <i>Helicobacter typhlonius</i>	13
2.1.4.2. <i>Helicobacter rodentium</i>	14
2.1.4.3. <i>Helicobacter muridarum</i>	15
2.1.4.4. <i>Helicobacter hepaticus</i>	16
2.1.4.5. <i>Helicobacter bilis</i>	17
2.1.5. Patogenez.....	18

2.1.5.1. Gastrik Enfeksiyonlar	18
2.1.5.2. Enterohepatik Enfeksiyonlar	19
2.1.6. Bulaşma.....	25
2.1.7. Virülans.....	26
2.1.8. <i>Helicobacter</i> ve İmmünite	27
2.1.9. Tanı Yöntemleri.....	28
2.1.9.1.Serolojik Yöntemler.....	28
2.1.9.2.Histopatolojik Yöntemler.....	29
2.1.9.3.Kültür Yöntemi.....	30
2.1.9.4. Moleküler Yöntemler	31
2.1.10. Prevelans.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Hayvan Materyali	40
3.2. Yöntem	41
3.2.1. Numune Alımı	41
3.2.2. DNA İzolasyonu	41
3.2.2.1. QIAamp Stool Mini Kit Prosedürü.....	42
3.2.3. PCR.....	43
3.2.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	43
3.2.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10xTaq Buffer, dNTP Set	43
3.2.3.3. Primerler	43
3.2.3.4. PCR işlemi ve Protokol	43
3.2.3.5.Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	44
3.2.3.6.Jelde Yürütme.....	45
3.2.3.7.Görüntüleme ve Değerlendirme	45
3.2.4. İstatistiksel Yöntem	46

4. BULGULAR	47
4.1. Tesis Hayvan ve Örnek Sayıları	47
4.2. Fare Kolonilerinde <i>Helicobacter</i> spp.	47
4.2.1. Fare Tesis Dışkı Örneklem Havuzu.....	50
4.3. Rat Kolonilerinde <i>Helicobacter</i> spp.	50
4.3.1. Rat Tesis Dışkı Örneklem Havuzu	53
4.4. Gerbil Kolonisinde <i>Helicobacter</i> spp.	53
4.4.1. Gerbil Tesis Dışkı Örneklem Havuzu	54
4.5. Dışkı ve Kolon Örnek Sonuçları Karşılaştırmaları.....	54
5. TARTIŞMA	57
5.1. Klinik Belirtiler ve Bulaşma Yolları.....	57
5.2. Prevalans.....	60
5.3. Dışkı ve Kolon Örnek Sonuçları Karşılaştırmaları.....	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	69
BİLİMSEL ETİK BEYANI	79
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	Amerika Tip Kültür Koleksiyonu
EHS	Enterohepatik <i>Helicobacter</i> Türleri
BHI	Beyin Kalp İnfüzyon
C	Sitozin
CagPAI	Cag Patojenite Adası
CDT	Sitoletal Distansiyon Toksini
cdtABC	Sitoletal Distansiyon Toksini Kodlayan Gen Kümesi
DMSO	Di Metil Sülfooksit
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
FCS	Fetal Buzağı Serumu
FELASA	Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilimi Dernekleri Federasyonu
G	Guanin
HCC	Hepatoselüler Karsinom
HHG	<i>H. hepaticus</i> Genomik Adası
IBD	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
IL	İnterlökin
ORF	Open Reading Frame
PBS	Fosfat Buffer Salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEB	Periplasmic Binding Protein
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SCID	Severe Combined Immunodeficiency - Kombine İmmün Yetmezliği
SPF	Spesifik Patajonlerden Ari
T4SS	Tip 4 Sekresyon Sistemi
Th17	Yardımcı T Hücresi 17
TREG	Regülatör T Hücreleri
tRNA	Transport RNA
TSA	Triptikaz Soya Agarı
TTC	Trifenil Tetrazolyum Klorür
vacA	Vakuolleştirici Sitotoksin Geni

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Fare Kolonileri 16S rRNA PCR Bant Görünümleri.....	49
Şekil 2 Rat Kolonileri 16S rRNA PCR Bant Görünümleri.	51
Şekil 3. Multiplex PCR Bant Görünümleri.	52



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Kemirgenlerde hastalıkla ilişkilendirilen <i>Helicobacter</i> spp. türlerinin doku tropizmleri ve neden olduğu hastalıklar (Whary ve Fox, 2006).....	20
Tablo 2. Farelerde Bakteriyel enfeksiyöz ajanların Avrupa ve Kuzey Amerika prevalansları (Pritchett- Corning ve diğerleri,2009).....	34
Tablo 3. Sıçan bakteriyel enfeksiyöz ajanların Avrupa ve Kuzey Amerika prevalansları (Pritchett Corning ve diğerleri, 2009).....	35
Tablo 4. Örneklem tablosu.....	40
Tablo 5. PCR’da kullanılan 16S rRNAoligonükleotid dizisi (Riley ve diğerleri, 1996; Beckwith ve diğerleri, 1997).....	43
Tablo 6. <i>Helicobacter</i> spp. PCR işlemi ve uygulanacak protokol (Beckwith ve diğerleri, 1997).....	44
Tablo 7. Türlerle ait primer dizilimleri (Feng ve diğerleri, 2004).....	45
Tablo 8. Fare kolonilerinde <i>Helicobacter</i> spp.ve türlerle göre dağılımı.....	48
Tablo 9. Fare kolonilerinde mix enfeksiyon oranları.....	49
Tablo 10. Fare tesis dışkı örneklem havuzunda <i>Helicobacter</i> spp.ve türlerle göre dağılımı.....	50
Tablo 11. Rat kolonilerinde <i>Helicobacter</i> spp.ve türlerle göre dağılımı.....	52
Tablo 12. Rat tesis dışkı örneklem havuzunda <i>Helicobacter</i> spp.ve türlerle göre dağılımı.....	53
Tablo 13. Gerbil kolonisinde <i>Helicobacter</i> spp.ve türlerle göre dağılımı.....	54
Tablo 14. Gerbil tesis dışkı örneklem havuzunda <i>Helicobacter</i> spp.ve türlerle göre dağılımı.....	54
Tablo 15. Dışkı ve Kolon Örnek Sonuçları Karşılaştırmaları.....	55

ÖZET

EGE BÖLGESİ RUHSATLI DENEY HAYVANI TESİSLERİNDEKİ FARE, RAT VE GERBİLLERDE HELICOBACTER TÜRLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

İçil N.İ. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2024

Amaç: Bu çalışmayla Ege Bölgesindeki fare, rat ve gerbillerde *Helicobacter* spp. ve *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* ve *H. typhlonius* türlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ruhsatlı 11 adet deney hayvanı tesisinin her birinden 15-22 haftalık yaşlar arasından rastgele seçilen ayrı kafeslerden 10 adet fare, 10 adet rat ve 10 adet de gerbil olmak üzere toplam 230 hayvandan kolon ve dışkı örnekleri toplanmıştır. Elde edilen DNA'lardan *Helicobacter* spp,16S ribozomal RNA geni kullanılarak PCR yöntemi ile pozitif örneklerin tür tayini ise multiplex PCR ile belirlenmiştir.

Bulgular: Farelerde *Helicobacter* spp. prevalansı %90,91 olarak gerçekleşmiştir. Pozitif örneklerin tür bazındaki PCR sonuçlarına göre en yaygın tür %90,91 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* %72,73 prevalans oranıyla ikinci yaygın tür olurken onu %27,27'lik prevalansla *H. hepaticus*'un takip ettiği tespit edilmiştir. Ratlarda *Helicobacter* spp prevalansı %87,5 olarak gerçekleşmiştir. Pozitif örneklerin PCR sonuçlarına göre en yaygın tür %87,5 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis*, *H. hepaticus* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* %12,5 prevalans oranıyla ikinci yaygın türdür. Gerbil bulunduran tek tesisten alınan kolon örneklerinde ise sadece *H. rodentium* ve *H. typhlonius* tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmaya konu olan bölgede, özellikle subklinik olmak üzere deney hayvanlarındaki enfeksiyonlara neden olan *Helicobacter* spp.'nin oldukça yaygın olduğu belirlenmiştir. Deney Hayvanı tesislerinin bu ajan yönünden takibinin yapılması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter* spp, Fare, Rat, Gerbil

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *HELICOBACTER* SPP. IN MICE, RAT AND GERBILS IN LICENSED EXPERIMENTAL ANIMAL FACILITIES IN AEGEAN REGION.

İçil N.İ. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2024

Objective: In this study, it was aimed to investigate the presence of *Helicobacter* spp. and *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* and *H. typhlonius* species in mice, rats and gerbils in the Aegean Region.

Material-Method: Colon and stool samples were collected from a total of 230 animals, 10 mice, 10 rats and 10 gerbils, from separate cages randomly selected between the ages of 15- 22 weeks from each of the 11 licensed experimental animal facilities. From the DNA obtained, *Helicobacter* spp. 16S ribosomal RNA gene was determined by PCR method, and positive samples were determined by multiplex PCR.

Results: The prevalence of *Helicobacter* spp. in mice was 90,91%. According to the species-based PCR results of the positive samples, the most common species was *H. rodentium* with a prevalence of 90,91%. In the study in which *H. bilis* and *H. muridarum* species were not detected in any facility, it was determined that *H. typhlonius* was the second most common species with a prevalence rate of 72,73%, followed by *H. hepaticus* with a prevalence of 27,27%. The prevalence of *Helicobacter* spp. in rats was 87,5%. According to the PCR results of the positive samples, the most common species was *H. rodentium* with a prevalence of 87,5%. In the study where *H. bilis*, *H. hepaticus* and *H. muridarum* species were not detected in any facility, *H. typhlonius* was the second common species with a prevalence of 12,5% in rats. On the other hand, only *H. rodentium* and *H. typhlonius* were detected in the colon samples taken from a single facility containing gerbils.

Conclusion: It was determined that *Helicobacter* spp., which causes infections in experimental animals, especially subclinical, is quite common in the study area. It is recommended that the Experimental Animal facilities monitorize for this agent.

Key Words: *Helicobacter* spp., Mice, Rat, Gerbil.

1. GİRİŞ

Çevresel ve genetik faktörler ve bunların birbiriyle olan etkileşimleri, deneysel amaçla kullanılacak hayvanların araştırmada kullanım uygunluğunu etkileyebilmektedir. Laboratuvar hayvanı üreten veya kullanan tesislerde enfeksiyöz ajanların ortaya çıkması, deneysel değişkenliğe bağlı olarak bilimsel araştırma projelerini doğrudan etkilemesinin yanı sıra hayvan refahını da etkilediğinden söz konusu tesislerin mikrobiyolojik kalitesini dikkate alma ihtiyacı doğmuştur (Mähler ve diğerleri, 2014). Bilimsel gerekliliklerden biri olan araştırmaların tekrarlanabilirliğinin sağlanması, deneysel sonuçları etkileyebilecek hastalıklardan ve diğer koşullardan arınmış laboratuvar hayvanlarını gerektirdiği büyük ölçüde kabul gören bir yaklaşımdır (Matos-Rodrigues ve diğerleri, 2020).

Şimdiye kadar yapılan araştırmalara göre kemirgenlerdeki enfeksiyonlardan birkaç grup mikroorganizmanın sorumlu olduğu belirtilmektedir (Mähler ve diğerleri, 2014). Bu enfeksiyonlardan önemli bir kısmının açık klinik belirtilere yol açmaması nedeniyle klinik belirtilerin yalnızca sınırlı tanısal değere sahip olduğu, ancak klinik bir tablo oluşturmasa bile enfeksiyonların hayvan deneylerinin sonucunu etkileyecek potansiyel taşıdıkları bildirilmektedir. Zira subklinik bile olsa deney hayvanlarında doğal olarak meydana gelen enfeksiyonlar, hayvanın fizyolojisini, bağışıklığını ve davranışını etkileyebilmektedir (Mähler ve diğerleri, 2014). Söz konusu bu etkiler bağışıklığı baskılanmış deney hayvanları için baskılanmamış olanlara nispetle daha büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Matos-Rodrigues ve diğerleri, 2020). Bu nedenle, deney hayvanı kullanımı ile ilgili standartlar oluşturma amacıyla kurulan uluslararası organizasyonlar her kurumun herhangi bir kalite güvence sistemine entegre edilmiş bir laboratuvar hayvanı 'Sağlık İzleme' programı oluşturmasını tavsiye etmektedirler (Bracken ve diğerleri, 2017; Mähler ve diğerleri, 2014).

Bu organizasyonlardan en geniş katılımı olan Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilimi Dernekleri Federasyonu (FELASA)'nın tavsiye ettiği 'Sağlık İzleme' programının rutin taramalarında; laboratuvar fareleri için 3 aylık periyotlarda izlenmesi önerilen bulaşıcı ajanlar arasında *Helicobacter spp*'de yer almaktadır. Söz konusu etkenin cins düzeyinde pozitif olması durumunda ise, *H. hepaticus*, *H. bilis* ve *H. typhlonius* türlerinin belirlenmesini, ratlar için ise yine 3 aylık periyotlarda *Helicobacter spp.*'nin izlenmesi ve söz konusu ajanın cins düzeyinde pozitif olması durumunda ise *H. bilis* türünün belirlenmesini tavsiye etmektedir (Mähler ve diğerleri, 2014).

Robin Warren ve Barry Marshall 1984'te *Helicobacter pylori*'yi keşfettiğinden beri, hızla genişleyen *Helicobacter* cinsi şu ana kadar 67'si klasifiye edilmiş 314 adeti ise klasifiye edilmemiş toplam 381 türü içermektedir (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2023)

Helicobacter spp. sadece insanlarda değil, özellikle laboratuvar kemirgenlerinde önemli olmak üzere olan tüm hayvanlar aleminde bulunmaktadır. Söz konusu bakterinin kabaca mideyi kolonize eden gastrik *Helicobacter* türleri ve bağırsakta ve hepatobiliyer sistemde bulunabilen enterohepatik *Helicobacter* türleri olmak üzere iki gruba ayrılabilceği belirtilmektedir (Neubert ve diğerleri, 2022). Enterohepatik *Helicobacter* türlerinin (EHS) farelerde baskın *Helicobacter* türleri olduğu ve fare tesislerinde küresel olarak endemik olduğu belirtilmektedir (Pritchett- Corning ve diğerleri, 2009).

Laboratuvar kemirgenlerinde *Helicobacter* spp. subklinik seyrin yanı sıra klinik semptomlara da neden olabilmektedir. Bazı Enterohepatik *Helicobacter* türlerinin azalmış üreme performansı, rektal prolaps, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve tiflokolit ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *H. hepaticus* ve *H. bilis* ayrıca farelerde hepatit ve hepatokarsinoma da neden olabilmektedir (Whary ve Fox, 2006). Bununla birlikte *Helicobacter* ile ilişkili hastalık, bağışıklığı yeterli kemirgenlerin çoğunda klinik olarak gözlemlenebilir değildir ve bağışıklık sistemi anormallikleri olan bağışıklığı yetersiz veya transgenik fareler deneysel veya doğal olarak enfekte olduğunda, morbidite safhasına kadar subklinik inflamasyon gelişmektedir (Whary ve Fox, 2006). Hastalık belirtilerinin ortaya çıkması, normal savunmadan yoksunlaştırılan veya *Helicobacter* enfeksiyonuna karşı proinflamatuvar yanıtlara yatkınlık oluşturan bağışıklık kusurlarına bağlı olmaktadır. Bazı fare ırklarında ve suşlarda cinsiyetin hastalık seyri üzerindeki etkisine ek olarak, konağın yaşı ile pozitif bir korelasyonun varlığından söz edilmektedir (Fox ve diğerleri, 2003; Ward ve diğerleri, 1994).

Kemirgenlerin enterohepatik *Helicobacter* spp. enfeksiyonlarına olan ilgi, yalnızca araştırma modelleri üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle değil, aynı zamanda kolesistit, hepatoselüler karsinom, bakteriyemi ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları dahil olmak üzere beşeri hastalıkların modellenmesindeki deneysel yararları nedeniyle arttığı belirtilmektedir. Şöyle ki; *H. hepaticus* ile fareleri ve gerbilleri deneysel olarak kolonize eden gastrik *Helicobacter* spp. mide, karaciğer ve alt bağırsak yolunda neoplastik lezyonlara ilerleyebilen önemli epitelyal hiperplazi ve displazi ile ilişkili kronik inflamasyonu uyarmaktadır (Whary ve Fox, 2006).

İmmünolojik olarak insanlara benzer şekilde fareler de enfeksiyöz ajanlara karşı, normal

tepkinin yanı sıra ilgisiz enfeksiyonlara karşı konak yanıtlarının modüle edildiği bir bellek T hücreleri repertuarı ile yanıt vermektedir. Bu konakçı bağışıklık tepkisi genellikle heterolog bağışıklık olarak adlandırılır. Bu bağlamda; farelerde enterik *Helicobacter* enfeksiyonlarının yaygın olarak görülmesinin yanı sıra insanlarda enterohepatik *Helicobacter* ile ilişkili hastalık sayısında gözlenen belirgin artış, *Helicobacter* koenfeksiyonlarının *H. pylori* patogenezi, aşı stratejileri ve antimikrobiyal modellemeleri içeren kemirgen çalışmalarını etkileyebileceği düşüncesi ile yapılan çalışmada; *H. pylori* ve *H. bilis* ile deneysel bir koenfeksiyonun, *H. pylori* kaynaklı gastriti azaltıcı bir etki gösterebildiği belirtilmektedir. Lemke ve diğerleri (2009) tarafından yapılan söz konusu çalışmada daha önce *Helicobacter* spp. antijenlerine maruz bırakılmış olan farelerde, *Helicobacter* spp. tarafından aktive edilen doğal regülatör T hücrelerinin (TREG), *H. pylori* enfeksiyonu oluşumu sonrası bağırsaktan mideye göç etmesi halinde, mide lezyonlarında azalma olabileceği belirtilmektedir. Benzer bir sonuç C57BL/6 fareleri deneysel olarak *H. pylori* ve *H. muridarum* ile birlikte enfekte edildiğinde de görülmüştür (Ge ve diğerleri, 2011). Bununla birlikte Ge ve diğerleri (2011) tarafından yapılan çalışmada Lemke ve diğerleri, (2009) nın ulaştığı sonuçla tutarsız olarak *H. Pylori* ve *H. hepaticus*'un deneysel ko-enfeksiyonunun *H. pylori* mono-enfekte farelere kıyasla daha güçlü mide lezyonlarının geliştiği gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak, *H. hepaticus*'un Th17 hücrelerini TREG hücrelerinden daha fazla uyarması, Th17 sinyallerini arttırması ve daha belirgin patolojik bulgulara yol açması olarak belirtilmektedir (Ge ve diğerleri, 2011). Bu sonuçlara benzer sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda da alınmış ve *H. bilis* ve özellikle de *H. hepaticus* ile enfeksiyonun, gerbil modelinde *H. pylori* kaynaklı gastrit ve mide kanserinde, konakçının *Helicobacter* spp.'ye verdiği yanıtın potansiyel bir etkileyicisi olarak endişe verici boyutlara ulaştığı bildirilmiştir (Bergin ve diğerleri, 2006). Ayrıca hamsterlerin söz konusu cinsin bir başka türü olan *H. aurati* ile subklinik enfeksiyonunun atipik *Giardia* kolonizasyonunu meydana getirdiği de belirtilmektedir (Nambiar ve diğerleri, 2005).

Uygun konakçı bağışıklık tepkilerine rağmen *Helicobacter* spp.'nin kalıcı olarak kolonize olmasına izin veren veya doku tropizmini etkileyen bakteriyel virülans faktörleri konusunda oldukça fazla araştırma yapıldığı belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2004). Kemirgenlerdeki doğal enfeksiyonlar ile insan hastalıkları arasındaki bağlantılar bulunduğca, 1990'lı yıllarda *H. rappini* ve *H. cinaedi* gibi bazı *Helicobacter*'lerin zoonotik olduğuna dair kanıtların ortaya çıktığı bildirilirken (Fox, 1997) 2000'li yıllarda bu kuşku doğrulanmış ve insanlarda *H. bilis* enfeksiyonunun safra yolu karsinomunu tetikleyebileceği belirtilmiştir (Segura ve diğerleri, 2015).

Deneysel çalışmalarda sadece herhangi bir patojen veya potansiyel olarak zoonotik kommensal ile enfekte olmayan hayvanlar kullanılması araştırmacıların ortak görüşü olmasına karşın birçok *Helicobacter* spp. enfeksiyonunun subklinik seyrettiği bilinmektedir. Bu enfeksiyonlar araştırma sonuçlarının yanlış yorumlanmasına neden olabilmekte, deneylerin tekrarlanması gerektirebilmekte veya sonuçlar artık tekrarlanabilir olmayabilmektedir. Bunların tümü göz önüne alınmadığında daha fazla sayıda hayvanın kullanılması kaçınılmazdır. *Helicobacter* spp. enfeksiyonu, bağışıklığı yetersiz ve/veya düzensiz fare ve sıçanlarda morbiditeye önemli oranda katkıda bulunarak araştırma programlarını zaman, para ve veri kaybıyla etkilemektedir (Neubert ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, Avrupa Laboratuar Hayvan Bilimi Dernekleri Federasyonu (FELASA), fare *Helicobacter* izleme sıklığı 1995'te gözetimsiz iken 2014'te *H. hepaticus*, *H. bilis* ve *H. typhlonius*'un üç aylık peryoda yükseltme ihtiyaı duymuştur (Mhler ve diğerleri, 2014).

Kemirgenlerde, bir kısmı normal komensal bağışsak mikrobiyotası olarak kabul edilen bir kısmı ise hastalıkla ilişkilendirilen 14 *Helicobacter* türü tanımlanmıştır. Deneysel ve yabani kemirgen türleri üzerinde yapılan araştırmalar, bağışsak mukozasının genellikle bir veya daha fazla Enterohepatik *Helicobacter* türü (EHS) ile kolonize olduğunu göstermiştir. Yaygın olarak bulunan organizmalar arasında *H. bilis*, *H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. mastomyrinus*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, *H. trogontum* ve *H. typhlonius* yer almaktadır. Bu organizmaların immünkompetan hayvanlarda daha çok normal bağışsak mikrobiyotasının bir parçasını oluşturduklarından ve patojenik bir rolü destekleyen çok az kanıtın varlığından da ayrıca söz edilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2013).

Whary ve Fox (2006) Rodentlerde *Helicobacter* spp. enfeksiyonlarının tespiti için izlenebilecek 4 ana yöntemin bulunduğunu bildirmektedir. Bunlar;

a) Seroloji: *Helicobacter* ile doğal olarak enfekte olmuş immünokompetan farelerin çoğu, enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) veya western blot ile tespit edilebilen güçlü bir serum antikor yanıtı geliştirecek olmasına karşın bu konuda yapılmış çalışmalarda özellikle mix enfeksiyonlarda yanlış negatif seroloji raporlarının varlığı bilinmektedir.

b) Histoloji: Enterohepatik *Helicobacter* spp. enfeksiyonlarından kaynaklanan bağışsak ve karaciğer lezyonları, bu lezyonları geliştirme eğilimine genetik yatkınlığı olan immünokompetan farelerde bile oluşmayabilmektedir. Bu nedenle histopatolojik tanı, *Helicobacter* spp. enfeksiyonu için duyarlı veya spesifik olmaktan uzaktır.

c) Kültür Yöntemi: *Helicobacter* spp. Özel gereksinimleri olan hassas bakterilerdir

ve bu nedenle kültürü zor olan bir cins olduğu bilinmektedir. Kemirgenlerin birden fazla *Helicobacter* türü ile enfekte olması durumunda, aralarından bazı türlerin aşırı çoğalması, ayrı ayrı kolonize olan *Helicobacter* türleri için yanlış negatif kültür sonuçları verebilmektedir.

d) Moleküler Yöntemler: PCR, klasik kültür teknikleriyle tür düzeyinde kültürlenmesi veya tanımlanması zor olan bazı bakterilerin, özellikle de *Helicobacter* spp.'nin tespiti ve tanımlanması için rutin olarak kullanılmaktadır. PCR yöntemi *Helicobacter* enfeksiyonunu tespit etmek için en hassas ve özel araç olduğu genel kabul görmüş yöntemdir

Bu çalışmayla bölgesel olarak fare, rat ve gerbillerde *Helicobacter* spp. varlığının belirlenmesinin yanı sıra rutin taramaya elverişli bir yöntemin tespit edilerek doğrulanması planlanmaktadır. *Helicobacter* spp'nin kültürünün zorluğu, histopatolojik tanının *Helicobacter* spp. enfeksiyonu için duyarlı veya spesifik olmaması ve serolojik yöntemlerin mix enfeksiyonlarda özgünlükten yoksun olması nedenleri ile PCR yönteminin *Helicobacter* spp. enfeksiyonunu tespit etmek için en hassas ve güvenilir araç olduğu belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2006). Söz konusu tespit yönteminin sensitivite ve spesifite oranlarının yüksekliğinin yanı sıra rutin uygulamaya uygun ve nispeten düşük maliyetli olması tarama testlerini kolaylaştırıcı faktörlerdir. Bütün bu etkenler göz önüne alındığında, yapılacak tarama testinde PCR yöntemi kullanılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir.

Örnekleme için ise dışkı kullanımının tarama testlerini kolaylaştırıcı bir faktör olduğu belirtilmektedir (Matos-Rodrigues ve diğerleri, 2020). Ayrıca bu yöntem ötenaziyi önlediğinden dolayı tarama testlerinde ve klinik araştırmalarda 3R (Aritma, Azaltma, Değiştirme) sağlanması açısından güvenilir ve kolay bir yöntem sağlayacaktır (Neubert ve diğerleri, 2022). Bu nedenle çalışmada dışkı kullanımında alınan sonuçlar ile kolon içeriği sonuçları kıyaslanarak, örneklem için fekal örnek kullanımının uygunluğu da tartışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Helicobacter* spp.

2.1.1. Tarihçe

Hayvanların midesinde spiral şekilli bakteriler ilk kez 1881'de Rappini ve 1893'te Bizzozero tarafından tanımlanmıştır. 1896'da ise Salomon'un köpeklerde, kedilerde ve kahverengi Norveç ratlarında spiral organizmaların varlığını rapor ettiği belirtilmektedir (Hristova ve diğerleri, 2017). 1984 yılında Marshall ve Warren tarafından izole edilen spiral şekilli mikroaerofilik söz konusu bakteriler, mide hastalığı ile ilişkileri nedeniyle önemli araştırmaların odak noktası olmaya başlamıştır. O yıllarda ilk kez izole edilen bu bakterilerin *Helicobacter* cinsine ait olduğu düşünülmektedir (Fox ve diğerleri, 1994). Bu çalışmanın ardından domuz kuyruklu makaklardan *Helicobacter nemestrinae* sp izole ve tanımlanmıştır (Bronsdon ve diğerleri, 1991). Bunların yanı sıra köpeklerde *Helicobacter canis* (Stanley ve diğerleri, 1993) gibi memeli bağırsaklarından da ek *Helicobacter* türleri izole edilmiştir. Öncelikle kemirgenlerin ileum ve sekumlarını kolonize eden ancak aynı zamanda daha yaşlı kemirgenlerin mide mukozasını kolonize ettikten sonra gastrite neden olabilen enterik türlerden biri olan *H. muridarum* ise 1992 yılında Lee ve diğerleri, (1992) tarafından izole edilmiştir.

