

**ZESZYTY NAUKOWE
AKADEMII ROLNICZEJ
WE WROCŁAWIU**

NR 543

ROZPRAWY CCXLII

KRZYSZTOF KUBIAK

**COLONIZATION OF GASTRIC MUCOSA IN DOGS
AND CATS WITH MICROORGANISMS
OF *HELICOBACTER* SPP. – CLINICAL ASPECT**

**DEPARTMENT OF INTERNAL AND PARASITIC
DISEASES WITH CLINIC FOR HORSES,
DOGS AND CATS**



WROCŁAW 2006

KRZYSZTOF KUBIAK

**KOLONIZACJA BŁONY ŚLUZOWEJ ŻOŁĄDKA
PSÓW I KOTÓW DROBNOUSTROJAMI
Z RODZAJU *HELICOBACTER*
– ASPEKT KLINICZNY**

**KATEDRA CHORÓB WEWNĘTRZNYCH
I PASOŻYTNICZYCH Z KLINIKĄ CHORÓB KONI,
PSÓW I KOTÓW**



WROCŁAW 2006

Opiniodawca

prof. dr hab. Eligiusz Madej

Redaktor merytoryczny

prof. dr hab. Wojciech Zawadzki

Opracowanie redakcyjne i korekta

mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie

Halina Sebzda

Projekt okładki

Grażyna Kwiatkowska

© Copyright by Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław 2006

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany
za pomocą urządzeń elektronicznych, nagrywających i innych
bez pisemnej zgody posiadacza praw autorskich

ISSN 0867-7964

ISSN 0867-1427

WYDAWNICTWO AKADEMII ROLNICZEJ WE WROCŁAWIU

Redaktor naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki

ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax (071) 328-12-77

e-mail: wyd@ozi.ar.wroc.pl

Nakład: 100 + 16 egz. Ark. druk. 6,5

Druk i oprawa: F.P.H. „Elma”

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
1. WSTĘP	9
2. CEL BADAŃ	25
3. MATERIAŁ I METODY	26
4. WYNIKI.....	49
5. DYSKUSJA.....	73
6. WNIOSKI	79
PIŚMIENNICTWO.....	80
ZAŁĄCZNIKI.....	93

WYKAZ SKRÓTÓW

ALP, AP, FA	fosfataza alkaliczna
ALT, GPT	aminotransferaza alaninowa
AST, GOT	aminotransferaza asparaginianowa
bezp. prep. bakt.	bezpośredni preparat bakteriologiczny
CagA	białko CagA <i>H. pylori</i> (cytotoxin-associated gene A antigen)
CDT	cytoletalna toksyna rozciągająca
CLO	organizmy podobne do <i>Campylobacter</i> (<i>Campylobacter</i> – like organisms)
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy (deoxyribonucleic acid)
EHS	wątrobowo-jelitowe gatunki <i>Helicobacter</i> (enterohepatic helicobacter species)
ELISA	serologiczna metoda immunoemzymatyczna (enzyme-linked immunosorbent assay)
GHLO	organizmy występujące w żołądku podobne do <i>Helicobacter</i> (gastric <i>Helicobacter</i> – like organisms)
<i>H. bilis</i>	<i>Helicobacter bilis</i>
<i>H. bizzozeronii</i>	<i>Helicobacter bizzozeronii</i>
<i>H. canis</i>	<i>Helicobacter canis</i>
<i>H. cinaedi</i>	<i>Helicobacter cinaedi</i>
<i>H. felis</i>	<i>Helicobacter felis</i>
<i>H. fennelliae</i>	<i>Helicobacter fennelliae</i>
<i>H. heilmannii</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>
<i>H. hepaticus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>
<i>H. mustelae</i>	<i>Helicobacter mustelae</i>
<i>H. pulorum</i>	<i>Helicobacter pulorum</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>H. rappini</i>	<i>Helicobacter rappini</i>

<i>H. salomonis</i>	<i>Helicobacter salomonis</i>
<i>H. suis</i>	<i>Helicobacter suis</i>
HGB, Hb	hemoglobina
Hct, Ht	hematokryt
hist.-pat. barw. Giemsy	preparat histopatologiczny barwiony metodą Giemsy
hodowla mikrobiol.	hodowla mikrobiologiczna
Hsp	białko szoku cieplnego (heat shock protein)
IgA	immunoglobulina klasy A
IgG	immunoglobulina klasy G
IL-6	interleukina 6
IL-8	interleukina 8
LPS	lipopolisacharyd
m.c.	masa ciała
MALT	tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (mucosa-associated lymphoid tissue)
n.s.	nieistotne statystycznie
PCR	polimerazowa reakcja łańcuchowa (polymerase chain reaction)
RBC	erytrocyty
spp.	gatunki (species)
UBT	ureazowy test oddechowy (urea brath test)
<i>UreB</i>	gen kodujący podjednostkę UreB ureazy <i>H. pylori</i>
<i>VacA</i>	toksyna wakuolizująca <i>H. pylori</i>
WBC	leukocyty

1. WSTĘP*

W 1983 roku Marshall i Warren opublikowali doniesienie o wyizolowaniu u ludzi z błony śluzowej żołądka, objętej przewlekłym zapaleniem i chorobą wrzodową, spiralnych drobnoustrojów podobnych do bakterii z rodzaju *Campylobacter*. Pierwotnie bakterie te określono jako drobnoustroje podobne do *Campylobacter* (CLO – *Campylobacter* – like organisms), następnie nazwę tę zmieniono na *Campylobacter pyloridis*, a w późniejszym czasie, mając na uwadze względy gramatyczne, na *Campylobacter pylori*. Dalsze badania wykazały znaczne biochemiczne i strukturalne różnice między nowo odkrytym drobnoustrojem a rodzajem *Campylobacter*. Z tego względu w 1989 r. bakterię tę zaliczono do nowo wyodrębnionego w systematyce mikrobiologicznej rodzaju *Helicobacter*, nadając jej ostateczną nazwę *Helicobacter pylori* [Heatley, 1999; Malfertheiner i wsp., 1997].

Początkowo nie doceniano doniosłości odkrycia Marshalla i Warrena i tylko niewielu naukowców zajmowało się kontynuowaniem dalszych badań nad tym mikroorganizmem, w aspekcie jego patogennego wpływu na żołądek i dwunastnicę człowieka. Wśród nich dominowali badacze, którzy już wcześniej zajmowali się tym drobnoustrojem – fascynaci jego morfologicznych i czynnościowych cech mikrobiologicznych [Malfertheiner i wsp., 1997].

W 1987 roku wykazano, że skuteczna terapia zakażenia *Helicobacter pylori* u chorych z chorobą wrzodową dwunastnicy prowadzi do znacznego zmniejszenia częstości nawrotów tej choroby. Od tego momentu zagadnieniem tym zainteresowali się także lekarze kliniści, którzy skupili swą uwagę głównie na poszukiwaniu jeszcze skuteczniejszych metod leczenia tej infekcji [Malfertheiner i wsp., 1997].

Wyniki badań wskazujące na związek infekcji *Helicobacter pylori* z rozwojem chorób żołądka i dwunastnicy u ludzi, w tym także nowotworów, doprowadziły do tego, że w 1994 r. Światowa Organizacja Zdrowia zaklasyfikowała ten drobnoustrój do I grupy karcynogenów [International Agency for Research on Cancer, 1994].

W latach dziewięćdziesiątych XX w. nastąpił gwałtowny rozwój badań nad spiralnymi bakteriami z rodzaju *Helicobacter*. Ich konsekwencją jest m.in. ciągły wzrost liczby odkrywanych gatunków, dokładne wyjaśnienie mechanizmów patogennego wpływu *Helicobacter pylori* na błonę śluzową żołądka i dwunastnicy człowieka, opracowanie nieinwazyjnych i inwazyjnych metod oraz testów wykrywania tego zakażenia, a także podjęcie badań u zwierząt. Dotychczas opisano 29 gatunków zaliczanych do rodzaju *Helicobacter* [Melito i wsp., 2001].

Bakterie z rodzaju *Helicobacter* to Gram-ujemne pałeczki, które posiadają od 1 do 20 rzęsek (witek), położonych jednobiegunowo, dwubiegunowo lub okołokomórkowo.

* Badania wykonano w ramach projektu badawczego KBN nr 3P06K 00723

Kształt tych drobnoustrojów jest zmienny – obserwowane są formy spiralne, zagięte oraz ziarniakowate. Rosną na podłożach wzbogaconych krwią lub surowicą w warunkach mikroaerofilnych w temperaturze 36–42 °C, po 3–14-dniowej inkubacji. Mają zdolność produkowania katalazy, z wyjątkiem *Helicobacter canis*. Niektóre, jak np.: *H. pylori*, *H. heilmannii*, *H. felis* są ureazo-dodatnie, inne natomiast, jak np.: *H. canis*, *H. pullorum*, *H. fennelliae* są ureazo-ujemne [Hua i wsp., 1999; Iwańczak i wsp., 1998; Taneera i wsp., 2002].

Ze względu na miejsce bytowania, cechy morfologiczne i właściwości biochemiczne bakterie *Helicobacter* spp. podzielono na 2 grupy. Do grupy pierwszej zaliczane są gatunki umiejscawiające się w początkowym (górnym) odcinku przewodu pokarmowego, które mogą u ludzi prowadzić do zapalenia żołądka i dwunastnicy, choroby wrzodowej oraz raka żołądka. Są to *H. pylori*, *H. heilmannii* i *H. felis*. Drugą grupę stanowią gatunki wątrobowo-jelitowe (Enterohepatic *Helicobacter* Species – EHS), które występują w końcowym (dolnym) odcinku przewodu pokarmowego, tj. w jelicie biodrowym, okrężnicy i prostnicy oraz w wątrobie (drogach żółciowych) człowieka i zwierząt. Do tej grupy należą m.in.: *H. hepaticus*, *H. canis*, *H. bilis*, *H. pullorum* oraz *H. cinaedi*. Gatunki wątrobowo-jelitowe nie kolonizują błony śluzowej żołądka, choć mają wiele wspólnych cech fizjologicznych i morfologicznych z gatunkami tam występującymi [Solnick i Schauer, 2001].

Tabela 1
Table 1

Najważniejsze gatunki z rodzaju *Helicobacter* i ich występowanie
Most significant *Helicobacter* spp. and their occurrence

<i>Helicobacter</i> spp.	Występowanie Occurrence	
<i>H. pylori</i>	człowiek – human	żołądek stomach
<i>H. heilmannii</i>	człowiek, kot, pies – human, cat, dog	
<i>H. felis</i>	kot, pies, mysz – cat, dog, mouse	
<i>H. salomonis</i>	kot, pies – cat dog	
<i>H. bizzozeronii</i>	kot, pies – cat dog	
<i>H. suis</i>	świnia – swine	
<i>H. mustelae</i>	fretka – ferret	
<i>H. canis</i>	pies – dog	żołądek, jelito, wątroba stomach, intestine, liver
<i>H. fennelliae</i>	człowiek – human	jelito intestine
<i>H. cinaedi</i>	człowiek, chomik – human, hamster	
<i>H. pullorum</i>	człowiek, drób – human, poultry	
<i>H. rappini</i>	gryznie, pies – rodents, dog	
<i>H. bilis</i>	pies, kot, mysz – dog, cat, mouse	wątroba liver
<i>H. hepaticus</i>	człowiek, mysz – human, mouse	

Charakterystyka wybranych gatunków z rodzaju *Helicobacter* występujących u zwierząt i człowieka

Helicobacter pylori

Jest to Gram-ujemna spiralna lub zakrzywiona pałeczka o długości 2,5–5 μm i szerokości 0,5–1 μm , posiadająca od 2 do 6 biegunowo położonych rzęsek [Geis i wsp., 1993; Gibiński, 1997].

Na dzień dzisiejszy jest to najlepiej poznany gatunek z rodzaju *Helicobacter*, spotykany przede wszystkim w żołądku człowieka, choć wyizolowano go także z żołądka kotów, małp i owiec [Baskerville i Newell, 1988; Dore i wsp., 2001; Fox i wsp., 1995; Newell i wsp., 1988]. Uważa się, że zwierzęta te mogą odgrywać pewną rolę w transmisji zakażenia. Nie potwierdzono jednak bezpośredniego zakażenia człowieka od zwierząt. Nie mniej wykazanie obecności *H. pylori* w kale, ślinie i soku żołądkowym kotów skłania do zachowania szczególnej higieny w obcowaniu z tymi zwierzętami. Odwizierzęcy charakter zakażenia sugeruje częstsze wykrywanie tych drobnoustrojów u pasterzy owiec, w porównaniu z innymi grupami zawodowymi [Dore i wsp., 1999].

U ludzi zakażenie *Helicobacter pylori* jest szeroko rozpowszechnione. W krajach rozwiniętych częstość zakażeń u dzieci nie przekracza 10%, a u osób powyżej 50 roku życia zawiera się w granicach 25–50%. Nieco inaczej przedstawia się sytuacja w krajach rozwijających się. Odsetek zakażonych dzieci wynosi od 13 do 60%, natomiast dorosłych – od 70 do 90 (100)%. Większe zakażenie w tych państwach jest związane z nieodpowiednimi warunkami mieszkaniowymi, często ograniczonym dostępem do czystej wody oraz z niskim poziomem higieny [Heatley, 1999; Mitchell i wsp., 1997].

Amerykańscy naukowcy zaobserwowali, że Aborygeni nie utrzymujący kontaktu z białą ludnością Australii rzadko ulegają zakażeniu *H. pylori*, natomiast Aborygeni prowadzący „zachodni styl życia” zakażeni są w bardzo wysokim odsetku i częściej występuje u nich choroba wrzodowa [Heatley, 1999].

Dotychczas jednoznacznie nie określono, w jaki sposób dochodzi do przenoszenia się zakażenia *Helicobacter pylori* wśród ludzi. Przyjmuje się, że zakażenie może być wywołane transmisją tego drobnoustroju następującymi drogami:

- oralno-oralną (jama ustna – jama ustna) – obecność drobnoustrojów w płytce nazębnej [Majmudar i wsp., 1991] i ślinie [Ferguson i wsp., 1993; Parsonnet i wsp., 1999];
- fekalno-oralną (kał – jama ustna) – drobnoustroje w wodzie zanieczyszczonej odchodami ludzkimi [Hulten i wsp., 1996; Hulten i wsp., 1998]; wykazano, że w chłodnej wodzie morskiej lub rzecznej *H. pylori* może przetrwać nawet 2 tygodnie [Heatley, 1999];
- gastro-oralną (żołądek – jama ustna) – drobnoustroje w wymiocinie [Leung i wsp., 1999; Parsonnet i wsp., 1999];
- jatrogeną – poprzez zakażony sprzęt endoskopowy [Akamatsu i wsp., 1996; Tytgat, 1995]. Możliwość zakażenia za pośrednictwem sprzętu medycznego potwierdzili m.in. Amerykanie przeprowadzając eksperyment, podczas którego grupa ochotników została zakażona poprzez elektrodę do pomiaru pH żołądka, którą bez dezynfekcji stosowano u kolejnych uczestników badania. Zaobserwowano także, że zakażeniom ulegali lekarze wykonujący gastroscopię, którzy nie stosowali zasad aseptyki i antyseptyki [Mitchell i wsp., 1989; Sobala i wsp., 1991].

Zakażenie drogą pokarmową zostało m.in. potwierdzone przez dwóch niezależnych badaczy: Barry'ego Marshalla z Australii oraz Arthura Morrisa z Nowej Zelandii. Obaj przeprowadzili na sobie próby zakażenia drogą doustną, polegające na wypiciu zawiesiny *Helicobacter pylori*. Marshall, po wcześniejszej gastrokopii, na podstawie której stwierdzono prawidłową strukturę błony śluzowej żołądka, przyjął leki hamujące wydzielniczość żołądka, a następnie wypił zawiesinę bakterii wyizolowanych od chorego. Powtórna gastroscopia, wykonana po 10 dniach, wykazała zapalenie błony śluzowej żołądka oraz zakażenie. Infekcji towarzyszyły nieswoiste objawy kliniczne: wymioty, bóle głowy, bóle głodowe, uczucie pełności w nadbrzuszu, burczenie w brzuchu, cuchnący oddech oraz rozdrażnienie. U tego naukowca doszło do samoistnego wyleczenia przed upływem 14 dnia zakażenia. Morris wykonał bardzo podobny eksperyment. Jednak obserwowane objawy kliniczne zakażenia były bardziej intensywne i wyrażały się bólami kolkowymi w nadbrzuszu oraz wymiotami. Nie doszło do samowyleczenia, a eradykacja drobnoustroju miała miejsce dopiero po 3 latach intensywnej terapii [Heatley, 1999].

Cechami umożliwiającymi drobnoustrojom *Helicobacter pylori* kolonizację błony śluzowej żołądka, przetrwanie w jego kwaśnym środowisku oraz wywołanie zmian zapalnych są:

- Zdolność poruszania się – umożliwia ją zarówno spiralny kształt bakterii, jak i obecność 2–6 biegunowo położonych rzęsek. Dzięki nim bakterie mogą poruszać się w lepkim śluzie pokrywającym błonę śluzową żołądka, przenikać przez jego warstwę oraz zasiedlać nabłonek [Albrecht i Łazowska, 2001; Jagusztyn-Krynicka i wsp., 1999; Wiśniewska, 2003]. Wykazano, że nieruchliwe mutanty *H. pylori* posiadają ograniczoną zdolność zakażenia myszy [Ottemann i Lowenthal, 2002]. Stwierdzono także, że im mniejsza lepkość śluzu żołądkowego, tym większa ruchliwość drobnoustrojów [Worku i wsp., 1999]. Ukierunkowanie ruchu w stronę błony śluzowej żołądka uwarunkowane jest chemotaktycznie [Malferteiner i wsp., 1997; Wiśniewska, 2003].
- Obecność adhezyn na powierzchni bakterii – dzięki nim drobnoustroje zdolne są do wiązania się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek nabłonka błony śluzowej żołądka oraz powierzchni komórek typu żołądkowego, które tworzą ogniska metaplastyczne w przełyku, dwunastnicy i jelicie grubym [Gibiński, 1997].
- Niska aktywność immunologiczna lipopolisacharydu (LPS) – lipopolisacharyd jest endotoksyną, stanowiącą istotny składnik ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, wywołującą reakcje odpornościowe organizmu. W przypadku *H. pylori* aktywność LPS jest niewielka i dzięki temu nie jest indukowana odpowiedź immunologiczna na poziomie niezbędnym do eliminacji bakterii. Zapewnia to drobnoustrojom dłuższą przeżywalność [Albrecht i Łazowska, 2001; Torres i wsp., 2000].
- Zdolność wytwarzania enzymów – enzymy te umożliwiają przeżycie w kwaśnym środowisku żołądka oraz uszkadzają nabłonek błony śluzowej żołądka. Do nich należą: ureaza – hydrolizująca mocznik, katalaza, proteaza, oksydaza, gamma-glutamylotranspeptydaza, fosfolipaza A i C, glikosulfataza, dysmutaza nadtlenkowa oraz fosfataza alkaliczna [Albrecht i Łazowska, 2001; Jagusztyn-Krynicka i wsp., 1999].
- Zdolność wytwarzania cytotoksyny wakuolizującej VacA – jest to jeden z czynników powodujących uszkodzenie błony śluzowej żołądka, co wyraża się stanem zapalnym, nadżerkami i owrzodzeniami [Jagusztyn-Krynicka i wsp., 2005; Wiśniewska, 2003; Zawilak i Zakrzewska-Czerwińska, 2001].

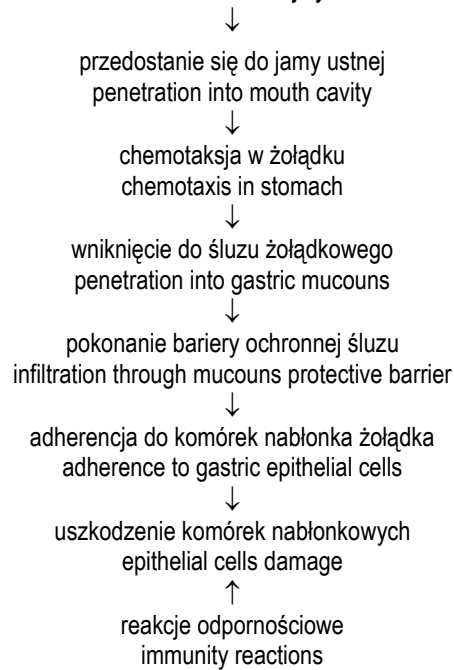
- Zdolność wytwarzania białka szoku termicznego (Hsp) – białko to chroni ureazę przed inaktywacją w kwaśnym środowisku oraz indukuje wzmożone wydzielanie prozapalnej interleukiny 8 (IL – 8) [Hunt i Tytgat, 2000; Jagusztyn-Krynicka i wsp., 1999].
- Zdolność syntezy białka CagA – białko to jest wysoce immunogenne, pobudza syntezę interleukin 6 i 8 (IL – 6 i IL – 8) oraz wykazuje aktywność proapoptyczną [Kato i wsp., 2000; Zawilak i Zakrzewska-Czerwińska, 2001].

Tabela 2
Table 2

Czynniki chorobotwórczości *Helicobacter pylori* [Wiśniewska, 2003]
Helicobacter pylori prevalence factors [Wiśniewska, 2003]

Procesy Processes	Czynnik oddziaływania Virulence factor	Efekt Result
Kolonizacja błony śluzowej Colonization of mucous membrane	rzęski cilia	aktywny ruch active movement
	ureaza urease	wytwarzanie alkalicznego środowiska origination of alkaline environment
	adhezyny adhesines	adhezja do komórek nabłonka adhesion of epithelial cells
Uszkodzenie komórek Cells damage	proteazy proteases	degradacja śluzu pokrywającego nabłonek degradation of mucous covering epithelium
	fosfolipaza A phospholipase	niszczenie komórkowych błon fosfolipidowych destruction of phospholipid cell membranes
	VacA	wakuolizacja komórek cell vacuolization
	CagA	aktywność proapoptyczna proapoptotic activity
	ureaza urease	wytwarzanie amoniaku (właściwości cytotoksyczne) origination of ammoniac (cytotoxic properties)
	LPS	właściwości proapoptyczne proapoptotic properties
	Hsp	indukcja wydzielania IL – 8 induction of IL-8 extretion
Przeżycie w organizmie gospodarza Survival in host's organism	dysmutaza nadtlenkowa i katalaza superoxide dysmutase and catalase	inaktywacja aktywnych form tlenu, unikanie mechanizmu bakteriobójczego komórek żernych inactivation of active oxygen forms, avoidance of phagocytes bactericidal mechanism
	Hsp	ochrona białek bakteryjnych protection of bacterial proteins
	LPS	„mimikra antygenowa” – maskowanie antygenów bakteryjnych „antigenic mimesis” – masking of bacterial antigens

Helicobacter pylori



Ryc. 1. Mechanizm zakażenia *Helicobacter pylori* [Malfertheiner i wsp., 1997]
Fig. 1. *Helicobacter pylori* infection mechanism [Malfertheiner et al., 1997]

W wyniku zakażenia *Helicobacter pylori* początkowo rozwija się ostre zapalenie błony śluzowej żołądka, które następnie przechodzi w zapalenie przewlekłe. Powikłaniami przewlekłego zapalenia mogą być:

- choroba wrzodowa – występuje u 10–15% zakażonych,
- rak żołądka – występuje u 1% chorych z przewlekłym zanikowym zapaleniem żołądka,
- chłoniak żołądka (typu MALT),
- autoimmunologiczne zanikowe zapalenie żołądka ze złośliwą niedokrwistością,
- choroba Menetriera.

Wykazano także, że istnieje związek pomiędzy zakażeniem *Helicobacter pylori* a chorobą refluksową przełyku. Drobnoustrój ten jest także odpowiedzialny za stany zapalne i owrzodzenia dwunastnicy [Albrecht i Łazowska, 2001; Archer i wsp., 1998; Donati i wsp., 2000; Ławniczak i Starzyńska, 2002; Włodarek i wsp., 2001; Wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, 2001].

Obecnie prowadzone są badania nad wpływem zakażenia *H. pylori* na występowanie niezwiązanych z przewodem pokarmowym chorób, takich jak: alergii u dzieci [Corrado i wsp., 1998], choroby wieńcowej i zawału mięśnia sercowego [Koenig i wsp. 1999; Pollicano i wsp., 1999], migreny [Gasbarrini i wsp., 2000], chorób dermatologicznych

oraz immunologicznych [De Luis i wsp., 1998; Wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, 2001].

Helicobacter heilmannii

W 1987 roku Dent i wsp. odkryli w żołądku człowieka bakterię kształtu spiralnego, którą nazwali *Gastrospirillum hominis*. Od tego momentu wielu badaczy prowadziło intensywne badania nad rolą tych drobnoustrojów w rozwoju chorób żołądka i dwunastnicy, w tym K. Heilmann i F. Borchard. W uznaniu zasług K. Heilmanna w tej dziedzinie zmieniono pierwotną nazwę tej bakterii na *Helicobacter heilmannii* [O'Rourke i wsp., 2001].

Jest to drobnoustrój nieco większy od *H. pylori*, kształtu spiralnego (przypomina korkociąg), posiadający 5–8 skrętów, długości 5,5–7,5 μm i średnicy ok. 0,5 μm , mający 8–12 wici na biegunach [Iwańczak i wsp., 1998]. Niektórzy autorzy wyodrębniają 2 podtypy *H. heilmannii*: *Helicobacter heilmannii* typu I wykazujący filogenetyczne podobieństwo do „*Candidatus Helicobacter suis*” oraz typu II, spokrewniony z *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter salomonis* oraz *Helicobacter felis* [Baele i wsp., 2004].

Helicobacter heilmannii występuje w żołądku psów, kotów, gepardów, szczurów, świń, różnych gatunków naczelnych, natomiast rzadko u ludzi [Fox, 2002]. Zdaniem Heilmanna i Borcharda częstość występowania zakażenia u ludzi waha się w granicach od 0,25 do 0,6%. Jednakże w Tajlandii i Chinach u 6% chorych stwierdzono zakażenie *H. heilmannii* [Heilmann i Borchard, 1991]. Zakażenie tym drobnoustrojem trzykrotnie częściej spotykane jest u mężczyzn [Malfertheiner i wsp., 1997]. *H. heilmannii* głównie kolonizuje błonę śluzową trzonu i części przedodźwiernikowej żołądka, nieco rzadziej spotykany jest w dnie żołądka oraz w dwunastnicy [Andersen, 2001; Iwańczak i wsp., 1998]. Zakażeniu najczęściej towarzyszy przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka o średnim nasileniu, z umiarkowanym naciekiem limfocytów i komórek plazmatycznych w blaszce właściwej błony śluzowej. Przy ostrym zapaleniu spotykane są nadżerki błony śluzowej oraz nacieki granulocytów obojętnochłonnych. Podczas badania endoskopowego u chorych zakażonych *H. heilmannii* obserwowane jest przede wszystkim przewlekłe zapalenie żołądka oraz dwunastnicy, natomiast nadżerki i owrzodzenia spotykane są znacznie rzadziej. W porównaniu do zapalenia błony śluzowej żołądka wywołanego przez *H. pylori* zapalenie na tle infekcji *H. heilmannii* ma łagodniejszą formę [Iwańczak i wsp., 1998]. Heilmann zaobserwował, że chorzy zakażeni tym drobnoustrojem skarżyli się na przewlekły ból w nadbrzuszu, rzadko natomiast spotykano krwawienia z wrzodów żołądka [Fox, 2002; Heilmann i Borchard, 1991]. Jednak u większości pacjentów infekcja przebiega bezobjawowo. Rozpoznawanie zakażeń tym drobnoustrojem opiera się przede wszystkim na ocenie morfologii tych drobnoustrojów w preparatach mikroskopowych oraz na wykrywaniu tego gatunku metodą PCR w wycinkach błony śluzowej pobranych z żołądka. Prowadzone próby hodowli *in vitro* dotychczas bardzo rzadko kończyły się sukcesem. Można utrzymywać hodowlę *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych [Solnick, 2003]. Niektórzy autorzy wskazują na możliwość przenoszenia się zakażenia od psów, kotów i świń na człowieka [Simpson i Burrows, 1997].

Helicobacter felis

W 1987 roku Lee i wsp. wyizolowali z błony śluzowej żołądka kotów spiralnie skręcony, z biegunowo położonymi wtkami, ureazo-, katalazo- i oksydazododatni drobnoustrój [Paster i wsp., 1991]. Były to cechy charakterystyczne dla *Helicobacter* spp. Na podstawie dalszych badań, uwzględniających analizę sekwencjonowania 16S rRNA i dalszą charakterystykę biochemiczną, mikroorganizm nazwano *Helicobacter felis* [Lee i Megraud, 1996]. W oparciu o badania w mikroskopie elektronowym bakterie o podobnej morfologii znaleziono także w żołądkach psów, świń, leopardów i szczurów [Paster i wsp., 1991]. Zaobserwowano, że zakażenie *H. felis* indukuje nowotwór u transgenicznych myszy. Drobnoustrój ten w wycinkach błony śluzowej żołądka pobranych od ludzi stwierdzany jest sporadycznie. *Helicobacter felis* wykazuje w 96% zgodność homologiczną z *Helicobacter pylori* [Simpson i Burrows, 1997]. Jest to bakteria długości 5 – 7,5 μm i szerokości ok. 0,4 μm , z 14–20 dwubiegunowo położonymi wtkami [Hua i wsp., 1999].

Helicobacter canis

Drobnoustrój ten po raz pierwszy wyizolowany został z kału dzieci z zapaleniem żołądka i jelit [Burens i wsp., 1993]. Posiada ok. 4 μm długości i 2 dwubiegunowo położone wtki. Jest to gatunek cechujący się wysoką odpornością na działanie żółci. Nie tak dawno został on również wyizolowany z kału zdrowych psów i kotów oraz psów i kotów z biegunką. Drobnoustrój ten stwierdzono także u szczenięcia z aktywnym zapaleniem wątroby [Foley i wsp., 1999; Fox, 2002; Fox i wsp., 1996; Stanley i wsp., 1993]. Jednym z kierunków prowadzonych obecnie badań jest ustalenie, czy psy i koty mogą być rezerwuarem zarazka stanowiącym zagrożenie dla człowieka [Stanley i wsp., 1993]?

Helicobacter suis

Drobnoustrój ten może wywoływać chorobę wrzodową żołądka u świń, co zostało potwierdzone badaniami endoskopowymi, histopatologicznymi i mikrobiologicznymi. *H. suis* wykazuje 99,5% homologii z *H. heilmannii* [De Groote, 1999].

Helicobacter mustelae

Jest to drobnoustrój występujący u fretek, który morfologicznie, fenotypowo, biochemicznie i molekularnie zbliżony jest do *Helicobacter pylori*. Zakażenie doustne fretek *Helicobacter mustelae* wywołuje przewlekłe zapalenie żołądka, podobne do obserwowanego u zwierząt naturalnie zakażonych. Drobnoustrój ten odpowiedzialny jest za rozwój gruczolakoraka żołądka oraz chłoniaka żołądka typu MALT u tych zwierząt. U większości fretek w wieku powyżej 6 tyg. w żołądku stwierdzany jest *Helicobacter mustelae* [Sapierzyński i Malicka, 2004; Suerbaum i wsp., 1992].

Helicobacter cinaedi* oraz *Helicobacter fennelliae

W 1984 roku zostały wyizolowane z wymazów odbytniczych homoseksualistów z zapaleniem jelita grubego mikroaerofilne drobnoustroje o cechach morfologicznych

podobnych do bakterii z rodzaju *Campylobacter*, które nazwano *Campylobacter – like organisms – CLO*. Następnie, na podstawie homologów DNA, bakterie te podzielono na 3 grupy. Do grupy pierwszej, określanej jako CLO – 1A, zaliczono *Helicobacter cinaedi*, wcześniej sklasyfikowane jako *Campylobacter cinaedi*; do grupy drugiej – CLO – 2 – *Helicobacter fennelliae*. Grupę trzecią – CLO – 3 tworzą nadal nieokreślone organizmy [On i Holmes, 1995].