Daha sonra yapılan araştırmalarda köpeklerin, kedilerin ve Rhesus maymunlarının midelerinde %100'e varan oranlarda spiral organizma prevalanslarının kaydedildiği belirtilmektedir (Fox, 2002). Hayvanların midelerinde gözlemlenen *Helicobacter* spp'nin büyük bir kısmı görece yakın zamanda izole edildiğinden, bu bakterilerin daha önceki makalelerde morfolojik kriterlerle açıklanmakta olduğu görülmektedir. Bu organizmaların üç morfolojik formunun, 1970 yılında Lockard ve Boler tarafından köpeklerde rapor edildiği belirtilmektedir (Fox, 2002).

H. rapini taksası olarak bilinen Lockard tip 1, organizmanın tüm yüzeyini kapsamış gibi görünen periplazmik liflerle çevrelenmiş bir bakteri olarak tanımlanmıştır. Bryner ve diğerleri (1987) benzer bir organizmayı aborte küçükbaş fetüslerden izole etmişler ve organizmayı, günümüzde bir *Helicobacter* türü olduğu bilinen "*Flexispira rapini*" olarak sınıflandırmışlardır. "*Flexispira rapini*" deneysel olarak kobay ve koyunlarda abort ve aborte fetüslerde ise hepatitise neden olmaktadır. Ayrıca bu tür çeşitli hayvanların ve insanların bağırsaklarından da izole edilmiştir (Schauer ve diğerleri, 1993).

Lockard bakterisi tip 2'de de tip 1'e benzer şekilde periplazmik lifler mevcut olmakla birlikte bu lifler daha seyrekler ve organizma üzerinde tek tek veya ikili, üçlü, dörtlü gruplar halinde dağılmış görülebilmektedir (Fox, 2002). $0.4 \times 5-10$ µm boyutlarındaki bu bakteri, kedi, köpek ve insan midelerinden elde edilmiş ve *H. felis* olarak adlandırılmıştır (Paster ve diğerleri, 1991).

Üçüncü morfolojik olarak farklı organizma olan tip 3, hayvan midelerinde en sık görülen bakteri (köpekler, kediler, insan olmayan primatlar, çitalar, domuz) olmakla birlikte kimi zaman insan midelerinde de bulunmaktadır. Bu bakteri, sıkı sarmal yapısına karşın, periplazmik liflerden yoksundur. Organizmaya "*Gastrospirillum hominis*", "*H. heilmannii*" gibi çeşitli isimler verilmesine karşın son zamanlarda Hanninen ve diğerleri (1996) tarafından köpeklerden kültüre alındığı ve *H. bizzozeronii* olarak adlandırıldığı bildirilmektedir (Fox 2002). Bu bakterinin $0,3 \times 5-10$ µm boyutlarında olduğu ve hücrenin her iki ucunda 10-20 kılıflı kamçıya sahip olduğu belirtilmektedir (Fox, 2002).

Helicobacter türleri ayrıca gelinciklerin, insan olmayan primatların, çitaların, yunusların, balinaların ve vizonların midelerinden de kültürlenmiştir. İnsan gastritinin ve mide kanseri dahil ilgili rahatsızlıkların sık görülen bir nedeni olarak *H. pylori*'ye olan yoğun ilgi, birçok araştırmacıya benzer bakteriler için çeşitli hayvanları inceleme konusunda motive ettiği belirtilmektedir. Başlıca *Helicobacter cinaedi* ve *Helicobacter fennelliae* olmak üzere bazı türlerin alt bağırsak disfonksiyonları ile ilişkili olduğunun fark edilmesi de cinse olan ilgiye katkıda bulunmuştur. *Helicobacter felis*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter canis*, *Helicobacter pullorum* gibi bazı türlerinin zoonoz potansiyeli ve hepatit ile ilişkili olduğunu gösteren gözlemlerin varlığı da ayrıca bilinmektedir (Fox,2002). İnsanlarda mide lezyonlarına neden olan *H. pylori* bu cinsin en çok incelenen türüdür. Son derece yaygın olduğu ve dünya nüfusunun %50'sinden fazlasını etkilediği düşünülmektedir. Eski Mısır döneminde Ebers Papyrus, M.Ö 1600 ve daha sonra Hipokrat, Galen, Dioscurides ve diğerleriyle birlikte klasik dünyada, gastrointestinal semptomlar tanımlandığı ve çeşitli mide semptomlarını tedavi etmek için belirli şifalı bitkilerden elde edilen özler olan çeşitli veya gastrointestinal veya diğer zehirlenmeler için Theriaca olarak adlandırılan panzehir tabiatlı ilaçlar kullanıldığı bilinmektedir (Charitos ve diğerleri, 2021).

2.1.2. Taksonomi

Taksonomi bilimi her birinin değerine bağlantılı olduğu üç ana alandan oluşur; bunlar sınıflandırma, tanımlama ve terminolojidir. Suşlar, bazı ortak özellik(ler) temelinde gruplar halinde sıralanır veya sınıflandırılır ve grubun tanımlanmasını sağlayan özellikler tanımlanır. Pratik amaçlar için, takson isimlendirilmeli ve netlik adına isim, isimlendirme kurallarına göre oluşturulmalıdır. Taksonomi, üzerine çeşitli diğer bilimlerin inşa edildiği anlamlı bir biyolojik çerçeve sağlamayı amaçlar (On, 2001).

İlk kez 1963'te tanımlanan ve başlangıcından bu yana taksonomik yapısı büyük ölçüde değişim gösteren *Campylobacter* cinsi, moleküler yöntemlerin kullanılması sonucunda içerisinde *Helicobacter spp*'nin de bulunduğu farklı cinslere köken olmuştur. *Helicobacter* cinsi, *Epsilonproteobacteria* bölümü içindeki *Proteobacteria* sınıfı *Campylobacteriaceae* familyasına atanmıştır (Coldham, 2004).

Helicobacter cinsinin en yakın taksonomik akrabaları *Campylobacter*, *Wolinella*, *Arcobacter*, *Thiovulum* ve *Sulfurospirillum*'dur. *Helicobacter* türlerinin tanımlanmasının, biyokimyasal inertlik ve türler içindeki fenotipik değişkenlik nedenleriyle son derece zor olduğu belirtilmektedir (Coldham, 2004).

Kısmi 16S rRNA gen dizilerinin sayısal karşılaştırması ile, *Campylobacter spp.* içerisinde birkaç farklı kuşak tanımlanmıştır (Pastor ve Dewhirst, 1988). Bunlardan insan mide mukozasından izole edilen *Campylobacter pylori* ve gelincik mide mukozasından izole edilen *Campylobacter mustelae*, daha sonra *Helicobacter* olarak klasifiye edilmiştir. *Helicobacter spp.*, flagellar yapı, yağ asidi ve menakinon bileşimi ve 16S rRNA gen sekansları bakımından diğer *Campylobacter* türlerinden önemli farklılıklar göstermektedir (Goodwin ve diğerleri, 1989). Paster ve Dewhirst (1988) ayrıca *Campylobacter cryaerophila* ve *Campylobacter nitrofigilis*'in diğer *Campylobacter* ve *Helicobacter* türlerinden farklı olmakla birlikte ilişkili olduğunu ve birkaç *Wolinella* ve *Bacteroides* türünün *Campylobacter spp.* ile veya *Helicobacter spp.* ile bağlantılı olduğunu belirlemiştir.

DNA, rRNA hibridizasyonlarının kullanılmasıyla, bağlı filogenetik pozisyonların belirlendiği fenotipik ve genetik verilerle çapraz referanslandığı bir çalışma şu anda kullanılan taksonomik yapının temelini sağlamış ve *Campylobacter spp.*'yi rRNA süper ailesi VI olarak tanımlamıştır. Bu grup ayrıca *Proteobacteria*'nın ϵ bölümü olarak da bilinmektedir. Bu rRNA homoloji grupları, grup I (*Campylobacter* ve *Bacteriodes ureolyticus*), grup II (*Arcobacter*) ve

grup III'ü (*Helicobacter* ve *W. succinogenes*) içermektedir. rRNA homoloji grupları I ve II'nin yakın akrabalığına bağlı olarak daha sonra yapılan bir çalışma ile bunların *Campylobacteraceae* familyasına dahil edilmesi önerilmiştir (On, 2001).

Proteobacteria içinde filogenetik olarak farklı bir soy olan *Epsilonproteobacteria* sınıfı içerisinde ilk tespit edilen cinsin *Campylobacter* cinsi olduğu belirtilmektedir. Bu cins içerisinde belirli türlerin önemli insan ve hayvan patojenleri olduğunun fark edilmesi, benzer organizmaların ekolojisini ve dağılımını daha geniş şekilde araştıran birçok başka çalışmayı harekete geçirmiştir. İnsan gastriti vakalarında bulunan ve başlangıçta *Campylobacter spp.* daha sonra ayrı ama ilgili bir cins olan *Helicobacter* olarak yeniden sınıflandırılmıştır. İzolasyon, tespit ve taksonomik karakterizasyonda iyileştirme yöntemleri, bu tür bakterilerin önemi ve dağılımına yönelik devam eden ilgiyle birlikte, 100'den fazla takson içeren oldukça çeşitli organizmalar grubu olan *Epsilonproteobacteria*'nin mevcut durumunu oluşturmuştur. Söz konusu sınıf içinde filogenetik alt gruplar tanımlanabilir. Bunlardan *Campylobacteraceae* familyasındaki çoğu takson ve *Helicobacteraceae*, *Nautiliaceae* gibi serbest yaşayan *Epsilonproteobacteria* üyelerine göre birbirleriyle daha yakından ilişkili görünmektedir. Patojenler olarak bilinen ve aynı ekolojik nişi paylaşan birçok taksonla birlikte *Campylobacter* ve *Helicobacter*'in en yoğun üreme gösteren cinsler olduğu bildirilmektedir. Birbirlerine yakın fenotipik benzerlikleri nedeniyle birçok *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* ve *Helicobacter spp.* orijinal olarak *Campylobacter* türleri olarak tanımlanmıştır (On ve diğerleri, 2017).

Suşların *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* veya *Wolinella* cinsine kolayca atanmasını sağlayan tek bir fenotipik özellik olmadığından *Campylobacteraceae* familyasına ait yeni türlerin tanımı veya *Helicobacteraceae* yeni taksonun cinse atanması için hem genotipik hem de fenotipik yöntemleri kullanan çok fazlı bir taksonomik yaklaşım gerektirmektedir. Bu nedenle, suşları cins seviyesine uygun şekilde atamak için en azından 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırmalı analizine dayanan bir filogenetik atama zorunluluğundan söz edilmektedir. Taksonomik sınıflandırmada kullanılan fenotipik yöntemler; hücre morfolojisi, motilite, büyüme koşulları, biyokimyasal özellikler, antimikrobiyal ajanlara direnç ve diğer testler olarak sınıflandırılabilir (On ve diğerleri, 2017).

Bu cinsle ilgili dikkate alınması gereken birkaç önemli taksonomik sorun olduğu belirtilmektedir. Bazı taksonlar, karakteristik hücre morfolojileri ile büyük, sıkıca sarılmış sarmal çubuklar olarak tanınırlar ve sonraları *Gastrospirilla hominis* adını alan bazı insan gastrit vakalarında görülen suşlar için ilk önerilen jenerik isim "gastrospirilla" olarak

anılmaktadırlar (On, 2001). Benzer organizmalar, evcil hayvanlar, maymunlar ve çeşitli egzotik etoburlar da dahil olmak üzere çok çeşitli diğer hayvanlarda görülmüştür; sırasıyla domuz ve lemur midelerindeki bakteriler için '*Gastrospirillum suis*' ve '*Gastrospirillum lemur*' isimleri önerilmiştir. Bilinen tüm *Gastrospirilla*'nın in vitro kültürünün son derece zor olduğu kanıtlanmıştır ve bu durum çeşitli konakçılarda bulunan suşlar arasındaki ilişkiyi doğru bir şekilde belirlemek için yapılan taksonomik çalışmaları büyük ölçüde engellemiştir. Bununla birlikte, kedi ve köpeklerden birkaç 'gastrospirilla' kültürü yapılmış ve *H. felis*, *H. bizzozeronii* ve *H. salomonis* olmak üzere üç farklı tür belirlenmiştir. İnsan suşları ("*G. hominis*" veya "*H. heilmannii*" olarak anılır) iki farklı sekans tipine ayrılır. Tip 1 suşlar Candidatus *H. suis* ile bir klad oluştururken, tip 2 suşlar *H. felis*, *H. bizzozeronii* ve *H. salomonis*'e bağlıdır. Bu türlerin 16S rRNA genindeki intraspesifik ve infraspesifik değişkenlik, kesin bir farklılaşmanın elde edilemeyeceği şekildedir. İnsan suşlarının *H. felis*, *bizzozeronii*, *salomonis* kompleksi ve Candidatus *H. suis* ile ilgili taksonomik durumunun bu nedenle doğru bir şekilde değerlendirilmesinin imkansız olduğu belirtilmektedir (On, 2001).

2.1.3. Mikrobiyolojik Özellikler

2.1.3.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Bu cinsin üyelerinin hücresel morfolojisi çeşitlidir ve boyutları 0,2 ila 1,2 µm genişliğinde ve 1,5 ila 10 µm uzunluğunda değişen kavisli, spiral veya iğ şeklinde çubuklar içerir. Spor ve kapsül oluşturmeyen söz konusu cins gram negatif boyanma özelliğindedir. Cinsine ait çoğu tür, tek polar flagella veya 20 flagellaya kadar çift kutuplu kümeler aracılığıyla hareketlidirler. *Helicobacter mustelae* ayrıca lateral flagellaya sahiptir. Türlerin büyük kısmında flagella kılıflıdır ancak *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter rodentium*, *Helicobacter ganmani* ve *Helicobacter mesocricetorum* dahil olmak üzere kılıfsız flagellaya sahip birkaç tür tanımlanmıştır. Hücreler zamanla veya çevresel strese maruz kaldıklarında daha küresel hale gelebilmektedir (On ve diğerleri, 2017).

2.1.3.2. Kültür Özellikleri

Oldukça kırılğan olmasından dolayı kültürlenmesinin zor olduğu belirtilen *Helicobacter* cinsinin kültürünün, yaşayabilirliği değerlendirmenin en doğru yolu olduğu, organizmanın

izolasyonunu ise patojenite, antibiyotik duyarlılığı ve suşlar arasındaki farklılıkların tespiti amacıyla yapılacak çalışmalar için gerekli olduğu belirtilmektedir (Whary ve ark 2006).

Helicobacter türlerinin birincil izolasyonu genellikle %5-10 at veya koyun kanı veya %20 fetal buzağı serumu (FCS) ile desteklenmiş katı besiyeri ile gerçekleştirilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014). Kanlı agar, Brucella, Columbia, beyin kalp infüzyon agarı (BHI), triptikaz soya agarı (TSA) gibi zenginleştirilmiş agarlar rutin olarak kullanılmasına karşın bu besiyerlerinin çok sayıda hücre elde etmek için çok uygun olmadığı da belirtilmektedir. %5 fetal sığır serumu içeren Brucella broth'a inokülasyon ve döner çalkalayıcıda 24-48 saat inkübasyon ile bakteri sayılarını çoğaltmak ise mümkün olabilmektedir (Whary ve diğerleri, 2006).

Daima çeşitli konakçı hayvan türlerinin gastrik, enterik, üreme ve/veya hepatik ortamları ile ilişkilendirilen *Helicobacter* spp. için optimum büyüme sıcaklıkları 37 °C ile 42 °C arasındadır ve bilinen tüm türler 37 °C'de kültürlenebilmektedir (Neubert ve diğerleri, 2021). Havalandırmalı kavanozlarda 37 °C ve 42 °C'de mikroaerobik koşullar altında (%80–90 N₂, %5–10 H₂ ve %5–10 CO₂ karışımı) 3–7 gün inkübasyon rutindir, ancak negatif pleytlerin 21 gün tutulması önerilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014).

Daha kırılğan mide bakterilerinden bazılarının kültürlenmesi büyüme faktörlerinin yanı sıra toksik bileşikler uzaklaştırmak için aktif kömürün eklenmesi ve ortamın pH'ının 5'e düşürülmesiyle mümkün olabilmektedir. Hem selektif hem de non-selektif agarların merdiven filtre tekniğiyle birlikte kullanılması kültürden elde edilen verimi iyileştirilebilmektedir.

Helicobacter cinsine ait türlerin kültürlenmesinde antibiyotik kullanımı da önerilen yöntemler arasındadır. Yaygın olarak kullanılan antibiyotik takviyeleri Skirrow's (TVP) (Vancomycin 10 mg/L Trimethoprim 5 mg/L Polymyxin B 2,500 IU/L) (Skirrow 1977) ve CVA'dır (Cefoperazone 20 mg/L Vancomycin 10 mg/L Amphotericin B 2 mg/L) (Burnens ve diğerleri, 1993). Skirrow's (TVP) bileşimine mantar gelişimini engellemek için genellikle Amfoterisin B (5 mg/L) veya sikloheksimit (100 mg/L) eklenebilmektedir.

Aerobiyoz, hemen bütün *Helicobacter* spp.'de strese neden olmasına ve sonunda kültürlenebilirlikte bir kayba yol açmasına karşın in vitro büyüme için az miktarda oksijen de gereklidir. Ancak bunun bir istisnası, yalnızca anaerobik koşullar altında büyüyen *H. ganmani*'dir. Hidrojen, bazı türler için gereklidir ve diğerlerinin büyümesini, bazen türe bağlı bir şekilde provake de edebilmektedir. Örneğin, başlangıçta *H. westmeadii* olarak tanımlanan izolatlar daha sonra hidrojen gerektiren *H. cinaedi* olarak tanımlanmıştır (DeLong ve

diğerleri, 2014).

Helicobacter spp.'nin büyük bir kısmı nemli bir ortamı korumak için kapaklar üstte olacak şekilde inkübe edilmelidir. İnkübasyon sırasında anaerob kavanozlara ıslak kağıt havlu konularak elde edilecek yüksek derecedeki nemin birçok farklı türün kültürü için genellikle gerekli olduğu belirtilmektedir. Nemli plakalara duyulan ihtiyaç, birkaç günde bir BHI sıvı besiyerinin eklendiği agar pleytlerinde *H. bizzozeronii* ve *H. salomonis*'in başarılı bir şekilde üretilmesiyle vurgulanmıştır. Çoğu *Helicobacter* türü, sıvı ortamda zayıf bir şekilde büyür veya hiç gelişmez, ancak *H. pylori* ve diğer bazı türler, genellikle serum veya b-siklodekstrin ile desteklenmiş sıvı kültüre uyarlanabilmektedirler. Kültürler gliserol (%10–20) veya Di Metil Sülfoksit (DMSO) gibi bir kiryoprotektif madde ile muamelenin ardından -80 C'de veya sıvı nitrojende 5 yıla kadar saklanabilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014).

Dondurma için alternatif bir çözüm 25 mL BHI, 75 mL inaktif at serumu artı 7,5 g glikozdur. Bu organizmalarda liyofilizasyonun genellikle istenilen sonucu vermediği vurgulanmaktadır (DeLong ve diğerleri, 2014).

2.1.3.3. Biyokimyasal Özellikleri

Genellikle mikroaerofilik atmosferde kültürlenmiş *Helicobacter* spp.'lerinde katalaz üreten suşların çoğunluğunun yanı sıra oksidaz üretimi yapanlarında olduğu bilinmektedir. Gastrik *Helicobacter* spp. ise bugüne kadar tanımlanan verilere göre bol miktarda üreaz üretmesine karşın birçok enterohepatik türler üreaz negatiftir (DeLong ve diğerleri, 2014).

Helicobacteraceae yaygın laboratuvar yöntemleri arasında olan, karbonhidratları fermente etme veya oksitleme yeteneği göstermez (On ve diğerleri, 2017). Nispeten yaygın olarak görülen bazı türlere ait;

- (i) oksidaz aktivitesi,
- (ii) reaktif çözeltisinin yüzdesi ve süresi ile katalaz aktivitesi;
- (iii) nitrat edüksiyonu,
- (iv) bir disk yöntemi kullanılarak indoksil asetat hidrolizi,
- (v) üreaz aktivitesi
- (vi) alkalın fosfataz aktivitesi;
- (vii) hippurat hidrolizi

- (viii) selenit redüksiyonu
- (ix) %2,0 NaCl, %1 glisin ve %0,04 trifenil tetrazolyum klorür (TTC) ortamlarında büyüme özelliklerini içeren biyokimyasal özellikler ayırıcı tanı için kullanılmaktadır.

2.1.4. Çalışmaya Konu Olan *Helicobacter* Türleri

2.1.4.1. *Helicobacter typhlonius*

Helicobacter typhlonius; (typhlonius: sekuma ait) ilk olarak kombine immün yetmezliği olan (SCID) farelerinin enterik lezyonlarından izole edilmiş ve orijinal olarak *Helicobacter typhlonicus* olarak adlandırılmış (Franklin ve diğerleri, 1999), ancak isim daha sonra *Helicobacter typhlonius* olarak değiştirilmiştir (Franklin ve diğerleri, 2001). *H. typhlonius* DNA'sı araştırma farelerinin fekal örneklerinde yaygın olmasının yanı sıra üç fare türünün eşey organlarında da saptanmıştır (Franklin ve diğerleri, 2001; Scavizzi ve Raspa; 2006).

Bu türe ait bakteriler morfolojik olarak periplazmik lifler içermeyen, 0,3 µm çapında ve 2-3 µm uzunluğunda spiral çubuklara kıvrımlı filamentlidir. Çift kutuplu olantek kılıflı kamçı sayesinde hareketlidirler ve 37°C veya 42°C'de mikroaerobik koşullar altında agar üzerinde noktasal koloniler halinde gelişmektedirler. Anaerobik veya aerobik koşullarda veya 25 C°'de gelişemezler, oksidaz ve katalaz pozitif üreaz negatiftir. Alkalın fosfataz veya g-glutamil transferaz aktivitesi olmayan bu tür %1 glisin varlığında büyüebilmektedir. Üreyen bakterilerin çoğu kokoid morfolojiye sahiptir. %1,5 NaCl varlığında gelişmezler. Nitratı redükte eden söz konusu tür indoksil-asetat ve hippuratu hidrolize etmez. *H. typhlonius* sefalotine dirençli nalidiksik aside ise duyarlıdır (DeLong ve diğerleri, 2014).

Son zamanlarda, bu türle enfekte fareler; IBD, hepatit ve *Helicobacter* kaynaklı karsinogenez çalışmalarında önemli modeller olarak kabul edilmiştir (Scavizzi ve Raspa, 2006). *H. typhlonius* ile enfeksiyonun bağışıklığı zayıflamış IL10-/- farelerde ciddi IBD ve IBD ile ilişkili neoplazi gelişimini tetikleyebildiği belirtilmektedir (Chichlowski ve diğerleri, 2008). *H. typhlonius* inokule edilmiş CB-17 SCID farelerinde tiflokolitin saptanmasına karşın *H. hepaticus* veya *H. bilis* ile enfekte olmuş farelerdekinin aksine, bu farelerde kronik aktif hepatit lezyonları saptanmadığı belirtilmektedir. Bunun yanı sıra *H. typhlonius* ile doğal yollardan enfekte edilen IL-10-/- farelerde, diyare, perianal ülserasyon, bağırsak hemorajisi ve rektal prolapsus gelişimi de raporlanmıştır (Whary ve Fox, 2004).

Bu tür Avrupa Laboratuar Hayvanları Bilim Dernekleri Federasyonu (FELASA)

tarafından önerilen uluslararası standartlara göre potansiyel murin patojenleri olarak kabul edilmiştir (Mahler ve diğerleri, 2014). Kemirgen kolonilerinde yaygın oldukları ve araştırma sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine yol açacağı gerekçesi ile 2002'den itibaren de rutin taramaların bir parçası haline gelmiştir. *Helicobacter typhlonius*, spiral şekli ve iki kutuplu kılıflı flagellası ile *H. hepaticus* ile benzer özellikler göstermesinin (Whary ve Fox, 2004) yanı sıra 16S rRNA gen sekansında yalnızca % 2,36'lık bir farka sahip olan *H. hepaticus* ile genetik olarak da en yakın akrabadır. Ancak bu gende, onu PCR ile kolayca tanımlanabilir kılan benzersiz bir diziyeye sahip olduğu belirtilmektedir (Scavizzi ve Raspa 2006). Bu sayede PCR ile ayrımı kolayca yapılabilmektedir.

2.1.4.2. *Helicobacter rodentium*

Helicobacter rodentium ilk olarak farelerin barsak mukozasından ve dışkılarından izole edilmiştir (Shen ve diğerleri, 1997). Bakteriler, bir ila üç spiral dönüşü olan, 0,3 µm çapında ve 1,5-5 µm uzunluğunda spiral çubuklara sahiptir. Kılıfsız, çift kutuplu tek flagellaları sayesinde hareketlidirler. Mikroaerobik koşullar altında veya anaerobik koşullar altında 37°C'de 1-2 mm çapında bireysel koloniler halinde üreme paterni gösteren bu tür genellikle ince yayılan katmanlar olarak görünmektedirler. Aerobik koşullar altında üreme göstermeyen bu türe ait suşların çoğu (tip suşu dahil) 42 C°'de gelişebilmesine karşın 25 C°'de gelişme göstermemektedir. Oksidaz ve zayıf katalaz aktivitesine sahiptir, üreaz aktivitesi ise yoktur. Nitratı redükte edebilen söz konusu tür indoksil asetat veya hippuratu hidrolize etmez. Büyüme, %1,5 NaCl, %1 glisin ve %0,04 TTC varlığında gerçekleşebilmektedir. *H. rodentium* sefalotin ve nalidiksik aside dirençlidir (DeLong ve diğerleri, 2014).

Fenotipik, protein elektroforetik ve filogenetik analizler, *H. rodentium* ve *H. ganmani*'nin yakından ilişkili olduğunu ancak farklı türler olduğunu göstermiştir. Bu türün, *H. canadensis*, *H. mesocricetorum* ve *H. pullorum* ile birlikte, flagellar kılıfı olmayan diğer tüm *Helicobacter* türlerinden farklı olduğu belirtilmekle birlikte bu farklılığın teori ya da pratiğe yansıyan bir öneminin bilinmediği vurgulanmaktadır (DeLong ve diğerleri, 2014).

H. rodentium başlangıçta subklinik olarak enfekte olmuş bir fare kolonisinden kültürlendiğinden normal bağırsak florasının bir parçası olarak değerlendirilmiştir (Myles ve diğerleri, 2004). Bununla birlikte, Shomer ve diğerleri (1998) tarafından daha sonra *H. rodentium* ve *H. bilis* ile ko-enfekte (scid/Trp53-/-) fare kolonisinde bir diyare salgını tanımlanmıştır. Bu kolonide histopatolojik olarak proliferatif tifilit, kolit ve proktit gözlenen orta ila şiddetli hemorajik diyare geliştirdiği raporlanmıştır. Tek başına *H. bilis* ile deneysel

olarak indüklenen enfeksiyonun, immün yetmezlikli farelerde enterite neden olduğu belgelenmiş olsa da, bu çalışmadaki klinik hastalığın ciddiyeti, *H. rodentium*'un da patojenik sürecin önemli bir bileşeni olabileceği şeklinde değerlendirilmesine yol açmıştır. Ancak bu çalışmanın sonuçları, *H. rodentium*'un, tek bir enfeksiyon ajanı olarak, bağışıklığı yeterli A/JCr farelerinde veya bağışıklığı baskılanmış SCID farelerinde hepatit veya tiftite neden olmadığını gösterdiği bildirilmektedir (Whary ve Fox, 2004). Ayrıca, *H. rodentium* ve *H. hepaticus* ile birlikte enfekte olmuş farelerde histolojik lezyonların şiddetinde, tek başına *H. hepaticus* ile enfekte olmuş farelerdekine kıyasla anlamlı bir fark olmadığı da bir başka çalışmanın çıktıları arasında yer aldığı belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2004). Ancak, bu bilgi, ko-enfekte A/JCr ve SCID farelerinde artmış sekal proinflamatuvar gen ekspresyonu bulguları, sekal içeriğinin sıvılaşması, yalnızca ko-enfekte SCID farelerinde gözlemlenen düşük ortalama terminal vücut ağırlığı ve artan IL-10 bulgularıyla çeliştiği bildirilse de bu çalışmaların sonucunda ortaya çıkan sentez, *H. rodentium*'un konvansiyonel fare kolonilerinin çoğunda kabul edilebilir bir kirletici olarak değerlendirilmiştir (Matthew H. Myles ve diğerleri, 2004).

Bu tür Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilim Dernekleri Federasyonu (FELASA) tarafından önerilen rutin izleme ajanları arasında yer almamaktadır (Mahler ve diğerleri, 2014).

2.1.4.3. *Helicobacter muridarum*

Helicobacter muridarum ilk olarak sıçanların ve farelerin bağırsak mukozasından izole edilmiş (Lee ve diğerleri, 1992) daha sonra ise yaşlı hayvanlarda midede kolonize olduğu tespit edilmiştir (Lee ve diğerleri, 1993). Morfolojik olarak sarmal şekilde, 0,5–0,6 µm genişliğinde ve 3,5–5,0 µm uzunluğundadırlar ve iki ila üç spiral dönüşü vardır. Hücreler, çift kutuplu 10-14 kılıflı kamçı sayesinde hızlı bir tirbuşon benzeri harekete sahiptir. Her hücre, hücre yüzeyinde eşmerkezli sarmal yükselti olarak görünen 9-11 periplazmik lifle çevrilidir. *H. muridarum* beslenme açısından kırılgandır, yalnızca kan veya serumla zenginleştirilmiş besiyerlerinde gelişmekte ve optimum büyümesini nemli bir agar yüzeyinde gerçekleştirmektedir. Bakteriler, 37 °C'de mikroaerobik koşullar altında 2-3 günlük inkübasyonun ardından ince, yarı saydam, yayılan bir film olarak görülür. %1 – 16 O₂ ve %5 – 10 CO₂ içeren atmosferlerde gelişim hızlanmaktadır. Aerobik veya anaerobik koşullar altında veya 25 °C veya 42 °C'de üremenin olmadığı belirtilmektedir. Tüm suşlar üreaz,

oksidaz, katalaz, alkalın fosfataz ve arginin aminopeptidaz pozitifdir.

Bu tür tarafından hippurat hidrolize olmaz ve nitrat indirgenmez, indol ve H₂S üretilmez. %2 safra tuzu, %1 glisin veya %1,5 NaCl varlığında üreme yeteneği göstermemektedir. *H. muridarum*, nalidiksik asit ve sefalotine dirençlidir (DeLong ve diğerleri, 2014).

Bağışıklığı yeterli kemirgenlerin bu tür ile doğal enfeksiyonu, klinik hastalık ile ilişkilendirilmemiştir. *H. muridarum* için doğal niş kalın bağırsak olsa da, farelerde gastrit ile ilişkilendirilmiştir. Farelerde, mide atrofisi gelişmiş ve bu nedenle daha az asidik mide, *H. muridarum* kolonizasyonunu desteklemektedir (Whary ve Fox, 2004).

Bu türde *H. rodentium* ile birlikte şu an için Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilim Dernekleri Federasyonu (FELASA) tarafından önerilen rutin izleme ajanları arasında yer almamaktadır (Mahler ve diğerleri, 2014).

2.1.4.4. *Helicobacter hepaticus*

Helicobacter hepaticus ilk olarak farelerin karaciğerlerinden ve bağırsak mukozal kazıntılarında izole edilmiş Fox ve diğerleri (1994) ve insanlarda PCR ile tespit edilmiştir (Hamada ve diğerleri, 2009). Morfolojik olarak hücreler, bir ila üç spiral dönüşü olan, 0,2 – 0,3 µm genişliğinde ve 1,5 – 5,0 µm uzunluğunda ince kavisli-spiral çubuklardır. Mikroorganizmalar kılıflı, tek ve/veya çift kutuplu kamçı sayesinde hareketlidir. Hücreler, belirgin nokta kolonileri olarak gelişir, ancak kültürler genellikle ince yayılan katman olarak görünmektedirler. Büyüme hem mikroaerobik hem de anaerobik koşullarda 37 C'de gerçekleşir, ancak aerobik koşullar altında veya 25 C° veya 42 C°'de üreme olmaz. *H. hepaticus* üreaz, katalaz ve oksidaz aktivitesine sahiptir. Hücreler, %1,5 NaCl, %1 glisin, %0,1 trimetilamin N-oksit ve %0,4 TTC varlığında anaerobik olarak büyür. Nitrat redüksüyonu gerçekleşir ve kurşun asetat disklerde H₂S tespit edilebilir. Bakteriler indoksil asetatı hidrolize etmesine karşın hippuratu hidrolize etmez. *H. hepaticus* sefalotin ve nalidiksik aside dirençlidir ancak metronidazole duyarlıdır. *Helicobacter ulmiensis* orijinal olarak Genbank'ta (AJ007931) yeni bir tür olarak tanımlanmış ancak 2009'daki bir araştırma sonucunda, suşun yanlış sınıflandırılmış bir *H. hepaticus* izolatu olduğunu doğrulanmıştır (DeLong ve diğerleri, 2014).

Helicobacter hepaticus, A/JCr, BALB/CANNCr, SJL/NCr, B6C3F1, SCID/NCr ve C3H/HeNCr fareleri dahil olmak üzere duyarlı fare suşlarında kronik aktif hepatit ile ilişkili farelerde tanımlanan ilk enterohepatik *Helicobacter* türüdür. İmmünokompetan bir suş olan A/JCr faresi ve immün yetmezlikli bir suş olan SCID/NCr, karaciğer lezyonlarının yaşla birlikte giderek daha şiddetli hale gelmesiyle hepatite en yatkın suşlar arasındadır. A/JCr farelerinde *Helicobacter hepaticus* ile ilişkili hepatit ve hepatoselüler karsinomada ilerleme en yaygın olarak enfeksiyon sonrası 18. aydan sonra görülmekte ve bilinmeyen nedenlerle erkeklerin bu türe predispoze olduğu belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2004).

Helicobacter hepaticus, Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilim Dernekleri Federasyonu (FELASA) tarafından önerilen uluslararası standartlara göre potansiyel murin patojeni olarak kabul edilmiştir (Mahler ve diğerleri, 2014). Kemirgen kolonilerinde yaygın oldukları ve araştırma sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine yol açacağı gerekçesi ile 2002'den itibaren de rutin taramaların bir parçası haline gelmiştir (Mahler ve diğerleri, 2014).

2.1.4.5. *Helicobacter bilis*

Helicobacter bilis ilk olarak farelerin kolon ve sekumundan ve hepatitli farelerin safra ve karaciğerlerinden (Fox ve diğerleri, 1995) ve ardından sağlıklı olanların yanı sıra diyareli kedi ve köpeklerden (Eaton ve diğerleri, 1996) izole edilmiştir. İnsan safrası, karaciğer ve safra kesesi örneklerinden alınan suşların da 16S rRNA gen sekansı karşılaştırmaları sonucunda *H. bilis* olarak tanımlandığı belirtilmektedir (Fox ve diğerleri, 1998; Tolia ve diğerleri, 2004). İnsanlardan, koyunlardan ve domuzlardan izole edilen ve daha önce *Flexispira* taksonları 2, 3 ve 8 olarak adlandırılanların fenotipik ve genotipik özelliklerinin polifazik analizinin, bunların *H. bilis* türünün birer üyesi olduğu gösterdiği bildirilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014). Morfolojik olarak mikroorganizmalar fusiform ila hafif spiral şeklindedir ve 0,5 µm genişliğinde ve 4-5 µm uzunluğundadır. Hücreler, kılıflı bipolar flagella (3 - 14) demetleri aracılığıyla hareketlidir. Bakteriler, mikroaerobik koşullar altında noktasal koloniler halinde büyürler, ancak kültürler genellikle hem 37 °C hem de 42 °C'de ince bir yayılma tabakası olarak görünürken 25 °C de bir büyüme gözlenmez. Bakteriler üreaz, katalaz ve oksidaz aktivitelere sahiptir. %20 safra ve %0.4 TTC'de gelişebilir ve %1 glisinde değişken büyüme gösterebilirler. %1,5 NaCl'de üremezler. Nitratı redükte eder ve H₂S kurşun asetat disklerde tespit edilir. İndoksil asetat ve hippurat hidrolize olmaz. *H. bilis*, sefalotin ve nalidiksik aside dirençlidir ancak metronidazole duyarlıdır (DeLong ve diğerleri,2014).

H. bilis'in yaşlı ve inbred farelerde karaciğere nispetle sekum ve kolondan daha yaygın olarak izole edildiği belirtilmektedir (Fox ve diğerleri, 1995). Ortam pH'sının değişkenliği bu üreme paternine neden olarak gösterilmektedir. Bu tür *Fasciola hepatica* ile deneysel olarak enfekte olmuş sıçanların safra kanalında gözlenmiştir. Enfeksiyonun farelerin bakteriyostatik olan safra sıvısının biyokimyasal özelliklerini değiştirdiği ve bu değişikliğin de ortamın bakterilerin kolonizasyonuna uygun hale gelmesine neden olduğu tahmin edildiği bildirilmektedir (Fox ve diğerleri, 1995).

Bu tür Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilim Dernekleri Federasyonu (FELASA) tarafından önerilen uluslararası standartlara göre potansiyel murin patojenleri olarak kabul edilmiştir (Mahler ve diğerleri, 2014). Kemirgen kolonilerinde yaygın oldukları ve araştırma sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine yol açacağı gerekçesi ile 2002'den itibaren de rutin taramaların bir parçası haline gelmiştir (Mahler ve diğerleri, 2014).

2.1.5. Patogenez

Helicobacter türleri, insanların ve diğer memeli türlerinin gastrointestinal sisteminin hemen her yerinde bulunan kolonizörleridir. Çoğu durumda, bu bakterilerin konakçıları ile patojenik bir ilişkisi olduğu görülmemektedir. Bununla birlikte, bu genellemenin önemli istisnaları vardır, en önemlisi insanlarda peptik ülserlerin ve mide kanserinin gelişimi ile ilişkili olan *H. pylori*'dir. Ancak, *H. pylori* ile konakçı arasındaki ilişkinin bile karmaşık, genellikle kommensal ve hatta bazı durumlarda yararlı olduğu dahi vurgulanmaktadır (DeLong ve diğerleri, 2014).

Helicobacter türleri, çok çeşitli evcil ve vahşi hayvanların gastrointestinal mukozal yüzeyi boyunca her yerde bulunmaktadır. Yine de, bağışıklığı yeterli, doğal bir konağın enfeksiyonunun klinik hastalığa yol açması ile ilgili çok az örneğin varlığından söz edilmektedir (Solnick ve Schauer, 2001).

Söz konusu bakterinin kabaca mideyi kolonize eden gastrik *Helicobacter* türleri ve bağırsakta ve hepatobiliyer sistemde bulunabilen enterohepatik *Helicobacter* türleri olmak üzere iki gruba ayrılacağı belirtilmektedir. *Helicobacter* spp. sadece insanlarda değil, laboratuvar kemirgenlerinde önem arz etmekle birlikte tüm hayvanlar aleminde bulunmaktadır (Neubert ve diğerleri, 2022). Laboratuvar kemirgenlerinde görülen bu cinse ait türlerin çok büyük kısmı ise enterohepatik özellik sergilemektedir (Whary ve Fox, 2006).

2.1.5.1. Gastrik Enfeksiyonlar

H. pylori dışında insanlarda görülen tek önemli mide kolonizatörünün *Helicobacter heilmannii sensu lato* olduğu ifade edilmektedir. Bu organizmaların genel prevalansı, çocuklar da dahil olmak üzere endoskopi yapılan hastalarda yaklaşık %0,5'tir. Tür bazında ise, *H. suis* için %36,6, *H. salomonis* için % 21, *H. felis* için % 15 ve *H. bizzozeronii* için ise %8 prevalans oranları tanımlanmıştır (DeLong ve diğerleri, 2014).

Hayvanlarda Gastrik *Helicobacter* enfeksiyonları, insanlarda görülene benzer histolojik bir gastrit ile ilişkilidir, ancak polimorfonükleer bileşen genellikle minimal düzeydedir veya yoktur. Kediler ve köpekler, şu anda tanımlanmış olan en az altı farklı *Helicobacter* türüyle, genellikle gastrik bakteriler tarafından yüksek düzeyde kolonizasyon göstermektedir. *H. suis*'in domuzlarda %60'a kadar çıkan yüksek prevalans oranlarına sahip olduğu, deneysel ve doğal olarak enfekte olmuş domuzlarda gastrit ve pars özofagus ülserasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Büyük vahşi kedigil türlerinde *H. acinonychis* ve *H. heilmannii* vahşi gösterilmiştir. Çitalarda kronik gastritin önemli bir klinik problem olduğu bilinmektedir. *H. mustelae* ise diffüz antral kronik gastrit ve gastrik ülserlerle birlikte bulunduğu dağ gelinciği mide mukozasının doğal kolonizatörüdür (Fox ve diğerleri,1990). *H. aurati*, hamsterlarda kronik gastrit, bağırsak metaplazisi ve bildirilen bir mide adenokarsinomu vakası ile ilişkilendirilmiştir (Nambiar ve diğerleri, 2005).

2.1.5.2. Enterohepatik Enfeksiyonlar

H. pylori'nin ve bunun bir insan patojeni olma potansiyelinin ilk tanımlarından kısa bir süre sonra, insan hastalığına potansiyel olarak karışan mide dışı *Helicobacter* türlerinin ilk raporlarının Quinn ve diğerleri (1983) tarafından yapıldığı belirtilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014). Bunu takiben, gastroenterit ile ilişkili enterohepatik *Helicobacter* türleri (EHS) ile ilgili çok sayıda rapor olduğu, ancak doğrudan bir nedensel bağlantının kurulamadığı bilinmektedir (DeLong ve diğerleri 2014). İlgili ek türler arasında *H. canis*, *H. pullorum*, *H. canadensis*, "*H. winghamensis*" ve *H. bilis* yer almaktadır. Bu bulgular gastrointestinal mukusla ilişkili bakterilerin inflamatuvar bağırsak hastalığının (IBD) etiolojisindeki olası rolünün incelenmesine yol açmıştır. EHS'nin IBD'deki nedensel rolünü destekleyen potansiyel kanıtlarınise hem hayvan hem de insan çalışmalarından elde edildiği

bildirilmektedir (DeLong ve diğerleri,2014). Diğer bağırsak patojenlerinde olduğu gibi, EHS'nin bakteriyeminin yanı sıra selülit ve artrit gibi diğer ikincil enfeksiyonlara yol açacak şekle evrildiği de gösterilmiştir (Rimbara ve diğerleri, 2012). DeLong ve diğerleri'nin (2014) bildirdiğine göre bu enfeksiyonlarda tanımlanan baskın organizma *H. cinaedi* iken, diğer vakalar önceden flexispira olarak sınıflanan *H. bilis*, *H. fennelliae* ve daha yakın zamanda *H. canis*'e atfedilmiştir. EHS duyarlı hayvanlarda karaciğer lezyonları ve hepatoselüler karsinomun (HCC) gelişmesine yol açan hepato-safra sistemini de etkilemektedir.

Tablo 1. Kemirgenlerde hastalıkla ilişkilendirilen *Helicobacter spp.* türlerinin doku tropizmleri ve neden olduğu hastalıklar (Whary ve Fox, 2006).

Rodent	Taxon	Doku tropizmi	İlişkili Hastalık
Fare	<i>H. bilis</i>	Bağırsak, karaciğer	İmmün yetmezliği olan farelerde tiflokolit ve hepatit, belirli immün yetmezlikli suşlarda hepatitis.
	<i>H. ganmani</i>	Bağırsak	Bulgu rapor edilmemiştir.
	<i>H. hepaticus</i>	Bağırsak, karaciğer	Bağırsak sistemi anormallikleri olan birçok suşta tiflokolit, belirli immün yetmezlikli suşlarda hepatit, duyarlı fare suşlarında karaciğer ve kolon kanseri.
	<i>H. muridarum</i>	Bağırsak, mide	Gastritis
	<i>H. mastomyrinus</i>	Bağırsak, karaciğer	p53-/-,C57BL/6 farelerde proktit, mastomilerde ılımlı hepatit
	<i>H. rappini</i>	Bağırsak	Bulgu rapor edilmemiştir.
	<i>H. rodentium</i>	Bağırsak	Bulgu rapor edilmemiştir.
	<i>H. typhlonius</i>	Bağırsak	IL-10-/- (B6.129P2(B6)-IL-10tm1Cgn/J) tiflokolit.
Rat	<i>H. bilis</i>	Bağırsak	Typhlocolitis in nude rats (Cr: NIH-rnu)
	<i>H. muridarum</i>	Bağırsak	
	<i>H. rodentium</i>	Bağırsak	
	<i>H. trogonum</i>	Bağırsak	Bulgu rapor edilmemiştir.
	<i>H. typhlonius</i>	Bağırsak	
Gerbil	<i>H. bilis</i>	Bağırsak	
	<i>H. hepaticus</i>	Bağırsak	Bulgu rapor edilmemiştir.

Kemirgenlerde, bir kısmı normal komensal bağırsak mikrobiyotası olarak kabul edilen bir kısmı ise hastalıkla ilişkilendirilen türlerin doku tropizmleri ve neden olduğu hastalıklar tablo halinde özetlenmiştir (Whary ve Fox, 2006) (Tablo 1). Deneysel ve yabani kemirgen

türleri üzerinde yapılan araştırmaların, bağırsak mukozasının genellikle bir veya daha fazla Enterohepatik *Helicobacter* türü (EHS) ile kolonize olduğunu gösterdiği belirtilmektedir. Yaygın olarak bulunan organizmalar arasında *H. bilis*, *H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. mastomyrinus*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, *H. trogontum* ve *H. typhlonius* yer almaktadır. Bu organizmaların immunkompetan hayvanlarda normal bağırsak mikrobiyotasının bir parçasını oluşturdukları ve patojenik rolü destekleyen çok az kanıtın varlığından da söz edilmektedir. Ancak patojenite mono enfekte hayvanlarda sınırlı olsa da, birden fazla tür ile oluşan enfeksiyonlar patolojik lezyonlar oluşturabilmektedir. Türler arasında gerçekte etkileşimlerin genellikle yaşı hayvanlarda meydana geldiği, bu duruma ise söz konusu bakterilerin doğal yaşam alanlarından daha farklı nişlere invazyonuna izin veren bağışıklık yeterliliklerinin rolü olabileceğini göstermektedir. *H. muridarum* ve *H. aurati*, gastrit, atrofi, intestinal metaplazi ve adenokarsinoma ile ilişkili mide mukozasında bulunması ise bu olguya bir örnek teşkil etmektedir (Whary ve Fox, 2006).

EHS'nin önemli bir özelliği, normal koşullar altında bağışıklığı yeterli hayvanlarda birçoğunun mide mukozasını kolonize etme ve/veya hepatobiliyer sisteme invzyon yeteneği sergilemesi ve bu durumlarda normal konakçılarında ciddi hastalıklarla ilişkilendirilebilmesidir. Kliniği normal farelerin sekumundan izole edilmesinden dolayı normal bağırsak florasının bir üyesi olduğu kabul edilen *Helicobacter rodentium* ko-enfeksiyon durumunda patolojik bulguya neden olabilmektedir. Zira *H. rodentium* ve *H. bilis* ile birlikte enfekte olan bir fare kolonisinde bir diyare salgını sonrası bu bakteri için "normal flora" tanımlamasının sorgulanmaya başladığı belirtilmektedir. *H. bilis*'in immünsuprese farelerde patojenik olduğu bilinmesine rağmen söz konusu salgının gerçekteleği kolonide hemorajik ishalin ve proliferatif tiflokolitin şiddeti, *H. rodentium*'un hastalıktaki rolü ile açıklanmıştır (Myles ve diğerleri, 2004). *H. rodentium* mono-enfekte farelerde karaciğer ve sekum lezyonları bulunmamasına ve *H. rodentium* ve *H. hepaticus* ile birlikte enfekte olmuş farelerde gözlemlenen lezyonların şiddetinin, yalnızca *H. hepaticus* ile enfekte olmuş farelerdekinden önemli ölçüde farklı olmamasına karşın ko- enfekte gruptan SCID farelerinde sıvı sekum içeriği ve düşük terminal vücut ağırlığı raporlanmıştır (Myles ve ark. 2004). Ayrıca *H. rodentium*'un yetişkin vahşi tip farelerde patojenik olmadığı, ancak *H. hepaticus* ile enfekte olmuş farelerin sekumunda IL-10 üretimini arttırdığı belirtilmektedir (Franklin ve diğerleri, 2001). *H. rodentium* geleneksel fare kolonilerinin çoğunda kabul edilebilir bir kirletici olabileceği ile birlikte, *H. rodentium* ile mix enfeksiyonun, bu cinsin *H. hepaticus* veya *H. bilis* gibi daha patojenik üyelerinin neden olduğu hastalığı güçlendirebileceği

vurgulanmaktadır (Myles ve diğeri, 2004).

Tüm EHS'ler arasında en şiddetli klinik tabloya *H. hepaticus*'un neden olduğu gösterilmiştir. Bindokuyüzdoksanlı yılların başında, *H. hepaticus*'un izolasyonundan önce, dış ortamdan korunaklı biçimde yetiştirilen birkaç fare suşunda yeni bir aktif kronik hepatit formu kaydedilmiştir. Bu hayvanların incelenmesi sonucunda, karaciğerlerinde daha sonra kültürlenmiş ve *H. hepaticus* olarak karakterize edilen sarmal organizmaların varlığını belirlenmiştir. *H. hepaticus*, hepatit ve hepatoselüler karsinomu indükleyebilmekle birlikte, bu indüksiyonda konakçı bağışıklık tepkisi, cinsiyet, yaş ve enfeksiyon gibi birtakım faktörler önemli bir rol oynamaktadır. İmmün yetmezlikli farelerde *H. hepaticus*'un rol oynadığı diğer bir karsinomunda bağırsak karsinomu olduğu gösterilmiştir (Fox ve diğeri, 2011). *H. hepaticus* ile enfekte olan bağışıklığı baskılanmış çeşitli fare suşlarında, rektal prolapsus ve hepatitin de eşlik edebildiği klinik bir tiflokolit sendromu tanımlanmıştır (Whary ve Fox, 2004). *H. hepaticus* enfeksiyonunun bazı hassas fare suşlarında koliti indükleyebileceğini, ancak enflamatuvar tepkinin doğası ve bazı suşların neden daha duyarlı olduğuna dair daha fazla araştırma gerektirdiği belirtilmektedir (Fox ve diğeri, 2011).

H. typhlonius, başta immün yetmezliği olan farelerde olmak üzere sekum ve kolonda mukozal hiperplazi ve ilişkili inflamasyon ile karakterize hastalığa neden olmaktadır. Kemirgen kolonilerinde oldukça yaygın olduğu bildirilen *H. typhlonius* immünokompetan farelerde doğal olarak oluşan gastrointestinal lezyonlarla ilgili daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir (Franklin et al. 2001). İki laboratuvar tarafından eş zamanlı ve birbirinden bağımsız olarak fare ve sıçan kolonilerinde tespit edilen *Helicobacter typhlonius*'un CB-17 SCID farelerinde tiflokolite neden olduğu belirtilmektedir. Ancak *H. hepaticus* veya *H. bilis* ile enfekte farelerin aksine, *H. typhlonius* inokule edilmiş farelerde kronik aktif hepatit lezyonlarının saptanmadığı belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2004). Bir başka çalışmada ise daha sonra *H. typhlonius* olarak tanımlanacak bir *Helicobacter* ile doğal olarak enfekte edilen IL-10^{-/-} fareler, diyare, perianal ülserasyon, bağırsak hemorajisi ve rektal prolapsus geliştirdiği belirtilmektedir. Daha sonra *Helicobacter* enfeksiyonu olmadığı teyit edilen söz konusu IL-10^{-/-} farelerinin deneysel *H. typhlonius* inokulasyonunun reenfeksiyona neden olduğu ve yeniden typhlocolitis tablosu oluştuğu gözlemlenmiştir.

Araştırma farelerinin *Helicobacter typhlonius* enfeksiyonu, *H. hepaticus* ve *H. rodentium* enfeksiyonundan daha az yaygın görünmekte ve prevalansı ise akademik kurumlardaki fare kolonilerinde *H. bilis* prevalansına benzer oranlardadır (Whary ve Fox, 2004).

EHS'nin önemli bir özelliği, normal koşullar altında, bağışıklığı yeterli hayvanlarda, birçoğunun mide mukozasını kolonize etme ve/veya hepatobiliyer sisteme invazyon yeteneği sergilemesi ve bu durumlarda normal konakçılarında ciddi hastalıklarla ilişkilendirilebilmesidir. *Helicobacter muridarum* ilk olarak sıçan ve farelerin bağırsak mukozasından izole edilmiş ve immunkompetan kemirgenlerin doğal enfeksiyonu klinik hastalıkla ilişkilendirilmiştir. *H. muridarum* için her ne kadar doğal niş olarak kalın bağırsaklar işaret edilse de, muhtemelen kolonizasyonu destekleyen gastrik atrofi kaynaklı asiditesi düşmüş midede gastrite neden olduğu bildirilmektedir. *H. muridarum* ile mono inokulasyon, CD4⁺T hücre yoksunluğu olan konjenik BALB/c farelerinde tiflokoliti tetiklediğinin gösterildiği bildirilmektedir (Whary ve Fox, 2004).

H. bilis'in karaciğerde ve adından da anlaşılacağı gibi yaşlı farelerin safra kesesinde kolonize olduğu gösterilmiştir (Fox ve diğerleri, 1995). Hepatit, hepatik displazi ve safra hiperplazisi dahil olmak üzere bir dizi hepato-safra hastalığı teşhisi konan yaşlı hamsterlarda da *H. bilis* tespit edilmiştir (Fox ve diğerleri, 2009). *H. bilis*'in sözü edilen hastalıklardaki ve IBD'deki rolü açıklığa kavuşturulmayı gerektirse de, bu organizmanın konağın kendi mikrobiyotasına verdiği tepkiyi bağırsak enflamasyonuna yol açabilecek şekilde değiştirebileceği de öne sürülmüştür (Jergens ve diğerleri, 2007). *H. bilis* ayrıca koyunlarda ve deneysel olarak enfekte olmuş kobaylarda aborta neden olabilen bir patojen olarak tanımlanmıştır (DeLong ve diğerleri, 2014). *H. hepaticus* enfeksiyonuna benzer şekilde, farelerin *H. bilis* enfeksiyonu, bağışıklığı baskılanmış farelerde orta ila şiddetli proliferatif tiflit ve kronik aktif hepatit ile ilişkilidir. *H. bilis*'in bulaş yolları ve invazyon kinetiğini değerlendirmek üzere yapılan bir çalışmada söz konusu etkeni taşıdığı bilinen fare kafeslerine maruz bırakılan sentinel Swiss farelerinin etkeni aldığı ve rektal prolapsus, sekumda, kolonda ve rektumda fokal ülserler ile tiflokolit gibi lezyonlar geliştirdiği ancak klinik tablo göstermediği belirtilmektedir (Whary ve diğerleri, 2000). Literatürde non- pylori *Helicobacter* türlerinin zoonoz karakterlerinin varlığı ile ilgili çok sayıda araştırma dikkati çekmektedir. Bunlardan biri de Şili'de insanlar üzerinde yapılan bir çalışmadır. Söz konusu çalışmada kronik kolesistitli hastalardan alınan safra kesesi ve safra örneklerinde *H. bilis*'in PCR ile tanımlandığı ve bu türün varlığının Japonya ve Tayland olmak üzere iki ülkede safra yolları ve safra kesesi kanserleri ile ilişkilendirildiği bildirilmektedir (Whary ve Fox, 2004).