H. cinaedi izolowano głównie od chorych z upośledzoną odpornością (nosiciele wirusa HIV) [Trivett-Morre i wsp., 1997], osób dorosłych oraz dzieci [Vandamme i wsp., 1990]. Zakażenie tym drobnoustrojem może przebiegać bezobjawowo lub obserwowane są objawy podobne do zakażeń *Campylobacter jejuni*: gorączka, ból brzucha oraz biegunka. W celu wyjaśnienia patogenyzy infekcji *H. cinaedi* zakażono doustnie makaki. U zwierząt tych wystąpiły: bakteriemia oraz biegunka. W badaniach anatomopatologicznych stwierdzono zapalenie okrężnicy. Wykazano także, że drobnoustroje te mają zdolność wnikania w głębsze warstwy błony śluzowej jelita [Fox i wsp., 2001]. *H. cinaedi* został wyizolowany także z jelit chomików i tym samym zasugerowano, że zwierzęta te mogą być rezerwuarem zarazka i stanowić źródło zakażenia dla człowieka [Fox i wsp., 1998]. Obecność tego drobnoustroju została również wykazana w kale psów i kotów [Kielbauch i wsp., 1994].

Helicobacter fennelliae (wcześniej określane jako *Campylobacter fennelliae*), podobnie jak *H. cinaedi*, został po raz pierwszy wyizolowany z wymazów z odbytnicy u homoseksualistów z zapaleniem okrężnicy. Drobnoustrój ten, w odróżnieniu od *H. cinaedi*, nie wywołuje bakteriemii u osób dorosłych. Obecność *H. fennelliae* wykazano także w kale psów i makaków [Fox, 2002].

Helicobacter pullorum

Drobnoustrój ten został wyizolowany z jelit zdrowych kurcząt oraz z wątroby i jelit kurcząt z zapaleniem wątroby. Ponadto wykazano jego obecność w kale ludzi z zapaleniem żołądka i jelit [Burens i wsp., 1993; Burens i wsp., 1994]. *H. pullorum* wytwarza cytoletalną toksynę rozciągającą (CDT), podobną do toksyny produkowanej przez *H. pylori*. Toksyna ta powoduje wakuolizację komórki, nieprawidłowości w budowie cytoszkieletu oraz zahamowanie cyklu komórkowego [Young i wsp., 2000]. W związku z tym, że kurczęta są głównym rezerwuarem *Campylobacter jejuni* i stanowią źródło zakażenia dla ludzi, przypuszcza się, że kurczęta zakażone *Helicobacter pullorum* także mogą stanowić zagrożenie dla człowieka [Fox, 2002; Solnick i Schauer, 2001]. W związku z trudnością w różnicowaniu *Campylobacter* od *Helicobacter* za pomocą rutynowych testów biochemicznych – zakażenia u ludzi, wywołane spożyciem niedogotowanego mięsa, rozpoznane jako infekcje *Campylobacter*, mogą być błędnie zdiagnozowane [Fox, 2002].

Helicobacter canadensis

Ostatnio w Kanadzie w 4 przypadkach drobnoustroje wcześniej rozpoznane jako *Helicobacter pullorum*, na podstawie badań molekularnych, w których wykazano znaczne różnice w sekwencji DNA, określono jako *Helicobacter canadensis*. Ich rezerwuarem był drób. Drobnoustroje te charakteryzują się niewytwarzaniem cytoletalnej toksyny

rozsiewającej (CDT), opornością na kwas nalidyksowy oraz brakiem zdolności do hydrolizy octanu indoksyli [Fox, 2002; Fox i wsp., 2000].

Helicobacter rappini

Obecność *Helicobacter rappini* (zwanego dawniej *Flexispira rappini*) po raz pierwszy wykazano u osób z przewlekłą biegunką i u ich zwierząt domowych [Derwish i wsp., 2000]. Następnie stwierdzono, że bakterie te występują powszechnie w jelitach u małych gryzoni. Drobnoustroje te wywołują bakterieję, co udowodniono zakażając eksperymentalnie świnki morskie, u których po 15 tyg. wyhodowano *H. rappini* z krwi [Fox, 2002; Schauer i wsp., 1993; Solnick i Schauer, 2001].

Helicobacter westmeadii

Helicobacter westmeadii został wyhodowany z krwi 2 chorych zakażonych wirusem HIV. Jest to drobnoustrój bardzo podobny pod względem morfologicznym i biochemicznym do *H. cinaedi*. Gatunki te różnicowano na podstawie badań molekularnych oraz zdolności wzrostu w warunkach beztlenowych, jaką wykazuje *Helicobacter westmeadii* [Fox, 2002; Trivett-Moore i wsp., 1997].

Helicobacter bilis

Helicobacter bilis początkowo stwierdzano w żółci, wątrobie i jelitach dorosłych myszy. Następnie został wyizolowany u psów, kotów i szczurów. W wyniku eksperymentalnego zakażenia tym drobnoustrojem myszy i szczurów z niedoborem odporności dochodziło do rozwoju zespołu nadwrażliwego jelita i zapalenia wątroby. *Helicobacter bilis* wykryto także w żółci i pęcherzyku żółciowym u mieszkańców Chile z chronicznym zapaleniem woreczka żółciowego. Wskazuje to na udział tej bakterii w rozwoju chorób wątroby i dróg żółciowych u ludzi [Fox i wsp., 1998; Zhongming i wsp., 2001].

Helicobacter hepaticus

Został odkryty w 1992 r. przez patologów Narodowego Instytutu Raka w USA [Ward, 1994]. Jest to najlepiej poznany gatunek wątrobowo-jelitowy. U myszy wywołuje zapalenie jelita grubego oraz guzy w wątrobie (hepatocellular tumor). Stanowi także zagrożenie dla człowieka. W przebiegu zakażenia u myszy obserwowano ogniskowe, nieropne, nekrotyczne zapalenie wątroby, przechodzące w postać przewlekłą, z hiperplazją komórek wątrobowych oraz zmianami zapalnymi i nekrotycznymi w drogach żółciowych. Sposób w jaki *Helicobacter hepaticus* przemieszcza się z jelita do wątroby, nie jest poznany. Sugerowano, że drobnoustroje te mogą wnikać do wątroby z makrofagami tkankowymi i rozprzestrzeniać się drogą naczyń krwionośnych do przewodów żółciowych. Potencjalnym czynnikiem wirulencji *H. hepaticus* jest cytoletalna toksyna rozciągająca. Bakteria ta ma także drugi mechanizm cytotoksyczny, tzw. cytotoksynę granulocytarną, która jest białkiem termolabilnym i powoduje wakuolizację komórek wątroby [Young i wsp., 2000].

Właściwości biochemiczne wybranych gatunków *Helicobacter*
(„+”- reakcja dodatnia, „-” – reakcja ujemna)
Biochemical properties of selected *Helicobacter* spp.
(„+” – positive reaction, „-” – negative reaction)

<i>Helicobacter</i> spp.	Wytwarzanie Production of				Redukcja azotu Nitrogen reduction	Hydroliza Hydrolysis of	
	katalazy catalase	oksydazy oxidase	ureazy urease	gamma-glu- tamylotrans- peptydazy gamma-glu- tamylotranspe- ptidase		fosfatazy alkalicznej alcaline phos- phatase	octanu indoksyłu indoxyl acetate
<i>H. pylori</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>H. felis</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>H. salomonis</i>	+	+	+	brak danych no data	+	+	+
<i>H. bizzozeronii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. mustelae</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. canis</i>	-	+	-	brak danych no data	-	+	+
<i>H. fennelliae</i>	+	+	-	-	-	+	-
<i>H. cinaedi</i>	+	+	-	-	+/-	-	-
<i>H. pullorum</i>	+	+	-	brak danych no data	+	-	-
<i>H. rappini</i>	+	+	+	+	-	-	brak da- nych no data
<i>H. bilis</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. hepaticus</i>	+	+	+	-	+	-	+

Bakterie z rodzaju *Helicobacter* w żołądku psów i kotów

W 1881 roku Rappin opublikował pierwsze doniesienie o występowaniu spiralnych bakterii w żołądku zwierząt mięsożernych. W 1893 roku zostało to potwierdzone przez Bizzozero, który wykazał ich obecność w błonie śluzowej żołądka psów. Z kolei w 1896 roku Salomon opisał występowanie spiralnych drobnoustrojów u psów, kotów i szczurów [Lecoindre i wsp., 2000; Salomon, 1896]. W 1911 roku wykazano obecność bakterii kształtu spiralnego w śluzie żołądkowym zdrowych psów i nazwano je *Spirochetæ regaudi* [Weber, 1958].

Po potwierdzeniu obecności drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* (GHLO – gastric *Helicobacter* – like organisms) w żołądkach psów i kotów podjęto próbę ich sklasyfikowania w oparciu o wygląd kolonii, sekwencję RNA, profil białkowy oraz wygląd w mikroskopie elektronowym. Na tej podstawie potwierdzono obecność w żołądku psów –

Helicobacter felis, *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter billis*, *Flexispira rappinii* oraz *Helicobacter salomonis*, a u kotów *Helicobacter felis*, *Helicobacter heilmannii* i *Helicobacter pylori* [Lecoindre i wsp., 2000; Norris i wsp., 1999; Simpson, 1999; Simpson i Burrows, 1997; Sobczyńska-Rak i Różańska, 2004; Strauss-Ayali i Simpson, 1999]. W opinii niektórych autorów *Helicobacter bizzozeronii* spotykany w żołądku psów jest tożsamy z *Helicobacter heilmannii* stwierdzanym u ludzi [Meining i wsp., 1998].

Zakażenia *Helicobacter* spp. w żołądku psów i kotów należą do powszechnie spotykanych. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono obecność tych drobnoustrojów w tym narządzie, u: 60–86% losowo wybranych kotów, 57–76% kotów z objawami wymiotów, 67–86% klinicznie zdrowych psów, 74–80% psów z objawami wymiotów oraz u 100% zdrowych psów rasy beagle [Happonen i wsp., 2000; Jergens, 2002; Konturek, 1996; Simpson, 1999; Simpson i Burrows, 1997]. Drobnoustroje te izolowano z błony śluzowej żołądka zwierząt zdrowych, jak i z błony śluzowej żołądka objętego procesem chorobowym. Bakterie te spotykano zarówno w części wpustowej, dennej, trzonie, jak i w części odźwiernikowej żołądka [Happonen i wsp., 1998; Henry i Long, 1987; Hermanns i wsp., 1995; Lecoindre i wsp., 2000; Simpson i Burrows, 1997; Simpson, 1999; Simpson i wsp., 1999; Simpson i wsp., 2000; Yamasaki i wsp., 1998].

Coraz częściej pojawiają się opinie, że psy i koty mogą być rezerwuarem tych drobnoustrojów i stanowić źródło zakażenia dla ludzi [Heatley, 1999; Simpson i Burrows, 1997].

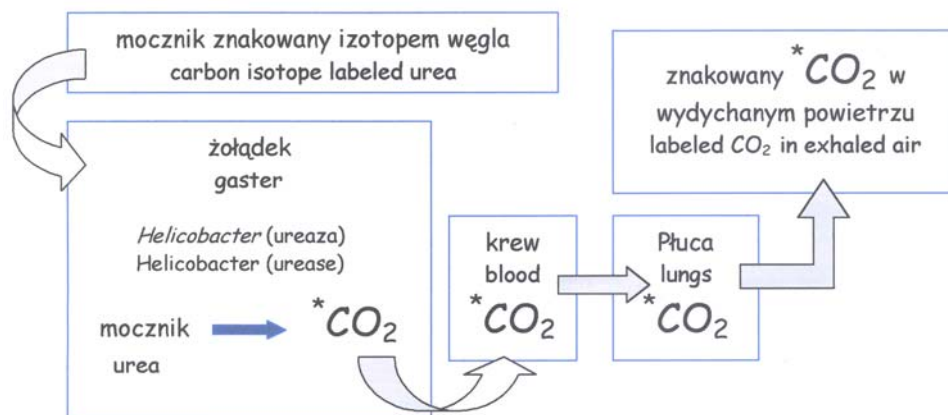
Dotychczas nie wyjaśniono jednoznacznie roli zakażeń *Helicobacter* spp. w rozwoju chorób żołądka u psów i kotów. Stan wiedzy na ten temat jest niewystarczający, a samo zagadnienie nadal aktualne.

Wykrywanie zakażeń *Helicobacter pylori* u ludzi

Do wykrywania zakażeń *Helicobacter pylori* u ludzi stosowane są metody inwazyjne – związane z wykonaniem gastrokopii i pobraniem wycinków błony śluzowej do dalszych badań laboratoryjnych oraz metody nieinwazyjne, takie jak: ureazowy test oddechowy, badania serologiczne, wykrywanie obecności bakterii w kale.

Ureazowy test oddechowy (UBT, urea breath test)

Polega na wykrywaniu aktywności ureazy wytwarzanej przez *H. pylori*, która rozkłada wprowadzony do żołądka mocznik, znakowany izotopami węgla ^{13}C (trwały, nieradioaktywny) lub ^{14}C (słabo radioaktywny). Powstały w wyniku hydrolizy substratu $^{13}\text{CO}_2$ lub $^{14}\text{CO}_2$, po przeniknięciu przez warstwę śluzu i nabłonek żołądka, dostaje się do krwioobiegu, a następnie z krwią do płuc i jest wydychany z powietrzem, gdzie można go wykryć za pomocą odpowiednich urządzeń. Izotop ^{14}C wykrywany jest za pomocą zwykłych liczników scyntylicyjnych, dostępnych w większości szpitali, jednak ze względu na radioaktywność jego zastosowanie ma pewne ograniczenia. Z kolei pomiar stężenia całkowicie bezpiecznego izotopu ^{13}C wymaga specjalistycznego sprzętu – spektografu masowego [Logan, 1998; Heatley, 1999].



Ryc. 2. Zasada działania ureazowego testu oddechowego
Fig. 2. Mechanism of breath urease test action

Badania serologiczne

Polegają na wykrywaniu przeciwciał przeciwko antygenom *H. pylori*, głównie klasy IgG i IgA [Aceti i wsp., 1991; Andersen i wsp., 1996; Crabtree, 1996; Gościński, 1992; Jagusztyn-Krynicka i wsp., 2005; Rechciński i wsp., 1997]. W tym celu opracowano nieinwazyjne testy wykorzystujące różne odczyny serologiczne: hemaglutynację bierną [Nilius i wsp., 2001], szybką aglutynację lateksową [Lozniewski i wsp., 1996], immunofluorescencję [Best i wsp., 1992]. Obecnie najczęściej stosowany jest test ELISA [Goodwin i wsp., 1987] oraz technika Western-blot [Faulde i wsp., 1993]. Materiałem biologicznym, w którym wykrywane są przeciwciała anty-*Helicobacter pylori*, mogą być: pełna krew, surowica, ślina, sok żołądkowy, moczu oraz kał [Alemohammad i wsp., 1993; Birkholz i wsp., 1998; Gościński, 1992; Luzzza i wsp., 1995; Nilsson i wsp., 2000; Reilly i wsp., 1997; Tinnert i wsp., 1998]. W ocenie uzyskanych wyników należy wziąć pod uwagę, że przeciwciała wykrywane są jeszcze przez pewien czas po skutecznej likwidacji drobnoustrojów z żołądka [Dzieniszewski i Jarosz, 2000; Heatley, 1999; Konturek i wsp., 1996; Travis i wsp., 2000]. Zaletą badań serologicznych, na podstawie których oceniana jest ogólnoustrojowa odpowiedź organizmu na zakażenie pałeczkami *Helicobacter pylori*, w porównaniu do metod wykorzystujących wycinki błony śluzowej żołądka, jest możliwość uniknięcia wyników fałszywie ujemnych przy głębszym umiejscowieniu w niej drobnoustrojów i jednocześnie zbyt powierzchownym pobraniu bioptatów oraz zredukowanej ich liczbie, w wyniku przyjmowania leków.

Wykrywanie obecności *Helicobacter pylori* w kale

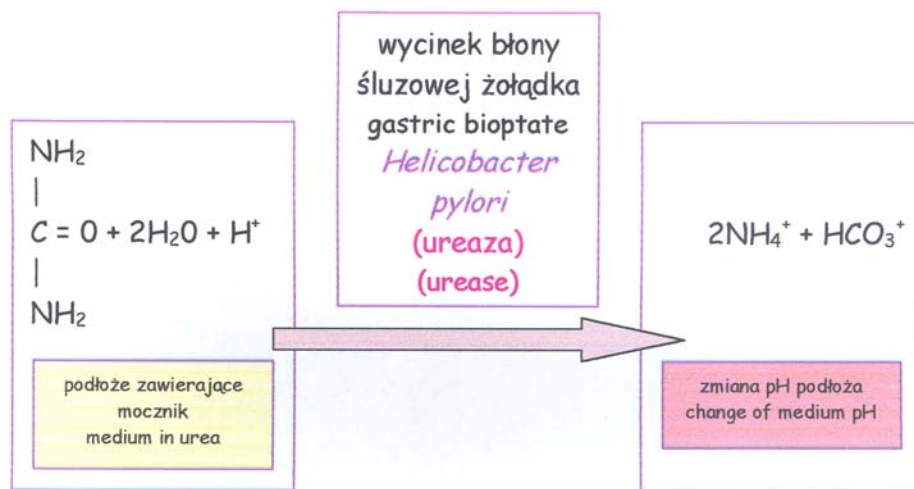
W tym celu wykonywano posiew kału i drobnoustroje hodowano na sztucznych podłożach, w określonych warunkach. Jednak takie postępowanie obecnie jest rzadko stosowane ze względu na niską jego czułość, która wynosi od 30 do 50% [Heatley, 1999].

Obecnie prowadzone są prace nad opracowaniem metodyki badania kału techniką PCR [Shubert i wsp., 2002]. Wykrywanie materiału genetycznego bakterii *Helicobacter pylori* w kale, za pomocą PCR, może być pomocne nie tylko w rozpoznawaniu zakażeń tymi drobnoustrojami, ale także w monitorowaniu skuteczności leczenia eradykacyjnego.

Wykrywanie obecności *Helicobacter pylori* w wycinkach błony śluzowej żołądka

Szybki test ureazowy

Zasada testu opiera się na wykrywaniu aktywności ureazy wytwarzanej przez *Helicobacter pylori*. Enzym ten rozkłada mocznik zawarty w podłożu do amoniaku. Jony amonowe (NH_4^+) powodują alkalizację środowiska, zmieniając barwę dodanego do podłoża wskaźnika. Najczęściej stosowanym wskaźnikiem jest czerwień fenolowa, która przy wzroście pH zmienia barwę z żółtej na różową lub czerwoną. Obecnie najczęściej stosowane są testy paskowe, w których nośnikiem substratu i indykatora jest bibuła [Malfertheiner i wsp., 1997; Rogge i wsp., 1995; Yousfi i wsp., 1997]. Na paski bibułowe nanoszone są wycinki błony śluzowej, następnie dodawane są 2 krople wody destylowanej lub płynu fizjologicznego i po określonym przez producenta testu czasie odczytywany jest wynik.



Ryc. 3. Zasada działania testu ureazowego z wycinkiem błony śluzowej żołądka
Fig. 3. Principle of urease test action with gastric biopstat

Badanie histopatologiczne

W celu uwidocznienia bakterii o charakterystycznym spiralnym kształcie na powierzchni komórek nabłonkowych i w śluzie pokrywającym błonę śluzową żołądka preparaty barwione są metodą Giemsy lub metodą Warthin-Starry'ego z użyciem srebra [Dzieniański i Jarosz, 2000; Heatley, 1999; Konturek, 1996; Travis i wsp., 2000]. Zadaniem badania histopatologicznego jest także określenie zmian w błonie śluzowej i w tym celu najczęściej preparaty barwione są hematoksyliną i eozyną [Glupczyński, 1994; Sapieryński i Malicka, 2004]. Przy zapaleniu ostrym błony śluzowej żołądka nacieki zapalne tworzą neutrofile, a przy zapaleniu przewlekłym limfocyty i komórki plazmatyczne [Lee i Megraud, 1996].

Należy podkreślić, że obecnie w rozpoznawaniu i ocenie zapaleń błony śluzowej żołądka u ludzi stosowana jest wyłącznie klasyfikacja Sydney, opracowana na IX Światowym Kongresie Gastroenterologii w 1990 r. w Sydney [Dixon i Sobala, 1992; Sapieryński i Malicka, 2004]. System ten został udoskonalony w 1994 r. podczas obrad w Houston (Houston Gastritis Workshop). Uwzględnia on obraz endoskopowy i histologiczny błony śluzowej żołądka. W opisie histologicznym zawarta jest część etiologiczna, topograficzna i morfologiczna.

Badanie mikrobiologiczne

Wycinki błony śluzowej żołądka posiewane są na podłoża mikrobiologiczne (np. Brucella agar, Columbia agar) wzbogacone 7–10% dodatkiem zhemolizowanej krwi końskiej lub baraniej. Do podłoża dodawane są także antybiotyki, takie jak: amfoterycyna B, wankomycyna, polimiksyna oraz timetoprim, które ograniczają wzrost flory towarzyszącej. Inkubacja posianych płytek prowadzona jest w temp. 37 °C, w warunkach mikroaerofilnych, przez 7–10 dni. Wyhodowane drobnoustroje klasyfikowane są na podstawie wyglądu kolonii, testów biochemicznych i oznaczana jest ich wrażliwość na antybiotyki [Dzieniański i Jarosz, 2000; Happonen i wsp., 1998; Heatley, 1999].

Inne możliwości wykrywania zakażeń *Helicobacter pylori*

W celu wykrywania zakażenia *Helicobacter pylori* może mieć także zastosowanie badanie wycinków błony śluzowej żołądka techniką PCR [Bamford i wsp., 1998; Hammar i wsp., 1992] oraz w mikroskopii elektronowej [Sapieryński i Malicka, 2003; Sapieryński i Malicka, 2005; Sapieryński i wsp., 2003; Simpson i wsp., 1999].

Wykrywanie zakażeń *Helicobacter* spp. u psów i kotów

Spśród nieinwazyjnych metod wykrywania zakażeń żołądka *Helicobacter* spp. u psów stosowano ureazowy test oddechowy [Cornetta i wsp., 1998] oraz badania serologiczne [Strauss-Ayali i wsp., 1999]. Najczęściej jednak, u tych gatunków zwierząt domowych, do tego celu wykorzystywane są metody inwazyjne.

Odkrycie przez Warrena i Marshalla związku między kolonizacją błony śluzowej żołądka i dwunastnicy drobnoustrojami *Helicobacter pylori* a przewlekłym zapaleniem i wrzodami tych narządów u ludzi – w znaczący sposób zmieniło dotychczasowe podej-

ście do tych chorób, przede wszystkim w aspekcie diagnostycznym i terapeutycznym. Od tego momentu w leczeniu ww. chorób, oprócz preparatów zobojętniających pH soku żołądkowego oraz zmniejszających wydzielniczość błony śluzowej zaczęto stosować leki przeciwbakteryjne skierowane przeciwko *Helicobacter pylori* – jest to tzw. postępowanie eradykacyjne. W związku z tym, że bakteria ta została uznana za czynnik uszkodzający błonę śluzową żołądka i dwunastnicy, co w konsekwencji może prowadzić m.in. do rozwoju zapalenia, wrzodów oraz nowotworów tych narządów, w postępowaniu diagnostycznym zaczęto poszukiwać metod służących do wykrywania zakażenia tym drobnoustrojem. Wynikiem tego jest opracowanie i ciągle doskonalenie inwazyjnych i nieinwazyjnych metod rozpoznawania infekcji *Helicobacter pylori* u ludzi [Heatley, 1999; Malferheiner i wsp., 1997; Simpson i Burrows, 1997; Wiśniewska 2003].

Od momentu poznania niekorzystnego wpływu *Helicobacter pylori* na błonę śluzową żołądka u ludzi rozpoczęto poszukiwania drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* u zwierząt, w tym zwłaszcza u psów i kotów. Pomimo badań, które wykazały, że drobnoustroje *Helicobacter* spp. w błonie śluzowej żołądka psów i kotów występują powszechnie, do dnia dzisiejszego nie wyjaśniono jednoznacznie ich patogenego wpływu na rozwój chorób żołądka u tych zwierząt [Hwang i wsp., 2002; Sapieryński i Malicka, 2003; Simpson i Burrows, 1997; Wiinberg i wsp., 2005].

2. CEL BADAŃ

Celem badań było:

- 1) określenie częstości występowania drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* w żołądku psów i kotów,
- 2) zastosowanie i ocena przydatności inwazyjnych metod rozpoznawania zakażeń żołądka bakteriami *Helicobacter* spp. u psów i kotów,
- 3) identyfikacja gatunkowa spiralnych drobnoustrojów stwierdzanych w żołądku psów i kotów,
- 4) określenie roli drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* w powstawaniu zmian patologicznych żołądka psów i kotów.

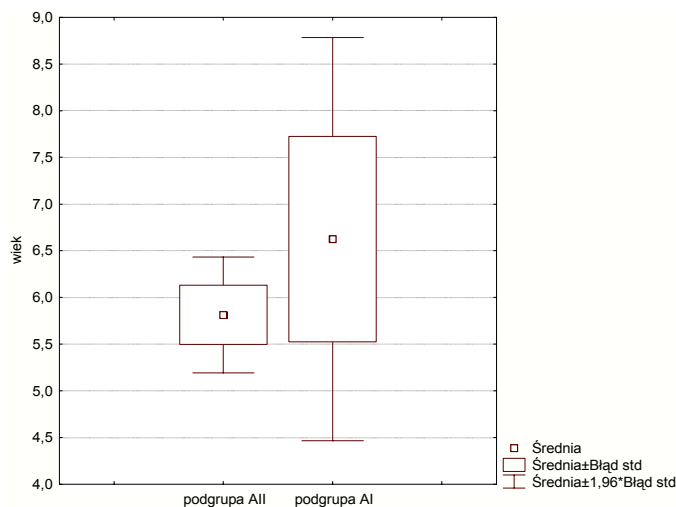
3. MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 241 zwierząt, które podzielono na dwie grupy A i B. Grupę A stanowiło 157 psów, a grupę B – 84 koty. Zarówno w grupie A, jak i w grupie B utworzono dwie podgrupy: I i II. W ten sposób powstały cztery podgrupy: AI, AII oraz BI i BII.

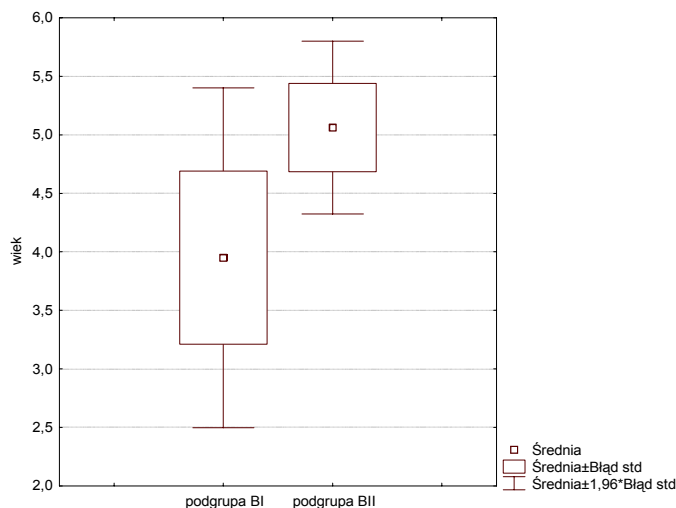
Podgrupy AI i BI (kontrolne) utworzono ze zwierząt zdrowych, u których na podstawie wywiadu, badania klinicznego, wyników badań hematologicznych i biochemicznych krwi nie stwierdzono żadnych zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu oraz podczas badania endoskopowego (ocena makroskopowa) nie obserwowano zmian w błonie śluzowej żołądka, uznając ją za normotypową.

Podgrupy AII i BII (doświadczalne) utworzono ze zwierząt z objawami dyspeptycznymi wskazującymi na choroby żołądka (wymioty o różnym charakterze, zmniejszony lub brak apetytu, postępująca utrata masy ciała, *fētor ex ore*, bolesność okolicy żołądka). Do podgrup tych włączono także zwierzęta nie wykazujące powyższych objawów klinicznych, ale u których podczas gastroskopii obserwowano makroskopowe zmiany w błonie śluzowej wskazujące na zapalenie żołądka.

Podgrupa AI liczyła 20 psów, różnej rasy i płci, w wieku od 6 mies. do 17 lat; AII – 137 psów, różnej rasy i płci, w wieku od 2 mies. do 17 lat; BI – 20 kotów, różnej rasy i płci, w wieku od 6 mies. do 12 lat, a BII – 64 koty, różnej rasy i płci, w wieku od 6 mies. do 13 lat.



Ryc. 4. Rozkład wieku psów w podgrupach AI i AII
Fig. 4. Age range in dogs in subgroups AI and AII



Ryc. 5. Rozkład wieku kotów w podgrupach BI i BII
 Fig. 5. Age range in cats in subgroups BI and BII

Badania laboratoryjne krwi

W badaniach hematologicznych krwi oznaczano: liczbę leukocytów (WBC), erytrocytów (RBC), liczbę hematokrytową (Hct, Ht), poziom hemoglobiny (HGB, Hb), a w badaniach biochemicznych: aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT, GPT), aminotransferazy asparaginianowej (AST, GOT), fosfatazy alkalicznej (ALP, AP, FA) oraz poziom mocznika i kreatyniny. Przyjęto następujące wartości referencyjne (Laboratorium Analityczne Katedry Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów AR we Wrocławiu): dla psów – WBC 7,0–15 G/l; RBC 5,5–8,9 T/l; Hct 0,37–0,55 l/l; HGB 7,5–11,8 mmol/l; ALT 9–70 U/l; AST 5–50 U/l; ALP 20–155 U/l; mocznik 3,3–8,9 mmol/l; kreatynina 88–159 μ mol/l; dla kotów – WBC 6,5–19,5 G/l; RBC 5,5–10,0 T/l; Hct 0,25–0,47 l/l; HGB 5,0–10,6 mmol/l; ALT 20–107 U/l; AST 21–56 U/l; ALP 23–107 U/l; mocznik 5,4–10,4 mmol/l; kreatynina 80–229 μ mol/l.

Badania hematologiczne wykonano aparatem ABX MICROS 60-OT, a badania biochemiczne aparatem POINT 80.

Badania radiologiczne i ultrasonograficzne jamy brzusznej

Zwierzęta z podgrup AII i BII z objawami klinicznymi, przed wykonaniem gastrokopii, kierowano do pracowni radiologicznej w celu wykonania badania radiologicznego i/lub ultrasonograficznego jamy brzusznej. Badania radiologiczne wykonano aparatem Multax 320 (XD – 18), a badania ultrasonograficzne aparatem Hitachi EUB 405, za pomocą głowicy elektronicznej konweksowej 5 MHz.

Badanie endoskopowe żołądka

Przygotowanie sprzętu endoskopowego

Gastroskopia wykonywana fiberoskopem pediatrycznym Olympus GIF XQ 20 (długość robocza 100 cm, średnica 9,8 mm). Wycinki błony śluzowej żołądka pobierano szczypcami biopsyjnymi Olympus FB-25-K-1 oraz FB-24KR-1. Przed badaniem sprzęt myto i odkażano zgodnie z przyjętymi następującymi zasadami:

- a) *mycie i dezynfekcja fiberoskopu* – wykonywane były w ręcznej myjni endoskopowej Olympus TD – 20 i obejmowały:
 - sprawdzenie szczelności fiberoskopu za pomocą testera szczelności OES Olympus MB – 155,
 - odłączenie zaworów wodno-powietrznego i ssącego od fiberoskopu,
 - umieszczenie fiberoskopu w myjni w 0,8% roztworze detergentu enzymatycznego CIDENZIME*,
 - podłączenie fiberoskopu do zaworów pompy myjni,
 - mycie endoskopu od zewnątrz,
 - kilkakrotne przepłukanie kanałów wodno-powietrznego i roboczego fiberoskopu roztworem detergentu,
 - czyszczenie kanału roboczego za pomocą szczoteczki przeznaczanej do tego celu,
 - ponowne przepłukanie kanałów wodno-powietrznego i roboczego fiberoskopu roztworem detergentu,
 - opróżnienie myjni z roztworu detergentu i nalanie do niej wody destylowanej,
 - przepłukanie kanałów wodno-powietrznego i roboczego fiberoskopu wodą destylowaną,
 - opróżnienie myjni z wody destylowanej,
 - przedmuchiwanie kanałów wodno-powietrznego i roboczego fiberoskopu,
 - nalanie do myjni preparatu przeznaczonego do odkażania sprzętu endoskopowego – CIDEX SOLUTION,
 - przepłukanie kanałów wodno-powietrznego i roboczego fiberoskopu roztworem CIDEX SOLUTION,
 - pozostawienie zanurzonego w ww. środku odkażającym fiberoskopu na minimum 20 minut (maksymalnie 10 godz.),
 - osuszenie fiberoskopu od zewnątrz i przedmuchiwanie kanałów wodno-powietrznego i roboczego,
 - spłukanie endoskopu od zewnątrz i przepłukanie kanału roboczego jałowym płynem fizjologicznym,
 - przepłukanie zaworów wodno-powietrznego i ssącego w jałowym płynie fizjologicznym i podłączenie ich do fiberoskopu.
- b) *mycie i dezynfekcja szczypiec biopsyjnych*:
 - wstępne mycie w 0,8% roztworze detergentu enzymatycznego CIDENZIME*,
 - mycie w myjni ultradźwiękowej BANDELIN SONOREX RK 100 przez 10 min,
 - płukanie w wodzie destylowanej,

- odkazanie w roztworze CIDEX SOLUTION przez minimum 20 min (w myjni endoskopowej razem z fiberoskopem),
- osuszenie i przepłukanie w jałowym płynie fizjologicznym.