Kemirgenleri enfekte eden diğer *Helicobacter* türlerinden *H. cinaedi*, *H. fennelliae* ve *H. mesocricetorum* hamsterlerin normal bağırsak florası olarak kabul edilmiş, ayrıca *H. cinaedia* semptomatik Rhesus maymunlarında da rapor edilmiştir (Fernandez ve diğerleri,

2002). Genç domuz kuyruklu makakların *H. cinaedi* ve *H. fennelliae* ile deneysel enfeksiyonu ise *C. jejuni*'nin neden olduğu bakteriyemi ve ishale benzer şekilde sonuçlanmıştır (Flores ve diğerleri, 1990). Hamsterlerden izole edilen diğer *Helicobacter* türlerinden farklı olarak *H. cholecystus*, kolanjyofibroz ve santrilobüler pankreatit ile çok güçlü bir korelasyon gösterdiği (Franklin ve diğerleri, 1996), *H. cholecystus* benzeri bir bakterinin ise bir gelincik kolonisinde hepatobilier hastalık ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Garci ve diğerleri, 2002).

Kemirgenlerden izole edilen diğer bir EHS de hepatoselüler karsinoma (HCC) teşhisi konmuş bir dağ sıçanının karaciğerinden kültürlenmiş *H. marmotae*'dir (Fox ve ark. 2002). Ancak *H. marmotae*'nin HCC'deki rolü şüphelidir, zira organizmanın izole edildiği dağ sıçanı da dahil olmak üzere dağ sıçanlarında, dağ sıçanı hepatit virüsünün neden olduğu yüksek bir HCC insidansı varlığı belirtilmektedir. Bununla birlikte, *H. hepaticus*'un neden olduğu hepatite duyarlı bir tür olan A/J farelerinin deneysel enfeksiyonunun sekumda, proksimal kolonda ve karaciğerde yangıya neden olduğu ve farelerin bir kısmında hepatit geliştiği de bilinmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014). *H. marmotae* bu iki hayvanın da karaciğerinden izole edilmiştir (Patterson ve diğerleri, 2010). Bu tür klinik olarak sağlıklı kedilerin dışkılarından da izole edilmiştir (DeLong ve diğerleri, 2014).

Köpek ve kedilerde bu cinse ait tespit edilen diğer yaygın türler olarak ise *H. canis*, *H. cinaedi* ve *H. bilis* işaret edilmektedir. Bu EHS'lerin hastalıkla ilişkisi ise tartışmalıdır. Rossi ve diğerleri, (2008) sağlıklı hayvanlarla kıyaslandığında diyareli hayvanlarda önemli bir kolonizasyon farkı olmadığını bildirmiş, Castiglioni ve diğerleri, (2012) ise semptomatik köpeklerde daha genç hayvanların bu *Helicobacter* türleri için nispeten yüksek kolonizasyon seviyelerine sahip olduğunu ve bunun da daha yüksek mukozal fibroz ve atrofi seviyeleri ile ilişkili olduğunu raporlamıştır (DeLong ve diğerleri, 2014). Köpek mide mukozası kazıntılarında direkt mikroskopi yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada taranan köpeklerin %84,4'ünün *Helicobacter* spp. ile enfekte olduğu belirlenmiştir (Diker ve diğerleri, 2002)

Beş enterohepatik *Helicobacter* türü de bir dizi kuş türünde tanımlanmıştır. Bu türlerden ikisi, *H. canadensis* ve *H. pullorum*, insan hastalıklarıyla ilişkilendirilirken, günümüzde doğal kuş konaklarında patojenik bir rol oynadığına dair bir kanıt yoktur. Aynı durum *H. anseris*, *H. brantae* ve *H. pametensis* için de söz konusudur. *H. pullorum*'lu tavuklarda iki deneysel enfeksiyon çalışması organizmaların bağırsak nişlerini yoğun şekilde kolonize edebilmelerine ve fekal örneklerde sürekli olarak tespit edilmelerine rağmen hastalık gelişimine dair herhangi bir kanıtın olmadığı belirtilmektedir. Tavuklarda *H. pullorum*'un yüksek prevalans oranları ve

tavuk ürünlerinde *H. pullorum*'un son zamanlarda çeşitli çalışmalarla tespit edilmesi ile birleşen bu son bulgu, hayvanlarda klinik bulgu olmamasına karşın halk sağlığı için bir endişe kaynağı oluşturmaktadır. Diğer EHS'ler gibi, bağışıklığı baskılanmış hayvanlarda *H. pullorum*'un, muhtemelen mide-bağırsak yolundan metastazla karaciğere ulaşması söz konusudur. Zira hepatit tablosu gelişen bu türden hayvanların karaciğerinde *H. pullorum*'un tespit edildiği belirtilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014).

2.1.6. Bulaşma

Helicobacter türlerinin bulaşmasına ilişkin literatür verileri birtakım çelişkiler içermektedir. Örneğin, kontamine altlık aracılığıyla koloniden sentinel farelere hızlı bir şekilde bulaşan *H. hepaticus*'un aksine *H. bilis*'in sentinel farelere gecikmeli ve tutarsız bir şekilde bulaştığını bildiren çalışmaların olduğu bildirilmektedir (Chichlowski ve Hale, 2009). Ancak *H. bilis*'in de diğer türlere benzer bir invazyon kinetiği sergilediği yönünde çalışmalar da vardır. Örneğin *Helicobacter*'den arılığı PCR ile doğrulanan bir grup fare deneysel olarak *H. hepaticus*, *H. rodentium* ve *H. bilis* ile enfekte edilmiştir. Çalışma sonunda sentinel olarak kullanılan farelerde %100'lük bir prevalans tespit edilmiş, bu da *H. hepaticus*, *H. rodentium* ve *H. bilis*'in fekal-oral temas yoluyla yayıldığını göstermiştir (Whary ve diğerleri, 2000).

H. hepaticus'un yetişkin farelere gavaj yoluyla uygulandığında 14 gün içinde sekum mukozası ile ilişkili mikrobiyotanın baskın bir üyesi haline geldiği belirtilmektedir. *Helicobacter* spp.'nin bulaşması ve dolayısıyla varlığının büyük ölçüde türlere ve bakım-besleme uygulamaları da dahil olmak üzere çevresel faktörlere bağlı olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ancak bu çalışmaların ortak çıktısı fekal-oral yayılmanın, kemirgenlerde enfeksiyonun doğal olarak edinilmesinin birincil yolu olduğu yönündedir (Chichlowski ve Hale, 2009).

Helicobacter enfeksiyonları bir kez edinildikten sonra kalıcı olmakta ve organizmaların dışkıda uzun süreli olarak yayılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, eradikasyonun yanı sıra önleyici tedbirler için özel adımlar atılmadıkça, endemik enfeksiyonların araştırma tesislerinde yaygınlığının devam edeceği vurgulanmaktadır. Birkaç çalışma, *Helicobacter* enfeksiyonlarının başarılı bir şekilde eradike edildiğini bildirmiştir. Bu amaç için kullanılan yöntemler arasında; popülasyon kontrolü ve ardından *Helicobacter* içermeyen farelerle yeniden stoklama, embriyo transferi, çapraz besleme ve antibiyotik tedavisi yer almaktadır, ancak bu yöntemlerin etkinliği kemirgen veya *Helicobacter* türüne, suşuna ve deney

koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Çoğu *Helicobacter* türünün patolojisi konağa bağımlı olduğundan ve enfeksiyon subklinik olabileceğinden, birçok durumda araştırmacıların enfeksiyonlardan habersiz olması beklenen bir durumdur.

Enterohepatik *Helicobacter* türlerinin (*H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. typhlonius* v.b) prevalansı ve yayılması üzerine yapılan bir çalışma enfekte farelerin, bitişik kafeslerde yetiştirilse bile ayrı havalandırılan kafeslerde barındırılmasının enfeksiyonları etkili bir şekilde önleyebileceğini göstermiştir. Aynı çalışma, konvansiyonel kafeslerde yetiştirilen farelerin ise enfekte olma ihtimalinin çok yüksek olduğunu göstermiştir (Chichlowski ve Hale, 2009).

2.1.7. Virülans

Virülans faktörlerinden olan flagellanın birincil yapısal bileşeni olan bakteriyel flagellin, kamçılı patojen bakterilerle oluşan enfeksiyonlarda humoral bağışıklığın baskın bir hedefidir. Flagellin monomerlerinin reseptör molekülleri tarafından tanınması doğmasal bağışıklığı özellikle proinflamatuvar gen ekspresyonunu tetikleyerek aktive etmektedir (Hayashi ve diğerleri, 2001). Flagellin monomerleri, Crohn hastalığı ile ilişkili artan adaptif bağışıklık tepkisinin bir hedefi olduğu ve saflaştırılmış flagellinin, bir T hücresi adjuvanı olarak işlev gördüğü belirtilmektedir (Myles ve diğerleri, 2004).

Gastrik türlerle karşılaştırıldığında, enterohepatik *Helicobacter* türlerinin bağırsak mukus nişlerini kolonileştirmeleri için flagella ve motilite öne çıkarken, üreaz kritik önemini kaybetmektedir. Dolayısıyla enterohepatik *Helicobacter* türlerinin çoğunun üreaz negatif olduğu bilinmektedir. Türler bazında virülens faktörlerinde de bir takım benzerliklerin yanı sıra kendilerine özgü faktörlerde bulunabilmektedir. Şimdiye kadar tanımlanmış olan bu mikroorganizma grubu için en belirgin virülans faktörü, sitoletal distansiyon toksinidir (CDT). *H. hepaticus*'ta ve *H. cinaedi*'nin insan ve hayvan izolatlarında saptanmasının yanı sıra *H. bilis*, *H. canis*, *H. pullorum* (hem insan hem de hayvan izolatları), *H. marmotae* ve *H. mastomyrinus* türlerinde de saptandığı belirtilmektedir (DeLong ve diğerleri, 2014).

Tür bazında virülens faktörleri konusunda *H. pylori*'den sonra en çok bilgi sahibi olunan tür *H. hepaticus*'tur. *H. hepaticus* genomunda, *H. pylori* vakuolleştirici sitotoksininin (*vacA*) bir ortoloğu yoktur, ancak *C. jejuni*'de bulunana benzer kromatin parçalanması ve tip I DNAase benzeri aktivite gösteren apoptotik hücre ölümü yolağı ile hücre bölünmesinin durmasıyla ilişkili olan sitoletal distansiyon toksini kodlayan bir gen kümesini

(cdtABC) içerdiği gösterilmiştir. Bu toksin mitokondriya aracılığında bağırsak epitel hücre ölümünü indüklemektedir (Liyanage ve diğerleri, 2010). *H. hepaticus*, Tip 4 sekresyon sistemi (T4SS)'nin temel bileşenleri ile homolojiye sahip üç protein dışında, *H. pylori* cag patojenite adası (CagPAI)'de bulunan genlerin ortologlarını içermez ve flagellar aparatı dışında bir tip III salgılama sistemi ile ilişkili bir virulans faktöründe içermemektedir (Suerbaum ve diğerleri, 2003). *H. hepaticus* Bab ve Sab adı verilen *H. pylori* adezinlerinden yoksundur. Ancak bir adezin faktörü olarak *C. Jejuni* adezyon geninin ortolojisi olan Periplasmic Binding Protein (PEB1)'in tespit edildiği raporlanmıştır (DeLong ve diğerleri, 2014). *H. hepaticus* genomu, G+C içerikleri bakımından kromozomun geri kalanından farklılık gösteren çok sayıda küçük bölgenin yanı sıra büyük bir bölge içermektedir. Söz konusu bölge *H. hepaticus* genomik adası 1 (HHGI1), %33,2 mol G+C içeriğine sahiptir ve 70 ORF içermektedir. HHGI1 içindeki genlerin çoğu varsayımsal proteinleri kodlar, ancak HHGI1'de tip VI salgılama sistemlerinin yapısal bileşenleriyle homolojiye sahip üç proteinin yanı sıra *Vibrio cholerae* hcp ile homolojiye sahip bir gen tanımlanmıştır. Diğer patojenite adalarının çoğunun aksine, HHGI1'in bir tRNA geni ile ilişkili olmadığı belirtilmekle birlikte, HHGI1 birkaç PAI'de rapor edilmiş olan bir profaj P4 benzeri integraz geni (HH269) içermektedir. Farelerde yapılan çalışmalar, bu PAI'nin söz konusu hayvanlarda hepatit gelişiminde rol oynadığı, ancak bu genin kolonizasyon için gerekli olmadığı bildirilmektedir (Boutin ve diğerleri, 2005; Ge ve diğerleri, 2008).

2.1.8. *Helicobacter* ve İmmünite

Kemirgenlerin enterohepatik *Helicobacter* enfeksiyonlarına olan ilgi, yalnızca araştırma modelleri üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı değil, aynı zamanda kolesistit, hepatoselüler karsinom, bakteriyemi ve enflamatuar barsak hastalıkları gibi insan hastalıklarının modellenmesinde kullanım alanı bulduklarından dolayı da artmıştır. Fareler ve gerbilleri deneysel olarak kolonize eden *H. hepaticus* ve gastrik *Helicobacter* türleri, mide, karaciğer ve alt bağırsak yolunda neoplastik lezyonlara ilerleyebilen önemli epitelyal hiperplazi ve displazi ile ilişkili kronik enflamasyonu uyarmaktadır (Whary ve Fox, 2006).

Aynı antijenlere karşı sistemik bir yanıtızlık olarak tanımlanan oral tolerans bazı durumlarda inhibe edilmekte ve bu etki, genellikle sensitizasyonun desteklenmesine eşdeğer kabul edilmektedir. Bu tür bir baskılama, fakültatif antijen sunan hücreler, dendritik hücreler ve düzenleyici T hücrelerinin baskılanmasının yanı sıra lenfosit anerjisi veya delesyonunu içermektedir. *Helicobacter* enfeksiyonunun oral tolerans üzerindeki inhibitör etkisi potansiyel

olarak kalıcı kronik gastrik inflamasyona ve laboratuvar hayvanı modellerinde allerjik tepkinin gelişmesine katkıda bulunabilmektedir. Bu yolak *H. pylori* enfeksiyonu ile gıda alerjisi arasındaki ilişkiye ek olarak kronik ürtiker gibi diğer allerjik hastalıklar, atopik dermatit ve kalıtsal anjiyon-nörotik ödemle de ilişkilendirilmesine yol açmıştır. Oral toleransı inhibe ederek inflamasyon oluşumunu alevlendirmesiyle birlikte *H. pylori* veya *H. felis* ile enfeksiyonun, antijenlerin in vitro sindirim epitelinden ve farelerde in vivo olarak mide mukozasından emilimini arttırdığı gösterilmiştir (Chichlowski ve Hale, 2009).

İmmünolojik tolerans oluşumuyla birlikte artan yangı olgusunun yanı sıra söz konusu bakterinin daha ılımlı ve kontrollü inflamasyon sağladığına dair çalışmalar da mevcuttur. Adjuvantsız *H. pylori* tam hücre lizatları kullanılarak intraperitoneal aşılardan sonra *H. pylori* ile eprüve edilen farelerde mide inflamasyonu ve T hücre tepkisinin incelendiği bir çalışmanın sonucunda; bağışıklama yapılmadan *H. pylori* ile enfekte edilen farelerde orta ila şiddetli mide inflamasyonu gelişirken, bağışıklamadan sonra *H. pylori* ile eprüve edilen farelerde kalıcı kolonizasyona rağmen inflamasyon ‘marker’larında ciddi bir azalma görüldüğü veya inflamasyonun hiç şekillenmediği rapor edilmiştir. Bu sonucun *H. pylori* taşıyan kişilerdeki kontrollü inflamasyon durumunu açıkladığı savunulmaktadır (Chichlowski ve Hale, 2009).

2.1.9. Tanı Yöntemleri

Rodentlerde *Helicobacter* enfeksiyonlarının tespiti için izlenebilecek Serolojik, Histopatolojik, Kültür ve Moleküler Yöntemler olmak üzere 4 ana yöntem bulunmaktadır (Whary ve Fox, 2004).

2.1.9.1. Serolojik Yöntemler

Serolojik yöntemlerin hassas olduğu ancak mix enfeksiyonlarda özgüllükten yoksun olduğu belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2006). *Helicobacter* türleri ile doğal enfekte olmuş immünokompetan farelerin çoğunun, enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) veya western blot ile tespit edilebilen güçlü bir serum antikor yanıtı geliştirmesine karşın yanlış negatif sonuçlar içeren seroloji raporlarının varlığı da bilinmektedir. Farelerde *Helicobacter* ile ilişkili karaciğer lezyonlarının ilk raporu 1994 yılında hepatitli outbred İsviçre Webster farelerinin *H. bilis* ile enfeksiyonunda saptanmıştır (Fox ve diğerleri, 2004). Bu çalışmada 6-8

aylık olan ve yapılan fekal kültürü ile *H. bilis* ile enfekte olduğu doğrulanan 11 fareden 8'inde *H. bilis* dış membran antijen serokonversiyonunun oluşmadığı raporlanmıştır. Benzer sorunlar nedeniyle, ticari seroloji kitinin mevcut olmadığı ve sonuç olarak teşhis laboratuvarları spesifite eksikliğinden dolayı rutin olarak seroloji sunmadığı belirtilmektedir (Fox ve diğerleri, 2004). Rutine girmeyen akademik çalışmalarda test için tam hücre sonikasyonu, membran sindirim preparatları veya rekombinant antijenler kullanılan serokonversiyon çalışmaları yapılmaktadır. Ancak diğer enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi, *Helicobacter* antijenleri ile serokonversiyon birkaç hafta veya daha uzun süre gerektireceğinden seroloji ile tespit, maruziyetten sonraki birkaç hafta içinde insensitiftir (Whary ve diğerleri, 2000). *Helicobacter* enfeksiyonunun tespiti için serolojik testler tipik olarak yüksek sensitiviteye sahiptir (> % 90), ancak antikörlerin homolog antijenlere çapraz reaktivitesi nedeniyle çoklu *Helicobacter* spp. enfeksiyonunda spesifite düşüktür. Bu enfeksiyonla ilgili yüksek spesifite raporlayan çalışmaların ise durumu halihazırda bilinen tek enfeksiyonlu farelerle yapıldığı belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2006).

Çeşitli laboratuvarlar, sensitivite ve spesifiteyi iyileştirmek için immünodominant rekombinant antijenleri kullanmayı denemiştir (Whary ve Fox, 2004). *H. hepaticus*, *H. muridarum* veya *H. bilis* ile enfekte olmuş farelerin serodeksiyonu için *H. hepaticus*'tan elde edilen rekombinant proteini ile *H. hepaticus*'un bir yüzey ekstraktının karşılaştırılması sonucunda, her iki testte de %98'lik yüksek spesifite elde edilmesine karşın yüzey ekstraktı bazlı ELISA'nın %89 ile daha yüksek bir sensitivite verdiği belirtilmektedir (Livingston ve diğerleri, 1999). Aynı çalışmada belirlenen %66'lık bir sensitiviteye sahip olan rekombinant protein esaslı ELISA'nın tüm enfekte fareleri tespit edemeyeceğini gösterdiği belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2006). Bir başka çalışmada immünodominant *H. bilis* peptitlerine dayalı bir ELISA spesifik 167-kDa proteininin *H. bilis* ile enfekte olan fareleri tanımladığı, ancak yüksek sensitivite ve spesifikle *H. hepaticus* ile enfekte olanları tanımlamadığı western blot ile desteklenerek belirtilmiştir (Kendall ve diğerleri, 2004). Aynı çalışmada *H. bilis* membran ekstraktları ile karşılaştırıldığında, rekombinant proteinler kullanıldığında sensitivitenin daha düşük, spesifitesinin ise çok daha yüksek olduğu raporlanmıştır (Whary ve Fox, 2006).

2.1.9.2. Histopatolojik Yöntemler

Helicobacter enfeksiyonlarında karaciğerde gözlenen önemli patolojik değişiklikler, özellikle immün yetmezliği olan farelerde olmak üzere hepatik nekrozu temsil eden soluktan beyaza kadar değişen odakları içerebilmektedir. *H. hepaticus* ayrıca A/JCr fareleri gibi duyarlı

suşlarda büyük ölçüde görülebilen neoplazmalara neden olmaktadır (Whary ve Fox, 2006). Warthin-Starry veya Steiner gümüş boyamanın kullanılması, karaciğer parankiminde ve safra sisteminde *H. hepaticus* veya *H. bilis*'in lokalizasyonunu mümkün kılmaktadır. Bakteriler enfekte farelerin karaciğerindeki safra kanaliküllerinde lokalize görünmektedir. Hepatik lezyonların ciddiyeti ile bağışıklığı yetersiz farelerde bakteri sayısı arasında bir ilişki vardır; bununla birlikte, enfekte A/JCr fareleri gibi immünokompetan farelerde, organizmaların karaciğerde bulunmasının zor olabileceği belirtilmektedir. İnflamatuar karaciğer lezyonlarının çevresinde gözlenen Warthin-Starry pozitif bakteriler, *H. hepaticus* veya *H. bilis* enfeksiyonlarını düşündürmekle birlikte tanısız değerinin olmadığı belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2006). İmmünokompetan fare türlerinin çoğunun bağırsak ve karaciğer lezyonları geliştirme eğilimine sahip genetik yatkınlığa sahip farelerde bile oluşamayabileceği, bu nedenle morfolojik tanının, *Helicobacter* enfeksiyonu için duyarlı veya spesifik olmadığı bildirilmektedir (Fox ve diğerleri, 1998).

2.1.9.3. Kültür Yöntemi

Helicobacter türleri özel gereksinimleri olan hassas bakterilerdir ve bu nedenle kültürü zor olan bir cins olduğu bilinmektedir. *Helicobacter* türleri sarmal görünümlü, hareketli, gram negatif, pigmentsiz, nitrat, glikoz ve indol testleri negatif, oksidaz, katalaz ve üreaz pozitif olan bir mikroorganizmadır. Ayrıca Giemsa boyası ile de boyanabilirler. Kemirgenler birden fazla *Helicobacter* türü ile enfekte olursa, aralarından bazı türlerin aşırı çoğalması, ayrı ayrı kolonize olan *Helicobacter* türleri için yanlış negatif kültür sonuçları verebilmektedir. Kültür için başarı oranı, sekum ve kolon örneklendiğinde ve beyin kalp infüzyonunda veya %30 gliserol içeren Brucella Broth'ta -70°C 'de uygun şekilde saklandığında yüksektir. Bağırsak örneklerinin PBS'de homojenleştirilmesinden sonra, muhtemel izolatların boyutuna bağlı olarak, 0.45 veya 0.65 μm 'lik bir filtreden süzme, rekabetçi komensalleri ortadan kaldıracığı belirtilmektedir. Üreme, filtratın daha sonra %1 trimetoprim, vankomisin ve polimiksin ile desteklenen kanlı agar üzerine ekilerek sağlanabilmektedir. Karaciğer gibi normalde steril bölgelerden alınan numuneler ise doğrudan kanlı agara ekilebilmektedir. Pleytler mikroaerobik koşullar altında (%80–90 N_2 , %5–10 H_2 ve %5–10 CO_2) $37 - 42^{\circ}\text{C}$ 'de 3–7 gün süreyle havalandırılmalı jarda inkübe edilir. Ancak negatif pleytlerin 21 gün inkübe edilmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır (Whary ve Fox, 2004).

Enterohepatik *Helicobacter* türlerinin çoğu, mukoid görünümündedir. Pek çok

Helicobacter türünün verimli büyüme için nemli agara ihtiyaç duyduğundan pleytlerin sağ taraf yukarı bakacak şekilde inkübe edilmesi gerektiği belirtilmektedir. İzolatlar, morfolojinin (Gram negatif, periplazmik lifler içeren veya içermeyen, tek veya bipolar flagellalı) *Helicobacter* spp. ile tutarlı olup olmadığını ve kaynak kemirgenin mix enfeksiyon olup olmadığını belirlemek için önce Gram boyama ve faz mikroskopu ile değerlendirilmelidir. Biyokimyasal karakterizasyon, üreaz, katalaz ve oksidaz, nitrat indirgemesi ve sefalotin, metronidazol ve nalidiksik asit gibi antibiyotiklere direnci test etmeyi içerir. PCR, kesin tanımlamayı doğrular. Bakteri sayısını, %5 fetal sığır serumu içeren *Brucella* Broth'a inokule ederek ve döner bir çalkalayıcıda 24-48 saat inkübe ederek artırmak mümkündür (Whary ve Fox, 2006).

Bütün gerekliliklerin yerine getirilmesi halinde bile kültürleme yöntemi ile kesin sonuca varmanın uzun bir süre gerektireceğinden rutin testlerde ve özellikle surveyans çalışmalarında moleküler yöntemlerin tercih edildiği görülmektedir.

2.1.9.4. Moleküler Yöntemler

PCR'in, klasik kültür teknikleriyle tür düzeyinde kültürlenmesi veya tanımlanması zor olan bazı bakterilerin, özellikle de *Helicobacter* türlerinin tespiti ve tanımlanması için rutin olarak kullanıldığı ve bu yöntemin *Helicobacter* enfeksiyonunu tespit etmek için en hassas ve özel araç olduğu belirtilmektedir. PCR yöntemleri, cins veya tür düzeyinde kemirgen *Helicobacter* karakterlerinin tanımlanmasına yönelik yüksek hassasiyet ve özgüllük nedeniyle kapsamlı bir şekilde tanımlanmış ve kullanılmıştır. Primer dizilerinin veritabanı dizileriyle dikkatli bir şekilde karşılaştırılmasının, ilgili organizmalarla çapraz reaksiyonu en aza indirmek için çok önemli olduğu vurgulanmaktadır. PCR sonuçlarının doğrulanması ise *Helicobacter* türlerinin kültürlenmesinin yanı sıra her izolatın biyokimyasal ve morfolojik karakterizasyonunu kapsamaktadır (Whary ve Fox, 2006).