Przygotowanie pacjenta

Gastroskopię wykonywano po 24-godzinnej głodówce oraz 6-godzinnej przerwie w podawaniu płynów bezpośrednio przed wziernikowaniem.

Endoskopię wykonywano w znieczuleniu ogólnym. U psów stosowano znieczulenie złożone, w którym do premedykacji pacjenta wykorzystywano ksylazynę w dawce 1–2 mg/kg m.c. z atropiną w dawce 0,05 mg/kg m.c., podawane w jednej domięśniowej iniekcji. Po 10–15-minutowej przerwie do znieczulenia głównego stosowano tiopental, podawany dożylnie, w dawce początkowej 5 mg/kg m.c., a następnie wg efektu działania. Do znieczulenia miejscowego błony śluzowej gardła stosowano 2% roztwór lignokainy. W oparciu o ocenę odruchów: powiekowego, źrenicowego, rogówkowego oraz krtańniowo-gardłowego kontrolowano głębokość znieczulenia i adekwatnie uzupełniano anestetyk główny. U kotów natomiast do znieczulenia ogólnego stosowano ksylazynę w dawce 1–2 mg/kg m.c., atropinę w dawce 0,05 mg/kg m.c. oraz ketaminę w dawce 10–20 mg/kg m.c. (w jednej iniekcji domięśniowej).

Gastroskopię przeprowadzano u zwierzęcia leżącego na lewym boku. Podczas gastroskopii pobierano szczypcami biopsyjnymi z trzonu i części odźwiernikowej żołądka wycinki błony śluzowej do dalszych badań laboratoryjnych. Z trzonu żołądka pobierano: 1–2 biopaty do badań mikrobiologicznych, 1 – na szybki test ureazowy, 1–2 do badań PCR, 1–2 do badań histopatologicznych, 1–2 do badań w mikroskopie elektronowym. Analogiczną liczbę wycinków, z takim samym przeznaczeniem, pobierano także z części odźwiernikowej żołądka.

Wycinki umieszczano w zależności od przeznaczenia:

- szybki test ureazowy – na krążku bibułowym testu i zalewano jałowym płynem fizjologicznym (2 krople),
- badania mikrobiologiczne (hodowla i bezpośredni preparat bakteriologiczny) – w jałowym płynie fizjologicznym w jałowych probówkach i do 2 godz. dostarczano do pracowni mikrobiologicznej lub w podłożach transportowych PORTAGERN PYLORI i wówczas do kilku godz. dostarczano do pracowni mikrobiologicznej,
- badania PCR – w jałowych probówkach i zamrażano w temp. –18 °C,
- badania histopatologiczne – w specjalnych pojemnikach przeznaczonych do tego celu i zalewano 10% zbuforowanym roztworem formaliny,
- badania w mikroskopie elektronowym – w szklanych buteleczkach i zalewano aldehydem glutarowym.

Badanie mikrobiologiczne pobranych bioptatów

Zakażenie *Helicobacter* spp. ustalano na podstawie badania bakteriologicznego wycinków błony śluzowej żołądka w oparciu o:

Szybki test ureazowy

Dwa wycinki błony śluzowej żołądka (jeden z części odźwiernikowej i jeden z trzonu), bezpośrednio po pobraniu, nakładano na bibułowy krążek szybkiego testu ureazowego (producent – Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie) i zalewano 2 kroplami jałowego płynu fizjologicznego. Wyniki testu odczytywano po 30 min i po 1 godz. inkubacji w temp. 37 °C. Zmiana zabarwienia krążka z żółtej na czerwoną świadczyła o wytwarzaniu przez drobnoustroje obecne w biopatach enzymu ureazy, co jest charakterystyczne dla większości szczepów *Helicobacter* spp.

Zasada testu

Ureaza hydrolizuje zawarty w krążku bibułowym mocznik do dwutlenku węgla i amoniaku, powodując alkalizację środowiska, a co za tym idzie, zmianę zabarwienia wskaźnika, którym jest czerwień fenolowa, z żółtej na różową lub czerwoną.

Bezpośredni preparat bakteriologiczny

Z wycinków błony śluzowej z części odźwiernikowej i trzonu żołądka wykonywano preparaty bezpośrednie barwione metodą Grama.

Technika wykonania preparatu:

- 1) rozcięcie skrawka biopsyjnego między dwoma szkiełkami podstawowymi w kropli płynu fizjologicznego,
- 2) suszenie preparatu w temperaturze pokojowej, a następnie utwalenie w płomieniu palnika,
- 3) barwienie, używając kolejno następujących odczynników:
 - a) roztworu fioletu krystalicznego (10 ml nasyconego alkoholowego roztworu fioletu + 100 ml 1% fenolu) – czas barwienia 2 min.,
 - b) płynu Lugola (1 g jodu + 2 g jodku potasu + 300 ml wody destylowanej) – czas barwienia 1 min,
 - c) 90% alkoholu etylowego – czas barwienia 30 s,
 - d) fuksyny karbolowej rozcieńczonej w stosunku 1:10 – czas barwienia 15 s,
- roztwór A (fuksyna zasadowa 0,3 g + alkohol etylowy 10 ml),
- roztwór B (fenol 15 g + woda destylowana 95 ml),
- 4) wysuszenie preparatu w bibule.

Tak przygotowane preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 100x, poszukując spiralnie skręconych, zabarwionych na różowo bakterii. Przyjęto następujące kryteria oceny ilości bakterii:

- „+” – do 5 drobnoustrojów w polu widzenia,
- „++” – od 5 do 10 drobnoustrojów w polu widzenia,
- „+++” – powyżej 10 drobnoustrojów w polu widzenia.

Mikrobiologiczne badania hodowlane

Wycinki z części odźwiernikowej i trzonu żołądka poddawano homogenizacji i posiewano na następujące podłoża wzrostowe:

- 1) Columbia agar (firmy Difco) z dodatkiem 7% zhemolizowanej krwi końskiej,
- 2) Podłoże wybiórcze Columbia agar wzbogacone 7% dodatkiem zhemolizowanej krwi końskiej oraz *Helicobacter pylori*, selektywnym suplementem (Dent)

(firmy Oxoid), zawierającym wankomycynę – 5,0 mg, trimetoprim – 2,5 mg, cefsulodynę – 2,5 mg i amfoterycynę B – 2,5 mg,

- 3) podłoże wybiórcze Columbia agar z dodatkiem 7% zhemolizowanej krwi końskiej i wybiórczym suplementem (Skirrow), zawierającym wankomycynę – 5,0 mg, polimyksynę B – 1250 i.u. i trimetoprim – 2,5 mg.

Hodowlę inkubowano w temp. 37°C w warunkach mikroaerofilnych (10% CO₂, 85% N₂, 5% O₂), przez 5–6 dni. Wyodrębnione szczepy identyfikowano biochemicznie.

Różnicowanie biochemiczne wyizolowanych szczepów

Wyodrębnione szczepy identyfikowano na podstawie charakterystycznej dla *Helicobacter* spp. morfologii kolonii na podłożu wzrostowym, morfologii komórki w preparacie bezpośrednim oraz ich właściwości biochemicznych.

Z wszystkich wyhodowanych drobnych kolonii o morfologii wskazującej na wzrost *Helicobacter* spp. wykonywano preparat barwiony metodą Grama. W przypadku stwierdzenia Gram-ujemnych spiralnych drobnoustrojów materiał z ww. kolonii posiewano na następujące podłoża: agar z krwią, MacConkey'a, Columbia agar z dodatkiem 7% zhemolizowanej krwi końskiej, Columbia agar wzbogacone 7% dodatkiem zhemolizowanej krwi końskiej i *Helicobacter pylori* – selektywnym suplementem oraz Columbia agar wzbogacone 7% dodatkiem zhemolizowanej krwi końskiej i wybiórczym suplementem. Izolaty wysiane na agarze z krwią i podłożu MacConkey'a inkubowano w temp. 37 °C w warunkach tlenowych, a wysiane na podłożu Columbia w warunkach mikroaerofilnych, przez 3–5 dni.

W pierwszym etapie identyfikacji biochemicznej sprawdzano dla Gram-ujemnych mikroaerofilnych drobnoustrojów zdolność wytwarzania ureazy, katalazy i oksydazy.

Drobnoustroje, które wyrosły na podłożach kontrolnych (agar z krwią i podłożu MacConkey'a), nie należały do rodzaju *Helicobacter*. W związku z tym w dalszym etapie ich nie identyfikowano.

Wytwarzanie ureazy – test Christensena

Badanie przeprowadzano na podłożu zawierającym mocznik, opisanym przez Christensena, w modyfikacji Hormaeche'a i Munilla.

Skład podłoża:

Bacto tryptone	20,0 g
NaCl	5,0 g
woda destylowana	1000 ml
0,2% roztwór alkoholowy błękitu bromotymolowego	20 ml
0,2% roztwór alkoholowy czerwieni krezolowej	10 ml
mocznik	10,0 g

Badany szczep posiewano na podłoże i inkubowano w temp. 37 °C przez 24 godz. Dodatnim wynikiem testu była zmiana zabarwienia podłoża na kolor niebieski.

Zasada testu

Ureaza wytwarzana przez drobnoustroje hydrolizuje mocznik do dwutlenku węgla i amoniaku. Uwolniony amoniak alkalizuje hodowlę, w wyniku czego błękit bromotymolowy, wchodzący w skład podłoża, zmienia zabarwienie z zielonego na niebieskie.

Wytwarzanie katalazy

Wyzolowany szczep umieszczano na szkiełku podstawowym i nakrapiano niewielką ilość nadtlenu wodoru (H_2O_2). Przy próbie dodatkowo obserwowano uwalnianie pęcherzyków tlenu.

Zasada testu

Katalaza wytwarzana przez drobnoustroje rozkłada nadtlenek wodoru do tlenu i wody.

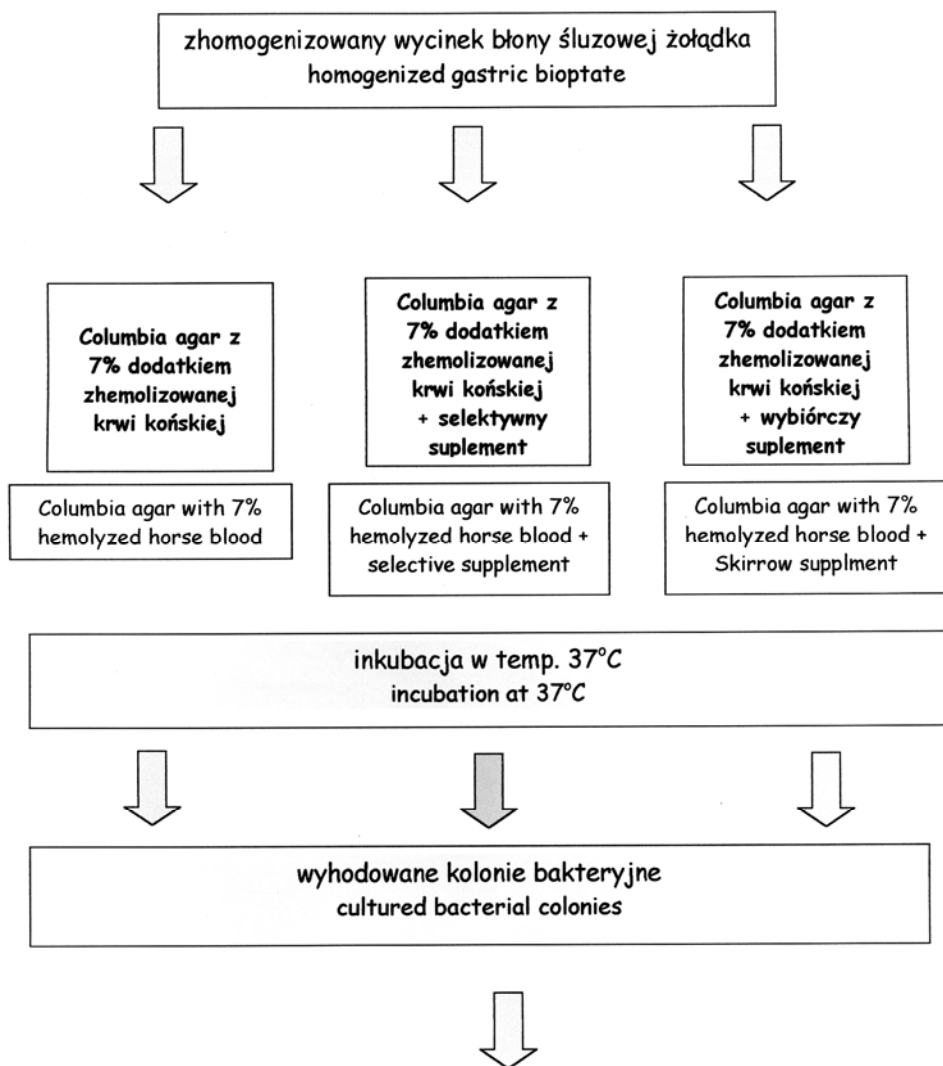
Wytwarzanie oksydazy cytochromowej

W tym celu użyto testu firmy OXOID w postaci patyczków. Jeden koniec patyczka nasączony jest roztworem szczawianu N,N-dimetylo-p-fenylo-diaminy, roztworem α -naftolu i kwasem askorbinowym. Do testu używano 3–4-dniowej hodowli na podłożu Columbia z 7% dodatkiem zhemolizowanej krwi końskiej. Końcem patyczka zbierano delikatnie masę bakteryjną i po 30 s sprawdzano jego zabarwienie. Przy braku zmiany zabarwienia ocenę powtarzano ponownie po 3 min. Zmiana zabarwienia na kolor fioletowy świadczyła o wytwarzaniu oksydazy cytochromowej.

Zasada testu

Oksydaza indofenolowa (cytochrom c) wytwarzana przez niektóre drobnoustroje utlenia p-fenylo-diaminę do formy zredukowanej i do barwnego produktu oksydacji.

W drugim etapie identyfikacji biochemicznej wykorzystano automatyczny test API Camp. (BIO MERIEUX), który produkowany jest w postaci paska z tworzywa, na którym znajduje się 20 mikroprobówek zawierających odwodnione substraty. Z testu API Camp. (BIO MERIEUX) w identyfikacji szczepów *Helicobacter* wykorzystano zdolność: wytwarzania ureazy, hydrolizy alkalicznej fosfatazy oraz redukcji azotu. Zawiesinę czystej hodowli rozlewano do probówek znajdujących się na pasku i inkubowano w warunkach mikroaerofilnych przez 3 dni, w temp. 37 °C. Wynik reakcji określano na podstawie zmiany zabarwienia wskaźników.





Ryc. 6. Schemat mikrobiologicznych badań hodowlanych w kierunku *Helicobacter* spp.
Fig. 6. Diagram of bacteriological culture examinations towards *Helicobacter* spp.

Badanie PCR pobranych bioptatów

Do wykrywania i gatunkowego oznaczania szczepów z rodzaju *Helicobacter*, oprócz klasycznej metody PCR, zastosowano również techniki nested-PCR i seminested-PCR, natomiast do izolacji DNA – technikę odwracalnego wiązania na złożach silikonowych. Na wybór metod wpływ miały:

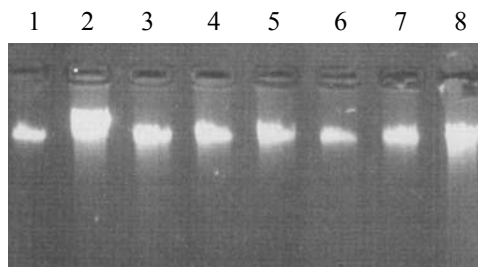
- Niewielka ilość pobieranego materiału.
Wycinki żołądka pobierane od kotów i psów są małe (najczęściej poniżej 10 mg), a intensywność ich zakażenia bakteriami z rodzaju *Helicobacter* może się wahać w szerokich granicach, choć najczęściej nie jest wysoka. Przyjęto zatem, że w badanych wycinkach może występować jedynie po kilka komórek *Helicobacter* spp.
- Ograniczona możliwość hodowli tych drobnoustrojów na podłożach mikrobiologicznych.
W klasycznych procedurach mikrobiologicznych badany materiał umieszcza się w odpowiednio dobranej pożywce, umożliwiającej namnożenie poszukiwanego patogenu w ilościach pozwalających na dalszą identyfikację. W przypadku rodzaju *Helicobacter* – na podłożach mikrobiologicznych zazwyczaj możliwe jest namnożenie jedynie *H. pylori*, który jednak stosunkowo rzadko występuje u psów i kotów. Natomiast najczęściej spotykane gatunki *H. heilmannii* i *H. felis* bardzo trudno hodować *in vitro*.

Izolacja DNA z badanego materiału

Do izolacji DNA z badanych wycinków dla pierwszych 23 prób stosowano kolumny oraz zestaw odczynników "QIAamp DNA mini" (nr kat. 51304) firmy QIAGEN. Poczynając od wycinka oznaczonego nr 24, wymienione materiały zastąpiono zestawami „Genomic mini” (nr kat. 116-250) firmy A&A BIOTECHNOLOGY, po uprzednim przeprowadzeniu testów, które wykazały zamienność obu zestawów, przy jednoczesnym lekkim podniesieniu wydajności izolacji DNA. Procedurę izolacji DNA prowadzono zgodnie z zaleceniami obu producentów. Poniżej podano najważniejsze etapy, jednakowe dla obu metod postępowania:

- Badane wycinki tkanek trawione są proteinazą K w temp. 50 °C – 56 °C przez ok. 3 godz. W tym czasie tkanki ulegają całkowitej maceracji, uwalniając pojedyncze, budujące komórki,
- Uwolnione komórki lizowane są detergentem w temp. 70 °C – 75 °C.
- Lizat komórkowy nanoszony jest na kolumnę ze złożem wybiórczo wiążącym DNA w pH niższym niż 7,5. Wiązanie to jest odwracalne w pH zasadowym.
- Kolumnę dwukrotnie przemywa się buforami usuwającymi zanieczyszczenia nie związane ze złożem.
- Kolumnę wysyca się 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Zmiana pH powoduje odłączenie oczyszczonego DNA od złoża. Odzyskany DNA gotowy jest do dalszych etapów postępowania.

Przykładowy wynik preparacji DNA genomowego na kolumnach „QIAamp DNA mini” podano na rycinie 7.



Ryc. 7. Elektroforetyczny rozdział całkowitego DNA wyizolowanego z wycinków tkanek zwierzęcych. Numery ścieżek odpowiadają numerom wycinków (od 1 do 8). Różnice w intensywności poszczególnych prążków odzwierciedlają różnice wielkości wycinków. Przed reakcjami PCR stężenie DNA było normalizowane

Fig. 7. Electrophoretic separation of total DNA isolated from animal tissue samples. Pathway numbers correspond to samples numbers (1-8). Differences of intensity of particular bands reflect differences of samples size. DNA concentration was normalized prior to PCR reactions

Nested – PCR i seminested – PCR

Metoda nested – PCR jest modyfikacją standardowej reakcji PCR, polegającą na wykonaniu dwóch, następujących bezpośrednio po sobie, reakcji PCR. W pierwszej, jako matrycę, stosuje się DNA wyizolowany z badanej próbki oraz zewnętrzną parę starterów ZF i ZR. Produkt tej reakcji, po dodaniu nowej porcji polimerazy oraz pary starterów wewnętrznych WF i WR, stanowi matrycę w drugim etapie nested – PCR.

Takie postępowanie podnosi czułość metody, umożliwiając wykrywanie nawet dwóch obcych komórek w badanym materiale. Jednocześnie zastosowanie dwóch różnych par starterów zapewnia wysoką specyficzną metody i eliminuje wyniki fałszywie pozytywne.

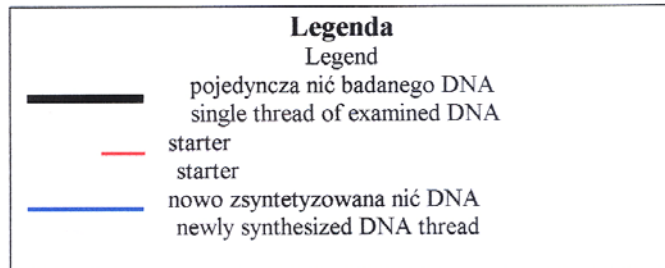
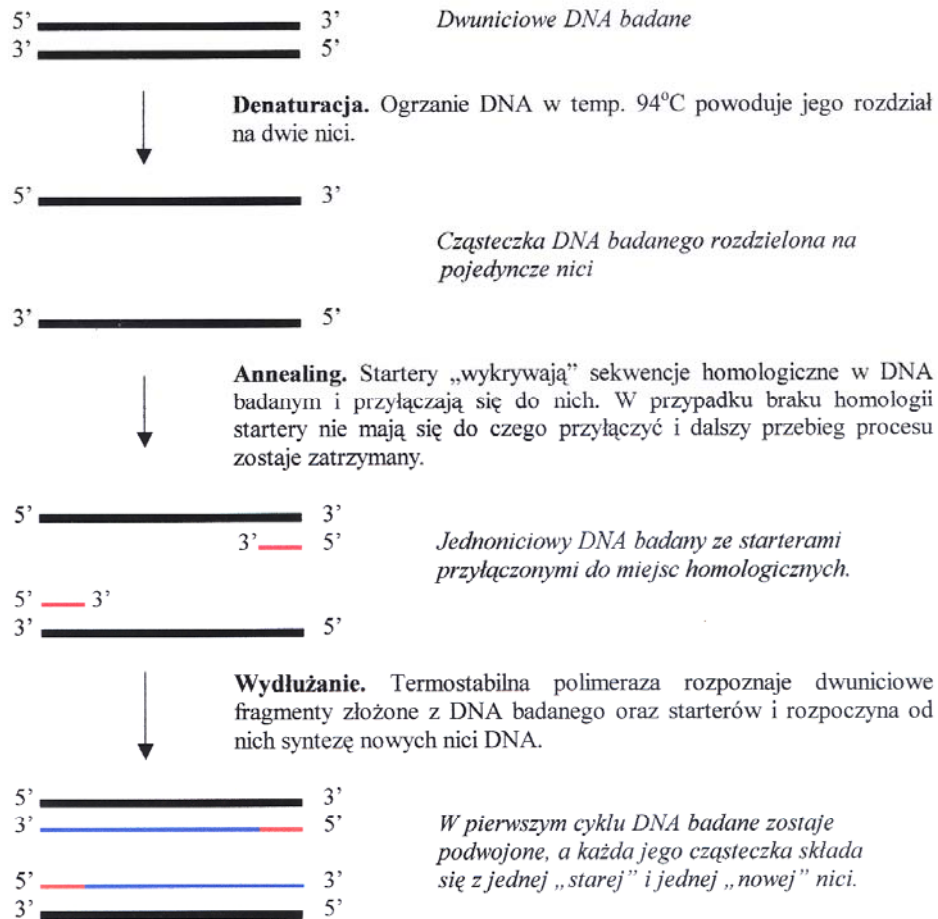
Prostszą odmianą metody nested – PCR jest seminested – PCR, gdzie stosuje się tylko trzy startery zestawiane ze sobą w dwie pary.

Warunki reakcji PCR

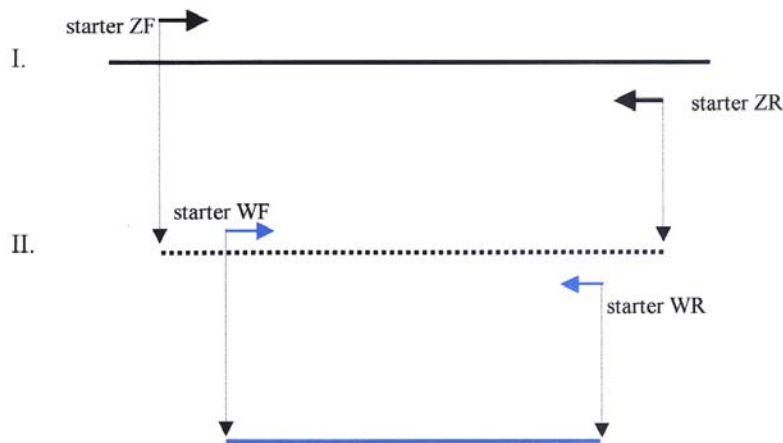
Ogólny tok postępowania

Wytwarzanie ureazy jest cechą diagnostyczną dla rodzaju *Helicobacter*. Geny kodujące ten enzym, mimo znacznego konserwatywności sekwencji nukleotydowych, różnią się na tyle, że mogą być wykorzystane jako gatunkowo specyficzna cecha diagnostyczna [Neiger i wsp., 1998; Solnick i wsp., 1994].

DNA wyizolowany z badanych tkanek sprawdzany był w pierwszej kolejności na obecność genów *ureB* kodujących ureazę u *H. heilmannii*, *H. pylori* i *H. felis*. Szczegółowe informacje o użytych starterach i warunkach reakcji PCR podano w dalszej części pracy oraz w tabelach 4 i 5. Na ich podstawie badane zwierzęta były kwalifikowane jako zakażone *H. heilmannii* bądź *H. pylori*, lub też *H. felis*.



Ryc. 8. Powielanie badanego DNA w pierwszym cyklu PCR
Fig. 8. Copying of examined DNA in first PCR cycle



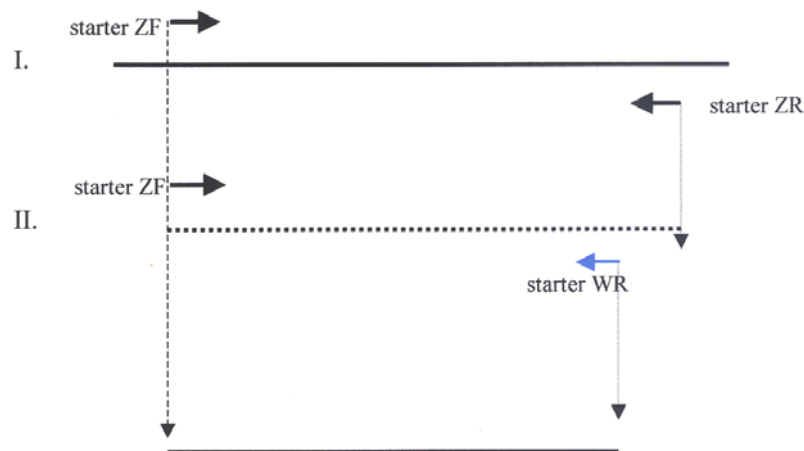
Pierwszy etap (I). Na matrycy DNA wyizolowanego z badanej próby (czarna ciągła linia), przy użyciu starterów zewnętrznych ZF i ZR, amplifikowany jest specyficzny fragment DNA (linia przerywana). Jeżeli intensywność zakażenia badanego materiału jest niska (kilkanaście komórek), to DNA wytworzonego w pierwszym etapie często nie daje się wykryć w elektroforezie kontrolnej.

Drugi etap (II). DNA wytworzonego w pierwszym etapie (linia przerywana) wykorzystywane jest jako matryca do syntezy produktu finalnego (linia niebieska) przy udziale starterów wewnętrznych WF i WR. W przeciwieństwie do pierwszego etapu, w przypadku próby pozytywnej, produkt finalny powstaje w dużej ilości i jest łatwy do wykazania.

Ryc. 9. Zasada metody nested – PCR
Fig. 9. Principles of nested – PCR method

Dwadzieścia cztery preparaty DNA dające trzy negatywne wyniki dla genów *ureB* zostały następnie użyte jako matryce w reakcji PCR ze starterami CAR577F i CAR636R (tab. 5), specyficznymi dla 16S rDNA trzech gatunków, a mianowicie *H. bizzozeronii*, *H. felis* i *H. salomonis* [De Groote i wsp., 2001]. Preparaty, które dały pozytywny wynik z tymi starterami, zostały dalej użyte w reakcjach PCR ze starterami Bi1F i Bi2R oraz T3B i HT135R (tab. 5), pozwalającymi na ostateczne potwierdzenie lub wykluczenie obecności *H. bizzozeronii* i *H. salomonis* [Baele i wsp., 2004].

W przypadku wycinków, które dały negatywne wyniki ze starterami specyficznymi dla *ureB* oraz starterami CAR577F i CAR636R, założono, że zwierzęta od których one pochodziły, nie były wcale zarażone lub że mogły być zarażone innymi niż dotychczas wymienione gatunkami *Helicobacter*. Aby zweryfikować tę hipotezę, wykonano reakcje seminested – PCR ze starterami HelF, HelR1 i HelR2 (tab. 5). Amplifikują one wysoce konserwatywną sekwencję 16S rDNA o długości 251 pz, obecną u wszystkich znanych gatunków z rodzaju *Helicobacter* [Trebesius i wsp., 2001]. Dodatni wynik tego testu jest dowodem na zakażenie dowolnym mikroorganizmem z rodzaju *Helicobacter*, nie pozwala jednak ustalić jego przynależności gatunkowej.



Pierwszy etap (I). Na matrycy DNA wyizolowanego z badanej próby (czarna ciągła linia), przy użyciu starterów zewnętrznych ZF i ZR, amplifikowany jest specyficzny fragment DNA oznaczony linią przerywaną. Jeżeli intensywność zakażenia badanego materiału jest mała (kilka komórek), to DNA wytworzonego w pierwszym etapie często nie daje się wykryć w elektroforezie kontrolnej.

Drugi etap (II). DNA wytworzony w pierwszym etapie (linia przerywana) wykorzystywany jest jako matryca do syntezy produktu finalnego (linia niebieska) przy udziale starterów ZF i WR. W przeciwieństwie do pierwszego etapu, w przypadku próby pozytywnej, produkt finalny powstaje w dużej ilości i jest łatwy do wykazania.

Ryc. 10. Zasada metody seminested – PCR
 Fig. 10. Principles of seminested – PCR method

Startery

Do projektowania starterów specyficznych dla genów *ureB* wykorzystano informacje dotyczące regionów ich lokalizacji, podane w pracy Neigera i wsp. [1998] oraz sekwencje nukleotydowe z bazy danych GenBank: L25079 dla *H. heilmannii*, M60398 dla *H. pylori* oraz X69080 dla *H. felis*.

Lokalizację starterów zmodyfikowano w oparciu o wyniki własnych analiz komputerowych i rezultaty wstępnych reakcji PCR. Dla podniesienia specyficzności i czułości zaprojektowano dodatkowe pary starterów, pozwalające na przeprowadzenie reakcji typu nested – PCR. Szczegółowe dane o lokalizacji tych starterów na sekwencjach z bazy danych podano w tabeli 4.

Szczegółowa lokalizacja starterów specyficznych dla genów *ureB*
(*startery za Neiger i wsp., 1998)
Detailed localization of specific starters for *ureB* genes (*Neiger i wsp., 1998)

Gatunek Species	Starter Starter	Lokalizacja startera na sekwencji źródłowej Localization of starter on original sequence	Sekwencja źródłowa Original sequence
<i>Helicobacter heilmannii</i>	Heil2F	984–1003	L25079
	Heil2R	1557–1536	
	W2heilF	1097–1115	
	W2heilR	1481–1459	
<i>Helicobacter pylori</i>	PylNF	3379–3400	M60398
	PylNR	5089–5068	
	WpylF	3931–3952	
	WpylR	4620–4598	
<i>Helicobacter felis</i>	FelF*	43–67	X69080
	FelR*	1190–1168	
	WfelF	154–173	
	WfelR	1045–1024	

Sekwencje nukleotydowe wszystkich starterów zaprojektowanych w niniejszej pracy oraz dobranych na podstawie danych literaturowych podano w tabeli 5.

Skład reakcji PCR

Wszystkie reakcje PCR przeprowadzano w roztworach o objętości 25 µl i składzie:

- starter XF (50 pmol/µl) 1,0 µl
- starter XR (50 pmol/µl) 1,0 µl
- DNA z badanego wycinka 1,0 µl
- bufor 2,5 µl
- dNTP 0,5 µl
- Taq polimeraza 0,3 µl
- woda 18,7 µl

gdzie XF i XR oznacza startery „**F**orward” i „**R**evers”, odpowiednie dla danego typu i etapu reakcji PCR (tab. 5 oraz ryc. 9 i 10).