PCR için numuneler aseptik olarak toplanmalı ve DNA ekstraksiyonundan önce – 20 °C'de saklanmalıdır. Nükleik asitlerin kandan izolasyonu için kullanılan ticari kitler, bir protokolün ardından dışkıdan bakteriyel DNA elde etmek için kullanılabilir. 16S RNA veya 23S RNA sekansları kullanılarak tasarlanan cinse özgü primerler kullanılarak, *Helicobacter* cinsine özgü bir PCR ürününün tanımlanmasının, bir kemirgen kolonisinin *Helicobacter* negatif veya pozitif olarak nitelendirilmesi için yeterli olduğu belirtilmektedir. *Helicobacter* türlerini belirlemek için seçenekler arasında PCR'nin türe özgü primerlerle

tekrarlanması veya cins düzeyindeki PCR ürününün kısıtlama enzimleriyle işleminin ardından tek tek *Helicobacter* türlerine özgü kısıtlama parçası uzunluğu polimorfizminin değerlendirilmesi için jel elektroforezinden yararlanılmaktadır (Shen ve diğerleri, 2005). Mix *Helicobacter* enfeksiyonlarının tespiti için multipleks PCR kullanılarak bir örnekte beş adede kadar farklı *Helicobacter* türünü tanımlayan yöntemler yayınlanmıştır (Feng ve diğerleri, 2004). *Helicobacter* türleri cinse özgü PCR ve ardından denatüre edici gradyan jel elektroforezi kullanılarak tayin edilebilmekle birlikte, yapılan bir çalışma bu tekniğin, birden fazla *Helicobacter* ile enfekte olmuş farelerden alınan bağırsak örneklerindeki farklı *Helicobacter* türlerini sayısını olduğundan az belirleyebileceği ileri sürülmektedir (Zhang ve diğerleri, 2005). Mix enfeksiyonlarda, bir türün DNA şablonunun önemli ölçüde diğerlerinden daha fazla miktarda bulunması durumunda, düşük miktarlarda bulunan *Helicobacter* türleri tespit edilemeyebilmektedir (Whary ve Fox, 2006).

Dışkıda bulunan inhibitör maddelerin PCR sonuçları üzerinde yanlış negatifliğe neden olabileceği belirtilmektedir (Whary ve Fox, 2006). Bilinen miktarda *Helicobacter* DNA'sı eklenmiş bir pozitif kontrol numunesinin işleme dahil edilmesi, bu sorunu önlemekte büyük ölçüde yeterlidir. Bundan başka; olası PCR inhibisyonunu gidermek için aynı DNA numunesi içinde laktobasil ile birlikte amplifiye eden bir dupleks PCR testi kullanılması da önerilen yöntemlerden biridir (Bourgade ve diğerleri, 2004). Beckwith ve diğerleri (1997) dışkıda varlığı bilinen inhibe edici maddelerin etkisini minimuma indirmek için; DNA izolasyonundan önce fekal örneklerinin PBS ile seyreltilmesi suretiyle hem dışkı hem de inhibitörlerin büyük ölçekli seyrelmesinin ardından örnekteki DNA'nın, ticari kitin silika matrisine bağlanmasının Taq polimeraz inhibitörleri dahil olmak üzere kalıntılarını gidereceğini belirtmektedir. Dışkıda bulunan inhibitör maddelerin etkisinin ortadan kaldırılması için konvansiyonel PCR yöntemleri yerine daha hassas olan Nested PCR, Real-time PCR ve florojenik nükleaz PCR testleri yapılabilmektedir. Zira Nested PCR kullanımı, hassasiyeti 10 ila 100 kat artırabilirken Real-time PCR ve florojenik nükleaz PCR testinin ise PCR sonrası işlemeyi ortadan kaldıran ve *Helicobacter* spp.'nin saptanması için hassas, spesifik ve yüksek verimli kapasite sağlayan teknikler olduğu belirtilmektedir (Ge ve diğerleri, 2001). Ayrıca fekal örneklerden DNA ekstraksiyonu bu amaç için özelleşmiş stool kitlerin kullanımı da diğer bir seçenektir.

Bakterinin tespiti için yapılacak dışkı örnekleme, kolondan alınacak örnekleme için yapılacak olan ötenaziyi önlediğinden dolayı uygundur, ancak karşılaştırmalı yapılan bir çalışmada, bağırsakların pozitif olduğu bazı durumlarda fekal örneklerin *Helicobacter* için

negatif olabileceğini bildirmiştir (Cao ve diğerleri, 2020). Bağırsak ve dışkı pozitifliği arasındaki farkın, *Helicobacter* DNA tespitinin enfeksiyon ve/veya kolonizasyon sırasında değişiklik göstermesinden de kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. *H. hepaticus* ile kontrollü olarak yapılan bir deneysel enfeksiyonda, enfeksiyondan sonraki 14. günde hayvanların tamamının dışkısında bakteriyel DNA tespit edilirken, bağırsak ve karaciğerde sırasıyla 60 ve 180 gün sonra bakteriyel DNA tespit edilmiştir (Cao ve diğerleri, 2020). Beckwith ve diğerleri (1997) tarafından yapılan çalışmada ise intestinal örneklerle fekal örnekler arasında *Helicobacter* spp. yönünden önemli bir farkın olmadığı belirtilmektedir.

2.1.10. Prevalans

İlk kez 1984 yılında Marshall ve Warren tarafından izole edilen spiral şekilli mikroaerofilik bakteriler, mide hastalığı ile ilişkileri nedeniyle önemli araştırmaların odak noktası olmaya başlamıştır. Yaygın olarak kullanılan tüm laboratuvar kemirgen türlerinde doğal olarak edinilmiş *Helicobacter* enfeksiyonlarının varlığı ve enfekte farelerden yapılan örneklemelerden sık izole edilen türlerin büyük kısmının *Helicobacter hepaticus*'un oluşturduğu bildirilmektedir (Taylor ve diğerleri, 2007). Daha önce alıntılanan veriler kullanılarak yapılan bir yorumda *Helicobacter* spp.'nin test edilen fare fekal örneklerinde %32'lik bir prevalansından söz edilmekte ve bu oranın da *Helicobacter* spp.'yi biyomedikal araştırma için kullanılan farelerde en yaygın patojen haline getirdiği belirtilmektedir (Livingston ve Riley, 2003).

Taraması yapılan diğer bakteriyel ajanlara kıysla *Helicobacter* spp. yaygınlığını ortaya çıkaran bir başka çalışma Pritchett- Corning ve diğerleri (2009) tarafından oldukça yüksek sayıda hayvan kullanılarak geniş bir coğrafyada yürütülmüştür. Laboratuvar farelerinde ve sıçanlarında görülen enfeksiyöz ajanların Avrupa ve Kuzey Amerika prevalanslarına dair söz konusu çalışma sonuçlarına göre; farelerde en yaygın olan bakteriyel ajan ortalama %16,08'lik bir oran ile *Helicobacter* spp. bu cins içerisinde en yaygın tür ise %12,37 ile *Helicobacter hepaticus* olarak tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada farelerde raporlanan diğer yaygın iki türden biri ortalama %12,9 ile *Pasteurella pneumotropica* ve diğeri de ortalama %6'lık bir prevalansla *Staphylococcus aureus* olmuştur. Bu çalışma da test edilen tüm bakteriyel ajanlara dair elde edilen prevalans oranları Tablo 2'de görüldüğü gibi gerçekleşmiştir.

Tablo 2. Farelerde Bakteriyel enfeksiyöz ajanların Avrupa ve Kuzey Amerika prevalansları (Pritchett- Corning ve diğerleri, 2009).

Etken	Metod	N	KA (%)	Avrupa (%)	Total (%)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Kültür	109.802	0,00	0,00	0,00
<i>Cilia-associated respiratory bacillus</i>	Seroloji	158.741	0,01	0,00	0,01
<i>Citrobacter rodentium</i>	Kültür	82.337	0,00	0,00	0,00
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Kültür	109.804	0,00	0,00	0,00
<i>Helicobacter spp.</i>	PCR	91.119	15,88	21,28	16,08
<i>Helicobacter hepaticus</i>	PCR	91.463	12,45	10,23	12,37
<i>Helicobacter bilis</i>	PCR	91.386	2,20	1,49	2,17
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kültür	185.937	0,38	1,32	0,38
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kültür	186.667	0,10	0,85	0,10
	Kültür	61.592	0,00	0,00	0,00
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Seroloji	455.102	0,01	0,16	0,01
	PCR	43.777	0,00	0,00	0,00
<i>Pasteurella multocida</i>	Kültür	109.376	0,00	0,00	0,00
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Kültür	109.403	13,20	4,00	12,90
Diğer <i>Pasteurella sp.</i>	Kültür	106.232	0,31	0,00	0,31
<i>Salmonella spp.</i>	Kültür	109.655	0,00	0,00	0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kültür	107.002	6,03	11,56	6,07
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Kültür	2.842	0,00	0,00	0,00
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kültür	109.804	0,00	0,00	0,00
<i>Streptococcus sp. – b-hemolitik, Grop B</i>	Kültür	106.971	0,24	0,00	0,24
<i>Streptococcus sp. – b-hemolitik, Grop G</i>	Kültür	109.733	0,00	0,11	0,00

KA: Kuzey Amerika, N: Örnek sayısı

Aynı çalışmanın sıçan sonuçları oransal olarak fare sonuçlarına göre farklılık gösterse de en yaygın bakteriyel ajanlar yönünden değişmemiştir. Zira en yaygın ilk üç bakteri yine ortalama prevalans oranları sırasıyla %6,61, %4,81 ve %23,61 ile *Helicobacter spp.*, *Pasteurella Pneumotropica* ve *Staphylococcus aureus* olarak raporlanmıştır. *H. hepaticus* ve *H. bilis*'in farelerde en yaygın *Helicobacter* türleri olmasına karşın sıçan *Helicobacter* türlerinin çoğunun büyük olasılıkla sıçanlara özgü diğer türleri içerdiği söz konusu çalışmanın

diğer bir çıktısı olarak belirtilmektedir (Pritchett- Corning ve diğerleri, 2009). Bu çalışma da test edilen tüm bakteriyel ajanlara dair elde edilen prevalans oranları Tablo 3'te görüldüğü gibi gerçekleşmiştir.

Tablo 3. Ratlarda Bakteriyel enfeksiyöz ajanların Avrupa ve Kuzey Amerika prevalansları (Pritchett- Corning ve diğerleri, 2009).

Etken	Metod	N	KA (%)	Avrupa (%)	Total (%)
<i>B. bronchiseptica</i>	Kültür	8.282	0,00	0,00	0,00
<i>Ciliaassociated respiratory bacillus</i>	Seroloji	267	0,27	4,63	0,48
<i>C. kutscheri</i>	Kültür	8.289	0,00	0,00	0,00
<i>Helicobacter spp.</i>	PCR	8.852	6,59	7,14	6,63
<i>H. hepaticus</i>	PCR	8.915	0,46	0,31	0,45
<i>H. bilis</i>	PCR	8.915	0,42	0,31	0,42
<i>K. oxytoca</i>	Kültür	7.315	0,37	0,00	0,37
<i>K. pneumoniae</i>	Kültür	7.513	0,55	0,00	0,53
	Kültür	3.433	0,06	0,00	0,06
<i>M. pulmonis</i>	Seroloji	81.524	0,16	2,57	0,23
	PCR	3.734	0,29	0,00	0,29
<i>P. multocida</i>	Kültür	8.223	0,00	0,00	0,00
<i>P. pneumotropica</i>	Kültür	8.241	4,92	3,99	4,81
<i>Diğer Pasteurella sp.</i>	Kültür	7.346	0,45	0,00	0,44
<i>Salmonella sp.</i>	Kültür	8.235	0,00	0,00	0,00
<i>S. aureus</i>	Kültür	7.365	23,50	30,63	23,61
<i>S. moniliformis</i>	Kültür	797	0,00	0,00	0,00
<i>S. pneumoniae</i>	Kültür	8.289	0,00	0,00	0,00
<i>Streptococcus sp. – b-hemolitik, Grup B</i>	Kültür	7.503	3,74	1,34	3,67
<i>Streptococcus sp. – b- hemolitik, Grup G</i>	Kültür	8.314	0,01	2,71	0,35

KA: Kuzey Amerika, N: Örnek sayısı

Rodentlerdeki spiral bakterilerin varlığı ile ilgili çalışmalar 80'li yıllarda başlamış, izole edilen yeni türlerin *Helicobacter* ile ilişkilendirildiği 90'lı yıllarda devam etmiştir (Lee ve diğerleri,1992; Schauer ve diğerleri,1993). Ancak bu türe olan ilgi 1992 yılında Frederick Kanser Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde farelerde etiyojisi bilinmeyen yeni bir kronik, aktif hepatit formu keşfedilmesiyle birlikte yeni bir eksene kaymıştır. Zira uzun soluklu bir toksikoloji çalışmasında kontrol grubunu oluşturan farelerin karaciğerlerinde tümör benzeri oluşumlar gözlenmiş ve çalışmanın sonuçlarını etkilediği belirlenmiştir (Ward ve diğerleri, 1994). Söz konusu hayvanların karaciğer dokularının çeşitli mikrobiyolojik tanı yöntemleri ile incelenmesi sonucu farelerin hepatik safra kanaliküllerini seçici ve kalıcı bir şekilde kolonize eden, morfolojik olarak farklı bir yapıda kronik, aktif hepatitise neden olan ve enfekte hayvanlarda yüksek hepatoselüler neoplazma insidansı ile ilişkili yeni bir *Helicobacter* türünün [geçici olarak *Helicobacter hepaticus* sp.(Fox ve diğerleri, 1994)] izolasyonu rapor edilmiştir (Ward ve diğerleri, 1994). Bu çalışmanın ardından söz konusu bakterinin nomenklatüre dahil edilmesi Fox ve diğerleri (1994) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Biyolojik çalışmaların yönünü değiştirme potansiyelinin farkedilmesi ile birlikte bu cinse olan ilgi artmış ve dünyanın çeşitli yerlerinde tarama ve prevalans çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Buna yönelik ilk çalışma 1995 yılında Shames ve diğerleri (1995) tarafından sadece *H. hepaticus* taramasına yönelik yapılmıştır. Bu çalışmada dört tesisten toplam 160 fare olmak üzere yirmi sekiz farklı suş veya stok kullanılmış ve dört tesisin ikisinde *H. hepaticus*'un tespit edildiği bildirilmiştir. Pozitif işletmelerin birinde insidans %100, diğerinde ise %52 olarak belirlenmiştir. *H.hepaticus* yönünden negatif çıkan bir tesiste ise %55'lik bir insidansla *H. bilis* tespit edilmiştir. Enfekte farelerde *H. hepaticus* için örneklenen bölgelerde, sekum (%92) ve kolon (%76) kazıntılarında *H. hepaticus* kültürlenebilmesine karşın karaciğer dokusundan izolasyonun mümkün olmadığı belirtilmektedir. Söz konusu oranların fekal filtrasyonla elde edilen filtratla yapılan ekimlerle % 100'lük bir uyuma sahip olduğu raporlanmıştır. Kültür yönteminin yanı sıra PCR yöntemi de kullanılan söz konusu çalışmada PCR yöntemi ile kültür yöntemi arasında ise mikroorganizma tespiti açısından önemli bir farkın oluşmadığı da belirtilmektedir (Shames ve diğerleri, 1995).

Adventif enfeksiyonlar, laboratuvar fareleri ve sıçanlarının kullanımında karşılaşılan en yaygın problemler arasında olduğu gerekçesi ile *Helicobacter* sürveyansının henüz yaygın olmadığı bir dönem olan 1998'de 102 laboratuvar hayvanı tesisi yöneticisiyle bir anket çalışması yapılmıştır. Ankete katılan tesislerde fare kolonilerinin %70'i ve sıçan kolonilerinin % 60'ı Spesifik Patajonlerden Ari (SPF) koşulları altında olmasına rağmen fare ve sıçan

kolonilerinde en az %10'luk bir *Helicobacter* prevalansını ortaya koymuştur (Jacoby ve Lindsay, 1998).

47 koloniden 820 fare; 10 koloniden 163 rat ve 4 koloniden 50 adet hayvan kullanılarak Goto ve diğerleri, (2000) tarafından yapılan bir çalışmada; *H. hepaticus* prevalansı; test edilen farelerde %10,9, koloni bazında %25,5, *H. bilis* prevalansı; test edilen farelerde %1,2, koloni bazında %2,1, *H. rodentium* prevalansı ise test edilen farelerde %17,2, koloni bazında %23,4 olarak gerçekleşmiştir. Altı koloniden (%12,8) 47 farede (%5,7) ise *H. hepaticus* ve *H. rodentium* ile birlikte bulunmuştur. Taraması yapılan 820 fareden 87'si (%10,6), 47 koloniden ise 9'u (%19,1) cinse özgü primere pozitif sonuç vermesine karşın araştırması yapılan hiçbir türe dahil olmamıştır. Cinse özgü pozitif örneklerin 2 tanesi *H. typlonius* ile %97,2 oranında homoloji gösterdiği de çalışmada ayrıca belirtilmiştir. *Helicobacter* spp.'nin ratlarda ki prevalansı söz konusu olduğunda farelerde olduğu gibi geniş yelpazede ve görece yüksek prevalansa karşın daha düşük oranlar söz konusu olmuştur. Zira sadece %29,4 oranında *H. rodentium* pozitif örneğin yer aldığı çalışmada koloni prevalansı %30 olarak gerçekleşmiştir. Ratlarda bunun dışında bir pozitifliğe rastlanmamıştır. Ratlara benzer durumun gerbillere için de geçerli olduğu çalışmada %78 oranında pozitif çıkan *H. hepaticus*'un koloni prevalansı %75 olarak gerçekleşmiştir. Gerbillerde bunun dışında cinse ya da türe özgü bir bağlanma gerçekleşmemiştir. Nilsson ve diğerleri, (2004) tarafından yapılan *Helicobacter* spp.'nin dağılımını ve bu dağılımın hastalıkla ilişkisini incelemek için mide, bağırsak ve hepatik doku örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada; 4 farklı tesiste barındırılan 9 fare suşunun fekal örneklerinde %85,7 oranında *Helicobacter* DNA'sı saptanmıştır ve bu oran diğer doku ve örneklerle kıyaslandığında en yüksek oran olmuştur. Söz konusu çalışmada fekal örnekler için bir başka çıktı ise IL-10 -/- fare hariç tüm hayvanların, fekal örneklerinde *Helicobacter* PCR pozitifliği olarak raporlanmıştır. Diğer dokulardaki *Helicobacter* spp. DNA dağılımı ise; gastrik dokuda %54,8, kan örneklerinde %14,3 ince bağırsakta %16,7 ve karaciğerde %21,4 olarak belirlenmiştir.

Bohr ve diğerleri, (2006) tarafından bir SPF tesiste barındırılan 37 inbreed 3 outbred olmak üzere toplam 40 fare hattında fekal örnekler kullanılarak *Helicobacter* spp. taraması yapılmış ve %87,5 oranında prevalans tespit edilmiştir. PCR ampliconlarının Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi sonucunda 27 fare suşunun tek bir *Helicobacter* türü taşıdığını, sekiz fare suşunun ise en az iki farklı *Helicobacter* türü tarafından enfekte olduğunu ortaya çıkardığı belirtilmektedir. Mix enfeksiyonun olduğu tespit edilen sekiz hayvandan beş tanesi anılan yöntemle çözümlenememiş üçünde ise, *H. ganmani*

ve *H. hepaticus* birlikte tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada monoenfekte fare suşlarının analizi sonucunda türler arasında dağılım; *H. ganmani* %37,5, A/J ve Tac:ICR: Hascid fRF farelerinde kolanjiyohepatiti ve IBD'yi indüklediği bilinen MIT 98- 5357 izolatu ile temsil edilen *Helicobacter* türleri (%15), *H. hepaticus* (%7,5), izole hamster B ile temsil edilen *Helicobacter* spp. (%8) ve *H. typhlonicus* (%4) olarak raporlanmıştır.

Taylor ve diğerleri (2007) tarafından materyalini Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 16 araştırma kurumundan ve Kanada, Avrupa, Avustralya ve Asya'daki 16 araştırma enstitüsünden alınan örneklere ek olarak iki ABD ticari işletmeden satın alınan 10 hayvanın oluşturduğu bir çalışma yapılmıştır. Bu örnekleri biyokimyasal reaksiyon, faz mikroskopisi, gram boyama ve *Helicobacter* cinsine özgü PCR ile değerlendirilmiş ve 79 fareden 62'sinin (%78) *Helicobacter* pozitif olduğu belirtilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 34 enstitünün 30'undan elde edilen örneklerin *Helicobacter* pozitif olmasından dolayı çalışmada elde edilen genel prevalans %88 düzeyinde gerçekleşmiştir. A.B.D'nin *Helicobacter* spp.'den ari kabul edilen bölgesinde faaliyet gösteren ticari işletmeden elde edilen farelerde *Helicobacter* spp. tespit edilmemesine karşın *Helicobacter* ile enfekte olduğu kabul edilen üretim alanındaki farelerde birden fazla *Helicobacter* spp. bulunduğu belirtilmektedir. Avrupada faaliyet gösteren ticari işletmede ise, *Helicobacter* sp MIT 96- 1001 suşu belirlenmiştir. Enstitüler söz konusu olduğunda ise enstitülerin %6'sının en az üç *Helicobacter* spp. ile, %29'unun iki *Helicobacter* spp. ile, %47'sinin ise tek bir *Helicobacter* türü ile kolonize edildiği gösterilmiştir.

Araştırılan 34 kurumdan alınan fareler arasında, tek başına veya diğer *Helicobacter* türleri ile kombinasyon halinde *H. hepaticus*'un en çok tespit edilen (%59), *H. typhlonius* (%26) ve MIT 96-1001, *H. rodentium* ve *H. mastomyrinus*'un ise her biri için %6'lık oranlarla *H. hepaticus*'u takip ettiği yeni bir *Helicobacter* türünde (strain MIT 01-6451) iki farklı Asya Enstitüsünden alınan farelerden kültürlendiği raporlanmıştır. Taranan kurumların hiçbirinde farelerde *H. ganmani*'ye Avrupa kurumlarından elde edilen farelerde ise *H. bilis*'e rastlanmadığıda çalışmanın çıktıları arasında yer almıştır (Taylor ve diğerleri, 2007).

ABD' deki bir veteriner teşhis laboratuvarı tarafından PCR kullanılarak taranan sıçan sekum örneklerinde *Helicobacter* spp.'nin %19 oranında varlığından söz edilmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların türlere göre dağılımının; %9 *H. bilis*, %10 *H. typhlonius*, %8 *H. hepaticus* ve *H. rodentium*'un yanı sıra %2 oranında tür tayini yapılamayan suşlardan oluştuğu bildirilmektedir (Whary ve Fox 2006).

Helicobacter testi için Missouri Üniversitesi Araştırma Hayvan Teşhis ve Araştırma

Laboratuvarı'na gönderilen fekal örneklerin PCR ile incelenmesi sonucu Kasım 1999- 2000 yıllarında test edilen 1.271 numunenin %4,88'i *H. typhlonius* için, %16,44'ü *H. hepaticus* için, %4,33'ü *H. bilis* için, %15,11'i *H. rodentium* için pozitif olarak raporlanmış, aynı çalışmada *Helicobacter* spp. için pozitiflik oranı ise %10,54 olmuştur (Franklin ve diğerleri, 2001). Aynı Laboratuvarda 2001 ve 2002 yıllarında test edilen fekal örneklerin ise yaklaşık % 20'sinin *H. hepaticus* için pozitif, % 17'sinin *H. typhlonius* için pozitif, %10'unun *H. rodentium* için pozitif, % 5'inin *H. bilis* için pozitif olduğu, %1'nin ise karakterize edilmemiş bir *Helicobacter* spp. olduğu belirtilmektedir (Myles ve diğerleri, 2003). Çift yönlü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile *Helicobacter* spp. ve *H. hepaticus* yönünden laboratuvar fareleri ve sıçanlarının taranmasını içeren sağlık izleme ve teşhis hizmeti sunan İsveç Ulusal Veteriner Enstitüsü'nün 2002-2003 verilerine göre ise *H. hepaticus* prevalansı %42 olarak gerçekleşmiştir (Johansson ve diğerleri, 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Ege bölgesinde yer alan ruhsatlı 11 adet deney hayvanı tesisinin her birinden ayrı kafeslerden olmak üzere 15-22 haftalık yaşlar arasından rastgele seçilen 10 adet fare, 10 adet rat ve 10 adet te gerbil olmak üzere toplam 200'er adet (110 fare ve 80 rat ve 10 gerbil) (Gerbil yalnızca bir tesiste bulundurulmaktadır) hayvan kolon ve dışkı örnekleme yapılmıştır.

Tablo 4. Örnekleme tablosu.

Örnekleme Yapılan birim	Örnekleme yapılan deney hayvanı türü ve sayıları						Tesis Dışkı Örnek sayısı
	Fare		Rat		Gerbil		
	Dışkı	Kolon	Dışkı	Kolon	Dışkı	Kolon	
1	10	10	-	-	-	-	1
2	10	10	10	10	-	-	1
3	10	10	10	10	-	-	1
4	10	10	10	10	-	-	1
5	10	10	-	-	-	-	1
6	10	10	10	10	-	-	1
7	10	10	10	10	-	-	1
8	10	10	10	10	-	-	1
9	10	10	10	10	10	10	1
10	10	10	-	-	-	-	1
11	10	10	10	10	-	-	1
Toplam hayvan sayısı	110	110	80	80	10	10	
Elde edilen örnek sayısı	11	11	8	8	1	1	11
Toplam örnek sayısı				51			

Onbir tesisten sadece 8 tanesinde rat yetiştirilmesi ve kullanımı yapıldığından ratları temsil eden örnek sayısı 80 adetle sınırlı kalmıştır. Bu hayvanlar için tesis sorumlusu ile önceden görüşülerek bireysel kafeslere alınması sağlanmış, böylece dışkı numunelerinin de bu hayvanlara ait olması garanti altına alınmıştır. Bu hayvanlardan alınan numuneler örnek havuzunu meydana getirmiştir. Tesislerden alınan hayvanların, kolon ve dışkı örnekleri birleştirilerek her bir tesisi temsil eden 1'er adet rat kolon ve dışkı örneği, 1'er adet fare kolon ve dışkı örneği bir adette gerbil kolon ve dışkı örneği seti oluşturulmuştur. Aynı zamanda her tesisten taze dışkılar alınmış, tesis bazında etiketlenerek birleştirilmiş ve tüm tesisi temsilen 'tesis dışkı örneklem havuzu' oluşturulmuştur. Böylece toplamda 11 adet fare, 8 adet rat ve 1 adet gerbilden elde edilen 20 adet kolon ve bu örneklerle bağımlı 20 adet dışkı numunesi ile 11 adet 'tesis dışkı örneklem havuzu' örneği olmak üzere toplam 51 örnekle çalışma yürütülmüştür (Tablo 4).

3.2. Yöntem

3.2.1. Numune Alımı

Fare, rat ve gerbiller kolon örneği alınmadan önce CO₂ ile ötenazi işlemine tabi tutulmuş ve her bir hayvandan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Bakteriyoloji Bölümünde aseptik şartlarda yaklaşık 1 cm uzunluğunda kolon örneği alınmıştır. Daha sonra her tesisi temsil edecek olan 10 adet kolon örneği steril şartlarda homojenize edilerek birleştirilmiş ve tesisi temsil eden kolon örneği oluşturulmuştur. Bu işlem her tesisden gelen fare, rat ve gerbil örnekleri için tekrarlanmıştır. Dışkı örnekleri için ise aynı şekilde gruplardan alınan taze feçesler homojenize edilerek her 10 hayvanı temsil eden örneklem havuzu oluşturulmuştur. Bununla birlikte her tesisi temsil edecek ve tesisin tümünden alınacak dışkı örnekleri de birleştirilmiş "tesis dışkı örneklem havuzu" oluşturulmuştur. Her bir tesisten alınan kolon ve dışkı örneği homojenizatı çalışma yapılına -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA İzolasyonu

-20 °C'de muhafaza edilen kolon ve dışkı örneği homojenizatları oda ısısında çözdürülmüştür. Örneklerden DNA ekstraksiyonu için "QIAamp Stool Mini Kit", kullanılmış ve kit protokolüne sadık kalınmıştır. Toplam 200 adet hayvandan elde edilen örneklerin tesis

bazında birleştirilmek suretiyle elde edilen örnekten ve tesislerden toplanan dışkı örneklerinden DNA ekstraksiyonu için “QIAamp Stool Mini Kit” kiti prosedürüne uygun olarak kullanılmıştır.