Do reakcji używano bufor, dNTP i Taq polimerazę firm QIAGEN (Taq PCR core kit, nr kat. 201225) oraz BIOTOOLS (Biotools DNA polymerase kit, nr kat. 10 038).

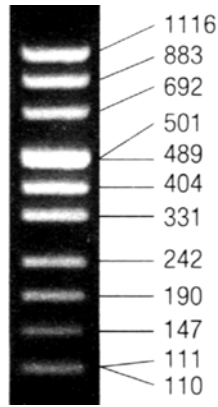
Tabela 5
Table 5

Zestawienie starterów i programów reakcji PCR
Tabulation of starters and PCR reaction programmes

Wykrywana sekwencja Detected sequence	Wykrywany gatunek Detected species	Typ reakcji PCR Type of PCR reaction	Etap reakcji PCR Stage of PCR reaction	Starter Starter	Sekwencja nukleotydowa startera w orientacji 5'-3' Nucleotide sequence of starter in orientation 5'-3'	Produkt PCR (pz) Product PCR	Program PCR Programme PCR
gen ureB gene ureB	<i>H. heilmannii</i>	nested	pierwszy	Hei12F Hei12R	GATAAAGTGGCTTGGGCGA GGTCAATGAGAGCAGGTTCAAA	574	3KOTY
			drugi	W2hei1F W2hei1R	ACAAAACCAACAGCCCCAGC GCGGAGCATTTCTTTTAAAGTTCC	385	
	<i>H. pylori</i>	nested	pierwszy	Py1NF Py1NR	ATGAAAAGATTAGCAGAAAAG CCTAGAAAATGCTAAAGAGTTG	1711	3KOTY6 2
			drugi	Wpy1F Wpy1R	GCGGCTGAAGAATATTCTATGA CGCTGGGTTAAATGGGTATTAG	690	3KOTY6 7
	<i>H. felis</i>	nested	pierwszy	FelF FelR	ATGAAACTAACGCCTAAAGAAGCTAG GGAGAGATAAAGTGAATATGCCGT	1148	3KOTY
			drugi	WfelF WfelR	CTCATTAGCGGGCGGTGTGAT CAATCTTGGCGTCTTTAAATCCC	892	
16S rDNA	<i>Helicobacter spp.</i>	seminested	pierwszy	HelF HelR1	CGTGGAGGATGAAGGTTTAA TACACCAAGAATCCACCTA	284	HELP
			drugi	HelR2	CGTGGAGGATGAAGGTTTAA AATCCACCTACCTCTCCC	275	
	<i>H. bizzozeronii</i> <i>H. felis</i> <i>H. salomonis</i>	klasyczna	jeden	CAR577F CAR636R	TGCGTAGGGGGGTTGTAAG CAGAGTTGTAGTTTCAAAATGC	78	CAR
	<i>H. bizzozeronii</i>	klasyczna	jeden	Bi1F Bi2R	AACCAAYAGCCCCAGCAGCC TGGTTTTAAGGTTCCAGCGC	373	Bi1-Bi2
	<i>H. salomonis</i>	klasyczna	jeden	T3B HT135R	AGGTGGGGGTTCCGAATCC ACCAACTGGGCTAAGCGACC	134	

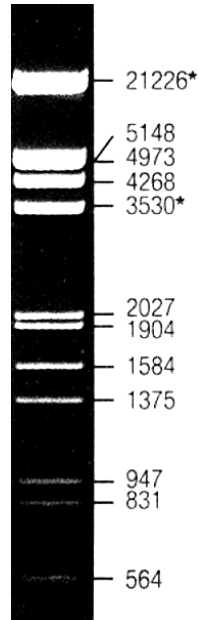
Kontrole pozytywne

Jako kontrole pozytywne reakcji nested – PCR wykorzystano DNA wyizolowane ze szczepów *Helicobacter pylori* J99 [Alm i wsp., 1999] oraz *Helicobacter heilmannii*, otrzymanych dzięki uprzejmości pani doc. dr hab. Grażyny Gościński z Akademii Medycznej we Wrocławiu. DNA *H. felis* wyizolowano w Zakładzie Genetyki Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego.



Ryc. 11. Marker masy pUC-MIX8 (Fermentas, nr kat. SM0301). Po prawej stronie zdjęcia podano wielkość fragmentów w parach zasad

Fig. 11. pUC-MIX8 mass marker (Fermentas, nr kat. SM0301). Size of fragments in alkali pairs is presented on right side of photo



Ryc. 12. Marker masy DNA faga λ trawiony enzymami *EcoRI* i *HindIII* (Fermentas, nr kat. SM0191). Po prawej stronie zdjęcia podano wielkość fragmentów w parach zasad

Fig. 12. DNA mass marker of λ phage digested with *EcoRI* and *HindIII* enzymes (Fermentas, nr kat. SM0191). Size of fragment

Elektroforetyczny rozdział produktów PCR

Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 0,9% żelu agarozowym w buforze TBE (Tris 10,1 g, kwas borsy 5,9 g, EDTA 0,9 g woda do 1000 ml, pH 8,0), w obecności bromku etydyny (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Elektroforezę prowadzono pod napięciem 140 V. Jako marker masy stosowano pUC-MIX8 (Fermentas nr kat. SM0301, ryc. 11) oraz DNA faga λ , trawiony enzymami *EcoRI* i *HindIII* (Fermentas nr kat. SM0191, ryc. 12). Żele fotografowano w przechodzącym świetle UV o długości 300–320 nm.

Synteza starterów

Syntezę starterów wykonał Serwis Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5a.

Programy pracy termocyklera

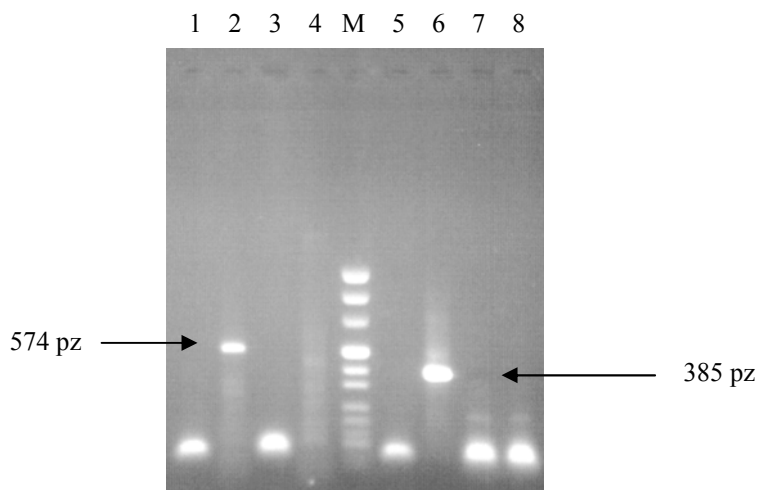
Wszystkie reakcje PCR wykonano w termocyklerze DNA-engine PT200, (JM Research, USA). Stosowano następujące programy pracy:

3KOTY	3KOTY62	3KOTY67
1. 94 °C, 5 min 2. 57 °C, 2 min 3. 72 °C, 1 min 4. 94 °C, 30 sek. 5. 57 °C, 30 sek. 6. 72 °C, 1 min 7. Go to step 4, 35 times 8. 72 °C, 4 min 9. 4 °C, for ever 10. END	1. 94 °C, 5 min 2. 57 °C, 2 min 3. 72 °C, 1 min 4. 94 °C, 30 sek. 5. 62 °C, 30 sek. 6. 72 °C, 1 min 7. Go to step 4, 35 times 8. 72 °C, 4 min 9. 4 °C, for ever 10. END	1. 94 °C, 5 min 2. 57 °C, 2 min 3. 72 °C, 1 min 4. 94 °C, 30 sek. 5. 67 °C, 30 sek. 6. 72 °C, 1 min 7. Go to step 4, 35 times 8. 72 °C, 4 min 9. 4 °C, for ever 10. END
HELf [Trebesius i wsp, 2001]	CAR [De Grootte i wsp. 2001]	Bi1 - Bi2 [Baele i wsp. 2004]
1. 94 °C, 3 min 2. 58 °C, 1 min 3. 72 °C, 1 min 4. 94 °C, 30 sek. 5. 58 °C, 30 sek. 6. 72 °C, 30 sek. 7. Go to step 4, 34 times 8. 72 °C, 3 min 9. 4 °C, for ever 10. END	1. 94 °C, 3 min 2. 58 °C, 1 min 3. 72 °C, 1 min 4. 94 °C, 30 sek. 5. 58 °C, 30 sek. 6. 72 °C, 30 sek. 7. Go to step 4, 34 times 8. 72 °C, 3 min 9. 4 °C, for ever 10. END	1. 95 °C, 5 min 2. 94 °C, 1 min 3. 58 °C, 1 min 4. 72 °C, 1 min 5. Go to step 2, 3 times 6. 94 °C, 1 min 7. 60 °C, 1 min 8. 72 °C, 1 min 9. Go to step 6, 35 times 10. 72 °C, 7 min 11. 4 °C, for ever 12. END

Gatunkowa specyficzność starterów amplifikujących fragmenty genów *ureB*

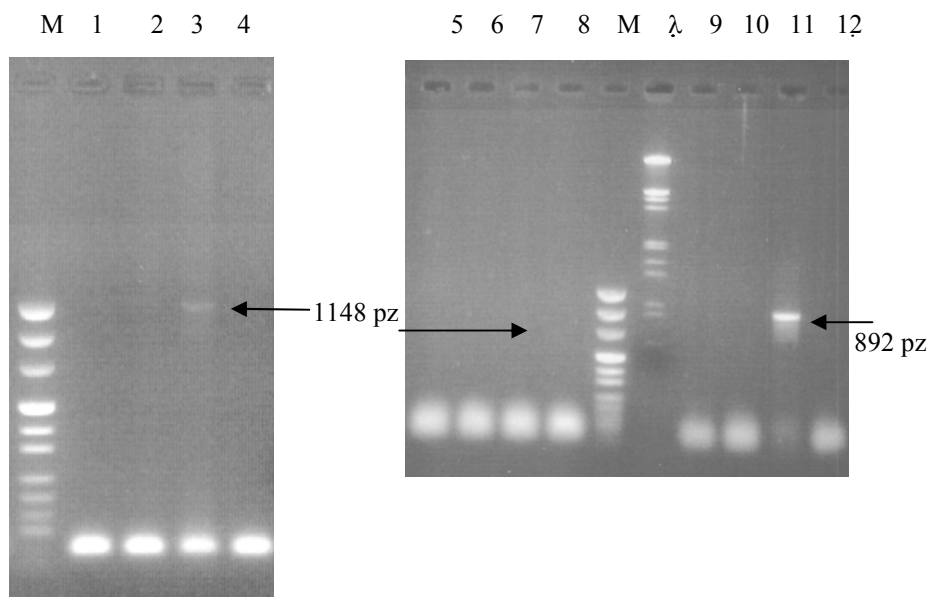
Na etapie projektowania specyficzność gatunkową starterów do wykrywania genów *ureB* sprawdzono przez komputerowe porównanie ich sekwencji z sekwencjami w bazie danych GenBank, wykorzystując program BLASTN 2.2.13 [Altschul i wsp., 1997]. Rezultaty tych porównań wykazały, że wszystkie startery spełniały stawiany im warunek specyficzności.

Dla doświadczalnego sprawdzenia gatunkowej specyficzności starterów wykonano reakcje nested – PCR, z użyciem starterów Heil2F, Heil2R, W2heilF i W2heilR oraz DNA wyizolowanego z *H. heilmannii*, *H. pylori* i *H. felis*. Analogiczne reakcje wykonano z pozostałymi zestawami starterów dla genów *ureB*. Za każdym razem produkty PCR uzyskano jedynie w tych reakcjach, gdzie do danego DNA matrycowego dodano odpowiednie, specyficzne startery, jak podano w tabeli 5. Wyniki tych reakcji przedstawiono na rycinach 13, 14 i 15.



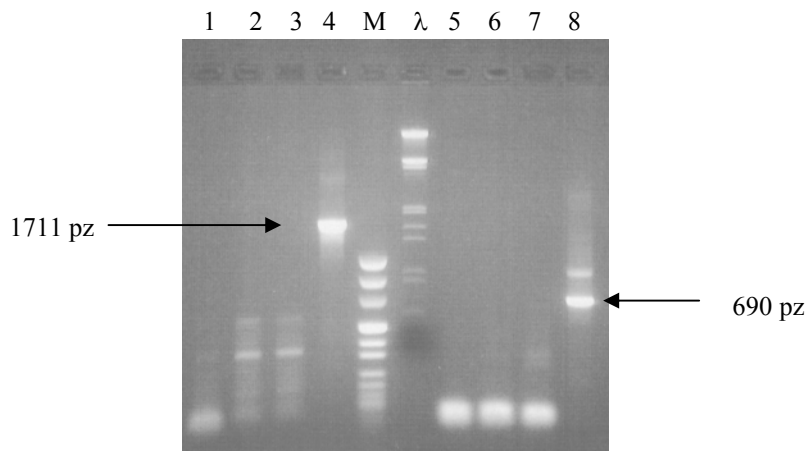
Ryc. 13. Specyficzność gatunkowa starterów amplifikujących fragmenty genu *ureB Helicobacter heilmannii*. Ścieżki 1 i 5 negatywne kontrole odczynnikowe bez DNA. Pierwszy etap reakcji nested – PCR ze starterami Heil2F i Heil2R oraz DNA *H. heilmannii* (ścieżka 2); *H. felis* (3) oraz *H. pylori* (4). Drugi etap reakcji ze starterami W2heilF i W2heilR oraz DNA *H. heilmannii* (ścieżka 6); *H. felis* (7) oraz *H. pylori* (8). M – marker masy, pUCMix8 (Fermentas, SM0301). Strzałkami zaznaczono produkty charakterystyczne dla poszczególnych etapów nested – PCR

Fig. 13. Species specificity of starters amplifying *ureaB Helicobacter heilmannii* gene fragments. Pathways 1 and 5-negative reagent controls without DNA. First stage of nested – PCR reaction with Heil2F and Heil2R starters and *H. heilmannii* DNA (pathway 2). Second stage of reaction with W2heilF and W2heilR starters and *H. heilmannii* DNA (pathway 6); *H. felis* (7) and *H. pylori* (8). M – mass marker, pUCMix8 (Fermentas, SM0301). Products characteristic for subsequent nested – PCR stages are marked with arrows



Ryc. 14. Specyficzność gatunkowa starterów amplifikujących fragmenty genu *ureB Helicobacter felis*. Ścieżki 1, 5 i 9 negatywne kontrole odczynnikowe. Pierwszy etap reakcji nested – PCR ze starterami FelF i FelR oraz DNA *H. heilmannii* (ścieżki 2 i 6); *H. felis* (3 i 4) oraz *H. pylori* (4 i 8). Drugi etap reakcji ze starterami WfelF i WfelR oraz DNA *H. heilmannii* (ścieżka 10); *H. felis* (11) oraz *H. pylori* (12). M – marker masy, pUCMix8 (Fermentas, SM0301); λ – marker masy, DNA faga λ trawiony enzymami *EcoRI* i *HindIII* (Fermentas, SM0191). Strzałkami zaznaczono produkty charakterystyczne dla poszczególnych etapów nested – PCR. Na fotografiach widoczna jest często występująca w praktyce bardzo słaba amplifikacja produktu w pierwszym etapie. Dopiero w drugim etapie produkt powstaje w ilości umożliwiającej jego łatwe wykrycie

Fig. 14. Species specificity of starters amplifying *ureB Helicobacter felis* gene fragments. Pathway 1, 5 and 9 – negative reagent controls. First stage of nested – PCR reaction with FelF and FelR starters and *H. heilmannii* DNA (pathway 2 and 6); *H. felis* (3 and 4) oraz *H. pylori* (4 and 8). Second stage of reaction with WfelF and WfelR starters and *H. heilmannii* DNA (pathway 10); *H. felis* (11) oraz *H. pylori* (12). M – mass marker, pUCMix8 (Fermentas, SM0301); λ – mass marker, DNA λ fage digested by *EcoRI* i *HindIII* enzymes (Fermentas, SM0191). Products characteristic for subsequent nested – PCR stages are marked with arrows. Photographs show frequently occurring product amplification at first stage, weakly marked in practice. Only at second stage product originates in amount allowing its easy detection



Ryc. 15. Specyficzność gatunkowa starterów amplifikujących fragmenty genu *ureB Helicobacter pylori*. Ścieżki 1 i 5 negatywne kontrole odczynnikowe bez DNA. Pierwszy etap reakcji nested – PCR ze starterami PylNF i PylNR oraz DNA *H. heilmannii* (ścieżka 2); *H. felis* (3) oraz *H. pylori* (4). Drugi etap reakcji ze starterami WpyLF i WpyLR oraz DNA *H. heilmannii* (ścieżka 6); *H. felis* (7) oraz *H. pylori* (8). M – marker masy, pUCMix8 (Fermentas, SM0301), λ – marker masy, DNA faga λ trawiony enzymami *EcoRI* i *HindIII* (Fermentas, SM0191). Strzałkami zaznaczono produkty charakterystyczne dla poszczególnych etapów nested – PCR

Fig. 15. Species specificity of starters amplifying *ureB Helicobacter pylori* gene fragments. Pathway 1 and 5 – negative reagent controls without DNA. First stage of nested – PCR reaction with PylNF and PylNR starters and *H. heilmannii* DNA (pathway 2); *H. felis* (3) and *H. pylori* (4). Second stage of reaction with WpyLF i WpyLR starters and *H. heilmannii* DNA (pathway 6); *H. felis* (7) oraz *H. pylori* (8). M – mass marker, pUCMix8 (Fermentas, SM0301); λ – mass marker, DNA λ fage digested by *EcoRI* i *HindIII* enzymes (Fermentas, SM0191). Products characteristic for subsequent nested – PCR stages are marked with arrows

Badania histopatologiczne

Wycinki błony śluzowej żołądka utrwalano w 10% zbuforowanym roztworze formaliny i zatapiano w bloczki parafinowe. Następnie sporządzano skrawki grubości 4 μm, które barwiono hematoksyliną i eozyną oraz metodą Giemsy. Preparaty histopatologiczne oceniali dwóch niezależnych patologów. Zapalenie błony śluzowej żołądka oceniano stosując klasyfikację histologiczną systemu Sydney [Misiewicz i wsp., 1990].

Klasyfikacja ta obejmowała ocenę: stopnia zaawansowania zapalenia przewlekłego (ilość komórek jednojądrowych), jego aktywności (gęstość nacieku z granulocytów obojętnochłonnych), zaniku (ilość gruczołów żołądkowych), obecności metaplastji jelitowej, stopnia kolonizacji błony śluzowej żołądka przez drobnoustroje z rodzaju *Helicobacter*.

W systemie tym wymienione parametry oceniano według skali punktowej:

- a) stopień zapalenia przewlekłego: 0 pkt. – norma (sporadyczne komórki jednojądrowe w zrębie), 1 pkt – lekkie (nieliczne komórki jednojądrowe w podścielisku błony śluzowej), 3 pkt. – ciężkie (masywne nacieki komórek jednojądrowych w zrębie), 2 pkt. – umiarkowane (ilość komórek jednojądrowych pomiędzy lekkim a ciężkim stopniem zapalenia);
- b) aktywność: 0 pkt. (brak granulocytów obojętnochłonnych), 1 pkt (sporadyczne, pojedyncze neutrofile w podścielisku błony śluzowej), 2 pkt. (umiarkowana ilość granulocytów obojętnochłonnych w błonie śluzowej), 3 pkt. (masywne nacieki neutrofilowe);
- c) rozległość zaniku: 0 pkt. (brak zaniku), 1 pkt (zanik niewielki), 2 pkt. (wyraźny lecz umiarkowany zanik), 3 pkt. (zanik rozległy);
- d) metaplasja jelitowa: 0 pkt (brak), 1 pkt (nieznaczna), 2 pkt. (umiarkowana), 3 pkt. (nasilona);
- e) infekcja *Helicobacter* spp.: 0 pkt. (brak ognisk bakterii), 1 pkt (pojedyncze, ogniskowo stwierdzane bakterie), 2 pkt. (liczne, ogniskowo stwierdzane bakterie w kilku polach widzenia), 3 pkt (liczne bakterie w większości gruczołów).

Badania w mikroskopie elektronowym

Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej przeprowadzono w mikroskopie scanningowym Zeiss 435 Vp oraz w mikroskopie transmisyjnym Tesla BS 500.

Przygotowanie prób do badania w mikroskopie scanningowym (SEM)

Wycinki błony śluzowej żołądka utrwalano w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego na buforze fosforanowym. Następnie przepłukiwano je buforem fosforanowym. Uzyskane z materiału skrawki utrwalano także buforem fosforanowym. Po upływie określonego czasu próby odwadniano we wzrastających stężeniach acetonu (od 30 do 100%). Badany materiał następnie suszono, naklejało na stoliki oraz napyłano złotem w napyłarce typu Scancoat. Tak przygotowane preparaty oglądano w mikroskopie scanningowym w powiększeniach: 5000x, 10 000x, 15 000x, 18 000x, 20 000x.

Przygotowanie prób do badania w mikroskopie transmisyjnym (TEM)

Wycinki błony śluzowej żołądka utrwalano w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego na buforze fosforanowym. Następnie przepłukiwano je oraz wtórnie utrwalano w 2% OsO₄ na buforze fosforanowym. W dalszej kolejności materiał płukano buforem fosforanowym oraz odwadniano we wzrastających stężeniach acetonu (od 30 do 100%). Próby zatapiało w kapsułkach z eponem, krojono ultramikrotomem MTX, kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu wg Reynoldsa, a następnie oglądano w mikroskopie transmisyjnym w powiększeniach: 10 500x, 12 000x, 13 000x, 17 500x, 18 000x, 22 750x, 24 500x, 31 000x, 49 000x.

Analiza statystyczna wyników badań

Uzyskane wartości liczbowe analizowano obliczając średnią, odchylenie standardowe i wartości procentowe. W celu stwierdzenia istotności dane poddano analizie statystycznej. Aby ocenić różnicę pomiędzy grupami, stosowano testy parametryczne (t-Studenta) lub nieparametryczne (U-Mana-Whitneya) dla zmiennych niepowiązanych. Dla zmiennych powiązanych, w zależności od ich rozkładów, stosowano test parametryczny (t-Studenta) lub test nieparametryczny (test kolejności par Wilcoxon). Poziom istotności statystycznej przyjęto dla $p \leq 0,05$.

Badania wykonano:

- badania kliniczne, badania laboratoryjne krwi i badania endoskopowe – w Katedrze Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej we Wrocławiu,
- badania radiologiczne i ultrasonograficzne jamy brzusznej – w Katedrze i Klinice Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej we Wrocławiu,
- badania mikrobiologiczne – w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu,
- badania histopatologiczne – w Katedrze i Zakładzie Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu,
- badania PCR – w Zakładzie Genetyki Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego,
- badania w mikroskopach elektronowych – w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

4. WYNIKI

Charakterystyka kliniczna zwierząt z podgrup AI i BI

Na podstawie wywiadu, badania klinicznego oraz wyników badań laboratoryjnych krwi psy z podgrupy AI i koty z podgrupy BI uznano za zdrowe. U tych zwierząt nie stwierdzono żadnych objawów klinicznych wskazujących na chorobę. Wyniki badań hematologicznych i biochemicznych krwi mieściły się w granicach wartości referencyjnych (tab. 6). Podczas badania endoskopowego stwierdzono prawidłowy obraz błony śluzowej żołądka. Była ona barwy różowej, lśniąca, o lekko chropowatej powierzchni. Treść płynna tworząca tzw. „jeziorko żołądkowe” była klarowna, najczęściej podbarwiona na żółto. Fałdy błony śluzowej łatwo rozprostowywały się podczas insuflacji powietrza do żołądka.

Tabela 6

Table 6

Średnie arytmetyczne oraz odchylenia standardowe badań hematologicznych i biochemicznych krwi u zwierząt z podgrup AI i BI
Arithmetic means and standard deviations of hematological and biochemical blood examinations in animals from subgroups AI and BI

Parametr Parameter	Jednostka S.I. SI Unit	Grupa AI Group AI		Grupa BI Group BI	
		średnia arytmetyczna arithmetic mean	odchylenie standardowe standard deviation	średnia arytmetyczna arithmetic mean	odchylenie standardowe standard deviation
WBC	G/l	10,86	±2,07	11,71	±3,25
RBC	T/l	7,21	±0,99	7,22	±1,24
Hct	l/l	0,46	±0,06	0,37	±0,06
HGB	mmol/l	9,26	±1,26	7,19	±1,25
ALT	U/l	53,75	±23,21	60,45	±21,11
AST	U/l	43,05	±19,81	46,75	±15,46
ALP	U/l	78,50	±35,67	92,85	±44,58
mocznik	mmol/l	5,67	±1,64	6,86	±1,76
kreatynina	μmol/l	111,80	±17,10	135,75	±28,34

Charakterystyka kliniczna zwierząt z podgrup AII i BII

W podgrupie AII objawy kliniczne, towarzyszące chorobom żołądka, wykazywało 60 psów, a w podgrupie BII – 25 kotów. Najczęściej obserwowanymi objawami klinicznymi były wymioty o charakterze przewlekłym, zmniejszony lub brak apetytu, zmienny apetyt, postępująca utrata masy ciała, *fetor ex ore*, a najrzadziej bolesność okolicy żołądka.

Pozostałe zwierzęta, zarówno z podgrupy AII, jak i BII, nie wykazywały objawów klinicznych, jednak podczas gastroskopii stwierdzono u nich cechy przewlekłego zapalenia żołądka.

Podczas badania klinicznego u 13 psów oraz u 11 kotów stwierdzono objawy odwodnienia I stopnia, co potwierdzone zostało w wynikach badań hematologicznych wzrostem liczby hematokrytowej (u psów Hct wynosiła od 0,57 do 0,60 l/l, a u kotów od 0,48 do 0,55 l/l). U 14 psów i 9 kotów zaobserwowano umiarkowaną leukocytozę (u psów WBC wynosiła od 15,2 do 17,1 G/l, a u kotów od 21,0 do 30 G/l).

Pozostałe parametry zarówno badań hematologicznych, jak i biochemicznych krwi u wszystkich zwierząt z podgrupy AII i BII mieściły się w granicach wartości referencyjnych. W tabeli 7 podano średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe wyników badań laboratoryjnych krwi.

Tabela 7

Table 7

Średnie arytmetyczne oraz odchylenia standardowe badań hematologicznych i biochemicznych krwi u zwierząt z podgrup AII i BII
Arithmetic means and standard deviations of hematological and biochemical blood examinations in animals from subgroups AII and BII

Parametr Parameter	Jednostka S.I. SI Unit	Grupa AII Group AII		Grupa BII Group BII	
		średnia arytmetyczna arithmetic mean	odchylenie standardowe standard deviation	średnia arytmetyczna arithmetic mean	odchylenie standardowe standard deviation
WBC	G/l	11,46	±3,24	13,94	±5,58
RBC	T/l	6,92	±0,98	7,08	±1,17
Hct	l/l	0,47	±00,7	0,39	±0,08
HGB	mmol/l	8,94	±1,18	7,45	±1,48
ALT	U/l	56,77	±23,17	59,70	±23,19
AST	U/l	47,55	±19,65	45,72	±17,18
ALP	U/l	85,68	±32,80	81,56	±38,45
mocznik	mmol/l	5,42	±1,46	6,46	±1,67
kreatynina	μmol/l	109,90	±16,41	131,47	±31,83

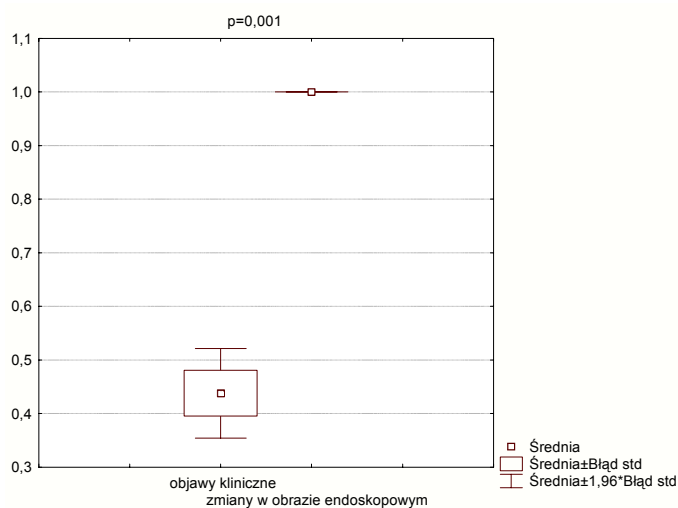
Wyniki badań radiologicznych i/lub ultrasonograficznych jamy brzusznej wykonanych u zwierząt z objawami klinicznymi z podgrup AII i BII były negatywne.

U wszystkich zwierząt z podgrup AII i BII wykonano gastroscopię. W obrazie endoskopowym przewlekłe zapalenie żołądka wyrażało się obrzękiem błony śluzowej, plamistymi lub smugowatymi zaczerwienieniami, występującymi w sąsiedztwie obszarów bledszych oraz jej kruchością. Pomiedzy fałdami błony śluzowej obserwowano obecność mętnego płynu o zabarwieniu szarym, niekiedy z domieszką żółci. Dodatkowo przy zmianach bardziej zaawansowanych widoczne były żywoczerwone lub ciemnosine wybroczyny, rozrost błony śluzowej w postaci mniejszych lub większych wyniosłości oraz nadżerki, które najczęściej umiejscowione były na grzbietach fałdów (załącznik 1).

Zgodnie z systemem Sydney nasilenie zmian makroskopowych błony śluzowej żołądka u zwierząt z podgrup AII i BII sklasyfikowano jako: zmiany nieznacznie nasilone – u 94 psów i u 43 kotów, zmiany umiarkowanie nasilone – u 25 psów i u 12 kotów oraz wyraźnie nasilone – u 18 psów i u 9 kotów.

Zaobserwowano, że objawy kliniczne w podgrupach AII i BII występowały istotnie statystycznie rzadziej niż zmiany zapalne widoczne podczas gastroscopii (ryc. 16 i 17).

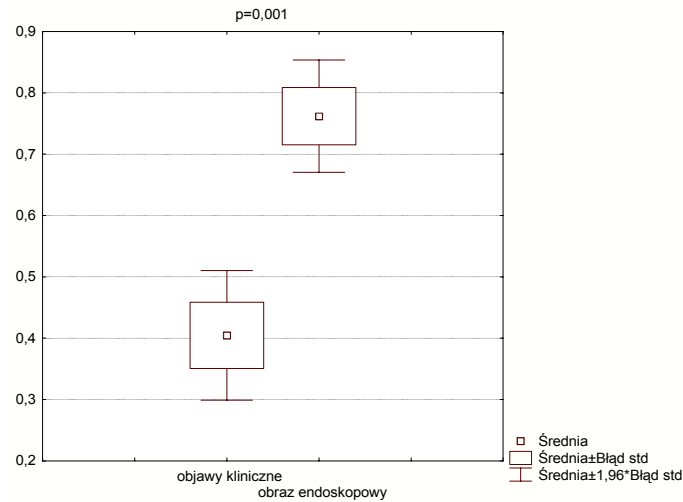
występowanie



Ryc. 16. Porównanie występowania objawów klinicznych z obserwowanymi zmianami podczas badania endoskopowego w podgrupie AII

Fig. 16. Comparison of occurrence of clinical signs with observed changes during endoscopic examination in subgroup AII

występowanie



Ryc. 17. Porównanie występowania objawów klinicznych z obserwowanymi zmianami podczas badania endoskopowego w podgrupie BII

Fig. 17. Comparison of occurrence of clinical signs with observed changes during endoscopic examination in subgroup BII

Wyniki badań mikrobiologicznych bioptatów błony śluzowej żołądka

szybki test ureazowy

Dotatni wynik szybkiego testu ureazowego (załącznik 2) uzyskano u 18 (90%) psów z podgrupy AI i 15 (75%) kotów z podgrupy BI oraz u 117 (85,4%) psów z podgrupy AII i u 42 (65,6%) kotów z podgrupy BII. Przeprowadzona analiza statystyczna wyników szybkiego testu ureazowego pomiędzy podgrupami AI i AII oraz BI i BII nie wykazała różnic istotnych statystycznie (ryc. 18 i 19).

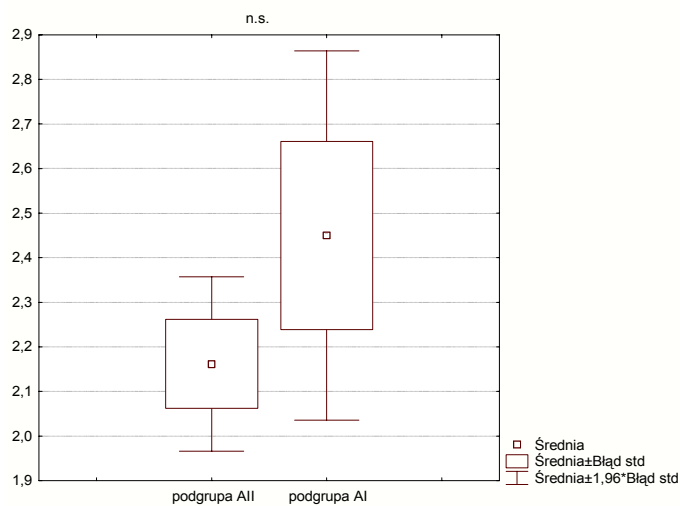
bezpośredni preparat bakteriologiczny

W bezpośrednim preparacie bakteriologicznym wykonanym z wycinków błony śluzowej z trzonu żołądka obecność spiralnych, zakrzywionych, Gram-ujemnych drobnoustrojów (załącznik 3) stwierdzono u:

- 16 (80%) psów w podgrupie AI, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 5 (31,3%) psów, „+++” – u 9 (56,3%), a „++++” – u 2 (12,4%),
- 13 (65%) kotów w podgrupie BI, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 6 (46,2%) kotów, „+++” – u 7 (53,8%), a „++++” – u 0,
- 107 (78,1%) psów w podgrupie AII, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 82 (76,6%) psów, „+++” – u 18 (16,8%), a „++++” – u 7 (6,6%),

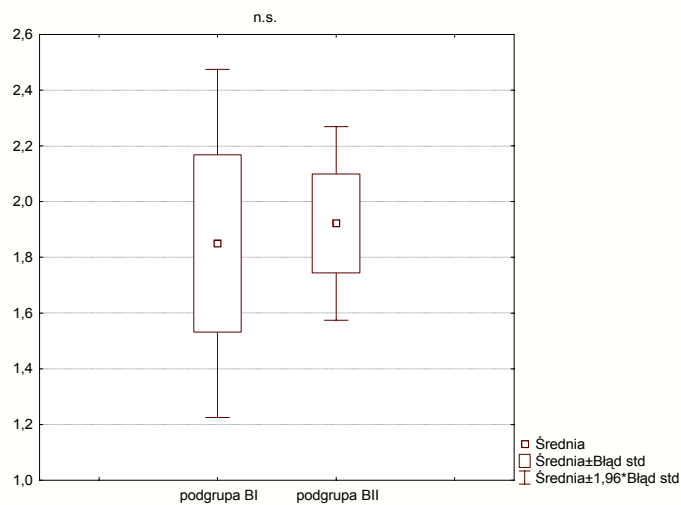
- 39 (60,9%) kotów w podgrupie BII, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 29 (74,4%) kotów, „++” - u 7 (17,9%), a „+++” – u 3 (7,7%).

test ureazowy



Ryc. 18. Wynik testu ureazowego po 60 min w podgrupie AI i AII
 Fig. 18. Result of urease test after 60 min. subgroups in AI and AII

test ureazowy



Ryc. 19. Wynik testu ureazowego po 60 min w podgrupie BI i BII
 Fig. 19. Result of urease test after 60 min. in subgroups BI and BII

Z kolei w bezpośrednim preparacie bakteriologicznym wykonanym z wycinków błony śluzowej z części odzwiernikowej żołądka obecność spiralnych, zakrzywionych, Gram-ujemnych drobnoustrojów stwierdzono u:

- 18 (90%) psów w podgrupie AI, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 7 (38,9%) psów, „++” – u 6 (33,3%), a „+++” – u 5 (27,8%),
- 13 (65%) kotów w podgrupie BI, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 8 (61,5%) kotów, „++” – u 0, a „+++” – u 5 (38,5%),
- 94 (68,6%) psów w podgrupie AII, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 47 (50%) psów, „++” – u 28 (29,8%), a „+++” – u 19 (20,2%),
- 37 (57,8%) kotów w podgrupie BII, w tym obserwowaną ilość bakterii oceniono na: „+” u 26 (70,3%) kotów, „++” – u 11 (29,7%), a „+++” – u 0.

Przeprowadzona analiza statystyczna wyników oceny bezpośredniego preparatu bakteriologicznego, wykonanego z wycinków błony śluzowej z trzonu i z części odzwiernikowej żołądka, pomiędzy podgrupami AI i AII oraz BI i BII nie wykazała różnic istotnych statystycznie.

Hodowla i różnicowanie biochemiczne wyizolowanych szczepów

Na podstawie bakteriologicznych badań hodowlanych oraz różnicowania biochemicznego wyizolowanych szczepów wykazano:

- u psów w podgrupie AI w 6 (30%) przypadkach obecność drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter*, w tym w 5 (83,3%) był to *Helicobacter felis*, a w 1 (16,7%) na podstawie w/w badań nie udało się określić gatunku,
- u kotów w podgrupie BI wynik powyższych badań był negatywny,
- u psów w podgrupie AII w 21 (15,3%) przypadkach obecność drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter*, w tym w 20 (95,2%) był to *Helicobacter felis*, a w 1 – *Helicobacter canis* (4,8%),
- u kotów w podgrupie BII w 11 (17,2%) przypadkach obecność drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* i był to tylko *Helicobacter felis*.

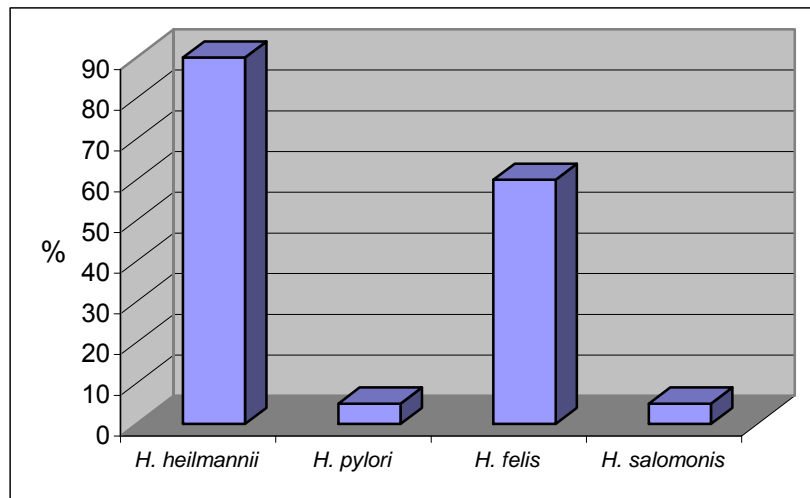
Wyniki badań bioptatów błony śluzowej żołądka za pomocą PCR

W oparciu o badania molekularne PCR obecność drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* w wycinkach błony śluzowej żołądka wykazano:

w podgrupie AI:

- u 20 (100%) psów, w tym:
 - a) w 7 (35%) przypadkach było to zakażenie jednym gatunkiem *Helicobacter*; z tego w 6 (85,7%) przypadkach stwierdzono *H. heilmannii*, a w 1 (14,3%) – *H. salomonis*,
 - b) w 13 (65%) przypadkach stwierdzono zakażenie dwoma gatunkami *Helicobacter*, w następujących zestawieniach: *H. heilmannii* + *H. felis* – 12 (92,3%) przypadków, *H. heilmannii* + *H. pylori* – 1 (7,7%) przypadek.

W podgrupie tej na podstawie badań PCR wykazano obecność 4 gatunków *Helicobacter*. *H. heilmannii* wykryto u 19 (95%) zwierząt, *H. pylori* – u 1 (5%), *H. felis* – u 12 (60%), a *H. salomonis* – u 1 (5%), co ilustruje rycina 20.

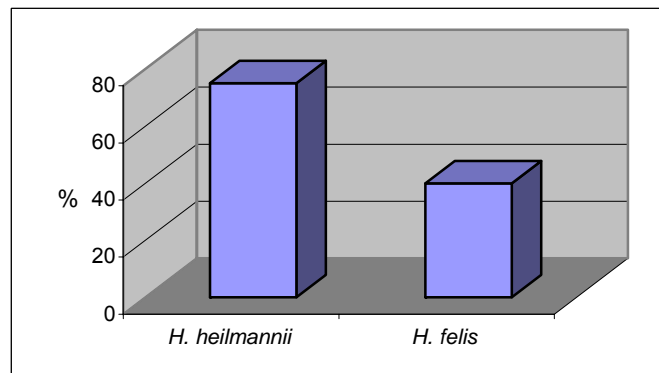


Ryc. 20. Częstość występowania poszczególnych gatunków *Helicobacter* u psów w podgrupie AI
 Fig. 20. Frequency of particular *Helicobacter* spp. occurrence in dogs in subgroup AI

w podgrupie BI:

- u 15 (75%) kotów, w tym:
 - a) w 7 (46,7%) przypadkach było to zakażenie jednym gatunkiem *Helicobacter* i był to *H. heilmannii*,
 - b) w 8 (53,3%) przypadkach stwierdzono zakażenie dwoma gatunkami *Helicobacter*, w zestawieniu: *H. heilmannii* + *H. felis*.

W podgrupie tej na podstawie badań PCR wykazano obecność 2 gatunków *Helicobacter*. *H. heilmannii* wykryto u 15 (75%) zwierząt, a *H. felis* – u 8 (40%), co ilustruje rycina 21.



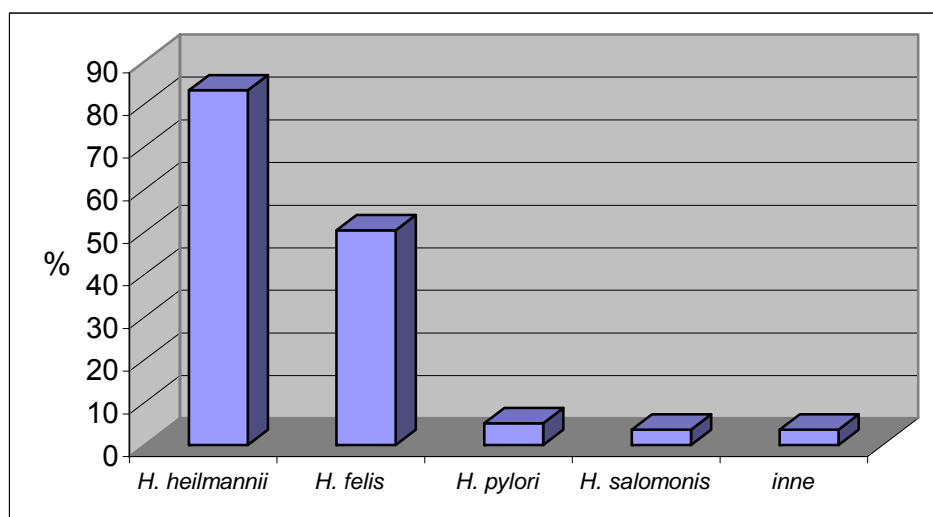
Ryc. 21. Częstość występowania poszczególnych gatunków *Helicobacter* u kotów w podgrupie BI
 Fig. 21. Frequency of particular *Helicobacter* spp. occurrence in cats in subgroup BI

w podgrupie AII:

- u 133 (97,1%) psów, w tym:
 - a) w 73 (54,9%) przypadkach było to zakażenie jednym gatunkiem *Helicobacter*; z tego w 55 (75,3%) przypadkach stwierdzono *H. heilmannii*, w 11 (15,1%) – *H. felis*, w 2 (2,7%) – *H. salomonis*, a w 5 (6,9%) – gatunki, których nie udało się zidentyfikować,
 - b) w 53 (39,8%) przypadkach stwierdzono zakażenie dwoma gatunkami *Helicobacter*, w następujących zestawieniach: *H. heilmannii* + *H. felis* – 50 (94,3%) przypadków, *H. heilmannii* + *H. pylori* – 2 (3,8%) przypadki, *H. felis* + *H. salomonis* – 1 (1,9%) przypadek,
 - c) w 6 (4,5%) przypadkach stwierdzono zakażenie trzema gatunkami *Helicobacter*, w następujących zestawieniach: *H. heilmannii* + *H. pylori* + *H. felis* – 5 (83,3%) przypadków, *H. heilmannii* + *H. felis* + *H. salomonis* – 1 (16,7%) przypadek,
 - d) w 1 (0,8%) przypadku stwierdzono zakażenie czterema gatunkami *Helicobacter*, w zestawieniu: *H. heilmannii* + *H. pylori* + *H. felis* + *H. salomonis*.

W podgrupie tej na podstawie badań PCR wykazano obecność 4 określonych gatunków *Helicobacter*, a u 5 (3,6%) zwierząt wynik reakcji PCR wskazywał na zakażenie *Helicobacter* spp.

H. heilmannii wykryto u 114 (83,2%) zwierząt, *H. felis* – u 69 (50,4%), *H. pylori* – u 7 (5,1%), a *H. salomonis* – u 5 (3,6%), co ilustruje rycina 22.



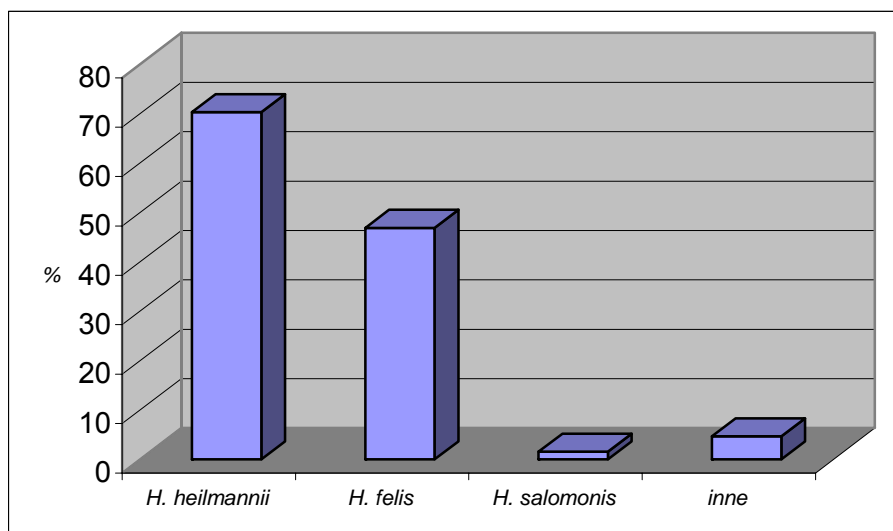
Ryc. 22. Częstość występowania poszczególnych gatunków *Helicobacter* u psów w podgrupie AII
Fig. 22. Frequency of particular *Helicobacter* spp. occurrence in dogs in subgroup AII

w podgrupie BII:

- u 46 (71, 9%) kotów, w tym:
 - a) w 13 (28,3%) przypadkach było to zakażenie jednym gatunkiem *Helicobacter*; z tego w 12 (92,3%) przypadkach stwierdzono *H. heilmannii*, a w 1 (7,7%) – *H. salomonis*,
 - b) w 33 (71,7%) przypadkach stwierdzono zakażenie dwoma gatunkami *Helicobacter*, w następujących zestawieniach: *H. heilmannii* + *H. felis* – 30 (90,9%) przypadków, *H. heilmannii* + niezidentyfikowane gatunki *Helicobacter* – 3 (9,1%) przypadki.

W podgrupie tej na podstawie badań PCR wykazano obecność 3 określonych gatunków *Helicobacter*, a u 3 (4,7%) zwierząt wynik reakcji PCR wskazywał na zakażenie *Helicobacter* spp.

H. heilmannii wykryto u 45 (70,3%) zwierząt, *H. felis* – u 30 (46,9%), a *H. salomonis* – u 1 (1,6%), co ilustruje rycina 23.

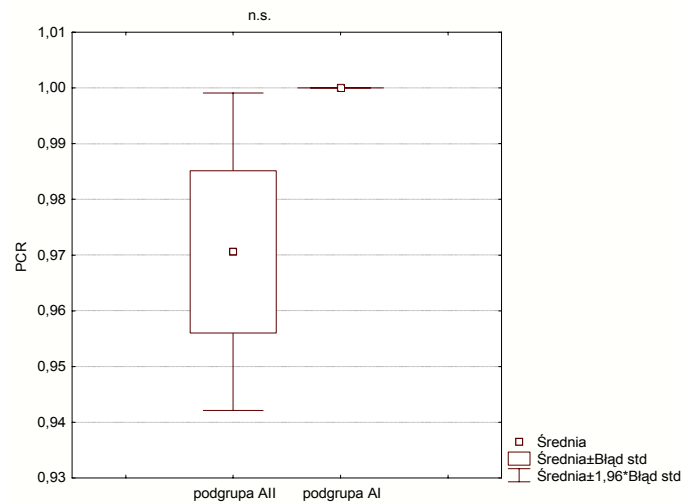


Ryc. 23. Częstość występowania poszczególnych gatunków *Helicobacter* u kotów w podgrupie BII
Fig. 23. Frequency of particular *Helicobacter* spp. occurrence in cats in subgroup BII

Przykładowe wyniki reakcji PCR podano w załączniku 4.

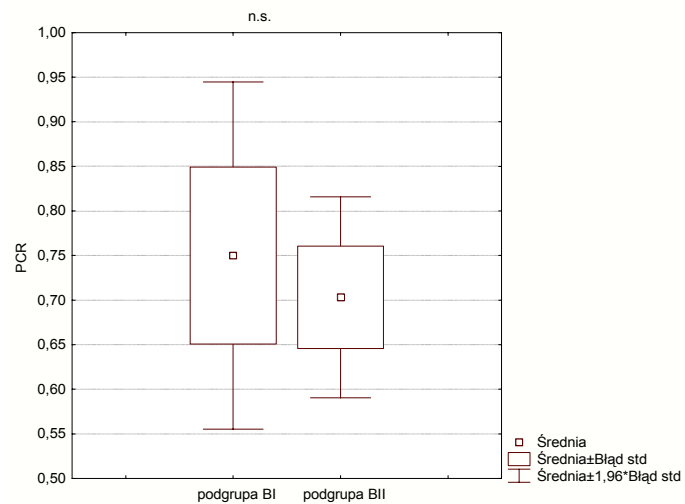
Porównanie częstości występowania zakażenia drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* w grupie A i w grupie B

Porównując częstość występowania *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka, określoną na podstawie PCR, pomiędzy podgrupami AI i AII oraz BI i BII, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, co ilustrują ryciny 24 i 25.



Ryc. 24. Porównanie częstości występowania zakażenia *Helicobacter* spp. u psów w podgrupach AI i AII

Fig 24. Comparison of frequency of *Helicobacter* spp. infection in dogs in subgroups AI and AII

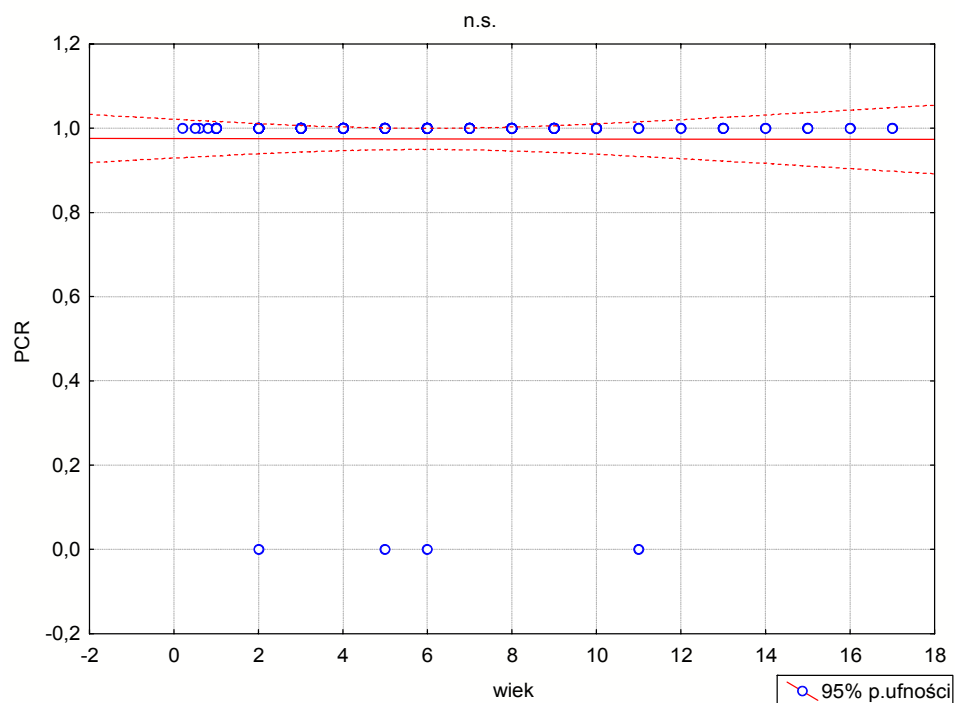


Ryc. 25. Porównanie częstości występowania zakażenia *Helicobacter* spp. u kotów w podgrupach BI i BII

Fig. 25. Comparison of frequency of *Helicobacter* spp. infection in cats in subgroups BI and BII

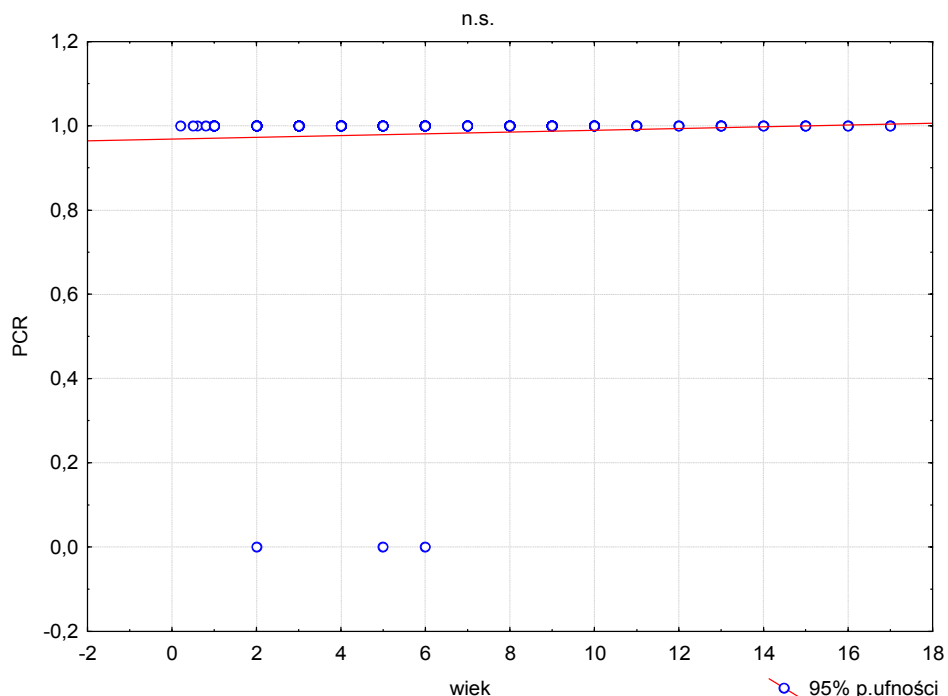
Porównanie częstości występowania zakażenia drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* w grupie A i w grupie B do wieku zwierząt

Porównując częstość występowania *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka, określoną na podstawie PCR, z wiekiem zwierząt zarówno w grupie A, jak i w grupie B, nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności, co ilustrują ryciny 26 i 27.



Ryc. 26. Korelacja między wiekiem psów (grupa A) a częstością występowania zakażenia *Helicobacter* spp. wykrytego metodą PCR

Fig. 26. Correlation between age of dogs (group A) and frequency of occurrence of *Helicobacter* spp. infection detected by PCR method



Ryc. 27. Korelacja między wiekiem kotów (grupa B) a częstością występowania zakażenia *Helicobacter* spp. wykrytego metodą PCR

Fig. 27. Correlation between age of cats (group B) and frequency of occurrence of *Helicobacter* spp. infection detected by PCR method

Wyniki badań histopatologicznych wycinków błony śluzowej żołądka

W podgrupie AI na podstawie badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej z trzonu i z części odźwiernikowej żołądka u 3 (15%) psów stwierdzono przewlekłe zapalenie żołądka stopnia lekkiego (*gastritis chronica levis*), przy czym u 2 psów zmiany zapalne występowały zarówno w trzonie, jak i w części odźwiernikowej, a u 1 – tylko w trzonie. Obecność drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* wykazano u 5 (25%) zwierząt, przy czym bakterie te obserwowano zarówno w trzonie, jak i w części odźwiernikowej żołądka, a intensywność zakażenia oceniono na 1 pkt.

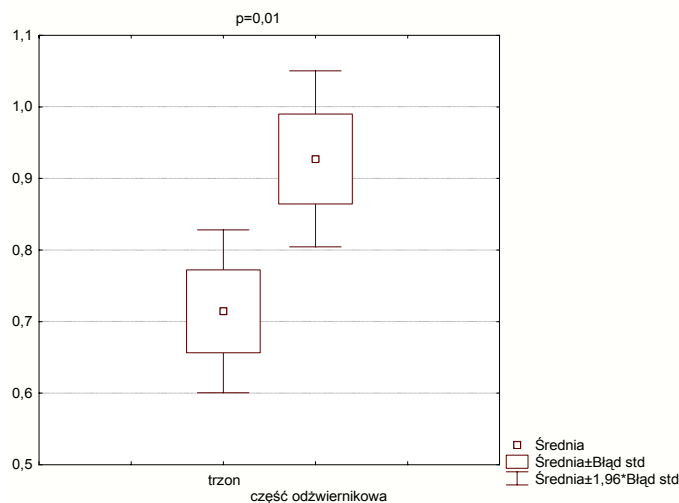
W podgrupie BI przewlekłe zapalenie żołądka stopnia lekkiego (*gastritis chronica levis*) stwierdzono u 5 (25%) kotów, przy czym u 3 kotów zmiany zapalne występowały zarówno w trzonie, jak i w części odźwiernikowej żołądka, u 1 – tylko w trzonie, a u 1 tylko w części odźwiernikowej żołądka. Obecność drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* wykazano u 3 (15%) kotów, przy czym bakterie te obserwowano zarówno

w trzonie, jak i w części odźwiernikowej żołądka, a intensywność zakażenia oceniono w 1 przypadku na 2 pkt., a w 2 – na 1 pkt.

W podgrupie AII przewlekłe zapalenie żołądka stwierdzono u 137 psów, w tym u 98 (71,5%) zwierząt zapalenie to było stopnia lekkiego (*gastritis chronica levis*), u 25 (18,2%) – stopnia umiarkowanego (*gastritis chronica mediū*), a u 15 (10,3%) – stopnia ciężkiego (*gastritis chronica magni*). U 97 (70,8%) psów zmiany zapalne występowały zarówno w trzonie, jak i w części odźwiernikowej, u 6 (4,4%) – w trzonie, a u 34 (24,8%) w części odźwiernikowej.

Porównując częstość występowania zmian zapalnych w trzonie i w części odźwiernikowej żołądka, w oparciu o ocenę histopatologiczną wycinków błony śluzowej, u psów w podgrupie AII, wykazano istotne statystycznie różnice, co ilustruje rycina 28.

występowanie
zmian zapalnych



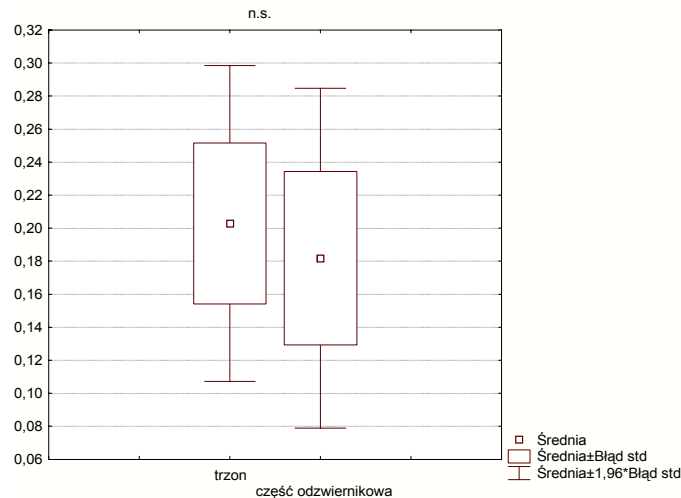
Ryc. 28. Porównanie częstości występowania zmian zapalnych w trzonie i w części odźwiernikowej żołądka w podgrupie AII w oparciu o badanie histopatologiczne bioptatów

Fig. 28. Comparison of frequency of inflammatory changes occurrence in corpus and pyloric antrum in subgroup AII basing on histopathological examination of biopstates

Obecność drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* wykazano u 36 (26,3%) zwierząt, przy czym bakterie te obserwowano zarówno w trzonie, jak i w części odźwiernikowej żołądka, a intensywność zakażenia oceniono na 1 pkt – w 31 przypadkach, a na 2 pkt. – w 5.

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w preparatach histopatologicznych z wycinków błony śluzowej z trzonu i z części odźwiernikowej żołądka w podgrupie AII, barwionych metodą Giemsy, nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy, co ilustruje rycina 29.

występowanie
Helicobacter spp.



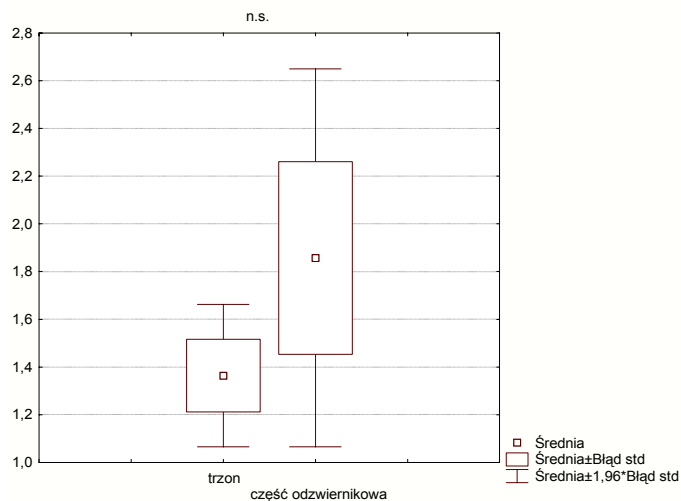
Ryc. 29. Porównanie częstości występowania *Helicobacter* spp. w trzonie i w części odźwiernikowej żołądka w podgrupie AII w oparciu o badanie histopatologiczne (barwienie metodą Giemsa)

Fig. 29. Comparison of frequency of *Helicobacter* spp. occurrence in corpus and pyloric antrum in subgroup AII basing on histopathological examination (Giemsa staining)

W podgrupie BII przewlekłe zapalenie żołądka stwierdzono u 64 kotów, w tym u 46 (71,9%) zwierząt zapalenie to było stopnia lekkiego (*gastritis chronica levis*), u 10 (15,6%) – stopnia umiarkowanego (*gastritis chronica medii*), a u 8 (12,5%) – stopnia ciężkiego (*gastritis chronica magni*). U 55 (85,9%) kotów zmiany zapalne występowały zarówno w trzonie, jak i w części odźwiernikowej, u 4 (6,3%) – w trzonie, a u 5 (7,8%) w części odźwiernikowej żołądka.

Porównując częstość występowania zmian zapalnych w trzonie i w części odźwiernikowej żołądka, w oparciu o ocenę histopatologiczną wycinków błony śluzowej, u kotów w podgrupie BII, nie wykazano istotnie statystycznych różnic, co ilustruje rycina 30.

występowanie
zmian zapalnych



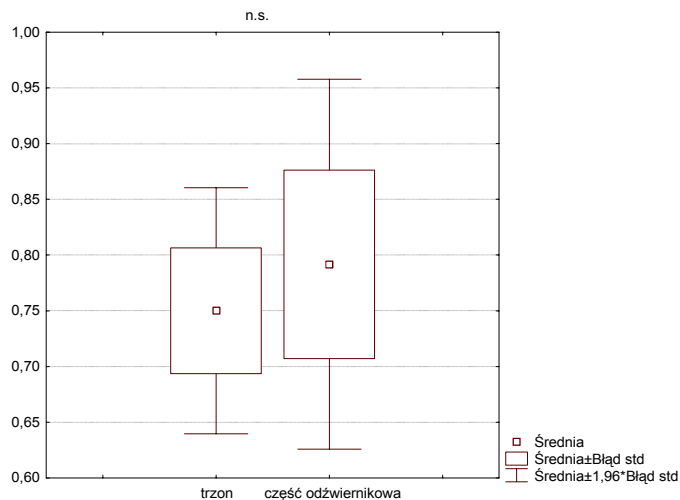
Ryc. 30. Porównanie częstości występowania zmian zapalnych w trzonie i w części odzwiernikowej żołądka w podgrupie BII w oparciu o badanie histopatologiczne bioptatów

Fig. 30. Comparison of frequency of inflammatory changes occurrence in corpus and pyloric antrum in subgroup BII basing on biopate histopathological examination of biopates

Obecność drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* wykazano u 11 (17,2%) zwierząt, przy czym bakterie te obserwowano zarówno w trzonie, jak i w części odzwiernikowej żołądka, a intensywność zakażenia oceniono na 1 pkt – w 7 przypadkach, na 2 pkt. – w 3, a na 3 pkt. – w 1.