3.2.2.1. QIAamp Stool Mini Kit Prosedürü

- 180-220 mg dışkı 2 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Her örneğe 1,4 ml Tampon ASL eklendi ve 1 dakika boyunca veya dışkı örneği iyice homojenleşene kadar vortekslendi.
- Dışkı Süspansiyonu 70°C termal blokta 5 dakika tutuldu, vortekslendi ve 1,2 ml süpernatant yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Her tüpe 1 InhibitEX Tablet eklendi ve 1 dakika boyunca veya tablet tamamen askıda kalana kadar vortekslendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Ardından 1.400 rpm'de 3 dk santrifüjlendi.
- Tüm süpernatant yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj alındı ve 3 dakika boyunca 14.000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi.
- Yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 15 ul proteinaz K, 200 ul süpernatant ve 200 ul Tampon AL eklendi ve vortekslenerek 70°C termal blokta 10 dakika tutuldu.
- Lizata 200 ul etanol (%96) eklendi, vortekslendi, spin kolona aktarıldı ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve filtrat içeren toplama tüpü uzaklaştırıldı.
- Yeni bir spin kolona geçildi, 500 ul Tampon AW1 eklendi 14.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpü uzaklaştırıldı.
- Spin kolona 500 ul Tampon AW2 eklendi. 14.000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. Filtrat içeren toplama tüpü uzaklaştırıldı.
- Spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpü uzaklaştırıldı. 14.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.
- Spin kolon, etiketli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, 200 ul Tampon AE eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, 14.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüjden sonra filtre atıldı ve altta kalan sıvı DNA olarak kullanıldı.
- Ayrılan DNA PCR çalışmaları yapılana kadar cryo tüplerde -20 °C derin

dondurucuda muhafaza edildi.

-

3.2.3. PCR

3.2.3.1. Kullanılan Cihazlar

PCR 100 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cyclers kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. MgCl₂, Taq DNA Polimeraz, 10xTaq Buffer, dNTP Set

25mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X TaqBuffer (100 mM (Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl), 100mM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanılmıştır.

3.2.3.3. Primerler

Helicobacter spp.'ye özgü 16S ribozomal RNA(16S rRNA) geninin belirlenmesinde kullanılan primer oligonükleotid dizisi Tablo 5'te verilmiştir. 16S ribozomal RNA geni için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edilen *H. Pylori* ATCC 43504 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 5. PCR'da kullanılan 16S rRNA oligonükleotid dizisi (Riley ve diğerleri, 1996; Beckwith ve diğerleri, 1997).

Primer	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Baz büyüklüğü
H276f:	5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3'	375
H676r:	5'-ATTCCACCTACCTCTCCCA-3"	

f:forward; r:reverse.

3.2.3.4. PCR işlemi ve Protokol

Helicobacter spp. PCR işlemi ve uygulanacak protokol Beckwith ve diğerleri (1997) tarafından bildirildiği şekilde Tablo 6'da görüldüğü gibi gerçekleştirildi.

Tablo 6. *Helicobacter* spp. PCR işlemi ve uygulanacak protokol (Beckwith ve diğerleri, 1997).

PCR içerik	
Herbir primer	1 µM
Herbir dNTP (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP)	200 mM
PCR Buffer	10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl ₂ 50 mM KCl (pH 8.3)
Taq polymerase	1.25 U
DNA	Dışkı DNA'sı: 5µl Bağırsak DNA'sı: 1.25 µl
Distile Su	50 µl'ye tamamlanır.
Kondisyon	
Başlangıç Denatürasyon	94°C'de 5 dk.
Isıtma	94°C'de 30 saniye.
Denaturasyon	94°C 2 saniye – 45 siklus.
Annealing	53°C 2 saniye .
Extension	72°C 30 saniye .
Elektroforez	1% agarose gel (16µl son hacimli PCR ürünü).

Tür identifikasyonu için her bir *Helicobacter* türü için Tablo 7'de belirtilen türe özgü 16S rRNA primer dizilimleri kullanılarak multiplex PCR yöntemi kullanılmıştır (Feng ve diğerleri, 2004).

PCR işlemi, 25 µl HotStar Taq Master karışımı (QIAGEN Inc., USA), 1 µl template DNA, 100 µM lık herbir primer diziliminden 1'er µl ve 22 µl distile su karıştırılarak toplam 50 µl'lik hacimde yürütülmüştür. Çalışmada genomik DNA konsantrasyonu 5 µg / ml ve dışkı DNA'sı ise 14 µg / ml kullanılmıştır (Feng ve diğerleri, 2004).

3.2.3.5. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

0,2 mL tüplerde oluşturulan 50 µl' lik PCR ürünlerinden 10' ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye solusyonu ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, %1'lik agaroz jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

Tablo 7. Türlerle ait primer dizilimleri (Feng ve diğerleri, 2004)

<i>Tür</i>		Primer Dizilimleri	Baz büyüklüğü
<i>H. rodentium</i>	1201f	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT	191
	1375r	TAGCCAGTTTGGCATTCC	
<i>H. typhlonius</i>	163f	AGGGACTCTTAAATATGCTCCTAGAGT	122
	262r	ATTCATCGTGTTTGAATGCGTCAA	
<i>H. bilis</i>	p17f	ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAACTTCAG	435
	p17r	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT	
<i>H. hepaticus</i>	p25f	ATGGGTAAGAAAATAGCAAAAAGATTGCAA	705
	p25 r	CTATTTTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC	
<i>H. muridarum</i>	p30f	ATGACAAAAAAATATTCTTTCACAAAACCTATTCATTGGT	807
	p30r	TTTATTTTAGATTCCATTTAACTGCTAAATCATCAATAGT	

f:forward; r:reverse.

3.2.3.6. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda *Helicobacter* spp. için 40 dakika multiplex için ise 60 dakika yürütüldü.

3.2.3.7. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Multiplex PCR sonuçları Feng ve diğerleri (2004) tarafından bildirilen baz büyüklükleri baz alınarak değerlendirilmiştir (Tablo 7).

3.2.4. İstatistiksel Yöntem

Örnekleme yeri karşılaştırmalarında; iki grubun verileri arasındaki önem testi için frekans analizleri ve Ki-kare testi uygulanmıştır. Bu işlem için Minitab 19 istatistik programından yararlanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Tesis Hayvan ve Örnek Sayıları

Çalışmanın yürütüldüğü tesislerde örnekleme esnasında toplamda 6356 adet fare, 903 adet rat ve 65 adet de gerbil türü hayvan varlığı belirlenmiştir. Söz konusu hayvan ve tesislerin hiçbirinde klinik bir hastalık tablosu gözlenmemesinin yanı sıra tesis sorumlu Veteriner Hekimlerden alınan bilgiler de bu yönde olmuştur.

4.1.1. Fare Kolonilerinde *Helicobacter* spp.

Çalışmanın yürütüldüğü 11 adet deney hayvanı tesisi örneklerinden elde edilen sonuçlar Tablo 8’de özetlenmiştir. Elde edilen numuneler üzerinde yapılan PCR sonucunda farelerde bir tesis hariç tamamında *Helicobacter* spp. tespit edilmiştir (Şekil 1).

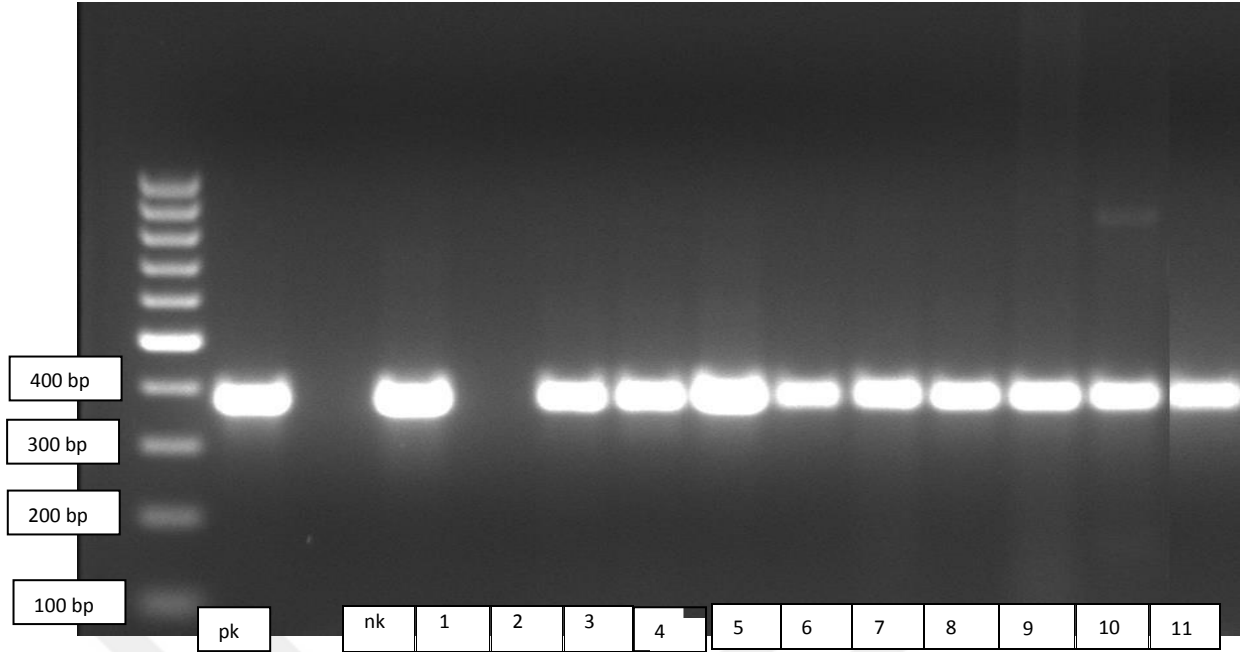
Bu sonuca göre prevalans %90,91 olarak gerçekleşmiştir. Elde edilen *Helicobacter* spp. pozitif örneklerin DNA ları kullanılarak tür bazında ayırım için Multiplex PCR sonuçlarına göre en yaygın tür %90,91 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* %72,73 prevalans oranıyla ikinci yaygın tür olurken onu %27,27’lik prevalansla *H. hepaticus*’un takip ettiği tespit edilmiştir (Tablo 8).

Örnekleme yerleri göz önüne alındığında ise tür oranlarında değişimler gözlenmiştir. *H. rodentium* ve *H. typhlonius* türlerinde fekal örneklerde yapılan testlerde pozitiflik oranı kolon örnekleriyle kıyaslandığında daha yüksek olurken *H. hepaticus* söz konusu olduğunda tam tersi bir durum ortaya çıkmıştır. Cins düzeyinde ise her iki örnekleme arasında oransal bir fark ortaya çıkmamıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Fare kolonilerinde *Helicobacter* spp.ve türlere göre dağılımı.

Tesis No:	Örnek (n=10)	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. rodentium</i>	<i>H. typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H. hepaticus</i>	<i>H. muridarum</i>
1	Fekal	p	p	n	n	p	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
2	Fekal	n	-	-	-	-	-
	Kolon	n	-	-	-	-	-
3	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	n	n
4	Fekal	p	p	P	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	n	n
5	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	n	n
6	Fekal	p	p	n	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	p	n
7	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	n	n
8	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	n	n
9	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	n	p	n	n	n
10	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	p	n
11	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
% Pozitif	Fekal	90,91	90,91	72,73	0,00	9,09	0,00
	Kolon	90,91	81,82	63,64	0,00	18,18	0,00
% Pozitif	Tesis	90,91	90,91	72,73	0,00	27,27	0,00

p: pozitif, n: negatif



Şekil 1. Fare Kolonileri 16S rRNA PCR Bant Görünümleri.

Multiplex PCR sonuçlarına göre (Şekil 3) çalışmanın yürütüldüğü 11 adet tesisin birinde *Helicobacter* spp. saptanmamış, *Helicobacter* spp. saptanan tesislerin tamamında *H. rodentium* bulunduğu belirlenmiştir. Tesislerden 1,6 ve numaralı olmak üzere 2 adedinin *H. rodentium*'a ek olarak *H. hepaticus* ile, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 ve 11 numaralı tesisler olmak üzere 7 adedinin ise *H. rodentium*'a ek olarak *H. typhlonius* ile mix enfekte olduğu tespit edilmiştir. İki den fazla tür ile enfekte olan bir tesis mevcut olup bu da 10 numara ile kodlanmış tesisdir. Bu bulgular dikkate alındığında oluşan oranlar tablo 9' da görüldüğü gibi gerçekleşmiştir. Buna göre iki tür ile mix enfeksiyon görülen tesis oranı %90 ve ikiden fazla tür ile mix enfeksiyon gelişen tesis oranı ise %10 olarak gerçekleşmiştir.

Tablo 9. Fare kolonilerinde mix enfeksiyon oranları.

Tesis Sayısı		% oran
Monoenfekte	-	-
Polienfekte	İki tür	90
	İkiden fazla	10
Toplam	10	100

4.2.1. Fare Tesis Dışkı Örneklem Havuzu

Bireysel örnekler dışında tesiste bulunan tüm kafeslerden alınan dışkı örneklerinin birleştirilmesi ile oluşturulan tesis dışkı örneklem havuzundan elde edilen sonuçlar bireysel olarak alınmak suretiyle oluşturulan örnek setinden alınan sonuçlarla büyük ölçüde uyumlu olmuştur. Zira *H. bilis* ve *H. muridarum* türlerinin saptanmadığı analiz sonuçlarında tek fark *H. hepaticus* türündeki oranda tespit edilmiştir. Bireysel örnekleme %27,27 olan *H. hepaticus* oranı 4 numaralı tesiste söz konusu türün saptanmasıyla %36,36 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Fare tesis dışkı örneklem havuzunda *Helicobacter* spp. ve türlere göre dağılımı.

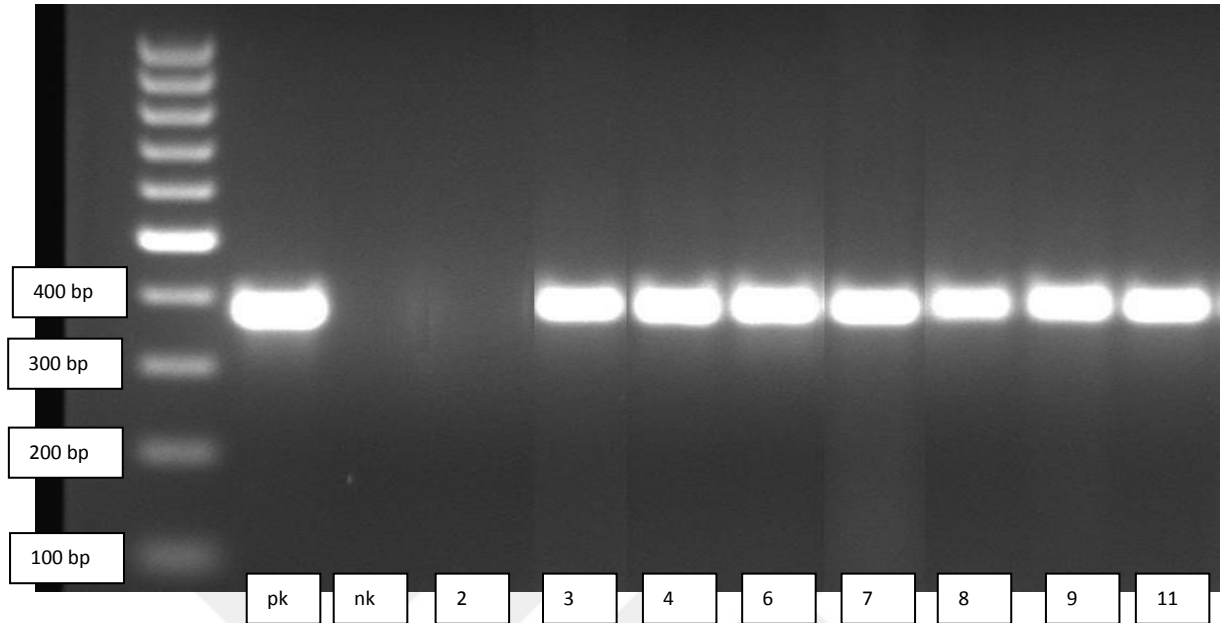
Tesis No:	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H.</i> <i>rodentium</i>	<i>H.</i> <i>typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H.</i> <i>hepaticus</i>	<i>H.</i> <i>muridarum</i>
1	p	p	n	n	p	n
2	-	-	-	-	-	-
3	p	p	p	n	n	n
4	p	p	p	n	p	n
5	p	p	p	n	n	n
6	p	p	n	n	p	n
7	p	p	p	n	n	n
8	p	p	p	n	n	n
9	p	p	p	n	n	n
10	p	p	p	n	p	n
11	p	p	p	n	n	n
% Pozitif	90,91	90,91	72,73	0,00	36,36	0,00

p: pozitif, n: negatif

4.3. Rat Kolonilerinde *Helicobacter* spp.

Çalışmanın yürütüldüğü 11 adet deney hayvanı tesisinin 3 tanesinde örnek toplama zaman aralığında geçici ya da kalıcı olarak Rat üretimi ve kullanımının olmaması nedeniyle sonuçlar 8 adet tesis üzerinde değerlendirilmiştir. Söz konusu tesislerin herbirinden 15-22 haftalık yaşlar arasından rastgele seçilen ayrı kafeslerden 10'ar adet ratdan toplanan kolon ve fekal örneklerinden elde edilen sonuçlar Tablo 11'de özetlenmiştir. Elde edilen numuneler

üzerinde yapılan PCR sonucunda farelerde bir tesis hariç tamamında *Helicobacter* spp. tespit edilmiştir (Şekil 2).



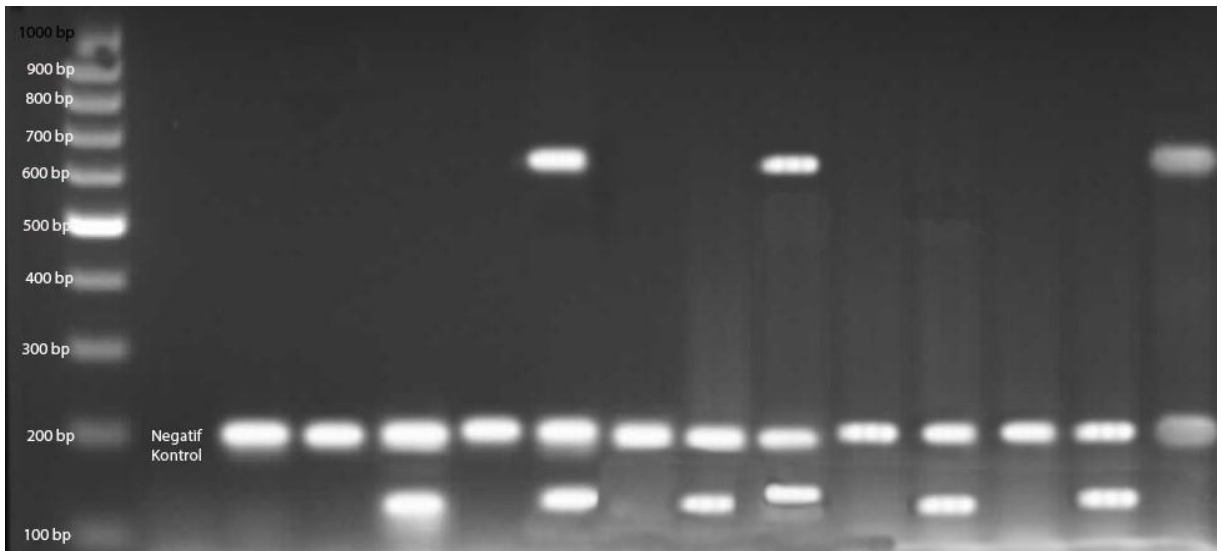
Şekil 2. Rat Kolonileri 16S rRNA PCR Bant Görünümleri. (pk:Pozitif kontrol; nk: Negatif kontrol)

Çalışmanın yürütüldüğü 8 adet tesisin 1 tanesinde *Helicobacter* spp. saptanmamış, *Helicobacter* spp. saptanan tesislerin tamamında *H. rodentium* bulunduğu belirlenmiştir. Sadece *H. rodentium* ile monoenfekte olan tesis sayısı 6 adet olarak belirlenmiştir. Bir tesisin ise *H. rodentium*'a ek olarak *H. typhlonius* ile mix enfekte olduğu tespit edilmiştir. Rat kolonilerinde ikiden fazla tür ile enfekte olan yetiştirme tesisi bulunmamaktadır. Bu sonuca göre prevalans %87,5 olarak gerçekleşmiştir. Elde edilen *Helicobacter* spp. pozitif örneklerin DNA ları kullanılarak yapılan multiplex PCR sonuçlarına (Şekil 3) göre en yaygın tür %87,5 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis*, *H. hepaticus* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* %12,5 prevalans oranıyla ikinci yaygın türdür. Cins ve tür düzeyinde örneklem yerleri göz önüne alındığında arasında oransal bir fark ortaya çıkmamıştır.

Tablo 11. Rat kolonilerinde *Helicobacter* spp.ve türlere göre dağılımı.

Tesis No:	Örnek (n=10)	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H.</i> <i>rodentium</i>	<i>H.</i> <i>typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H.</i> <i>hepaticus</i>	<i>H.</i> <i>muridarum</i>
1	Tesiste rat üretimi ve kullanımı bulunmamaktadır.						
2	Fekal	n	-	-	-	-	-
	Kolon	n	-	-	-	-	-
3	Fekal	p	p	n	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
4	Fekal	p	p	p	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	n	n
5	Tesiste rat üretimi ve kullanımı bulunmamaktadır.						
6	Fekal	p	p	n	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
7	Fekal	p	p	n	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
8	Fekal	p	p	n	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
9	Fekal	p	p	n	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
10	Tesiste rat üretimi ve kullanımı bulunmamaktadır.						
11	Fekal	p	p	n	n	n	n
	Kolon	p	p	n	n	n	n
% Pozitif	Fekal	87,5	87,5	12,5	0,00	0,00	0,00
	Kolon	87,5	87,5	12,5	0,00	0,00	0,00
%Pozitif	Tesis	87,5	87,5	12,5	0,00	0,00	0,00

p: pozitif, n: negatif

**Şekil 3.** Multiplex PCR Bant Görüntüleri.

Tablo 12. Rat tesis dışkı örneklem havuzunda *Helicobacter* spp.ve türlere göre dağılımı.

Tesis No:	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H.</i> <i>rodentium</i>	<i>H.</i> <i>typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H.</i> <i>hepaticus</i>	<i>H.</i> <i>muridarum</i>
1	Tesiste rat üretimi ve kullanımı bulunmamaktadır.					
2	n	-	-	-	-	-
3	p	p	n	n	n	n
4	p	p	p	n	p	n
5	Tesiste rat üretimi ve kullanımı bulunmamaktadır.					
6	p	p	n	n	n	n
7	p	p	n	n	n	n
8	p	p	n	n	n	n
9	p	p	n	n	n	n
10	Tesiste rat üretimi ve kullanımı bulunmamaktadır.					
11	p	p	n	n	n	n
% Pozitif	87,5	87,5	12,5	0	12,5	0

p: pozitif, n: negatif

4.3.1. Rat Tesis Dışkı Örneklem Havuzu

Bireysel örnekler dışında tesiste bulunan tüm kafeslerden alınan dışkı örneklerinin birleştirilmesi ile oluşturulan tesis dışkı örneklem havuzundan elde edilen sonuçlar Tablo 12’de özetlenmiştir. Bu sonuçlar bireysel olarak alınmak suretiyle oluşturulan örnek setinden alınan sonuçlarla büyük ölçüde uyumlu olmuştur. Zira *H. bilis* ve *H. muridarum* türlerinin saptanmadığı analiz sonuçlarında tek fark *H. hepaticus* türündeki oranda tespit edilmiştir. Bireysel örnekleme tespit edilmeyen *H. hepaticus* oranı 4 numaralı tesiste söz konusu türün saptanmasıyla %12,5 olarak gerçekleşmiştir.

4.4. Gerbil Kolonisinde *Helicobacter* spp.

Çalışmanın yürütüldüğü 11 adet deney hayvanı tesisinin sadece 1 tanesinde gerbil türü laboratuvar hayvanı olması nedeniyle sonuçlar 1 adet tesis üzerinde değerlendirilmiştir. Söz konusu tesisten alınan 15-22 haftalık yaşlar arasından rastgele seçilen ayrı kafeslerden 10 adet gerbilden toplanan kolon ve fekal örneklerinden elde edilen sonuçlar Tablo 13’de görüldüğü

gibi gerçekleşmiştir. Elde edilen numuneler üzerinde yapılan PCR sonucunda gerbil bulundurantesisten alınan örnekte *Helicobacter* spp. tespit edilmiştir. Elde edilen *Helicobacter* spp. pozitif örneğin DNA ları kullanılarak tür bazında ayırım için Multiplex PCR sonucuna kolon örneklerindesadce *H. rodentium* ve *H. typhlonius* tespit edilmiştir.

Tablo 13. Gerbil kolonisinde *Helicobacter* spp.ve türlere göre dağılımı.

Tesis No:	Örnek (n=10)	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. rodentium</i>	<i>H. typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H. hepaticus</i>	<i>H. muridarum</i>
9	Fekal	p	n	n	n	n	n
	Kolon	p	p	p	n	n	n

p: pozitif, n: negatif

4.4.1. Gerbil Tesis Dışkı Örneklem Havuzu

Bireysel örnekler dışında tesiste bulunan tüm kafeslerden alınan dışkı örneklerinin birleştirilmesi ile oluşturulan tesis dışkı örneklem havuzundan elde edilen sonuçlar Tablo 14’de özetlenmiştir. Bu sonuçlar bireysel olarak alınmak suretiyle oluşturulan örnek setinden alınan sonuçlarla birebir uyumlu olmuştur.

Tablo 14. Gerbil tesis dışkı örneklem havuzunda *Helicobacter* spp.ve türlere göre dağılımı.

Tesis No:	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. rodentium</i>	<i>H. typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H. hepaticus</i>	<i>H. muridarum</i>
9	p	p	p	n	n	n

p: pozitif, n: negatif

4.5. Dışkı ve Kolon Örnek Sonuçları Karşılaştırmaları

Çalışmada elde edilen dışkı ve kolon örneklerinde elde edilen sonuçlar hayvan türü ayırımı yapılmaksızın birlikte değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 15’te görüldüğü gibi gerçekleşmiştir.