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w preparatach histopatologicznych z wycinków błony śluzowej z trzonu i z części odzwiernikowej żołądka, barwionych metodą Giemsa, u kotów w podgrupie BII, nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy, co ilustruje rycina 31.

występowanie
Helicobacter spp.



Ryc. 31. Porównanie częstości występowania *Helicobacter* spp. w trzonie i w części odźwiernikowej żołądka w podgrupie BII w oparciu o badanie histopatologiczne (barwienie metodą Giemsa)

Fig. 31. Comparison of frequency of *Helicobacter* spp. occurrence in corpus and pyloric antrum in subgroup basing on histopathological examination (Giemsa staining)

Przykładowe zdjęcia z badania histopatologicznego podano w załączniku 5.

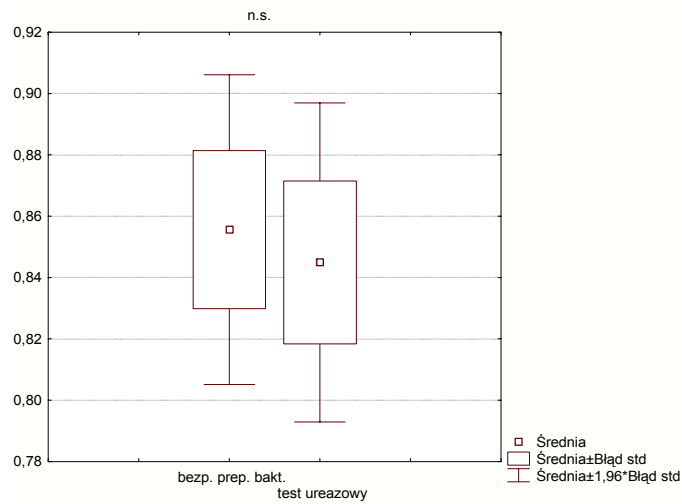
Analiza porównawcza inwazyjnych metod zastosowanych do wykrywania zakażenia *Helicobacter* spp. w błonie śluzowej żołądka u psów i kotów

W związku z tym, że nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w wynikach uzyskanych przy stosowaniu inwazyjnych metod wykrywania zakażenia *Helicobacter* spp. w błonie śluzowej żołądka pomiędzy podgrupami kontrolnymi (AI, BI) a podgrupami doświadczalnymi (AII, BII), porównano te metody między sobą w odniesieniu do całej populacji zbadanych zwierząt.

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i bezpośredniego preparatu bakteriologicznego

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka metodą szybkiego testu ureazowego i metodą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego w badanej populacji zwierząt, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, co ilustruje rycina 32.

wykrywalność
zakażeń
Helicobacter spp.



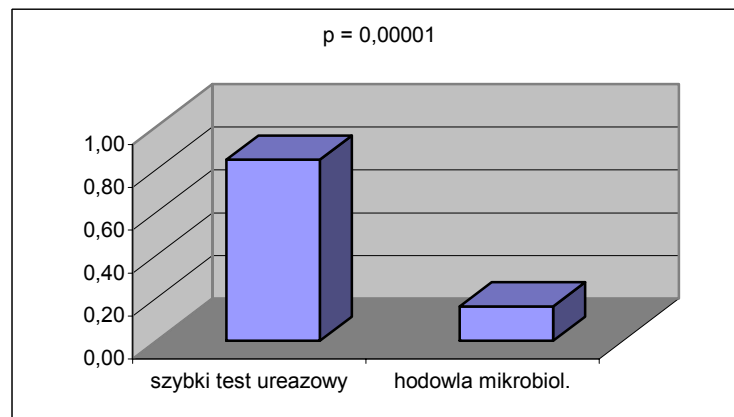
Ryc. 32. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i bezpośredniego preparatu bakteriologicznego

Fig. 32. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of rapid urease test and direct bacteriological preparation

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i mikrobiologicznych badań hodowlanych

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka metodą szybkiego testu ureazowego i metodą mikrobiologicznych badań hodowlanych, w badanej populacji zwierząt, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, co ilustruje rycina 33.

wykrywalność
zakażeń
Helicobacter spp.

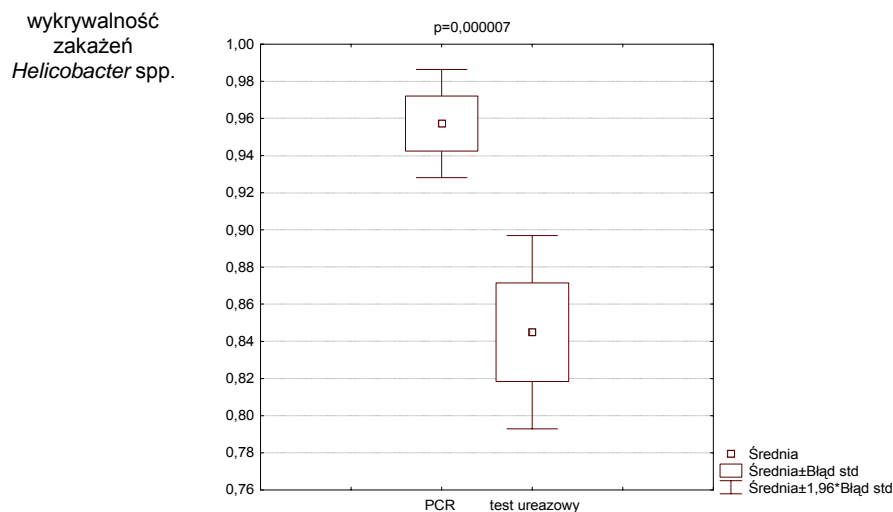


Ryc. 33. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i mikrobiologicznych badań hodowlanych

Fig. 33. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of rapid urease test and microbiological culture examinations

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i metody PCR

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka metodą szybkiego testu ureazowego i metodą PCR, w badanej populacji zwierząt, wykazano istotne statystycznie różnice, co ilustruje rycina 34.



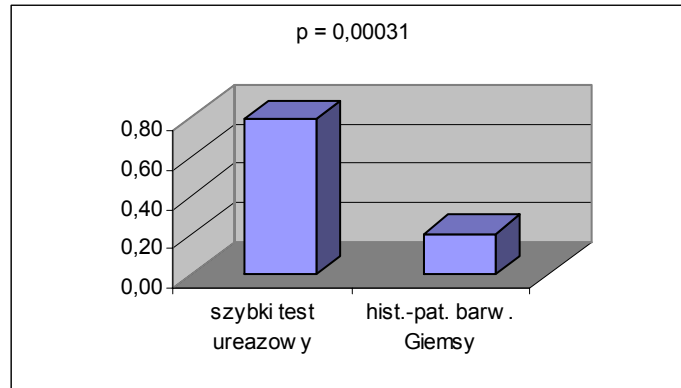
Ryc. 34. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i metody PCR

Fig. 34. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of rapid urease test and PCR method

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsy

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka metodą szybkiego testu ureazowego i w preparatach histopatologicznych wykonanych z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsy, w badanej populacji zwierząt, wykazano istotne statystycznie różnice, co ilustruje rycina 35.

wykrywalność
zakażeń
Helicobacter spp.



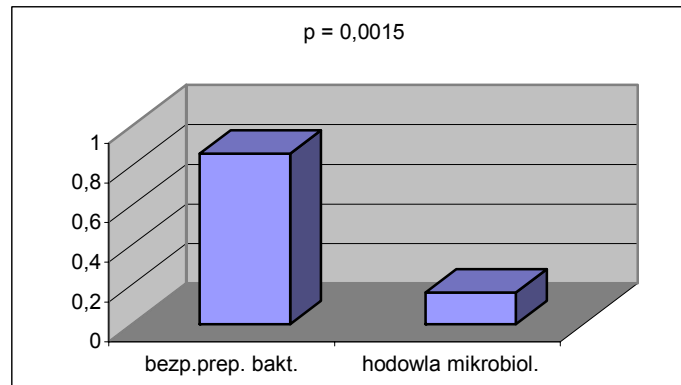
Ryc. 35. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą szybkiego testu ureazowego i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsa

Fig. 35. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of rapid urease test and histopathological preparation made from gastric mucous membrane biopsies using Giemsa staining

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i mikrobiologicznych badań hodowlanych

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka metodą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i metodą mikrobiologicznych badań hodowlanych, w badanej populacji zwierząt, stwierdzono różnice istotne statystycznie, co ilustruje rycina 36.

wykrywalność
zakażeń
Helicobacter spp.

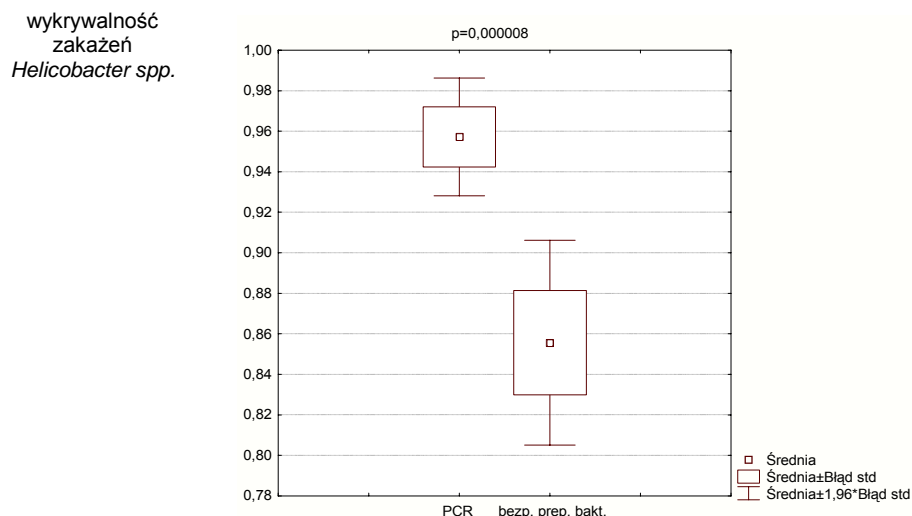


Ryc. 36. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i mikrobiologicznych badań hodowlanych

Fig. 36. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of direct bacteriological preparation and microbiological culture examinations

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i metody PCR

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i metodą PCR, w badanej populacji zwierząt, stwierdzono różnice istotne statystycznie, co ilustruje rycina 37.



Ryc. 37. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i metody PCR

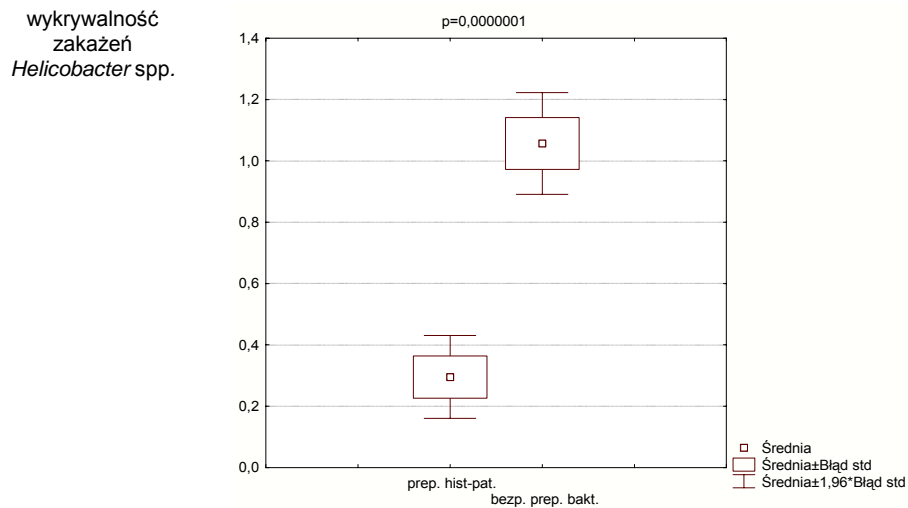
Fig. 37. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of direct bacteriological preparation and PCR method

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsy

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsy, w badanej populacji zwierząt, stwierdzono różnice istotne statystycznie, co ilustruje rycina 38.

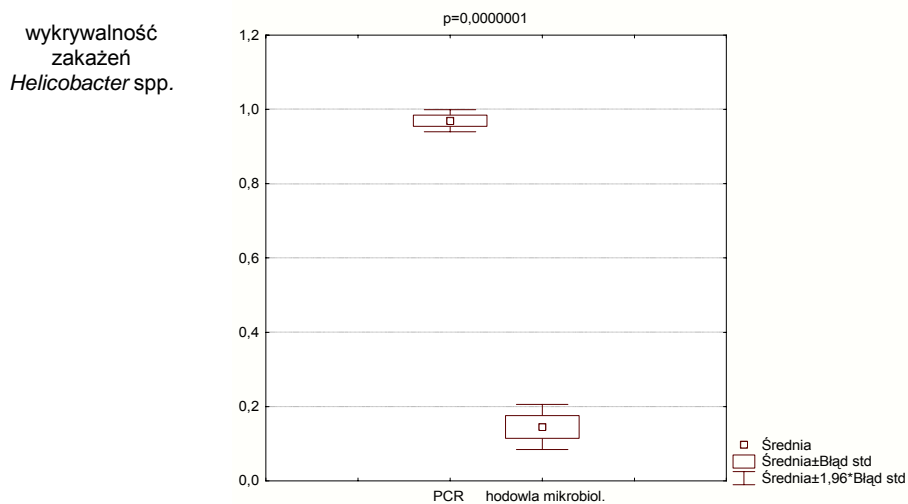
Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą mikrobiologicznych badań hodowlanych i metody PCR

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka za pomocą mikrobiologicznych badań hodowlanych i metody PCR, w badanej populacji zwierząt, stwierdzono różnice istotne statystycznie, co ilustruje rycina 39.



Ryc. 38. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą bezpośredniego preparatu bakteriologicznego i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsa

Fig. 38. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infection by means of direct bacteriological preparation and histopathological preparation made from gastric mucous membrane biopsies using Giemsa staining

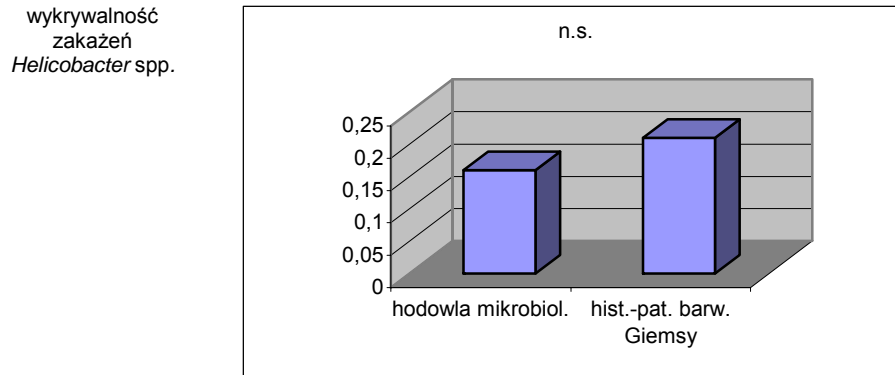


Ryc. 39. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą mikrobiologicznych badań hodowlanych i metody PCR

Fig. 39. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of microbiological culture examinations and PCR method

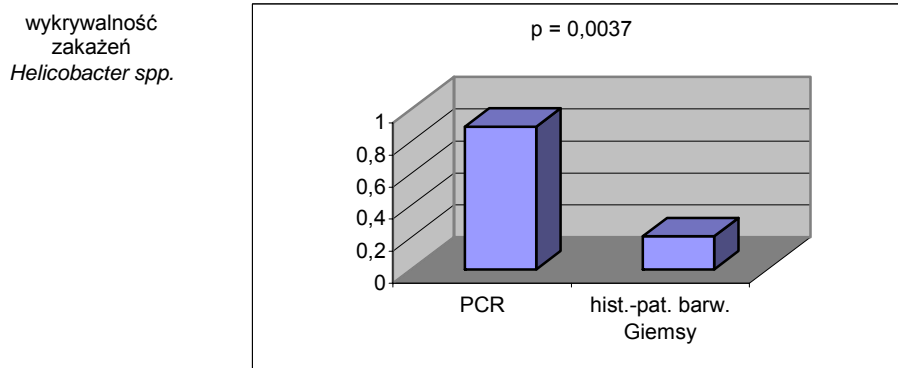
Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą mikrobiologicznych badań hodowlanych i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsy

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka za pomocą mikrobiologicznych badań hodowlanych i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsa, w badanej populacji zwierząt, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, co ilustruje rycina 40.



Ryc. 40. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą mikrobiologicznych badań hodowlanych i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsa

Fig. 40. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of microbiological culture examinations and histopathological preparation made from gastric mucous membrane biopsates using Giemsa staining



Ryc. 41. Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą metody PCR i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsa

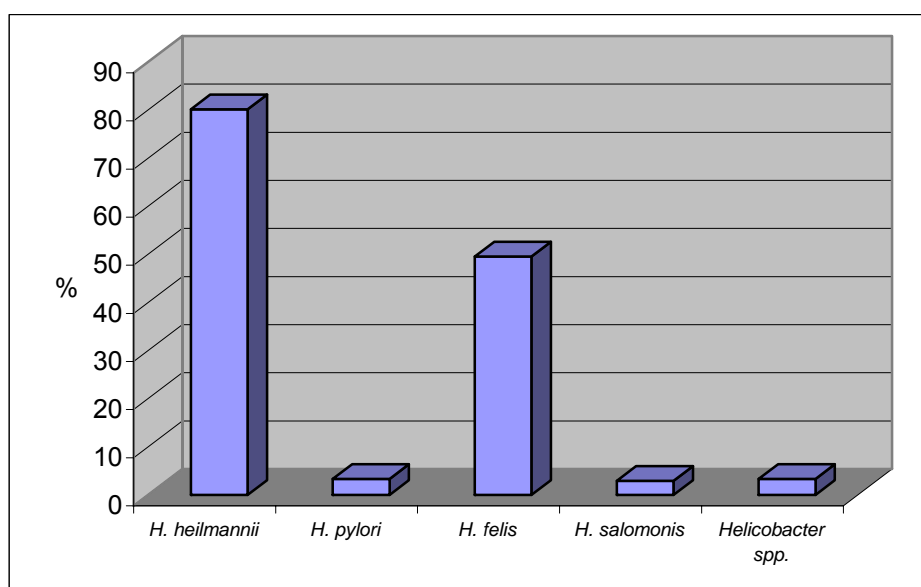
Fig. 41. Comparison of detection of *Helicobacter* spp. infections by means of PCR method and histopathological preparation made from gastric mucous membrane biopsates using Giemsa staining

Porównanie wykrywalności zakażeń *Helicobacter* spp. za pomocą metody PCR i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsy

Porównując wykrywalność *Helicobacter* spp. w wycinkach błony śluzowej żołądka za pomocą metody PCR i preparatu histopatologicznego wykonanego z wycinków błony śluzowej żołądka barwionych metodą Giemsy, w badanej populacji zwierząt, stwierdzono różnice istotne statystycznie, co ilustruje rycina 41.

Częstość występowania poszczególnych gatunków *Helicobacter* w błonie śluzowej żołądka w badanej populacji zwierząt w oparciu o badanie PCR

Na podstawie badania PCR wycinków błony śluzowej żołądka w badanej populacji zwierząt *Helicobacter heilmannii* stwierdzono u 193 (80,1%) zwierząt, *Helicobacter pylori* – u 8 (3,3%), *Helicobacter felis* – u 119 (49,4%), a *Helicobacter salomonis* – u 7 (2,9%). W 8 (3,3%) przypadkach nie ustalono gatunku *Helicobacter* (ryc. 42).

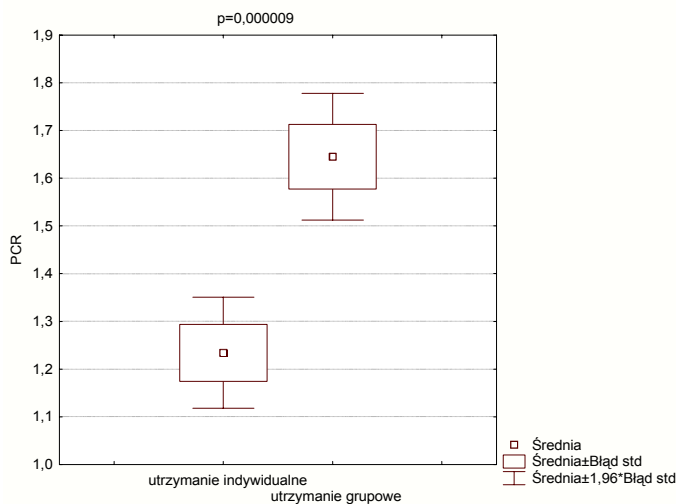


Ryc. 42. Częstość występowania poszczególnych gatunków *Helicobacter* w badanej populacji zwierząt

Fig. 42. Frequency of *Helicobacter* spp. occurrence in examined population of animals

Kolonizacja błony śluzowej żołądka drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* spp. a system utrzymania zwierząt

Porównując ilość gatunków *Helicobacter* stwierdzanych w wycinkach błony śluzowej żołądka, w oparciu o badanie PCR, pomiędzy zwierzętami utrzymywanymi indywidualnie i zwierzętami utrzymywanymi grupowo, wykazano, że przy grupowym utrzymaniu ilość gatunków kolonizujących błonę śluzową żołądka jest istotnie statystycznie większa (ryc. 43).



Ryc. 43. Zależność ilości wykrytych gatunków *Helicobacter* spp. metodą PCR od systemu utrzymania zwierząt

Fig. 43. Relationship between number of *Helicobacter* spp. detected by PCR method and animal keeping system

Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronicznej

Badania w mikroskopach elektronicznych, zwłaszcza scanningowym, umożliwiły uwidocznienie drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* na powierzchni błony śluzowej żołądka badanych zwierząt, a na podstawie ich morfologii możliwa była ich wstępna identyfikacja (załącznik 6). Najczęściej obserwowano bakterie o morfologii *Helicobacter heilmannii* i *Helicobacter felis*.

5. DYSKUSJA

Zdaniem Simpsona i Burrowsa [1997] gatunkami najczęściej zasiedlającymi błonę śluzową żołądka u psów są: *Helicobacter felis*, *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter bilis* oraz *Flexispira rappini* (obecna nazwa *Helicobacter rappini*), a u kotów: *Helicobacter felis*, *Helicobacter heilmannii* oraz *Helicobacter pylori*. Z kolei Hänninen [2005] wśród gatunków spotykanych w błonie śluzowej żołądka psów wymienia: *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter felis*, *Helicobacter bizzozeronii* oraz *Helicobacter salomonis*, a kotów: *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter felis*, *Helicobacter bizzozeronii*. Natomiast Baillon i Marshall-Jones [2004] podają, że u psów błonę śluzową żołądka mogą kolonizować: *Helicobacter felis*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter salomonis*, *Flexispira rappini* oraz *Helicobacter heilmannii*, a u kotów: *Helicobacter felis*, *Helicobacter heilmannii* oraz *Helicobacter pylori*. Z kolei przeprowadzone przez autora badania wykazały, że błonę śluzową żołądka u psów najczęściej kolonizują następujące gatunki *Helicobacter*: *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter felis*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter salomonis*, a u kotów: *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter felis* oraz *Helicobacter salomonis*.

W badaniach własnych zaobserwowano, że zarówno u psów z podgrupy AII, jak i u kotów z podgrupy BII, czyli zwierząt u których podczas endoskopii stwierdzono cechy przewlekłego zapalenia żołądka, objawy kliniczne występowały istotnie statystycznie rzadziej (60/137 psów; 25/64 kotów). Podobne obserwacje w odniesieniu do psów poczynili Sapieryński i Malicka [2004]. Na podstawie badania sekcyjnego rozpoznawali oni zmiany zapalne w żołądku u psów, które w zdecydowanej większości przyżyciowo nie wykazywały objawów chorobowych, związanych z przewodem pokarmowym.

Dodatni wynik szybkiego testu ureazowego uzyskano u 90% psów z podgrupy AI, 75% kotów z podgrupy BI oraz u 85,4% psów z podgrupy AII i 65,6% kotów z podgrupy BII. Na uwagę zasługuje fakt, że w przeprowadzonej analizie statystycznej wyników szybkiego testu ureazowego nie wykazano różnic istotnych statystycznie między grupą kontrolną (podgrupy: AI i BI) a grupą doświadczalną (podgrupy: AII i BII). Świadczy to o tym, że w wycinkach błony śluzowej pobranych z żołądka drobnoustroje wytwarzające ureazę, do których należy większość gatunków *Helicobacter*, spotykane są z bardzo zbliżoną częstością tak u zwierząt zdrowych, jak i u zwierząt chorych. Sapieryński i wsp. [2003], którzy wykonali szybki test ureazowy z wycinkami błony śluzowej żołądka, pobranymi od 94 psów poddanych eutanazji z różnych przyczyn, otrzymali zbliżony wynik testu ureazowego, który był dodatni u 85,1% badanych zwierząt. Norris i wsp. [1999], w badaniach przeprowadzonych u 15 zdrowych kotów, uzyskali nieco wyższy odsetek pozytywnych wyników szybkiego testu ureazowego, który wyniósł 86,6%. Natomiast Jalava i wsp. [1998] u 95 psów (54 – zdrowe psy, 23 – z objawami ze strony przewodu pokarmowego, 18 – poddanych eutanazji z różnych przyczyn) i u 22 kotów

(5 – zdrowych kotów, 2 – z objawami ze strony przedniego odcinka przewodu pokarmowego, 15 poddanych eutanazji z różnych przyczyn) pozytywny wynik testu ureazowego uzyskali aż u 100% zwierząt. Podobnie Happonen i wsp. [1996], w materiale pobranym *post mortem* z żołądka 10 psów i 10 kotów, uzyskali: u psów – 100% dodatnich wyników testu ureazowego z wycinków błony śluzowej z trzonu żołądka i 62% z wycinków z części odźwiernikowej żołądka oraz analogicznie u kotów – 100% z trzonu i 100% z części odźwiernikowej. Z kolei Hwang i wsp. [2002] zaobserwowali niższy odsetek dodatnich wyników szybkiego testu ureazowego, który wystąpił u 78,4% badanych psów i 64% badanych kotów, przy czym badania te dotyczyły łącznie zwierząt zdrowych i chorych. Natomiast Neiger i wsp. [1998] w badaniach, którymi objęto 58 zdrowych kotów, dodatni wynik szybkiego testu ureazowego uzyskali u 45 zwierząt, co stanowiło 78% badanej populacji.

Wyniki szybkiego testu ureazowego uzyskane w badaniach własnych w odniesieniu do obserwacji innych autorów są zbieżne i wskazują, że w żołądku psów i kotów bakterie wytwarzające ureazę (*Helicobacter* spp.) występują w znacznym odsetku i dotyczy to zarówno zwierząt zdrowych, jak i chorych.

U badanych zwierząt w bezpośrednich preparatach bakteriologicznych, wykonanych z wycinków błony śluzowej z trzonu i z części odźwiernikowej żołądka, wykazano obecność spiralnych, zakrzywionych Gram-ujemnych drobnoustrojów także w wysokim odsetku. Na podkreślenie zasługuje fakt, że nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między obecnością spiralnych, zakrzywionych Gram-ujemnych drobnoustrojów w trzonie i w części odźwiernikowej żołądka w badanych podgrupach zwierząt (AI, BI, AII, BII). Spostrzeżenia te potwierdzają inni autorzy [Happonen i wsp., 1998; Neiger i Simpson, 2000; Norris i wsp., 1999; Simpson, 2005].

W wykonanych w pracy badaniach hodowlanych wyniki pozytywne uzyskano u stosunkowo niskiej liczby zwierząt (podgrupa AI 6/20; podgrupa BI 0/20; podgrupa AII 21/137; podgrupa BII 11/64). Na podstawie morfologii wyhodowanych kolonii bakteryjnych, morfologii komórek bakteryjnych wyizolowanych z hodowli oraz ich różnicowania biochemicznego ustalono, że na zastosowanych podłożach wzrastały: *Helicobacter felis* oraz *Helicobacter canis*. Spośród 38 pozytywnych hodowli mikrobiologicznych najczęściej obserwowano wzrost *Helicobacter felis* (36/38). Wzrost *Helicobacter canis* stwierdzono tylko w 1 przypadku; także w 1 przypadku wystąpił wzrost spiralnych, zakrzywionych Gram-ujemnych drobnoustrojów, których jednak nie udało się zidentyfikować w oparciu o szeregi biochemiczne. Podobnie niski odsetek pozytywnych wyników mikrobiologicznych badań hodowlanych zaobserwowali: Cattoli i wsp. [1999], którzy spośród 25 badanych psów wynik dodatni uzyskali jedynie w materiale pobranym od 5; Happonen i wsp. [1996], którzy pozytywne wyniki hodowli mikrobiologicznej otrzymali u 3 spośród 8 psów i u 1 spośród 6 kotów oraz Simpson [2005], który na podstawie badań przeprowadzonych w Finlandii u 21 zakażonych *Helicobacter* spp. kotów dodatni wynik mikrobiologicznych badań hodowlanych uzyskał jedynie u 3 zwierząt i był to *Helicobacter felis*. W badaniach Happonen'a i wsp. [1996] wyhodowano *Helicobacter heilmannii* oraz *Helicobacter felis*. Natomiast Jalava i wsp. [1998] w swoich badaniach wyhodowali tylko *Helicobacter felis*. W badaniach Neigera i wsp. [1998] pozytywny wynik mikrobiologicznych badań hodowlanych uzyskano jedynie u 1 spośród 58 przebadanych kotów, u których w preparatach bezpośrednich stwierdzano obecność spiralnych, zakrzywionych

Gram-ujemnych drobnoustrojów. Wyhodowany drobnoustrój autorzy zidentyfikowali jako *Helicobacter pametensis*. Warto nadmienić, że Norris i wsp. [1999], w badaniach przeprowadzonych u 15 klinicznie zdrowych kotów, uzyskując pozytywny wynik szybkiego testu ureazowego u 13 kotów i potwierdzając obecność spiralnych, zakrzywionych Gram-ujemnych drobnoustrojów w bezpośrednich preparatach bakteriologicznych u 11, w ogóle nie wyhodowali *Helicobacter* spp. W odniesieniu do wyników badań własnych na uwagę zasługują także wyniki badań: Happonena i wsp. [1998], którzy w mikrobiologicznych badaniach hodowlanych materiału pobranego od psów częściej obserwowali wzrost *Helicobacter bizzozeronii*/*Helicobacter salomonis* niż *Helicobacter felis* oraz Jalavy i wsp. [1998], którzy otrzymali identyczne wyniki z materiału pobranego od psów i kotów.

W świetle obserwacji własnych oraz opinii innych autorów potwierdzona została teza, że hodowla *Helicobacter* spp. na podłożach *in vitro* jest trudna i bardzo często kończy się niepowodzeniem. Zwłaszcza dotyczy to *Helicobacter heilmannii*.

Wykorzystany w badaniach własnych szeroki zakres badań molekularnych z zastosowaniem polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), obejmujący zarówno klasyczną metodę PCR, jak i technikę nested – PCR oraz seminested – PCR, umożliwił zidentyfikowanie w wycinkach błony śluzowej żołądka następujących gatunków *Helicobacter*: *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, *Helicobacter salomonis* oraz *Helicobacter bizzozeronii*. W oparciu o wykrywanie, w wyizolowanym z tkanek DNA, genów ureaB kodujących ureazę, możliwe było ustalenie, czy zwierzęta są zakażone *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter pylori* oraz *Helicobacter felis*. Z kolei w reakcjach PCR ze starterami CAR577F i CAR636R, specyficznymi dla 16S rDNA trzech gatunków, tj. *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter felis* i *Helicobacter salomonis*, a następnie w reakcjach PCR ze starterami Bi1F i Bi2R oraz T3B i HT135R możliwe było wykrywanie obecności *Helicobacter bizzozeronii* oraz *Helicobacter salomonis* w badanym materiale. W przypadku zwierząt, u których ww. badania PCR dały negatywne wyniki, przyjęto założenie, że zwierzęta nie są zakażone drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* względnie zakażone są innymi niż ww. gatunkami. Wykonanie reakcji seminested – PCR ze starterami He1F, He1R1 i He1R2 umożliwiło zweryfikowanie powyższego założenia, bowiem wykorzystane startery amplifikują wysoce konserwatywną sekwencję 16S rDNA o długości 251 pz, która jest obecna u wszystkich znanych gatunków z rodzaju *Helicobacter*. Dodatni wynik testu był dowodem, że w badanym materiale znajdowały się drobnoustroje z rodzaju *Helicobacter*, jednak nie określał on przynależności gatunkowej.

U badanych psów, za pomocą metody PCR, wykryto następujące gatunki *Helicobacter*, które kolonizowały błonę śluzową żołądka: *Helicobacter heilmannii* (133/157), *Helicobacter felis* (81/157), *Helicobacter pylori* (8/157) oraz *Helicobacter salomonis* (6/157). U 5 psów w wycinkach błony śluzowej żołądka wykryto obecność *Helicobacter* spp., jednak nie określono jego przynależności gatunkowej. Z przebadanych 157 psów (podgrupa AI i podgrupa AII) jedynie 4 zwierzęta były wolne od zakażenia i pochodziły one z podgrupy AII. Z kolei u badanych kotów wykryto: *Helicobacter heilmannii* (60/84), *Helicobacter felis* (38/84), *Helicobacter pylori* (0/84) oraz *Helicobacter salomonis* (1/84). U 3 kotów w wycinkach błony śluzowej żołądka wykryto obecność *Helicobacter* spp., jednak nie określono jego przynależności gatunkowej. Z przebadanych 84 kotów

(podgrupa BI i podgrupa BII) 23 zwierzęta były wolne od zakażenia. Zarówno u psów, jak i u kotów obserwowano występowanie zakażeń mieszanych. Simpson [2005], w badaniach przeprowadzonych metodą PCR u 49 kotów w Szwajcarii, w 39 przypadkach wykrył *Helicobacter heilmannii*. Ten sam autor [2005], w badaniach przeprowadzonych w USA u 36 kotów, wykrył: w 18 przypadkach – *Helicobacter heilmannii*, w 6 – *Helicobacter felis*, w 2 – *Helicobacter bizzozeronii*, a u 10 kotów wykrył jedynie zakażenie *Helicobacter* spp., jednak nie określił przynależności gatunkowej. Obserwacje tego autora są zgodne z wynikami badań własnych i potwierdzają, że w błonie śluzowej żołądka kotów najczęściej spotykany jest *Helicobacter heilmannii*. Podobne wyniki uzyskali także Hwang i wsp. [2002], którzy u 18 z 21 przebadanych kotów wykryli *Helicobacter heilmannii*, a u 2 – *Helicobacter felis*. Autorzy ci, w badaniach przeprowadzonych u 42 psów, w 32 przypadkach wykryli zakażenie *Helicobacter heilmannii*, a jedynie w 2 przypadkach zakażenie *Helicobacter felis*. Obserwacje Hwanga i wsp. są zgodne z wynikami badań własnych i potwierdzają tezę, że najczęściej w błonie śluzowej żołądka psów spotykany jest *Helicobacter heilmannii*, jednak w odniesieniu do zakażenia *Helicobacter felis* znacznie różni się częstością występowania tej bakterii – Hwang i wsp. 4,8% psów, badania własne – 51,6%. Natomiast Neiger i wsp. [1998], w badaniach przeprowadzonych metodą PCR u 49 kotów, w 38 przypadkach wykryli *Helicobacter heilmannii*, nie stwierdzając zakażenia *Helicobacter felis* i *Helicobacter pylori*. Na uwagę zasługują również wyniki badań Neigera i wsp. [1999], którzy za pomocą PCR wykazali u psów częstsze występowanie zakażenia *Helicobacter bizzozeronii*/*Helicobacter salomonis* niż *Helicobacter felis*.

W badaniach własnych, na podstawie PCR, u 8 psów w wycinkach błony śluzowej żołądka stwierdzono obecność *Helicobacter pylori*. W literaturze medycznej przeważają opinie, że drobnoustroj ten może kolonizować błonę śluzową żołądka u kotów i nie był dotychczas stwierdzany u psów [Cygan i Cygan, 1998; Dubois, 1998; Esteves i wsp., 2000; Heatley, 1999; Simpson, 2005].

Badania własne wykazały także, że nie ma różnic istotnych statystycznie w częstości występowania drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* pomiędzy zwierzętami z podgrup AI i BI (zdrowe) a zwierzętami z podgrup AII i BII (chore). Potwierdzają to badania Simpsona [2005], który stwierdził zakażenie bakteriami z rodzaju *Helicobacter* u 67 – 100% zdrowych psów i u 74 – 90% psów z objawami wymiotów oraz u 47 – 100% zdrowych kotów i u 57 – 100% kotów z objawami wymiotów.

Na podstawie wyników badań histopatologicznych wycinków błony śluzowej z trzonu i z części odźwiernikowej żołądka w odniesieniu do zwierząt zdrowych (podgrupa AI i BI) zaobserwowano, że pomimo braku objawów klinicznych i zmian w obrazie endoskopowym (w ocenie makroskopowej) u 3 psów oraz u 5 kotów stwierdzono przewlekłe zapalenie żołądka lekkiego stopnia (*gastritis chronica levis*). Podobnie Simpson i wsp. [1999; 1999], w dwóch różnych pracach badawczych, wykazali możliwość występowania przewlekłego zapalenia żołądka stopnia lekkiego u zwierząt nie wykazujących objawów klinicznych. Obserwacje te potwierdzają także badania: Happonena i wsp. [1998], którzy u psów bez objawów klinicznych w badaniu histopatologicznym wycinków błony śluzowej rozpoznali przewlekłe zapalenie żołądka stopnia lekkiego oraz Yamasaki'ego i wsp. [1998], którzy u psów i u kotów, nie wykazujących objawów klinicznych, również

na podstawie badania histopatologicznego rozpoznali przewlekłe zapalenie żołądka lekkiego stopnia.

W psów z podgrupy AII ocena histopatologiczna wycinków błony śluzowej żołądka wykazała, że najczęściej występowało przewlekłe zapalenie żołądka stopnia lekkiego (98/137), a znacznie rzadziej stopnia umiarkowanego (25/137) i ciężkiego (15/137). Analogicznie w podgrupie BII przewlekłe zapalenie żołądka stopnia lekkiego rozpoznano u 46 z 64 kotów, stopnia umiarkowanego u 10, a stopnia ciężkiego u 8. Powyższe obserwacje potwierdzają w swoich badaniach Simpson i wsp. [1999; 1999], Simpson [2005] oraz Yamasaki i wsp. [1998].

W oparciu o wyniki badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej żołądka u psów w podgrupie AII wykazano, że zmiany zapalne w części odźwiernikowej występowały istotnie statystycznie częściej, niż w trzonie tego narządu. W przypadku kotów w podgrupie BII nie zaobserwowano powyższej zależności. Obserwacje dotyczące psów potwierdza Sapieryński i wsp. [2003]. Natomiast Happonen [1996], w odniesieniu do kotów, częściej stwierdzał zapalenie w części odźwiernikowej żołądka.

W badaniach własnych nie stwierdzono różnicy w stopniu kolonizacji błony śluzowej żołądka przez drobnoustroje z rodzaju *Helicobacter* w trzonie i w części odźwiernikowej tego narządu u zwierząt chorych. Lee i wsp. [1992], Simpson i wsp. [1999] oraz Happonen i wsp. [1996] w badaniach przeprowadzonych u psów – podobnie nie zauważyli różnicy w stopniu kolonizacji błony śluzowej poszczególnych części anatomicznych żołądka. U badanych zwierząt nie zaobserwowano zależności pomiędzy stopniem kolonizacji błony śluzowej żołądka, a nasileniem zmian zapalnych, co jest zgodne z opinią Happonena i wsp. [1998]. Hwanga i wsp. [2002], Simpsona i wsp. [1999] oraz Wiinberga i wsp. [2005]. Natomiast zdaniem Lee i wsp. [1992] oraz Sapieryńskiego i wsp. [2003] taka zależność istnieje.

Niektórzy autorzy [Cattoli i wsp., 1999; Happonen i wsp., 1998; Sapieryński i Malicka, 2005; Simpson i wsp., 1999; Stoffel i wsp., 2000] wskazują na możliwość rozpoznawania zakażenia oraz różnicowania drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* między sobą w oparciu o badania w mikroskopie elektronowym. Tezę tę potwierdzają badania własne, zwłaszcza z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej scanningowej, na podstawie których udało się zidentyfikować *Helicobacter heilmannii* i *Helicobacter felis*.

Na podstawie badań własnych stwierdzono, że najlepszą metodą rozpoznawania zakażenia błony śluzowej żołądka drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* jest badanie biopłatów metodą PCR, które określa przynależność gatunkową. Przyjęta w pracy metodyka badań PCR zasługuje na szczególną uwagę i jest godna polecenia.

Istotną statystycznie różnicę w analizie porównawczej, wykorzystanych w badaniach inwazyjnych metod wykrywania zakażenia *Helicobacter* spp., na korzyść PCR wykazano porównując: PCR z testem ureazowym, PCR z bezpośrednim preparatem bakteriologicznym, PCR z mikrobiologicznymi badaniami hodowlanymi oraz PCR z preparatem histopatologicznym, barwionym metodą Giemsa. Rozpoznawanie zakażeń błony śluzowej żołądka drobnoustrojami *Helicobacter* spp. metodą PCR zalecają także: Hänninen [2005], Neiger i wsp. [1999] oraz Owen [1998].

Z pozostałych metod wykorzystanych w badaniach własnych do wykrywania zakażenia *Helicobacter* spp. stosunkowo dobrą wykrywalność uzyskano stosując szybki test ureazowy oraz bezpośredni preparat bakteriologiczny, aczkolwiek pamiętać należy,

że szybki test ureazowy nie powinien być stosowany samodzielnie [Wiśniewska, 2003]. W opinii autora pracy mikrobiologiczne badania hodowlane oraz wykazywanie obecności *Helicobacter* spp. w preparatach histopatologicznych z wycinków błony śluzowej żołądka, za pomocą barwienia metodą Giemsy, charakteryzowały się stosunkowo niską wykrywalnością zakażeń *Helicobacter* spp. Podobnego zdania są Happonen i wsp. [1998], którzy uwzględniając czułość zastosowanych w swoich badaniach metod wykazali, że wykrywalność zakażenia *Helicobacter* spp. była wyższa w przypadku stosowania bezpośredniego preparatu bakteriologicznego niż w przypadku badania histopatologicznego i szybkiego testu ureazowego.

W badaniach własnych przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała zależności pomiędzy wiekiem zwierząt w grupie A oraz w grupie B a częstością występowania zakażenia błony śluzowej żołądka drobnoustrojami *Helicobacter* spp. Z kolei w badaniach Sapierzyńskiego i wsp. [2003], przeprowadzonych u psów, które autorzy podzielili na 3 grupy wiekowe: do 6 mies., od 6 mies. do 5 lat oraz powyżej 5 lat, wykazano częstsze występowanie zakażenia *Helicobacter* spp. u psów w wieku powyżej 5 lat (89,18%) w porównaniu do psów w wieku do 6 mies. (71,42%) oraz psów w wieku od 6 mies. do 5 lat (69,2%).

Na podstawie analizy statystycznej ilości wykrywanych metodą PCR gatunków *Helicobacter* spp. i systemu utrzymania zwierząt wykazano, że u zwierząt utrzymywanych grupowo częściej występowały zakażenia mieszane (dwoma, trzema, a nawet czterema gatunkami). Wydaje się, że taki system utrzymania sprzyja rozprzestrzenianiu się zakażenia. Podobne obserwacje poczynili Henry i Long [1997] oraz Simpson [2005], którzy stwierdzili zakażenie *Helicobacter* spp. u 100% psów utrzymywanych w systemie grupowym (panelowym) oraz u 100% beagle, także utrzymywanych grupowo, wykorzystywanych do różnych badań laboratoryjnych.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że zakażenie błony śluzowej żołądka drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* spp. jest szeroko rozpowszechnione wśród psów i kotów, a najlepszą metodą rozpoznawania infekcji jest badanie PCR. Zaproponowana w pracy metoda badań PCR charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością wykrywania zakażeń *Helicobacter* spp. W oparciu o badania własne wykazano, że psy i koty mogą być rezerwuarem drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter*, chorobotwórczych dla człowieka (*Helicobacter pylori* oraz *Helicobacter heilmannii*) i stanowić dla niego potencjalne źródło zakażenia. Powyższą tezę potwierdza fakt, że podczas realizacji badań, we współpracy z Akademią Medyczną we Wrocławiu, stwierdzono przypadek śródowiskowego zapalenia błony śluzowej żołądka u dziecka, wywołanego przez *Helicobacter heilmannii*. Wykonane badania endoskopowe u psa i kota, z którymi dziecko miało codzienny kontakt, wykazało u tych zwierząt przewlekłe zapalenie żołądka, a w badaniu PCR wycinków błony śluzowej stwierdzono zakażenie *Helicobacter heilmannii* [Gościński i wsp., 2004]. Miedzy innymi z powyższego względu u zwierząt z zapaleniem żołądka, a tym bardziej z rozpoznaną infekcją *Helicobacter*, w pełni uzasadnione jest leczenie eradykacyjne.

6. WNIOSKI

1. Zakażenie błony śluzowej żołądka drobnoustrojami z rodzaju *Helicobacter* jest szeroko rozpowszechnione u psów i kotów i dotyczy zarówno zwierząt zdrowych, jak i chorych.

2. Najczęstszym gatunkiem kolonizującym błonę śluzową żołądka u psów i kotów jest *Helicobacter heilmannii*.

3. Błonę śluzową żołądka psa może kolonizować *Helicobacter pylori*.

4. Badanie wycinków błony śluzowej żołądka metodą PCR jest najlepszym sposobem wykrywania zakażenia *Helicobacter* spp. u psów i kotów.

5. Łączne stosowanie klasycznej metody PCR, metody nested – PCR oraz seminested – PCR z wykorzystaniem odpowiednich primerów umożliwia najlepszą identyfikację gatunkową drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter*, występujących w żołądku psów i kotów.

6. Psy i koty mogą być rezerwuarem bakterii z rodzaju *Helicobacter*, potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka.

7. Ustalenie związku między zakażeniem *Helicobacter* spp. a zmianami w błonie śluzowej żołądka psów i kotów wymaga dalszych badań o charakterze doświadczalnym i obserwacji ciągłych.

PIŚMIENNICTWO

- Aceti A., Celestino D., Caferro M., Casale V., Citarda F., Conti E.M., Grassi A., Grilli A., Pennica A., Sciarretta F.: 1991. Basophil-bound and serum immunoglobulin E directed against *Helicobacter pylori* in patients with chronic gastritis. *Gastroenterol.* 101, 131–137.
- Akamatsu T., Tabata K., Hironga M., Kawakami H., Uyeda M.: 1996. Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am. J. Infect. Control.* 24, 396–401.
- Albrecht P., Łazowska I.: 2001. Znaczenie zakażeń *Helicobacter pylori* w patologii żołądka i dwunastnicy u dzieci. *Ped. Pol.* 76, 247–261.
- Alemohammad M.M., Foley T.J., Cohen H.: 1993. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2174–2177.
- Alm R.A., Ling L.S.L., Moir D.T., King B.L., Brown E.D., Doig P.C., Smith D.R., Noonan B., Guild B.C., deJonge B.L., Carmel G., Tummino P.J., Caruso A., Uria-Nickelsen M., Mills D.M., Ives C., Gibson R., Merberg D., Mills S.D., Jiang Q., Taylor D.E., Vovis G.F., Trust T.J.: 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 397, 176–180.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zheng Zhang J.Z., Miller W., Lipman D.J.: 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Andersen L.P., Rosenstock S.J., Bonnevie O., Jorgensen T.: 1996. Seroprevalence of immunoglobulin G, M, and A antibodies to *Helicobacter pylori* in an unselected Danish population. *Am. J. Epidemiol.* 143, 1157–1164.
- Andersen L.P.: 2001. New *Helicobacter* species in humans. *Dig. Dis.* 19, 112–115.
- Archer P., Petit M.L., Allayer J., Mannant P.R., Cezanne L., Bain P., Gaucherie J.L.: 1998. Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* infection and with *H. pylori* related ulcers. *J. Clin. Microbiol.* 36, 931–936.
- Baele M., Van den Bluck K., Decostere A., Vandamme P., Hanninen M.L., Ducatelle R., Haesebrouck F.: 2004. Multiplex PRC assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii* and *H. salomonis*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1115–1122.
- Baillon M.L., Marshall-Jones Z.: 2004. Enteropathogenic bacteria in cats and dogs. *Waltham Focus.* 14 (1), 12–18.
- Bamford K.B., Lutton D.A., O'Loughlin B., Coulter W.A., Collins J.S.: 1998. Nested primers improve sensitivity in the detection of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *J. Infect.* 36, 105–110.

- Baskerville A., Newell D.G.: 1988. Naturally occurring chronic gastritis and *Campylobacter pylori* in rhesus monkey: a potential model for gastritis in man. *Gut*. 29, 465–472.
- Best L.M., Veldhuyzen van Zanten S.J.O., Bezanson G.S., Haldane D.J.M., Malatjalian D.A.: 1992. Serological detection of *Helicobacter pylori* by a flow microsphere immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2311–2317.
- Birkholz S., Schneider T., Knipp U., Stallmach A., Zeitz M.: 1998. Decreased *Helicobacter pylori* specific gastric secretory IgA antibodies in infected patients. *Digestion*. 59, 638–645.
- Burens A.P., Stanley J., Morgenstern R.: 1994. Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum*. *Lancet*. 344, 1569–1570.
- Burens A.P., Stanley J., Schaad U.B.: 1993. Novel *Campylobacter* – like organism resembling *Helicobacter fennelliae* isolated from a boy with gastroenteritis and from dogs. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1916–1917.
- Cattoli G., van Vugt R., Zanoni R.G., Sanguinetti V., Chiochetti R., Gualtieri M., Vandembroucke-Grauls C.M., Gaastra W., Kusters J.G.: 1999. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. *Vet. Microbiol.* 70, 239–250.
- Cornetta A.M., Kenneth W., Simpson K., Strauss-Ayali D., McDonough P.L., Gleed R. D.: 1998. Use 13C urea breath test for detection of gastric infection with *Helicobacter* spp. in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1364–1369.
- Corrado G., Luzii I., Lucarelli S., Frediani T., Pacchiarotti C., Cavaliere M., Rea P., Cardi E.: 1998. Positive association between *Helicobacter pylori* infection and food allergy in children. *Scand. J. Gastroenterol.* 33, 1135–1139.
- Crabtree J.E.: 1996. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 215, 3-10.
- Cygan Z., Cygan W.: 1998. *Helicobacterie* w zakażeniach żołądka u człowieka i zwierząt. *Med. Wet.* 54 (4), 219–223.
- De Groot D., Haesebrouck F., van Doorn L.J., Vandamme P., Ducatelle R.: 2001. Evaluation of a group-specific 16S ribosomal DNA-based PCR for detection of *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter felis* and *Helicobacter salomonis* in fresh and paraffin-embedded gastric biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1197–1199.
- De Grote D., Van Doorn L.J., Ducatelle R., Verschuuren A., Haesebrouck F., Quint W.G., Jalava K., Vandamme P.: 1999. „*Candidatus Helicobacter suis*“ a gastric *Helicobacter* from pigs and its phylogenetic relatedness to other *gastrospirilla*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1769–1777.
- De Luis D.A., Varela C., de La Calle H., Canton R., de Agrila C.M., San Roman A.L., Boixeda D.: 1998. *Helicobacter pylori* infection is markedly increased in patients with autoimmune atrophic thyroiditis. *J. Clin. Gastroenterol.* 259–263.
- Derwish F.E., Fox J.G., Mendes E.N., Paster B.J. Gates C.E., Kirkbride C.A., Eaton K.A.: 2000. *Flexispira rappini* strains represent at least 10 *Helicobacter* taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1781–1787.
- Dixon M.F., Sobala G.M.: 1992. Gastritis and duodenitis: the histopathological spectrum. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 17–23.

- Donati M., Sambri V., Rannucini L., Orsi D., Tucci A., Poli L., Cevenini R.: 2000. Recombinant Cag A enzyme – linked immunosorbent assay and western immunoblot for the detection of serum antibodies to *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Inf.* 6, 164–166.
- Dore M.P., Bilotta M., Vaira D., Manca A., Massarelli G., Leandro G., Atzei A., Pisanu G., Graham D.Y.: 1999. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. *Dig. Dis. Sci.* 44, 1161–1164.
- Dore M.P., Sepulveda A.R., El-Zimaity H., Yamaoka Y., Osato M.S., Mototsugu K., Nieddu A.M., Realdi G., Graham D.Y.: 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep – implications for transmission to humans. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1396–1401.
- Dubois A.: 1998. Animal models of *Helicobacter* infection. *Lab. Anim. Sci.* 48, 596–603.
- Dzieniszewski J., Jarosz M.: 2000. Zakażenie *Helicobacter pylori* – wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii. Warszawa.
- Esteves M.I., Schrenzel M.D., Marini R.P., Taylor N.S., Shilu Xu., Hagen S., Yan Feng, Zeil Shen, Fox J.G.: 2000. *Helicobacter pylori* gastritis in cats with long-term natural infection as a model of human disease. *Am. J. Path.* 156, 709–721.
- Faulde M., Cremer J., Zoller L.: 1993. Humoral immune response against *Helicobacter pylori* as determined by immunoblot. *Electrophoresis.* 14, 945–951.
- Ferguson D.A., Li C., Patel N.R., Mayberry W.R., Chi D.S., Thomas E.: 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2802–2804.
- Foley J.E., Marks S., Munson L.: 1999. Isolation of *Helicobacter canis* from a colony of bengal cats with endemic diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3271–3275.
- Fox J.G., Batchelder M., Marini R., Yan L., Handt L., Li X., Shames B., Hayward A., Campbell J., Murphy J.C.: 1995. *Helicobacter pylori* – induced gastritis in the domestic cat. *Infect. Immun.* 63, 2674–2681.
- Fox J.G., Chien C.C., Dewhirst F.E.: 2000. *Helicobacter canadensis* sp. nov isolated from humans with diarrhea: an example of an emerging pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2546–2549.
- Fox J.G., Dewhirst F.E., Shen Z., Feng Y., Taylor N.S., Paster B.J., Ericson R.L., Lau C.N., Correa P., Araya J.C., Roa I.: 1998. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterol.* 114, 755–763.
- Fox J.G., Drolet R., Higgins S., Messier S., Yan L., Coleman B.E., Paster B.J., Dewhirst F.E.: 1996. *Helicobacter canis* isolated from dog a liver with multifocal necrotizing hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2479–2482.
- Fox J.G., Handt L., Sheppard B.J.: 2001. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from the colon, liver and mesenteric lymph node of a rhesus monkey with chronic colitis and hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 421–429.
- Fox J.G.: 2002. The non – *H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut.* 50, 273–293.
- Gasbarrini A., Gabrielli M., Fiore G., Candelli M., Bartolozzi F., de Luca A., Cremonini F., Franceschi F., Di Campli C., Armuzzi A., Ojetto V., Serricchio M., Pola R., Gasbarrini G., Giacovazzo M., Pola P.: 2000. Association between *Helicobacter*

- pylori cytotoxic type I CagA – positive strains and migraine with aura. *Cephalalgia*. 20, 561–565.
- Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B., Leyning H., Opferkuch W.: 1993. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 38, 371–377.
- Gibiński K.: 1997. Wrzód przełyku, żołądka i dwunastnicy. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa.
- Glupeczynski Y.: 1994. The diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a microbiologist's perspective. *Rev. Med. Microbiol.* 5, 199–208.
- Goodwin C.S., Blincow E., Peterson G., Sanderson C., Cheng W., Marshall B., Warren J.R., McCulloch R.: 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Campylobacter pyloridis*: correlation with presence of *C. pyloridis* in the gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* 155, 488–494.
- Gościniak G., Skala J., Kubiak K., Iwańczak B., Grabińska J.: 2004. Przypadek środowiskowego zapalenia błony śluzowej żołądka wywołanego przez *Helicobacter heilmannii* (dziecko, pies, kot). *Post. Mikrobiol.* 43, Supl.1, 178.
- Gościniak G.: 1992. IgG and IgA antibodies in *Helicobacter pylori* infections. *Zentralbl. Bakteriol.* 286, 494–502.
- Gościniak G.: 2000. Przeciwciała w zakażeniach *Helicobacter pylori*. Akademia Medyczna. Wrocław.
- Hammar M., Tyszkiewicz T., Wadstrom T., O'Toole P.: 1992. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 54–58.
- Hänninen M.L.: 2005. *Helicobacter* spp., taxonomy, evolution and diagnostics. *Mat. - 15th ECVIM-CA Congress.* Glasgow. 78–80.
- Happonen I., Linden J., Saari S., Karjalainen M., Hanninen M.L., Jalava K., Westermarck E.: 1998. Detection and effects of *Helicobacters* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1767–1774.
- Happonen I., Saari S., Castren L., Tyni O., Hanninen M.L., Westermarck E.: 1996. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter* – like organisms in dogs and cats. *J. Comp. Pathol.* 115 (2), 117–127.
- Happonen I., Saari S., Castren L., Tyni O., Hanninen M.L., Westermarck E.: 1996. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter* – like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 43 (5), 305–315.
- Happonen I., Linden J., Westermarck E.: 2000. Effect of triple therapy on eradication of canine gastric *Helicobacters* and gastric disease. *J. Small Anim. Pract.* 41, 1–6.
- Heatley R.V.: 1999. *Helicobacter pylori*. α – medica press. Bielsko – Biała.
- Heilmann K.L., Borchard F.: 1991. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrastructural findings. *Gut.* 32, 137–140.
- Henry G.A., Long P.H.: 1997. Gastric spirillosis in Beagles. *Am. J. Vet. Res.* 48, 831–836.

- Hermanns W., Kregel K., Breuer W., Lechner J.: 1995. Helicobacter – like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J. Comp. Pathol.* 112 (3), 307–318.
- Hua J.S., Zheng P.Y., Ho B.: 1999. Species differentiation and identification in the genus of Helicobacter. *World J. Gastroenterol.* 5 (1), 7–9.
- Hulten K., Enroth H., Nystrom T., Engstrand L.: 1998. Presence of Helicobacter spp. DNA in Swedish water. *J. App. Microbiol.* 85, 282–286.
- Hulten K., Han S.W., Enroth H., Klein P.D., Opekun A.R., Gliman R.H., Evans D.G., Engstrand L., Graham D.Y., El-Zaatari F.A.: 1996. Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. *Gastroenterol.* 110, 1031–1035.
- Hunt R.H., Tytgat G.N.J.: 2000. Helicobacter pylori. Basic mechanisms to clinical cure. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands 18–143.
- Hwang C.Y., Han H.R., Youn H.Y.: 2002. Prevalence and clinical characterization of gastritis Helicobacter species infection of dogs and cats in Korea. *J. Vet. Sci.* 3 (2), 123–133.
- International Agency for Research on Cancer.: 1994. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. *Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* 61, 177–178.
- Iwańczak F., Gościński G., Iwańczak B.: 1998. Helicobacter heilmannii w patologii chorób żołądka i dwunastnicy u dzieci. *Gastr. Pol.* 5, 229–233.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Gajkowska A., Godlewska R.: 1999. Czynniki wirulencji Helicobacter pylori. *Mikrobiol. Med.* 20, 3–13.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Godlewska R., Łaniewski P.: 2005. Helicobacter pylori – patogen roku 2005. *Kosmos.* 54, 307–319.
- Jalava K., On S.L., Vandamme P.A., Happonen I., Sukura A., Hanninen M.L.: 1998. Isolation and identification of Helicobacter spp. from canine and feline gastric mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10), 3998–4006.
- Jergens A.E.: 2002. Understanding Gastrointestinal inflammation – implications for therapy. *J. Feline Med. Surg.* 4, 179–182.
- Kato S., Sugiyama T., Kudo M., Ohnuma K., Ozawa K., Iinuma K., Asaka M., Blaser M.J.: 2000. CagA antibodies in Japanese children with nodular gastritis or peptic ulcers disease. *J. Clin. Microbiol.* 38, 68–70.
- Kielbauch J.A., Tauxe R.V., Baker C.N.: 1994. Helicobacter cinaedi – associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Ann. Intern. Med.* 121, 90–93.
- Koenig W., Rothenbacher D., Hoffmeister A., Miller M., Bode G., Adler G., Hombach V., Marz W., Pepys M.B., Brenner H.: 1999. Infection with Helicobacter pylori is not a major independent risk factor for stable coronary heart disease. *Circulation.* 100, 2326–2331.
- Konturek S.: 1996. Z antybiotykiem na wrzody. *Wiedza i Życie.* 6, 14–18.
- Ławniczak M., Starzyńska T.: 2002. Zakażenia Helicobacter pylori CagA (+) u chorych na raka żołądka. *Pol. Merk. Lek.* 13, 216–221.
- Lecoindre P., Chevallier M., Peyrol S., Boude M., Ferrero R.L., Labigne A.: 2000. Gastric helicobacter in cats. *J. Feline Med. Surg.* 2, 19–27.
- Lee A., Krakowska S., Fox J.G., Otto G., Eaton K.A., Murphy J.C.: 1992. Role of Helicobacter felis in chronic canine gastritis. *Vet. Pathol.* 29 (6), 487–494.

- Lee A., Megraud F.: 1996. *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis and basic research. W.B. Saunders Company Ltd.
- Leung W.K., Siu K.L.K., Kwok C.K.L., Chan S.Y., Sung R., Sung J.J.Y.: 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2881–2884.
- Logan R.P.: 1998. Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 43 suppl 1, 47–50.
- Lozniewski A., De Korwin J.D., Conroy M.C., Plenat F., Weber M.: 1996. Evaluation of pylorised dry, a new rapid agglutination test for *Helicobacter pylori* antibody detection. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1773–1775.
- Luzza F., Imeneo M., Maletta M., Monteleone G., Doldo P., Biancone L., Pallone F.: 1995. Isotypic analysis of specific antibody response in serum, saliva, gastric and rectal homogenates of *Helicobacter pylori* – infected patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10, 285–288.
- Majmudar P., Shah S.M., Dhunjibhoy K.R., Desai H.G.: 1991. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Indian. J. Gastroenterol.* 10, 33–34.
- Malferteiner P., Bayerdörffer E., Birkholz S., Börsch G., Geis G., Labenz J., Mannes G., Nilius M., Obferkuch W., Seifert E., Stadelmann O., Stolte M., Suerbaum S.: 1997. *Helicobacter pylori* od podstaw do leczenia. SANMEDICA Sp. z o.o. Warszawa.
- Meining A., Kroher G., Stolte M.: 1998. Animal reservoirs in the transmission of *Helicobacter heilmannii*. *Scand. J. Gastroenterol.* 33, 795–798.
- Melito P.L., Munro C., Chipman P.R., Wodward D.L, Booth T.F., Rodgers F.G.: 2001. *Helicobacter winghamensis* sp. nov., novel *Helicobacter* sp. isolated from patients with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2412–2417.
- Misiewicz J.J., Tytgat G.N., Goodwin C.S., Price A.B., Sipponen P., Strickland R.G., Cheli R.: 1990. The Sydney System: A new classification of gastritis. 9th World Congress of Gastroenterology. Sydney 1990. Blackwell Scientific Publications Melbourne Working Party Reports. 1–10.
- Mitchell H.M.: 1997. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Bailliere's Clin. Inf. Dis.* 4, 257–280.
- Mitchell H.M., Lee A., Carrick J.: 1989. Increased incidence of *Campylobacter pylori* infection in gastroenterologists: further evidence to support person- to person transmission of *Campylobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* 24, 396–400.
- Neiger R., Dieterich C., Burnens A., Waldvogel A., Corthesy-Theulaz I., Halter F., Lauterburg B., Schmassmann A.: 1998. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *J. Clin. Microbiol.* 36 (3), 634–637.
- Neiger R., Simpson K.W.: 2000. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *J. Vet. Intern. Med.* 14 (2), 125–133.
- Neiger R., Tschudi M.E., Burnens A., Goke B., Schmassmann A.: 1999. Diagnostic and identification of gastric *Helicobacter* species by polymerase chain reaction in dogs. *Microbiol. Ecol. Health. Dis.* 11, 234–240.