Buna göre *Helicobacter* spp. çalışmanın yürütüldüğü tüm hayvan türleri olan 10 fare, 7 rat ve 1 gerbil olmak üzere toplam 18 adet dışkı ve kolon örneğinde pozitif sonuç vermiş, 1 adet dışkı ve kolon örneğinde ise (negatif olan rat ve farenin barındırıldığı tesis) negatif sonuç

vermiştir.

Çalışmada değerlendirilmesi yapılan ve spp. düzeyinde pozitif sonuç (18) veren tesislerde her bir *Helicobacter* türünün dışkı ve kolon sonuçları hayvan türü ayrımı yapılmaksızın belirlenmiş ve istatistiki değerlendirmeler bu sayılar üzerinden yapılmıştır. Bu sayıma göre;

➤ Dışkı örneklerinde;

- *H. rodentium*, sadece 9 numaralı tesiste bulunan gerbil kolonisinde negatif sonuç verdiği için negatif örnek sayısı 1, pozitif örnek sayısı 17,
- *H. typhlonius*, fare kolonilerinde 1 ve 6 numaralı tesislerde, rat kolonilerinde 3, 6, 7, 8, 9, 11 numaralı tesislerde ve 9 numaralı tesis olan gerbil kolonisinde negatif sonuç verdiği için negatif örnek sayısı 9, pozitif örnek sayısı 9,
- *H. hepaticus*, fare kolonilerinde 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 numaralı tesislerde ve toplam 7 adet rat ile bir adet gerbil kolonisinde negatif sonuç verdiği için negatif örnek sayısı 17, pozitif örnek sayısı 1, olarak tespit edilmiştir.

➤ Kolon örneklerinde;

- *H. rodentium*, sadece 9 numaralı tesiste bulunan fare kolonisinde negatif sonuç verdiği için negatif örnek sayısı 1, pozitif örnek sayısı 17,
- *H. typhlonius*, fare kolonilerinde 1, 6 ve 11 numaralı tesislerde ve rat kolonilerinin tamamında negatif sonuç verdiği için negatif örnek sayısı 10, pozitif örnek sayısı 8,
- *H. hepaticus*, fare kolonilerinde sadece 6 ve 10 numaralı tesislerde pozitif çıkmasından dolayı negatif örnek sayısı 16, pozitif örnek sayısı 2, olarak tespit edilmiştir.

Çalışmaya konu olan hayvan türlerinin tamamından elde edilen sonuçlar örneklem yeri (Dışkı - Kolon) bazında karşılaştırıldığında; *H. hepaticus*'un %11,11'e karşılık %5,56 ile kolon örneklerinde daha yüksek bir oranla bulunduğu görülürken *H. typhlonius*'un ise %50'ye karşılık %44,44 oranı dışkı örneğindeki oranı yüksek olmuştur. Spp. düzeyinde ve diğer türler arasında ise oransal bir fark oluşmamıştır.

Ancak elde edilen bu sonuçlar karşılaştırıldığında dışkı ve kolon sonuçları arasında farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 15. Dışkı ve Kolon Örnek Sonuçları Karşılaştırmaları.

	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H.</i> <i>rodentium</i>	<i>H.</i> <i>typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H.</i> <i>hepaticus</i>	<i>H.</i> <i>muridarum</i>	
Dışkı	Pozitif	18	17	9	0	1	0
	Negatif	1	1	9	0	17	0
	Toplam	19	18	18	0	18	0
	Oran %	94,70	94,44	50,00	0,00	5,56	0,00
Kolon	Pozitif	18	17	8	0	2	0
	Negatif	1	1	10	0	16	0
	Toplam	19	18	18	0	18	0
	Oran %	94,70	94,44	44,44	0,00	11,11	0,00
P değeri	-	-	0,49	-	0,54	-	

5. TARTIŞMA

5.1. Klinik Belirtiler ve Bulaşma Yolları

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, çeşitli evcil ve vahşi hayvanların gastrointestinal mukozal yüzeyi boyunca her yerde bulunmakta olduğu ve klinik hastalığa yol açmasına ilişkin bildirilen literatür verisi ile uygunluk sergilemektedir. Zira *Helicobacter* türlerinin bağışıklığı yeterli, doğal bir konağın enfeksiyonunun klinik hastalığa yol açması ile ilgili çok az örneğin varlığı vurgulanmaktadır (Solnick ve Schauer 2001).

Söz konusu bakterinin kabaca mideyi kolonize eden gastrik *Helicobacter* türleri ve bağırsakta ve hepatobiliyer sistemde bulunabilen enterohepatik *Helicobacter* türleri olmak üzere iki gruba ayrılabilceği belirtilmektedir (Neubert ve diğerleri, 2022). Laboratuvar kemirgenlerinde görülen bu cinse ait türlerin çok büyük kısmı enterohepatik özellik sergilemektedir.

EHS'nin önemli bir özelliği, normal koşullar altında, bağışıklığı yeterli hayvanlarda, birçoğunun mide mukozasını kolonize etme ve/veya hepatobiliyer sisteme invazyon yeteneği sergilemesi ve bu durumlarda normal konakçılarında ciddi hastalıklarla ilişkilendirilebilmesidir. Kaydedilmesi gereken bir özellik de, bunun genellikle yaşlı hayvanlarda meydana gelmesidir ki; bu durumun söz konusu bakterilerin doğal yaşam alanlarından daha farklı nişlere invazyonuna izin veren bağışıklık yeterliliklerinin de bir rolü olabileceğini gösterdiği belirtilmektedir. Örneğin *H. muridarum* ve *H. aurati*, gastrit, atrofi, intestinal metaplazi ve adenokarsinoma ile ilişkili mide mukozasında bulunmuştur (Lee ve diğerleri, 1993; Nambiar ve diğerleri, 2005; Patterson ve diğerleri, 2010). Ayrıca *H. bilis*'in karaciğerde ve adından da anlaşılacağı gibi yaşlı farelerin safra kesesinde kolonize olduğu gösterilmiştir (Fox ve diğerleri, 1995). Sunulan çalışmada kullanılan materyalin 15-22 haftalık genç hayvanlardan oluşması klinik bir tabloyla karşılaşılmasının nedeni olabilir. Ancak deney materyalinin elde edildiği tesislerde yaşlı hayvan bulunmasına karşın tesis sorumlusu olan Veteriner Hekimlerden herhangi bir klinik tablo bildirimini de alınmamıştır.

Sunulan çalışmanın yürütüldüğü 11 adet fare kolonisinin 8 tanesinde ve 8 rat kolonisinin birinde *H. rodentium*'a ek olarak başta immün yetmezliği olan farelerde olmak üzere sekum ve kolonda mukozal hiperplazi ve ilişkili inflamasyon ile karakterize hastalığa

neden olduğu belirtilen (Franklin ve diğerleri, 2001) *H. typhlonius* ile mix enfekte olduğu tespit edilmiştir. Bu tür Franklin ve diğerleri (2001) tarafından bildirildiği gibi *H. rodentium*'un ardından en yaygın tür olmuştur. İmmünkompetan farelerde doğal olarak oluşan gastrointestinal lezyonlarla ilgili daha fazla araştırma yapılması önerilen *H. typhlonius*'un mix enfeksiyonlarda dahi klinik bir tablo oluşturmadığı gözlenmiştir.

Çalışmanın yürütüldüğü 11 adet tesisin 1 tanesinde *Helicobacter* spp. saptanmamış, hem fare hem de rat kolonilerinde *Helicobacter* spp. saptanan tesislerin tamamında *H. rodentium* bulunduğu belirlenmiştir. Sadece *H. rodentium* ile monoenfekte olan tesis sayısı rat kolonilerinde 7 adet olarak belirlenmiştir. *H. rodentium*'un yetişkin vahşi tip farelerde patojenik olmadığı, ancak *H. hepaticus* ile enfekte olmuş farelerin sekumunda IL- 10 üretimini arttırdığı belirtilmektedir (Franklin ve diğerleri, 2001). *H. rodentium* geleneksel fare kolonilerinin çoğunda kabul edilebilir bir kirletici olabileceği ile birlikte, *H. rodentium* ile mix enfeksiyonun, bu cinsin *H. hepaticus* veya *H. bilis* gibi daha patojenik üyelerinin neden olduğu hastalığı güçlendirebileceği vurgulanmaktadır (Myles ve diğerleri, 2004). Rat kolonilerinde herhangi bir klinik bulgunun olmaması bu çalışmayla paralellik göstermiştir. Bununla birlikte *H. rodentium* ile birlikte *H. hepaticus* ile enfekte olmuş farelerin sekumunda IL-10 üretimini arttığı (Franklin ve diğerleri, 2001) ve söz konusu iki tür ile mix- enfekte SCID farelerinde sıvı sekum içeriği ve düşük terminal vücut ağırlığının (Myles ve diğerleri, 2004) arttığı çalışmalarla uyumsuzluk sergilemiştir. Zira fare kolonileri söz konusu olduğunda *H. rodentium*'a ek olarak *H. hepaticus* ile enfekte olan 3 adet tesiste klinik bulguya rastlanmadığı gibi tesis sorumlusu olan Veteriner Hekimlerden de kliniğe dair herhangi bir bildirim alınmamıştır. Rat kolonilerinde ise *H. hepaticus* tespit edilmemiştir.

Fox ve diğerleri (1994) tarafından tüm EHS'ler arasında en şiddetli klinik tabloya *H. hepaticus*'un neden olduğu gösterilmesine karşın sunulan çalışmada incelenen fare kolonilerindeki prevalansı *H. hepaticus*'un %27.27 olarak bulunmasına rağmen herhangi bir klinik tabloyla karşılaşılmamıştır.

İncelemesi yapılan etkenlerin tek başına ya da mix olarak bulunmaları ile ilgili klinik tablo söz konusu olduğunda çalışmada elde edilen verilerle literatür verileri arasında bir takım uyumsuzluklar ortaya çıkmıştır. Bu uyumsuzluğun incelemesi yapılan tesislerde detaylı bir klinik gözlem yapılmaması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Zira incelenen etken yönünden pozitif sonuç veren tesislerin hiçbirinde bir kalite güvence sistemine entegre edilmiş laboratuvar hayvanı 'Sağlık İzleme' programının olmadığı tespit edilmiştir. Oysa, deney hayvanı kullanımı ile ilgili standartlar oluşturma amacıyla kurulan uluslararası

organizasyonların her kurumun herhangi bir kalite güvence sistemine entegre edilmiş bir laboratuvar hayvanı ‘Sağlık İzleme’ programı tavsiye ettiği belirtilmektedir (Mähler ve diğerleri, 2014; Bracken ve diğerleri, 2017).

Laboratuvar hayvanları üretimi yapılan tesislerde hayvanların klinik gözlemlerinin detaylı bir şekilde yapılmaması, söz konusu hayvanların görece hızlı ve kolay bir üreme dinamiği sergilemesi ile ilişkilendirilebilir. Şahsi gözlemlere dayanılarak söylenebilir ki; herhangi bir nedenle üreme yeteneğini yitirmiş kolonilerin ikamesi görece hızlı ve kolay bir şekilde yapılabildiğinden bu tesislerde klinik gözlem ve buna bağlı tedavi ya da eradikasyon programı yürütülmemektedir.

Helicobacter türlerinin bulaşmasına ilişkin literatür verileri birtakım uyumsuzluklar içermektedir. Örneğin, kontamine altlık aracılığıyla koloniden sentinel farelere hızlı bir şekilde bulaşan *H. hepaticus*'un aksine *H. bilis*'in sentinel farelere gecikmeli ve tutarsız bir şekilde bulaştığını bildiren çalışmaların olduğu bildirilmektedir (Chichlowski ve Hale, 2009). Sunulan çalışmada fare ve rat kolonilerinden elde edilen ‘Tesis Dışı Örneklem Havuzu’ örneklerinde bireysel örneklerle karşılaştırıldığında *H. hepaticus* oranlarında ılımlı bir yükselişin olduğu görülmektedir. Fare kolonilerinde bireysel örnekte %27.27 olan *H. hepaticus* oranı 4 numaralı tesiste söz konusu türün saptanmasıyla %36.36 olarak gerçekleşmiştir. Rat kolonilerinde ise bireysel örnekte tespit edilmeyen *H. hepaticus* oranı 4 numaralı tesiste söz konusu türün saptanmasıyla %12.5 olarak gerçekleşmiştir. Bu veriyle 4 numaralı kolonide *H. hepaticus* bulunduğu halde rastgele seçilen fare ve ratların hiçbirine bulaşmadığı ile ilgili bir yargı oluşturabilir. Ancak bunun aksine Chichlowski ve Hale (2009) kontamine altlık aracılığıyla koloniden sentinel farelere hızlı bir şekilde bulaşan türün *H. hepaticus* olduğu, bu bulaş dinamiğinin aksi yönünde olanın ise *H. bilis* olduğunu ve *H. bilis*'in sentinel farelere gecikmeli ve tutarsız bir şekilde bulaştığını bildirmektedir. Chichlowski ve Hale (2009) tarafından bildirilen bulaşma yoluna benzer olarak; deneysel olarak *H. hepaticus*, *H. rodentium* ve *H. bilis* ile enfekte edilen bir fare kolonisinde sentinel olarak kullanılan farelerde bu türler yönünden %100'lük bir prevalans tespit edilmiştir (Whary ve ark. 2000). Sunulan çalışmada örnekler arasında elde edilen bu veri farkı söz konusu cinse ait bulaşma dinamikleri ile daha fazla çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir. Zira bu konuyla ilgili verilerin sınırlı olduğu ve varolan verilerinde birtakım çelişkiler içerdiği de belirtilmektedir (Chichlowski ve Hale, 2009).

5.2. Prevalans

İlk kez Marshall ve Warren (1984) tarafından izole edilen spiral şekilli mikroaerofilik bakteriler, mide hastalığı ile ilişkileri nedeniyle önemli araştırmaların odak noktası olmaya başlamıştır. Yaygın olarak kullanılan tüm laboratuvar kemirgen türlerinde doğal olarak edinilmiş *Helicobacter* enfeksiyonlarının varlığı ve enfekte farelerden yapılan örneklemelerden sık izole edilen türlerin büyük kısmının *Helicobacter hepaticus*'un oluşturduğu bildirilmektedir (Taylor ve diğerleri 2007). Daha önce alıntılanan veriler kullanılarak yapılan bir yorumda *Helicobacter* spp.'nin test edilen fare fekal örneklerinde %32'lik bir prevalanstan söz edilmekte ve bu oranın da *Helicobacter* spp.'yi biyomedikal araştırma için kullanılan farelerde en yaygın patojen haline getirdiği belirtilmektedir (Livingston ve Riley, 2003).

Çalışmamızda fare kolonilerinde elde edilen %90,91 oranındaki *Helicobacter* spp. prevalansı bu konuda yapılan çalışmalarda bulunan en yüksek prevalans oranı olmuştur. Zira bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen en yüksek prevalans Taylor ve ark. (2007) tarafından yapılan ve materyalini Amerika Birleşik Devletleri Kanada, Avrupa, Avustralya ve Asya'daki 16 araştırma enstitüsünden alınan örneklerle ek olarak iki ABD ticari işletmeden alınan 10 hayvanın oluşturduğu bir çalışmada prevalans %88 düzeyinde gerçekleşmiştir. Benzer bir oran Bohr ve diğerleri (2006) tarafından yürütülmüş bir çalışmada da elde edilmiştir. Söz konusu çalışmanın yapıldığı tesis SPF nitelikte olmasına rağmen *Helicobacter* spp. taramasında %87,5 oranında prevalans tespit edilmiştir. SPF nitelikte bir başka tesiste yapılan çalışmada Jacoby ve Lindsay (1998) tarafından yürütülmüş ve %10'luk bir *Helicobacter* prevalansı ortaya konulmuştur.

Helicobacter spp. prevalansına yönelik yapılan ilk çalışma olan Shames ve diğerleri (1995) tarafından yapılmış ve çalışmada %50 prevalans oranı raporlanmıştır. *Helicobacter* testi için Missouri Üniversitesi Araştırma Hayvan Teşhis ve Araştırma Laboratuvarı'na gönderilen fekal örnekleri PCR ile incelenmesi sonucu Kasım 1999- 2000 yıllarında test edilen 1.271 numunede *Helicobacter* spp. için pozitiflik oranı %10,54 olarak raporlanmıştır (Franklin ve diğerleri, 2001). Pritchett- Corning ve diğerleri. (2009) tarafından yapılan çalışmada ise farelerde en yaygın olan bakteiyel ajan olarak ortalama %16,08'lik bir oran ile *Helicobacter* spp. raporlanmıştır. Dört farklı tesisde barındırılan 9 fare suşunun fekal örneklerinde saptanan *Helicobacter* DNA'sı %85,7 oranında gerçekleşmiştir (Nilsson ve diğerleri, 2004). Cins düzeyinde yapılan prevalans çalışmalarında, içerisinde SPF nitelikte

deney hayvanı tesislerinin de bulunduğu işletmelerde *Helicobacter* spp.'nin %10 ile 88 arasında bir prevalans oranı sergilediği görülmektedir.

Söz konusu çalışmalar farklı coğrafyalarda gerçekleştirilmiş olmasına karşın, prevalans oranı ile ilgili olarak coğrafik bölge özelinde bir değerlendirme yapmak mümkün görünmemektedir. Zira aynı coğrafik bölgede yapılan iki çalışmada Franklin ve diğerleri, (2001) %10,54'lük bir prevalans raporlarken Taylor ve diğerleri (2007) %88'lik bir oran raporlamaktadır. Coğrafik dağılımın belirleyici nitelik göstermemesine benzer bir durum çalışmaların yapıldığı tarihler için de geçerli olmuştur. Tarihsel sıralama ile elde edilen prevalans oranları arasında pozitif ya da negatif özellik gösteren lineer bir ilişki söz konusu olmamıştır.

Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda oldukça geniş bir varyasyon sergileyen *Helicobacter* spp. prevalans oranları görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen %90,91'lik oran ise bu çalışmalarla kıyaslandığında bulunan en yüksek oran olmuştur. Sözünü ettiğimiz coğrafya ve tarihsel sıralamadan bağımsız olarak yelpazenin genişliğinde en büyük payın bakım besleme kriterlerinden kaynaklandığı söylenebilir. Ülkemizde rodent *Helicobacter* spp. taramasına yönelik daha önce bir çalışmanın yapılmamış olması, söz konusu etkenin yaygınlığına dair bir fikir oluşmamasında önemli bir rol oynamış olabilir. Varlığı ile ilgili bir verinin olmaması, *Helicobacter* spp.'ye yönelik eradikasyona dair herhangi aksiyon alınmasının önüne geçerek prevalans oranının yüksek çıkmasında pay sahibi olduğu söylenebilir.

Bohr ve diğerleri (2006) tarafından yapılan bir çalışmaya göre bir SPF tesiste barındırılan 37 inbreed 3 outbred olmak üzere toplam 40 fare suşundan 27'sinin tek bir *Helicobacter* türü taşıdığını, sekiz fare suşunun ise en az iki farklı *Helicobacter* türü tarafından enfekte olduğunu ortaya çıkardığı belirtilmektedir. Yapılan çalışmada ise 10 adet tesisten alınan örneklerin tamamında birden fazla tür tespit edilmiştir. Bu veri oransal olarak Bohr ve diğerleri (2006) tarafından yapılmış çalışmanın sonuçlarından daha yüksek bir oranı göstermektedir. Elde edilen oranlar arasındaki fark mukayese edilen çalışmanın SPF olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ikiden fazla tür ile enfekte sadece bir tesis olup oransal olarak %10'a tekabül etmektedir. Mix enfeksiyonlarla ilgili olarak yapılan bir başka çalışma da Taylor ve diğerleri (2007) tarafından yapılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avrupa, Avustralya ve Asya'daki araştırma enstitüsünden alınan örneklerin materyalini oluşturduğu çalışmada, enstitülerin %6'sının en az üç *Helicobacter* spp. ile, %29'unun iki *Helicobacter*

spp. ile, %47'sinin ise tek bir *Helicobacter* türü ile kolonize edildiğini göstermiştir. Tez çalışmasında ikiden fazla tür ile enfeksiyon oranı olan %10 bu çalışmada bulunan değerle benzerlik göstermiş ancak tek ve iki tür ile enfeksiyon oranları Taylor ve diğerleri (2007)'nin bildirdiği oranların çok üzerinde gerçekleşmiştir.

Literatürde *Helicobacter* cinsine ait türler bazında yapılan prevalans çalışmalarında da cins düzeyinde bulunan sonuçlara benzer şekilde geniş bir yelpazeyle karşılaşılmaktadır. Tez çalışmamızda elde edilen *Helicobacter* spp. pozitif örneklerin DNA ları kullanılarak tür bazında ayırım için multiplex PCR sonuçlarına göre en yaygın tür %90,91 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* %72,73 prevalans oranıyla ikinci yaygın tür olurken onu %27,27'lik prevalansla *H. hepaticus*'un takip ettiği tespit edilmiştir.

Tür bazında elde edilen oranlar daha önce yapılan benzer çalışmalarla kıyaslandığında *H.rodentium*'un % 90,91 oranındaki prevalansı literatürdeki en yüksek prevalans oranı olmuştur. Bu türe ait oranlar %23,4 (Goto ve diğerleri (2000), %6 (Taylor ve diğerleri, 2007), %8 (Whary ve Fox, 2006), %15,11 (Franklin ve diğerleri, 2001), %10 (Myles ve diğerleri, 2003) şeklinde raporlanmıştır.

Tür düzeyinde yapılan bir başka çalışmada Goto ve diğerleri (2000) ise koloni bazında olmak üzere *H. Hepaticus* prevalansı %25,5, *H.rodentium* prevalansı ise %23,4 olarak gerçekleşirken, çalışmamızda varlığına dair bir veri elde edilemeyen *H. bilis* prevalansı %2,1 olarak gerçekleşmiştir. Bu oranlar tez çalışmasında elde edilen oranlarla karşılaştırıldığında; *H. hepaticus* prevalansının benzer oranda gerçekleştiği, *H. rodentium*'da ise elde edilen %90,91'lik oran ile oldukça yüksek olarak gerçekleşmiştir

Helicobacter cinsinin biyolojik çalışmaların yönünü değiştirme potansiyelinin fark edilmesi ile birlikte yapılan ilk çalışma Shames ve diğerleri (1995) tarafından sadece *H. hepaticus* taramasına yönelik yapılmıştır. Bu çalışmada dört tesisden toplam 160 fare olmak üzere yirmi sekiz farklı suş veya stok kullanılmış ve dört tesisin ikisinde *H. hepaticus*'un tespit edildiği bildirilmiştir. Bu oran sunulan çalışmada farelerde elde edilen %27,27'lik prevalanstan daha yüksek bir oran olmuştur. Yapılan araştırmada elde edilen *H. hepaticus* prevalansından daha yüksek prevalans oranı bildiren bir başka çalışma Taylor ve diğerleri (2007) tarafından yürütülmüştür. Söz konusu çalışmada araştırılan 34 kurumdan alınan fareler arasında, tek başına veya diğer *Helicobacter* türleri ile kombinasyon halinde %59'luk bir oran ile *H. hepaticus* en çok tespit edilen tür olmuştur. Monoenfekte fare suşlarının analizi sonucunda *H. hepaticus* %7,5 oran ile tez çalışmamızda elde edilen veriden daha düşük olarak

raporlanan tek araştırma Bohr ve diğerleri (2006) tarafından yürütülmüştür. İsveç Ulusal Veteriner Enstitüsü'nün 2002-2003 verilerine göre ise *H. hepaticus* prevalansı %42 olarak gerçekleşmiştir (Johansson ve diğerleri, 2006).

Araştırma farelerinin fekal örneklerinde yaygın olmasının yanı sıra üç fare türünün eşey organlarında da saptandığı bildirilen (Franklin ve diğerleri, 2001; Scavizzi ve Raspa; 2006) *H. typhlonius* tez çalışmasında ki prevalansı %72,73 olarak belirlenmiştir. Bu oranla söz konusu tür *H. rodentium*'un ardından ikinci en yaygın tür olmuştur. Taylor ve diğerleri (2007) tarafından yürütülen çalışmada da ikinci en yaygın tür olarak belirlenen *H. typhlonius*'un oranı ise %26 olarak belirtilmiştir. Bu oran literatür verileri arasında en yüksek oranı temsil etmekle birlikte çalışmamızda belirlenen orandan bir hayli düşük kalmıştır. 1999-2000 yılları arasında yürütülen bir çalışmada ise *H. typhlonius* için %4,88'lik bir oran belirtilirken (Franklin ve diğerleri, 2001), aynı Laboratuvarında 2001 ve 2002 yıllarında test edilen fekal örneklerin %17'sinin *H. typhlonius* için pozitif olduğu raporlanmaktadır (Myles ve diğerleri 2003). *Helicobacter* spp. için %8'lik bir oranın belirlendiği bir çalışmada ise toplam örneklerde elde edilen *H. typhlonicus* oranı %4 olarak raporlanmıştır (Bohr ve diğerleri, 2006). Goto ve diğerleri (2000) tarafından yapılan bir çalışmada 47 koloniden 9'unun (%19.1) cinse özgü primere pozitif sonuç vermesine karşın araştırması yapılan hiçbir türe dahil olmadığı belirtilmekle birlikte söz konusu cinse özgü pozitif örneklerin 2 tanesinin *H. typlonius* ile %97.2 oranında homoloji gösterdiği belirtilmiştir. Bu da yaklaşık %4'lük bir orana tekabül etmektedir.

Ratlarda yapılan survey çalışmaları farelerde yapılanlara kıyaslandığında oldukça kısıtlı olduğu görülmektedir. *Helicobacter* spp.'nin ratlarda ki prevalansı söz konusu olduğunda farelerde olduğu gibi geniş yelpazede ve görece yüksek prevalansa karşın daha düşük oranlar göze çarpmaktadır. Söz konusu tür olan ratlarda yapılan bir çalışmada PCR kullanılarak taranan sekum örneklerinde *Helicobacter* spp.'nin %19'luk prevalanstan söz edilmektedir (Whary ve Fox, 2006). Bu oran tez çalışmasında elde edilen oran olan %87,5'tan oldukça düşüktür. Tür düzeyinde elde edilen oranlar ise %87,5 prevalansla *H. rodentium*, %12,5 prevalansla *H. typhlonius* şeklinde gerçekleşmiştir. Bu oranlardan Whary ve Fox (2006) tarafından bildirilen %10'luk oranla benzerlik taşırken, elde edilen %87,5 oran ile *H. rodentium* oranı aynı çalışmada belirlenen % 8'lik orandan oldukça yüksek bulunmuştur.

Taranan tesis bazında %29,4 oranında *H. rodentium* pozitif örneğin yer aldığı Goto ve diğerleri (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada koloni prevalansı %30 olarak gerçekleşmiştir. Bu oran çalışmamızda belirlenen orandan daha düşük bir oranı ifade

etmektedir. Ratlara benzer durumun gerbillere için de geçerli olduğu çalışmada taranan tesis bazında %78 oranında pozitif çıkan *H. hepaticus*'un koloni prevalansı %75 olarak gerçekleşmiştir. Gerbillerde bunun dışında cinse ya da türe özgü bir bağlanma gerçekleşmeyen adı geçen çalışma verileri ile çalışmamızda elde edilen veriler arasında uyumsuzluk söz konusu olmuştur. Zira tez çalışmamızda gerbil kolonisinde saptanabilen türler arasında *H. rodentium* ve *H. typhlonius* yer alırken *H. hepaticus* saptanmamıştır.

5.3. Dışkı ve Kolon Örnek Sonuçları Karşılaştırmaları

Örnekleme için dışkı kullanımının tarama testlerini kolaylaştırıcı bir faktör olmasının yanı sıra ötenaziye önlediğinden dolayı tarama testlerinde ve klinik araştırmalarda 3R (Aritma, Azaltma, Değiştirme) sağlanması açısından güvenilir ve kolay bir yöntem olduğu belirtilmektedir (Matos-Rodrigues ve diğerleri, 2020). Tez çalışmasında çalışmaya konu olan hayvan türlerinin tamamından elde edilen sonuçlar örnekleme yeri bazında karşılaştırıldığında; Çalışmaya konu olan hayvan türlerinin tamamından elde edilen sonuçlar örnekleme yeri (Dışkı - Kolon) bazında karşılaştırıldığında; *H. hepaticus*'un %11,11'e karşılık %5,56 ile kolon örneklerinde daha yüksek bir oranla bulunduğu görülürken *H. typhlonius*'un ise %50'ye karşılık %44,44 oranı dışkı örneğindeki oranı yüksek olmuştur. Spp. düzeyinde ve diğer türler arasında ise oransal bir fark oluşmamıştır. Ancak elde edilen bu sonuçlar karşılaştırıldığında söz konusu iki örnekleme sonuçları arasında farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tez çalışmasında elde ettiğimiz bulgunun aksine, örnekleme yerlerinin karşılaştırmasını da içeren bir çalışmada, bağırsakların pozitif olduğu bazı durumlarda fekal örneklerin *Helicobacter* için negatif olabileceği bildirilmiştir (Cao ve diğerleri, 2020). İki numune alım yeri arasında kolon lehine sonuç bildiren bir başka çalışma da Matos-Rodrigues ve diğerleri (2020) tarafından yapılmıştır. Bu çalışma da spp. düzeyinde fekal örneklerde %59,6 olan oran, kolon örneğinde %70,1 olarak raporlanmıştır. Ancak söz konusu bu çalışmada karşılaştırma aynı hayvanlar üzerinde yapılmadığından verilen sonucun bu yönde bir değerlendirme amacıyla kullanımı belirleyici olmayacaktır.

Beckwith ve diğerleri (1997) tarafından yapılan ve kolon ile dışkı örneklerinin sonuç üzerindeki etkisinin önemsiz olarak bulunduğu sunulan çalışmadaki bulgulara benzer şekilde intestinal örneklerle fekal örnekleri arasında *Helicobacter* spp. yönünden önemli bir farkın olmadığı belirtilmektedir. Fekal filtrasyonla elde edilen filtratla yapılan ekimlerle sekum ve

kolon kazıntularından yapılan ekimler arasında tam bir uyumun raporlandığı bir başka çalışma da Shames ve diğerleri (1995) tarafından yürütülmüştür.

Helicobacter spp.'nin dağılımını ve bu dağılımın hastalıkla ilişkisini incelemek için mide, bağırsak ve hepatik doku örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada; 4 farklı tesiste barındırılan 9 fare suşunun dışkı örneklerinde %85,7 oranında *Helicobacter* DNA'sı saptanmıştır ve bu oran diğer doku ve örneklerle kıyaslandığında en yüksek oran olmuştur. Diğer dokulardaki *Helicobacter* spp. DNA dağılımı ise; gastrik dokuda %54,8, kan örneklerinde %14,3 ince bağırsakta %16,7 ve karaciğerde %21,4 olarak belirlenmiştir (Nilsson ve diğerleri, 2004). Tez çalışmasında tür düzeyinde değişkenlik olmasına karşın bu değişkenliğin istatistiki olarak önemsiz bulunması tarama için fekal örneklerin uygunluğunu ve Nilsson ve diğerleri (2004)'nın sonuçlarını teyit eder niteliktedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kemirgenlerin enterohepatik *Helicobacter* enfeksiyonlarına olan ilgi, sadece araştırma modelleri üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle değil, aynı zamanda kolesistit, hepatosellüler karsinom, bakteriyemi ve enflamatuvar bağırsak hastalıkları dahil olmak üzere insan hastalıklarının modellenmesindeki deneysel faydaları nedeniyle de artmıştır. Ayrıca *H. cinaedi* ve *H. rappini* gibi bazı *Helicobacter* türlerinin zoonotik olduğunu gösteren çalışmaların varlığı gündeme gelmiştir.

Deneysel kullanım aşamasında sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği üzerindeki etkilerinin yanı sıra *Helicobacter* enfeksiyonu, farelerde üreme dahil olmak üzere bir takım yetiştiricilik problemlerine de neden olmaktadır. Üreme dışında yetiştiricilik üzerinde etkisi olan diğer bir faktör başka etkenlerin oluşturduğu enfeksiyonlara eşlik ederek ko-enfeksiyon durumu yaratmasıdır.

Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilimi Dernekleri Federasyonu (FELASA), her kurumun bir kalite güvence sistemine entegre edilmiş bir laboratuvar hayvanı ‘Sağlık İzleme’ (Sİ) programı oluşturması gerekliliğinin bulunduğunu vurgulamaktadır Söz konusu bu federasyonun yapılmasını öngördüğü, rutin taramalarda; Laboratuvar fareleri (*Mus musculus*) için 3 aylık periyotlarda izlenmesi önerilen bulaşıcı ajanlar arasında *Helicobacter* spp.’de yer almaktadır. Söz konusu ajanın tür düzeyinde pozitif olması durumunda ise, *H. hepaticus*, *H. bilis* ve *H. typhlonius* türlerinin belirlenmesini, Sıçanlar (*Rattus norvegicus*) için ise yine 3 aylık periyotlarda *Helicobacter* spp.’nin izlenmesi ve söz konusu ajanın tür düzeyinde pozitif olması durumunda ise *H. bilis* türünün belirlenmesini, tavsiye etmektedir. Hamsterlar (*Mesocricetus auratus*) için ise *Helicobacter* spp.’nin 1 yıllık periyotlarda izlenmesi tavsiye edilmektedir.

Yapılan literatür taramasında da görüldüğü üzere *Helicobacter* türleri deneme hayvanlarında sıklıkla görülebilmekte, çeşitli enfeksiyonlara sebebiyet verebilmekte ve bunlardan dolayı da yapılacak olan denemelerin yanlış sonuçlar vermesine neden olabilmektedir. Ülkemizde yer alan deney hayvanı tesislerinde bulunan fare, rat ve gerbillerde *Helicobacter* spp. ile ilgili veriler literatürde yer almamaktadır. Bu çalışmayla ege bölgesindeki fare, rat ve gerbillerde *Helicobacter* spp. varlığı araştırılmış, aynı zamanda da rutin taramaya elverişli yöntem ve örnekleme metodu ile ilgiler veriler elde

edilmiştir.

Buna göre; Farelerde *Helicobacter* spp. prevalansı %90,91 olarak gerçekleşmiştir. Pozitif örneklerin tür bazındaki PCR sonuçlarına göre en yaygın tür %90,91 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* %72,73 prevalans oranıyla ikinci yaygın tür olurken onu %27,27'lik prevalansla *H. hepaticus*'un takip ettiği tespit edilmiştir. Ratlarda *Helicobacter* spp. prevalansı %87,5 olarak gerçekleşmiştir. Pozitif örneklerin PCR sonuçlarına göre en yaygın tür %87,5 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis*, *H. hepaticus* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* %12,5 prevalans oranıyla ikinci yaygın türdür. Gerbil bulunduran tek tesisten alınan kolon örneklerinde ise sadece *H. rodentium* ve *H. typhlonius* tespit edilmiştir. Çalışmaya konu olan bölgede, özellikle subklinik olmak üzere deney hayvanlarındaki enfeksiyonlara neden olan *Helicobacter* spp.'nin oldukça yaygın olduğu belirlenmiştir.

İncelemesi yapılan etkenlerin tek başına ya da mix olarak bulunmaları ile ilgili klinik tablo ve bulaşma kinetiğine ilişkin çalışmada elde edilen verilerle literatür verileri arasında bazı uyumsuzluklar ortaya çıkmıştır. Bu uyumsuzluğa neden olarak iki farklı spekülasyon geliştirilebilir. Bunlardan ilki çalışma alanında bulunan laboratuvar hayvanlarının oldukça gelişmiş bir immun sisteme sahip olması, ikincisi ise tesislerde sadece üretime odaklanması sonucu nispeten kolay üreyebilen bir tür olan farenin geliştirdiği klinik tablonun önemsenmemesi olabilir. Başka bir deyişle üreme kabiliyetini yitirmiş olan koloninin yerine yenisinin kolaylıkla ikamesinin, detaylı bir klinik gözlem yapma ihtiyacını ortadan kaldırdığı düşünülebilir.

1. Söz konusu ajanın oldukça yaygın bulunması,
2. Labarotuvuar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalardan gerçeğe en yakın sonuçların alınması için hayvanların tam bir sağlık halinde olması gerekliliği,
3. Deneysel kullanım aşamasında sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin sağlanabilmesi,

faktörleri göz önüne alındığında Deney Hayvanı tesislerinin bu ajan yönünden takibinin yapılması ve bu ajan yönünden ari tesisler oluşturmak üzere çalışmaların detaylandırılması önerilmektedir.

Çalışmaya konu olan hayvan türlerinin tamamından elde edilen sonuçlar örneklem yeri bazında karşılaştırıldığında *H. hepaticus*'un %11,11'e karşılık %5,56 ile kolon

örneklerinde daha yüksek bir oranla bulunduğu görülürken *H. typhlonius*'un ise %50'ye karşılık %44,44 oranı dışkı örneğindeki oranı yüksek olmuştur. Spp. düzeyinde ve diğer türler arasında ise oransal bir fark oluşmamıştır. Ancak elde edilen bu sonuçlar karşılaştırıldığında söz konusu iki örneklem sonuçları arasında farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Bu sonuçlar dikkate alındığında; survey ya da başka herhangi amaçla bu ajamın izlemesi ve kontrolünde dışkı örneklerinin kullanımının mümkün olduğu söylenebilir. Ötenazi yapılmadan gerçekleştirilen örneklemin tesisin bulaş durumunu belirlemedeki yeterliliği tatmin edici düzeyde gerçekleşmiştir. Bu yöntemin ötenaziyi önlediğinden dolayı 3R (Aritma, Azaltma, Değişirme) kurallarını sağlamanın yanı sıra tarama testlerini kolaylaştırıcı bir faktör olduğu söylenebilir.



KAYNAKLAR

- Beckwith, C. S., Franklin, C. L., Hook Jr, R. R., Besch-Williford, C. L., & Riley, L. K.(1997). Fecal PCR assay for diagnosis of Helicobacter infection in laboratory rodents. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1620-1623.
- Bergin, I. L., N. S. Taylor, and J. G. Fox. "Antibiotic-associated Clostridium difficilecolitis in mongolian gerbils (Meriones unguiculatus) treated with amoxicillin/metronidazole/bismuthwafers." Gut. Vol. 47. British Med Assoc House, Tavistock Square, London Wc1h 9jr, England: British Med Journal Publ Group,2000.
- Bohr, U. R. M., Selgrad, M., Ochmann, C., Backert, S., Konig, W., Fenske, A., ... & Malfertheiner, P. (2006). Prevalence and spread of enterohepatic Helicobacter species in mice reared in a specific-pathogen-free animal facility. *Journal of clinical microbiology*, 44(3), 738-742.
- Bourgade, F., Montagutelli, X., Bigbee, C., Weiss, A., Rigottier-Gois, L., Conti, C. J., & Benavides, F. (2004). Simple duplex fecal PCR assay that allows identification of false-negative results in Helicobacter sp.-infected mice. *Comparative medicine*, 54(5), 528-532.
- Bracken, T. C., Cooper, C. A., Ali, Z., Truong, H., & Moore, J. M. (2017). Helicobacter infection significantly alters pregnancy success in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 56(3), 322-329.
- Bronsdon, Melinda A., et al. "Helicobacternemestrinae sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pig tailed macaque (Macaca nemestrina)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41.1 (1991): 148-153.
- Bryner, J. H., Ritchie, A. E., Pollet, L., Kirkbride, C. A., &Collins, J. E. (1987). Experimental infection and abortion of pregnant guinea pigs with a unique spirillum- like bacterium isolated from aborted ovine fetuses. *American journal of veterinary research*, 48(1), 91-95.

- Cao, S., Zhu, C., Feng, J., Zhu, L., Yin, J., Xu, Y., ... & Zhang, Q. (2020). Helicobacter hepaticus infection induces chronic hepatitis and fibrosis in male BALB/c mice via the activation of NF- κ B, Stat3, and MAPK signaling pathways. *Helicobacter*, 25(2), e12677.
- Castiglioni, V., Facchini, R. V., Mattiello, S., Luini, M., Gualdi, V., Scanziani, E., & Recordati, C. (2012). Enterohepatic Helicobacter spp. in colonic biopsies of dogs: molecular, histopathological and immunohistochemical investigations. *Veterinary microbiology*, 159(1-2), 107-114.
- Charitos, I. A., D'Agostino, D., Topi, S., & Bottalico, L. (2021). 40 years of Helicobacter pylori: a revolution in biomedical thought. *Gastroenterology Insights*, 12(2), 111-135.
- Chichlowski, M., & Hale, L. P. (2009). Effects of Helicobacter infection on research: the case for eradication of Helicobacter from rodent research colonies. *Comparative medicine*, 59(1), 10-17.
- Chichlowski, M., Sharp, J. M., Vanderford, D. A., Myles, M. H., & Hale, L. P. (2008). Helicobacter typhlonius and Helicobacter rodentium differentially affect the severity of colon inflammation and inflammation-associated neoplasia in IL10-deficient mice. *Comparative medicine*, 58(6), 534-541.
- Coldham, Thosaporn. The detection and characterisation of Helicobacter species in Australian marsupials. Diss. University of New South Wales, 2004.
- Diker, K. S., Hazıroğlu, R., Akan, M., Çelik, S., & Kabakçı, N. (2002). The prevalence, colonization sites and pathological effects of gastric helicobacters in dogs. *Turkish journal of veterinary & animal sciences*, 26(2), 345-351.
- Eaton, K. A., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Tzellas, N., Coleman, B. E., Paola, J., & Sherding, R. (1996). Prevalence and varieties of Helicobacter species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *Journal of clinical microbiology*, 34(12), 3165-3170.

- FELASA Working Group on Revision of Guidelines for Health Monitoring of Rodents and Rabbits, Mähler, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., ... & Raspa, M. (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals*, 48(3), 178-192.
- Feng, S., Kendall, L. V., Hodzic, E., Wong, S., Lorenzana, E., Freet, K., ... & Khan, I. H. (2004). Recombinant *Helicobacter bilis* protein P167 for mouse serodiagnosis in a multiplex microbead assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 11(6), 1094-1099.
- Fernandez, K. R., Hansen, L. M., Vandamme, P., Beaman, B. L., & Solnick, J. V. (2002). Captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) are commonly infected with *Helicobacter cinaedi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1908-1912.
- Flores, B. M., Fennell, C. L., Kuller, L. A. R. E. N. E., Bronsdon, M. A., Morton, W. R., & Stamm, W. E. (1990). Experimental infection of pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*) with *Campylobacter cinaedi* and *Campylobacter fennelliae*. *Infection and immunity*, 58(12), 3947-3953.
- Fox, J. G. "The expanding genus of *Helicobacter*: pathogenic and zoonotic potential." *Seminars in gastrointestinal disease*. Vol. 8. No. 3. 1997.
- Fox, J. G. "The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases." *Gut* 50.2 (2002): 273-283.
- Fox, J. G., Correa, P., Taylor, N. S., Lee, A., Otto, G., Murphy, J. C., & Rose, R. (1990). *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets: an animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans. *Gastroenterology*, 99(2), 352-361.
- Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Shen, Z., Feng, Y., Taylor, N. S., Paster, B. J., ... & Roa, I. (1998). Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology*, 114(4), 755-763.
- Fox, J. G., Shen, Z., Muthupalani, S., Rogers, A. R., Kirchain, S. M., & Dewhirst, F. E. (2009). Chronic hepatitis, hepatic dysplasia, fibrosis, and biliary hyperplasia in hamsters naturally infected with a novel *Helicobacter* classified in the *H. bilis* cluster. *Journal of clinical microbiology*, 47(11), 3673-3681.

- Fox J.G, Dewhirst FE, Tully JG, et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov. a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol.* 1994;32(5):1238- 1245
- Fox J.G, Yan LL, Dewhirst FE, et al. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol.* 1995;33(2):445- 454.
- Franklin, C. L., Beckwith, C. S., Livingston, R. S., Riley, L. K., Gibson, S. V., Besch-Williford, C. L., & Hook Jr, R. R. (1996). Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *Journal of clinical microbiology*, 34(12), 2952-2958.
- Franklin, C. L., Riley, L. K., Livingston, R. S., Beckwith, C. S., Hook, R. R., Besch-Williford, C. L., ... & Gorelick, P. L. (1999). Enteric lesions in SCID mice infected with “*Helicobacter typhlonicus*,” a novel urease-negative *Helicobacter* species. *Comparative Medicine*, 49(5), 496-505.
- Franklin, C. L., Gorelick, P. L., Riley, L. K., Dewhirst, F. E., Livingston, R. S., Ward, J. M., ... & Fox, J. G. (2001). *Helicobacter typhlonius* sp. nov., a novel murine urease-negative *Helicobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 3920-3926.
- García, A., Erdman, S. E., Xu, S., Feng, Y., Rogers, A. B., Schrenzel, M. D., ... & Fox, J. G. (2002). Hepatobiliary inflammation, neoplasia, and argyrophilic bacteria in a ferret colony. *Veterinary pathology*, 39(2), 173-179.
- Ge Z.M, Sterzenbach T, Whary M.T, Rickman B.H, Rogers A.B, Shen Z.L, Taylor NS, Schauer DB, Josenhans C, Suerbaum S, Fox JG (2008) *Helicobacter hepaticus* HHGI1 is a pathogenicity island associated with typhlocolitis in B6.129-IL10(tm1Cgn) mice. *Microbes Infect* 10:726–733
- Ge, Z., Feng, Y., Muthupalani, S., Eurell, L. L., Taylor, N. S., Whary, M. T., & Fox, J. G. (2011). Coinfection with Enterohepatic *Helicobacter* species can ameliorate or promote *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology in C57BL/6 mice. *Infection and immunity*, 79(10), 3861-3871.

- Goto, K., Ebukuro, S., Ohashi, H., & Itoh, T. (2000). Pathogenicity of Helicobacter species isolated from the stomach of the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Comparative Medicine*, 50(1), 73-77.
- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., ... & Harper, W. E. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. As *Helicobacter pylori* comb. nov. And *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 397-405.
- Hamada, T., Yokota, K., Ayada, K., Hirai, K., Kamada, T., Haruma, K., ... & Oguma, K. (2009). Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease. *Helicobacter*, 14(6), 545-551.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immuneresponse to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor5. *Nature* 410:1099–1103.
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Jacoby, R. O., & Lindsey, J. R. (1998). Risks of infection among laboratory rats and mice at major biomedical research institutions. *Ilar Journal*, 39(4), 266-271.
- Johansson, S. K., Feinstein, R. E., Johansson, K. E., & Lindberg, A. V. (2006). Occurrence of *Helicobacter* species other than *H. hepaticus* in laboratory mice and rats in Sweden. *Comparative medicine*, 56(2), 110-113.
- Jergens, A. E., Wilson-Welder, J. H., Dorn, A., Henderson, A., Liu, Z., Evans, R. B., ... & Wannemuehler, M. J. (2007). *Helicobacter bilis* triggers persistent immune reactivity to antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut*, 56(7), 934-940.
- Kendall, L. V., Feng, S., Hodzic, E., Freet, K., & Barthold, S. W. (2004). Use of the P167 recombinant antigen for serodiagnosis of *Helicobacter bilis*. *Comparative medicine*, 54(1), 44-48.

- Lee, A., Phillips, M. W., O'Rourke, J. L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Fraser, G. J., ... & Kouprach, S. (1992). *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 27-36.
- Lee A, Chen M.H, Coltro N, O'Rourke J, Hazell S, Hu PJ, Li YY (1993) Lee, A., Chen, M., Coltro, N., O'Rourke, J., Hazell, S., Hu, P., & Li, Y. (1993). Long term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induce atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter pylori* infection. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 280(1-2), 38-50..
- Lemke, Laura B., et al. "Concurrent *Helicobacter bilis* infection in C57BL/6 mice attenuates proinflammatory *H. pylori*-induced gastric pathology." *Infection and immunity* 77.5 (2009): 2147-2158.
- Livingston, R. S., Riley, L. K., Hook Jr, R. R., Besch-Williford, C. L., & Franklin, C. L. (1999). Cloning and expression of an immunogenic membrane-associated protein of *Helicobacter hepaticus* for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(5), 745-750.
- Livingston, R. S., & Riley, L. K. (2003). Diagnostic testing of mouse and rat colonies for infectious agents. *Lab animal*, 32(5), 44-51.
- Lory, S. *The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry*. Eds. Eugene Rosenberg, et al. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- Liyanage N.P.M, Manthey K.C, Dassanayake R.P, Kuszynski C.A, Oakley G.G, Duhamel G.E(2010) *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin causes cell death in intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter* 15:98–107
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* (London, England). 1984;1(8390):1311-1315.

- Matos-Rodrigues GE, Masseron CC, SILVA FJ, Frajblat M, Moreira LO, Martins RA. PCR-based detection of *Helicobacter* spp. in animal facilities of a University in Rio de Janeiro, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2020;92(4).
- Mladenova-Hristova, I., Grekova, O., & Patel, A. (2017). Zoonotic potential of *Helicobacter* spp. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(3), 265-269.
- Myles, M. H., Livingston, R. S., Livingston, B. A., Criley, J. M., & Franklin, C. L. (2003). Analysis of gene expression in ceca of *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice before and after development of typhlitis. *Infection and immunity*, 71(7), 3885-3893.
- Myles, Matthew H., Robert S. Livingston, and Craig L. Franklin. "Pathogenicity of *Helicobacter rodentium* in A/JCr and SCID mice." *Comparative medicine* 54.5 (2004): 549-557.
- Nambiar, P. R., Kirchain, S., & Fox, J. G. (2005). Gastritis-associated adenocarcinoma and intestinal metaplasia in a Syrian hamster naturally infected with *Helicobacter* species. *Veterinary pathology*, 42(3), 386-390.
- Neubert, V., Sadek, A., Burell, T., Ralser, A., Erhard, M., Gerhard, M., ... & Kalali, B. (2022). Validation and improvement of a multiplex PCR method to detect murine *Helicobacter* species in feces samples of mice. *Helicobacter*, 27(3), e12888.
- Nilsson, H. O., Ouis, I. S., Stenram, U., Ljungh, A., Moran, A. P., Wadström, T., & Al-Soud, W. A. (2004). High prevalence of *Helicobacter* species detected in laboratory mouse strains by multiplex PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3781-3788.
- On, S. L., Miller, W. G., Houf, K., Fox, J. G., & Vandamme, P. (2017). Minimal standards for describing new species belonging to the families Campylobacteraceae and Helicobacteraceae: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* spp. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(12), 5296.
- On, Stephen LW. "Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns." *Journal of Applied Microbiology* 90.S6 (2001): 1S-15S.

- Paster, B. J., Lee, A., Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Tordoff, L. A., Fraser, G. J., ... & Ferrero, R. (1991). Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(1), 31-38.
- Paster, Bruce J., And Floyd E. Dewhirst. "Phylogeny of campylobacters, wolinellas, *Bacteroides gracilis*, and *Bacteroides ureolyticus* by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing." *International Journal of Systematic Bacteriology* 38.1 (1988): 56-62.
- Patterson, M. M., Rogers, A. B., & Fox, J. G. (2010). Experimental *Helicobacter marmotae* infection in A/J mice causes enterohepatic disease. *Journal of medical microbiology*, 59(10), 1235-1241.
- Pritchett- Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim*. 2009;43(2):165- 173.
- Rimbara, E., Mori, S., Matsui, M., Suzuki, S., Wachino, J. I., Kawamura, Y., ... & Shibayama, K. (2012). Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from seven hospitals in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 50(8), 2553-2560.
- Rossi, M., Hänninen, M. L., Revez, J., Hannula, M., & Zanoni, R. G. (2008). Occurrence and species level diagnostics of spp., enteric spp. and spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 129(3-4), 304.
- Scavizzi, F., & Raspa, M. (2006). *Helicobacter typhlonius* was detected in the sex organs of three mouse strains but did not transmit vertically. *Laboratory animals*, 40(1), 70- 79.
- Schauer, D. B., Ghori, N. A. F. I. S. A., & Falkow, S. (1993). Isolation and characterization of "*Flexispira rappini*" from laboratory mice. *Journal of clinical microbiology*, 31(10), 2709-2714.
- Shames, B., Fox, J. G., Dewhirst, F., Yan, L., Shen, Z., & Taylor, N. S. (1995). Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 33(11), 2968-2972.

- Shen, Z., Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Foltz, C. J., An, L. Y., ... & Perry, L. (1997). *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *International journal of systematic bacteriology*, 47(3), 627-634.
- Shen, Z., Xu, S., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Pena, J. A., Modlin, I. M., ... & Fox, J. G. (2005). A novel enterohepatic *Helicobacter* species 'Helicobacter mastomyrinus' isolated from the liver and intestine of rodents. *Helicobacter*, 10(1), 59-70.
- Shomer, N. H., Dangler, C. A., Marini, R. P., & Fox, J. G. (1998). *Helicobacter bilis*/*Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of scid mice. *Comparative Medicine*, 48(5), 455-459.
- Solnick, J. V., & Schauer, D. B. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical microbiology reviews*, 14(1), 59-97.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A. P., Dewhirst, F. E., Owen, R. J., Porter, A., ... & Costas, M. (1993). *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrate dstudy of phenotype and genotype. *Microbiology*, 139(10), 2495-2504.
- Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droge M, Fartmann B, Fischer HP, Ge ZM, Horster A, Holland R, Klein K, Konig J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen ZL, Weber J, Frosch M, Fox JG (2003) The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7901–7906
- Taylor, N. S., Xu, S., Nambiar, P., Dewhirst, F. E., & Fox, J. G. (2007). Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America. *Journal of clinical microbiology*, 45(7), 2166-2172.
- Ward, J. M., Fox, J. G., Anver, M. R., Haines, D. C., George, C. V., Collins Jr, M. J., ... & Rice, J. M. (1994). Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 86(16), 1222-1227.

- Whary, M. T., & Fox, J. G. (2004). Natural and experimental *Helicobacter* infections. *Comparative medicine*, 54(2), 128-158.
- Whary, M. T., & Fox, J. G. (2006). Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents. *Lab animal*, 35(7), 25-36.
- Whary, M. T., Cline, J. H., King, A. E., Hewes, K. M., Chojnacky, D., Salvarrey, A., & Fox, J. G. (2000). Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium*, and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. *Comparative medicine*, 50(4), 436-443.
- Whary, Mark T., and James G. Fox. "Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents." *Labanimal* 35.7 (2006): 25-36.
- Whary, Mark T., and James G. Fox. "Natural and experimental *Helicobacter* infections." *Comparative medicine* 54.2 (2004): 128-158.
- Zhang, L., Danon, S., Grehan, M., Lee, A., & Mitchell, H. (2005). Template DNA Ratio can Affect Detection by Genus-Specific PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of Bacteria Present at Low Abundance in Mixed Populations. *Helicobacter*, 10(1), 80-82.