- Newell D.G., Hudson M.J., Baskerville A.: 1988. Isolation of gastric *Campylobacter* – like organism from the stomach of four rhesus monkeys and identification as *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 27, 41–44.
- Nilius M., Wex T., Muller-Dietz G., Leodolter A., Schilling D., Malferttheiner P.: 2001. Comparative evaluation of two hemagglutination tests for the detection of anti – *Helicobacter pylori* antibodies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 221–223.
- Nilsson H.O., Lindgren S., Ericsson S., Wadstrom T.: 2000. Serum antibodies to *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* in patients with liver disease. *Gut.* 46, 410–414.
- Norris C.R., Marks S.L., Eaton K.A., Torabian S.Z., Munn R.J., Solnick J.V.: 1999. Healthy cats are commonly colonized with *Helicobacter heilmannii* that is associated with minimal gastritis. *J. Clin. Microbiol.* 37 (1), 189–194.
- O'Rourke J.L., Grehan M., Lee A.: 2001. Non – *pylori* *Helicobacter* species in humans. *Gut.* 49, 601–606.
- On S.L., Holmes B.: 1995. Classification and identification of *Campylobacters* and *Helicobacters* and allied taxanumerical analysis of phenotypic characters. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 374–390.
- Ottemann K.M., Lowenthal A.C.: 2002. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect. Immun.* 70, 1984–1990.
- Owen R.J.: 1998. *Helicobacter* – species classification and identification. *Br. Med. Bull.* 54 (1), 17–30.
- Parsonnet J., Shmueli H., Haggerty T.: 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *J. Am. Med. Assoc.* 282, 2240–2245.
- Paster B.J., Lee A., Fox J.G.: 1991. Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 31–38.
- Pollicano R., Mazzarello M.G., Morelloni S., Allergi M., Arena V., Ferrari M., Rizzetto M., Ponzetto A.: 1999. Acute myocardial infarction and *Helicobacter pylori* seropositivity. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 29, 141–144.
- Rechciński T., Chmiela M., Małecka-Panas E., Planeta-Małecka I., Rudnicka W.: 1997. Serological indicators of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors. *Microbiol. Immunol.* 41, 387–393.
- Reilly T.G., Poxon V., Sanders D.S., Elliot T.S., Walt R.P.: 1997. Comparison of serum, salivary and rapid whole blood diagnostic test for *Helicobacter pylori* and their validation against endoscopy based tests. *Gut.* 40, 454–458.
- Rogge J.D., Wagner D.R., Carrico R.J., Glowinski E.A., Mahoney S.J., Boguslaski R.C., Genta R.M.: 1995. Evaluation of a new urease reagent strip for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Am. J. Gastroenterol.* 90, 1965–1968.
- Salomon H.: 1896. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentralbl. Bakteriolog. Naturwiss.* 19, 422–441.
- Sapierzyński R., Malicka E.: 2003. Zakażenie *Helicobacter* u psów. *Życie Wet.*, 78, 279–282.
- Sapierzyński R., Malicka E.: 2004. Effect of gastric *Helicobacter* – like organism on gastric epithelial cell proliferation rate in dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 7 (4), 275–281.
- Sapierzyński R., Malicka E.: 2004. Patomorfologia zapaleń żołądka u psów. *Życie Wet.* 79, 327–332.

- Sapierzyński R., Malicka E.: 2004. Wpływ drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* spp. na liczbę komórek wydzielania wewnętrznego w błonie śluzowej żołądka psów. *Med. Wet.* 60, 1291–1295.
- Sapierzyński R., Malicka E.: 2004. Zakażenie *Helicobacter* spp. u kotów, psów i fretek. *Mag. Wet.* 13 (10), 14–16.
- Sapierzyński R., Malicka E.: 2005. Badania drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* w żołądku psów. *Med. Wet.* 61, 904–906.
- Sapierzyński R., Malicka E., Bielecki W., Sendecka H.: 2003. The presence of *Helicobacter*-like microorganisms in the gastric mucosa in dogs. *Pol. J.Vet. Sci.* 6 (4), 247–252.
- Schauer D.B., Ghorri N., Falkow S.: 1993. Isolation and characterization of *Flexispira rappini* from laboratory mice. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2709–2714.
- Shubert A.S., Ascano J.J., Boynton K.A., Mitchell A., Frierson H.F., el-Rifai W., Powell S.M.: 2002. Accurate, noninvasive detection of *Helicobacter pylori* DNA from stool samples: potential usefulness for monitoring treatment. *J. Clin. Microbiol.* 40, 262–264.
- Simpson K.W., Burrows C.F.: 1997. Zapalenie i choroba wrzodowa żołądka, a zakażenie *Helicobacter* spp. u ludzi, psów i kotów. *Waltham Focus.* 7, 1–5.
- Simpson K.W., McDonough P.L., Strauss-Ayali D., Chang Y.F., Harpending P., Valentine B.A.: 1999. *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. *Vet. Pathol.* 36 (3), 237–248.
- Simpson K.W., Neiger R., DeNowo R., Sherding R.: 2000. The relationship of *Helicobacter* spp. infection to gastric disease in dogs and cats. *ACVIM Consensus Statement. J. Vet. Intern. Med.* 14, 223–227.
- Simpson K.W., Strauss-Ayali D., McDonough P.L., Chang Y.F., Valentine B.A.: 1999. Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. infection. *J. Vet. Intern. Med.* 13 (6), 505–506.
- Simpson K.W.: 1999. *Helicobacter* spp. and gastritis in dogs and cats. Last Updated. 14, 123–129.
- Simpson K.W.: 2005. What's new in *Helicobacter*. *Mat. - 15th ECVIM-CA Congress. Glasgow.* 73–77.
- Sobala G.M., Crabtree J.E., Dixon M.F., Schorah C.J., Taylor J.D., Rathbone B.J., Heatley R.V., Axon A.T.: 1991. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut.* 32, 1415–1418.
- Sobczyńska-Rak A., Różańska D.: 2004. *Helicobacter* u zwierząt i ludzi. *Med. Wet.* 60, 132–136.
- Solnick J., O'Rourke J.L., Lee A., Tompkins L.S.: 1994. Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. *Infect. Immun.* 62, 1631–1638.
- Solnick J.V., Schauer D.B.: 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 59–97.
- Solnick J.V.: 2003. Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. *Clin. Inf. Dis.* 36, 349–354.

- Stanley J., Linton D., Burens A.P.: 1993. *Helicobacter canis* sp. nov. a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2495–2504.
- Stoffel M.H., Friess A.E., Burnens A., Schmassmann A., Neiger R.: 2000. Distinction of gastric *Helicobacter* spp. in humans and domestic pets by scanning and electron microscopy. *Helicobacter*. 5, 232–239.
- Strauss-Ayali D., Simpson K.W.: 1999. Gastric *Helicobacter* infection in dogs. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 29 (2), 397–414.
- Strauss-Ayali D.S., Simpson K.W., Schein A.H., McDonough P.L., Jacobson R.H., Valentine B.A., Peacock J.: 1999. Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* sp. and uninfected dogs. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1280–1287.
- Suerbaum S., Geis G., Josenhans C., Opferkuch W.: 1992. Biochemical studies of *Helicobacter mustelae* fatty acid composition and flagella. *Infect. Immun.* 60 (4), 1695–1698.
- Taneera J., Moran A.P., Hynes S.O., Nilsson H.O., abu Al-Soud W., Waldstrom T.: 2002. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp. *Microbiol.* 148, 667–684.
- Tinnert A., Hamlet A., Svennerholm A.M.: 1998. Antibodies against *Helicobacter pylori* in feces and saliva before and after eradication therapy. *Clin. Mikrobiol. Infect.* 4, 634–643.
- Torres J., Perez-Perez G., Goodman K.J., Atherton J.C., Golb B.D., Harris P.R., Garza A.M., Guarner J., Munoz O.: 2000. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch. Med. Res.* 31, 431–469.
- Travis S., Stevens R., Dalton H.: 2000. *Gastroenterologia*. Wyd. Medycyna Praktyczna. Kraków.
- Trebesius K., Adler K., Vieth M., Stolte M., Haas R.: 2001. Specific detection and prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent in situ hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1510–1516.
- Trivett-Moore N.L., Rawlinson W.D., Yuen M.: 1997. *Helicobacter westmaedii* sp. nov., a new species isolated from blood cultures of two AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1144–1150.
- Tytgat G.N.: 1995. Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9, Suppl. 2, 105–110.
- Vandamme P., Falsen E., Pot B.: 1990. Identification of *Campylobacter cinaedi* isolated from blood and feces of children and adult females. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1016–1020.
- Ward J.M., Fox J.G., Anver M.R.: 1994. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J. Nat. Cancer Inst.* 86, 1222–1227.
- Weber A.F., Hasa O.H., Sautter J.H.: 1958. Some observations concerning the presence of spirilla in the fundic glands of dogs and cats stomach. *Am. J. Vet. Res.* 19, 677–680.

- Wiinberg B., Sporhr A., Dietz H.H., Egelund T., Greiter-Wilke A., McDonough S.P., Olsen J., Priestnall S., Chang Y.F., Simpson K.W.: 2005. Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. infection. *J. Vet. Intern. Med.* 19 (1), 4–14.
- Wiśniewska M.: 2003. Inwazyjne i nieinwazyjne metody wykrywania zakażeń wywołanych przez pałeczki *Helicobacter pylori*. *Prac. dokt. Łódź.*
- Włodarek D., Pakszys W., Barlik M.: 2001. *Helicobacter pylori* w chorobach górnego odcinka przewodu pokarmowego – czy tylko? *Pol. Merk. Lek.* 11, 456–457.
- Worku M.L., Sidebotham R.L., Baron J.H., Misiewicz J.J., Logan R.P., Keshavarz T., Karim Q.N.: 1999. Motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1143–1150.
- Wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii.: 2001. Postępowanie w zakażeniach *Helicobacter pylori* (rok 2000). *Gastr. Pol.* 4, 11–16.
- Yamasaki K., Suematsu H., Takahashi T.: 1998. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212 (4), 529–533.
- Young V.B., Chien C.C., Knox K.A., Taylor N.S., Schauer D.B., Fox J.G.: 2000. Cytholetal distending toxin in avian and humans isolate of *Helicobacter pullorum*. *J. Inf. Dis.* 182, 620–623.
- Young V.B., Knox K.A., Schauer D.B.: 2000. Cytholetal distending toxin sequence and activity in the enteropathic *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* 68, 184–191.
- Yousfi M.M., el-Zimaity H.M., Cole R.A., Genta R.M., Graham D.Y.: 1997. Comparison of agar gel (CLOtest) or reagent strip (PyloriTek) rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 92, 997–999.
- Zawilak A., Zakrzewska-Czerwińska J.: 2001. Organizacja genomu *Helicobacter pylori*. *Post. Hig. Med. Dośw.* 55, 355–367.
- Zhongming G.E., Doig P., Fox J.G.: 2001. Characterization of proteins in the outer membrane preparation of murine pathogen, *Helicobacter bilis*. *Infect. Immun.* 69 (5), 3502–3506.

COLONIZATION OF GASTRIC MUCOSA IN DOGS AND CATS WITH MICROORGANISMS OF *HELICOBACTER* SPP. – CLINICAL ASPECT

Summary

The infections with *Helicobacter* spp. in the stomach of dogs and cats are popular. Those microorganisms were isolated from the gastric mucosa of the healthy animals as well as from the mucosa of the affected stomach. The bacteria were found both in the cardiac part, the fundus, the corpus and the pyloric part of the stomach. Recently more and more authors claim that dogs and cats may be a reservoir of those microorganisms and constitute the source of infection for humans. So far the significance of the infections with *Helicobacter* spp. in the course of gastric diseases in dogs and cats has not been elucidated. The current knowledge of the subject is not complete and the problem calls for further research.

The aim of the study was to determine the frequency of occurrence of *Helicobacter* spp. microorganisms in the dogs and cats stomach, the application and assessment of usefulness of invasive methods in the detection of stomach infections with *Helicobacter* spp., the species identification as well as determination of the role of those bacteria in the origination of pathological lesions in those animals stomach.

The study entailed 241 animals which were divided into two groups A and B. The group A included 157 dogs, group B – 84 cats. Both groups A and B were again divided into 2 subgroups: I and II. In this way four subgroups AI, AII and BI, BII were formed.

The subgroups AI and BI (control) included healthy animals in which no disorders in the functioning of the organism were found on the basis of anamnesis, clinical examination and the results of the hematological and biochemical blood tests. Those subgroups included also healthy animals in which the endoscopic examination (macroscopic assessment) did not show any lesions in gastric mucosa considered normotypical.

The subgroups AII and BII (study) included animals with dyspeptic signs indicating stomach diseases (vomiting of different character, decreased appetite, loss of appetite, changeable appetite, progressing body weight loss, fetor ex ore, painfulness in the stomach area). Those subgroups included also animals not manifesting the above clinical signs but in which the gastroscopy showed macroscopic lesions in gastric mucosa indicating gastritis. The subgroup AI included 20 dogs of different breed and sex, aged 6 months – 17 years; AII – 137 dogs of different breed and sex, aged 2 months – 17 years; BI – 20 cats of different breed and sex, aged 6 months – 12 years and BII – 64 cats of different breed and sex, aged 6 months – 13 years. All the animals underwent gastroscopy during which mucosa biopsies were collected from the corpus and the pyloric part of the stomach for further examinations: microbiological (rapid urease test, direct bacteriological preparation, culture examinations), PCR, histopathological (hematoxyline and eosine staining and Giemsa methods) and electron microscopy (scanning and transmission microscopy). The results were subjected to statistical analysis.

The positive results of the rapid urease test were obtained in 18 (90%) dogs from the subgroup AI, 15 (75%) cats from the subgroup BI and 117 (85.4%) dogs from the subgroup AII, 42 (65.6%) cats from the subgroup BII.

The spiral, curvy, Gram-negative microorganisms were found in the direct bacteriological preparation made from corpus mucosa samples in 16(80%) dogs from the subgroup AI, 13 (65%) cats from the subgroup BI, 107 (78.1%) dogs from the subgroup AII and 39 (60.9%) cats from the subgroup BII.

The spiral, curvy, Gram-negative microorganisms were found in the direct bacteriological preparation made from pyloric mucosa samples in 18(90%) dogs from the subgroup AI, 13(65%) cats from the subgroup BI, 94(68.6%) dogs from the subgroup AII and 37(57.8%) cats from the subgroup BII.

On the basis of the bacteriological culture examinations *Helicobacter* spp. were found in 6(30%) dogs from the subgroup AI, in 21 (15.3%) dogs from the subgroup AII, in 11 (17.2%) cats from the subgroup BII and in the cats the subgroup BI the result of the above examinations was negative.

Basing on molecular PCR examinations the microorganisms of *Helicobacter* were found in gastric mucosa samples: in 20 (100%) dogs in the subgroup AI, in 15 (75%) cats in the subgroup BI, in 133 (97.1%) dogs in the subgroup AII and in 46 (71.9%) cats in the subgroup BII.

On the basis of the histopathological examinations of gastric biotates from the corpus and the pylorus the chronic gastritis was observed in 3 (15%) dogs in the subgroup AI, in 5 (25%) cats in the subgroup BI and in all the animals in the subgroups AII and BII.

The histopathological examinations of gastric biotates stained by Giemsa method showed microorganisms of *Helicobacter* morphology in 5 (25%) dogs in the subgroup AI, in 3 (15%) cats in the subgroup BI, in 36 (26.3%) dogs in the subgroup AII and in 11 (17.2%) cats in the subgroup BII.

PCR examination of gastric biotates in the examined population of animals showed *Helicobacter heilmannii* in 193 (80.1%) animals, *Helicobacter pylori* – in 8 (3.3%), *Helicobacter felis* – in 119 (49.4%) and *Helicobacter salomonis* – in 7 (2.9%).

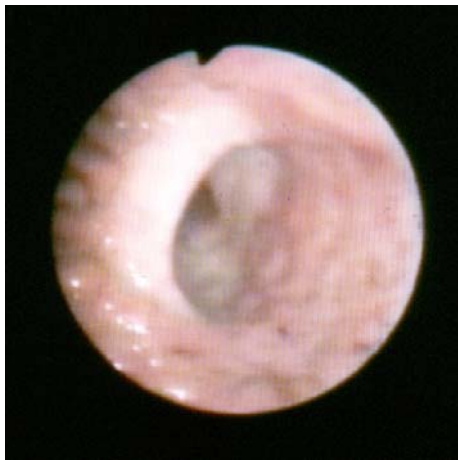
The conducted research showed that the infection of gastric mucosa with *Helicobacter* spp. is common in dogs and cats and it concerns both healthy and unhealthy animals. The most frequent species colonizing gastric mucosa in dogs and cats is *Helicobacter heilmannii*. It was also proved that gastric mucosa in dogs may be colonized by *Helicobacter pylori*. The examination of gastric mucosa biotates by PCR method is the best way to detect the infection with *Helicobacter* spp. in dogs and cats. The combined application of the classical PCR method, nested – PCR and seminested PCR with the use of appropriate primers allows the best species identification of those bacteria. Dogs and cats may be the reservoir of *Helicobacter* bacteria which are potentially pathogenic to human.

In spite of the fact that no connection between the infection of gastric mucosa with *Helicobacter* spp. and its inflammation was found it is recommended for dogs and cats with diagnosed gastritis to undergo the eradicating therapy.

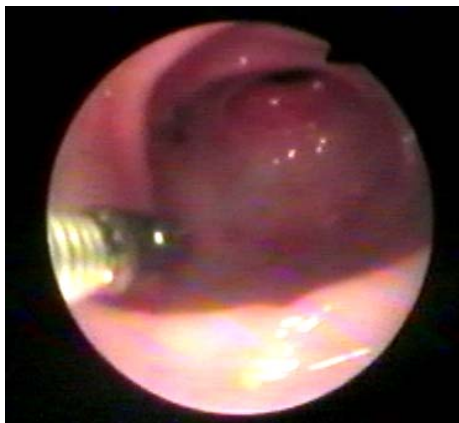
ZAŁĄCZNIKI



Ryc. A. Obraz endoskopowy przewlekłego zapalenia w części odźwiernikowej żołądka (pies). Zgodnie z systemem Sydney zmiany zapalne sklasyfikowano jako umiarkowanie nasilone
Fig. A. Endoscopic picture of chronic inflammation in pyloric part of stomach (dog). According to Sydney system inflammatory changes classified as moderately intensified changes



Ryc. B. Przewlekłe zapalenie żołądka w obrazie endoskopowym (pies). Widoczne wcięcie kątowe żołądka oraz część odźwiernikowa. Zgodnie z systemem Sydney zmiany zapalne sklasyfikowano jako wyraźnie nasilone
Fig. B. Chronic gastritis in endoscopic picture (dog). Angulus of stomach and pyloric part visible. According to Sydney system inflammatory changes classified as distinctly intensified changes



Ryc. C. Pobieranie wycinków błony śluzowej żołądka do dalszych badań laboratoryjnych. Widoczna część odźwiernikowa żołądka oraz szczytce biopsyjne wychodzące z kanału roboczego fiberskopu

Fig. C. Biopsy of gastric mucosa for further laboratory tests. Pyloric part of stomach and biopsy forceps (in instrumental fiberscope canal) visible



Ryc. D. Pobieranie wycinków błony śluzowej z części odźwiernikowej żołądka do dalszych badań laboratoryjnych (krwawienie po biopsji)

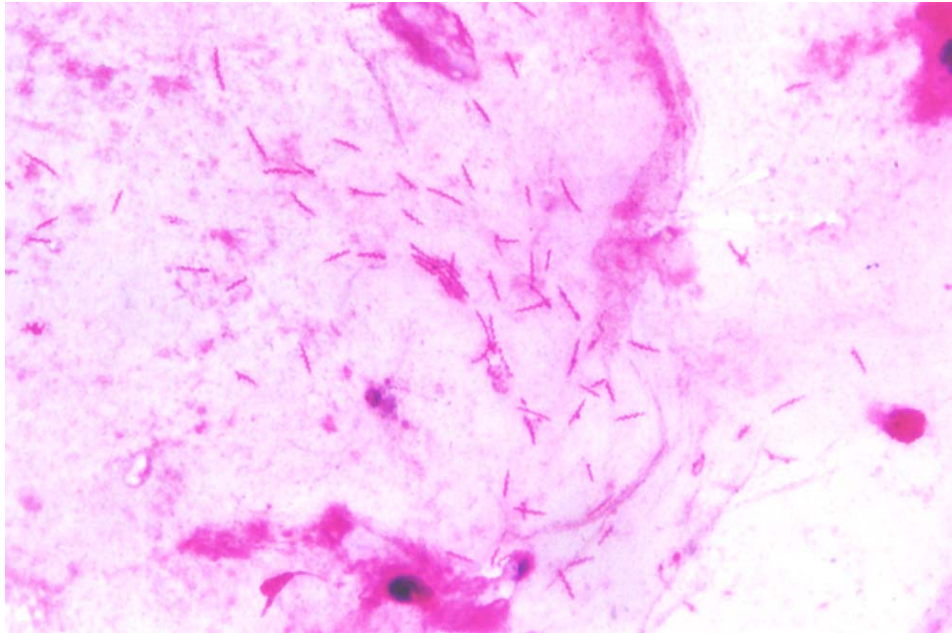
Fig. D. Biopsy of gastric mucosa from from pyloric part of stomach for further laboratory tests (bleeding after biopsy)



Ryc. A . Ujemny (negatywny) wynik szybkiego testu ureazowego
Fig. A. Negative result of rapid urease test



Ryc. B. Dodatni (pozytywny) wynik szybkiego testu ureazowego
Fig. B. Positive result of rapid urease test

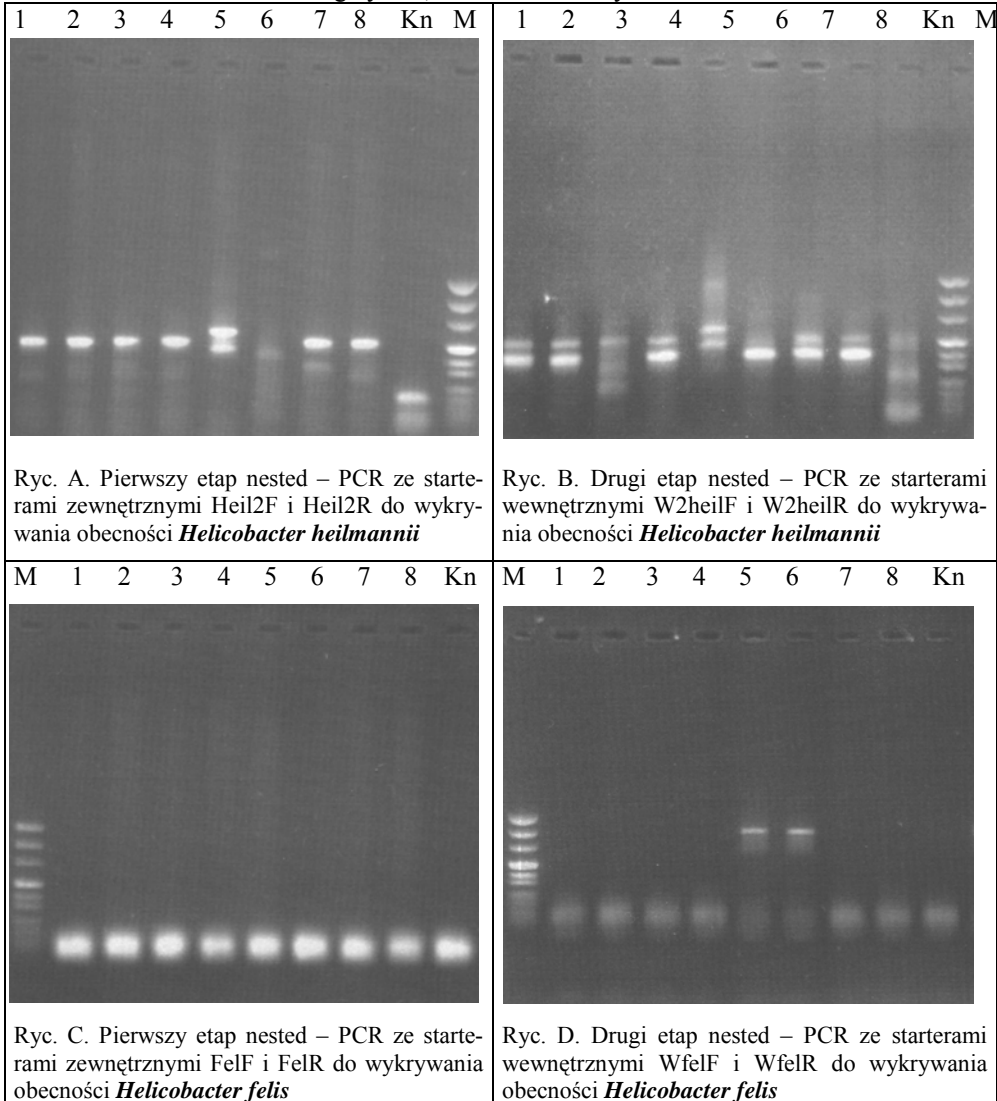


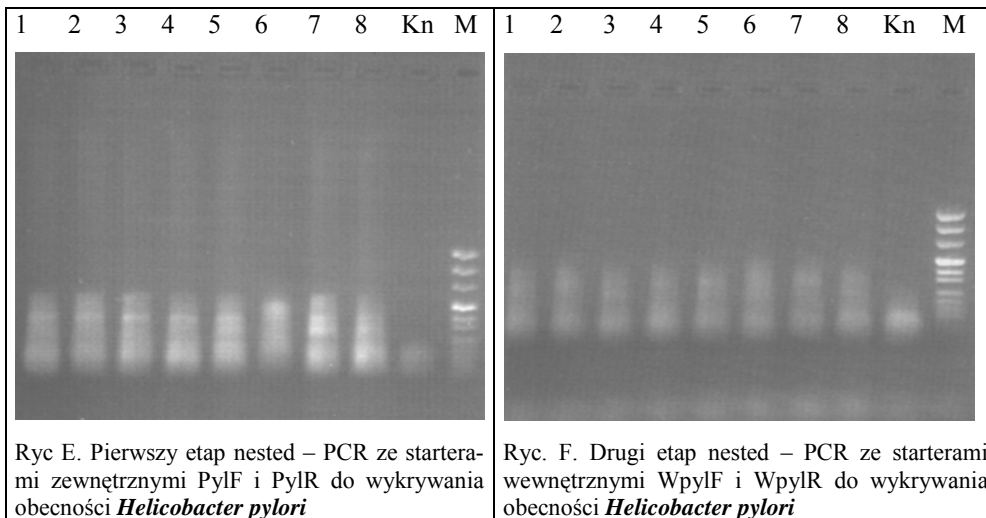
Ryc. A. Spiralne, zakrzywione, Gram-ujemne drobnoustroje widoczne w bezpośrednim preparacie bakteriologicznym, barwionym metodą Grama

Fig. A. Spiral, curvy, Gram-negative microorganisms visible in direct bacteriological preparation stained by Gram method

Przykładowe wyniki reakcji PCR

Na rycinach A, B, C, D, E i F przedstawiono elektroforetyczny rozdział produktów PCR w 0,9 % żelu agarozowym. Elektroforezy prowadzono w obecności bromku etydyny w stężeniu 0,25 µg/ml. Numery ścieżek odpowiadają numerom próbek. Pozostałe oznaczenia: Kn – kontrola negatywna; M – marker masy.





Examples of PCR reaction results

Fig. A, B, C, D, E and F show electrophoretic distribution of PCR products in 0,9% agarose gel. Electrophoreses were carried out in presence of etidine bromide at concentration of 0,25 ug/ml. Numbers of pathways correspond to numbers of samples. Remaining designations: Nc – negative control; M – mass marker

Fig. A. First stage of nested – PCR with external starters Heil2F and Heil2R for *Helicobacter heilmannii* detection

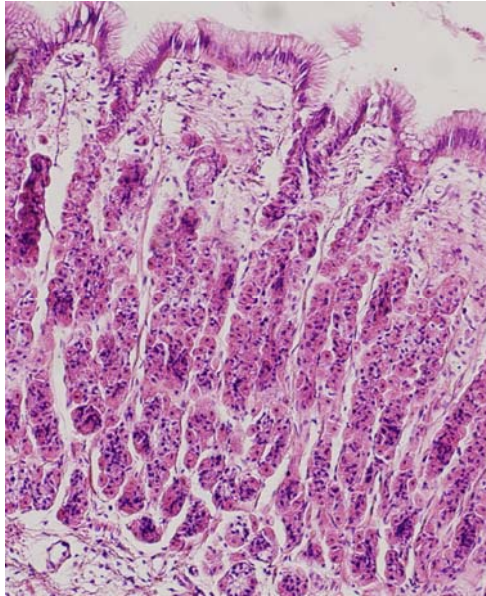
Fig. B. Second stage of nested – PCR with internal starters W2heilF and W2heilR for *Helicobacter heilamannii* detection

Fig. C. First stage of nested – PCR with external starters FelF and FelR for *Helicobacter felis* detection

Fig. D. Second stage of nested – PCR with internal starters WfelF and WfelR for *Helicobacter felis* detection

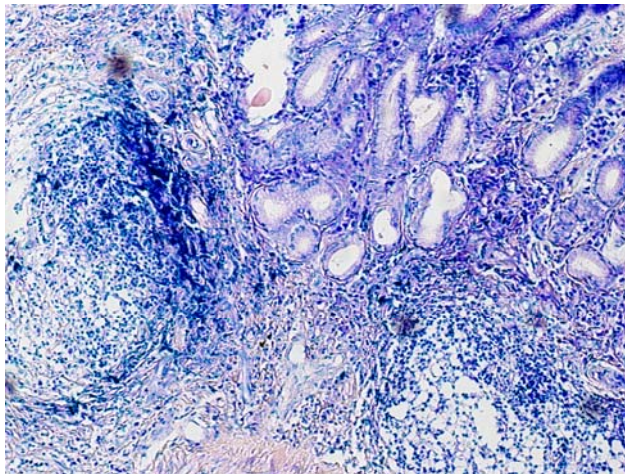
Fig. E. First stage of nested – PCR with external starters PylF and PylR for *Helicobacter pylori* detection

Fig. F. Second stage of nested – PCR with internal starters WpylF and WpylR for *Helicobacter pylori* detection



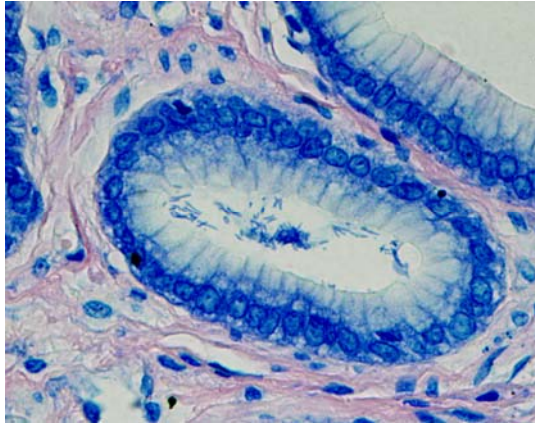
Ryc. A. Zapalenie błony śluzowej trzonu żołądka. Naciek limfocytarny zajmuje 1/3 warstwy błony śluzowej. Barwienie H-E. Powiększenie x100

Fig. A. Inflammation of gastric mucosa in corpus. Lymphocytic infiltration occupies 1/3 of mucosa. H-E staining. Magnification x100

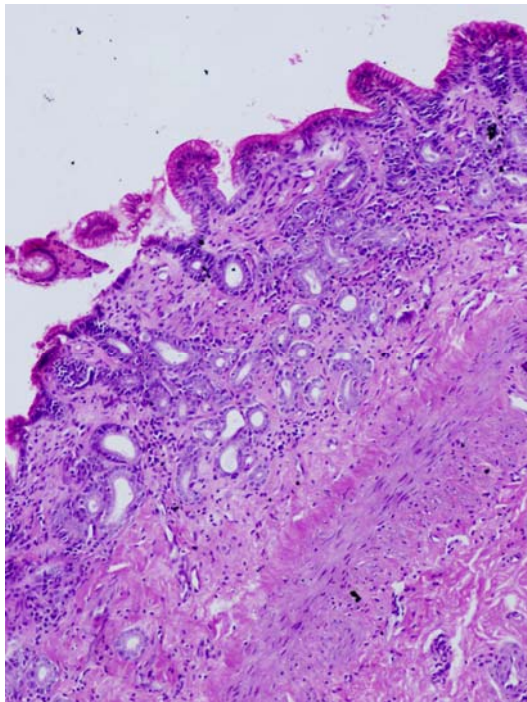


Ryc. B. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka w części odźwiernikowej, widoczny intensywny naciek limfocytarny obejmujący całą grubość błony śluzowej oraz grudki chłonne tzw. lymphoid hyperplasia. Barwienie met. Giemsa. Powiększenie x 100

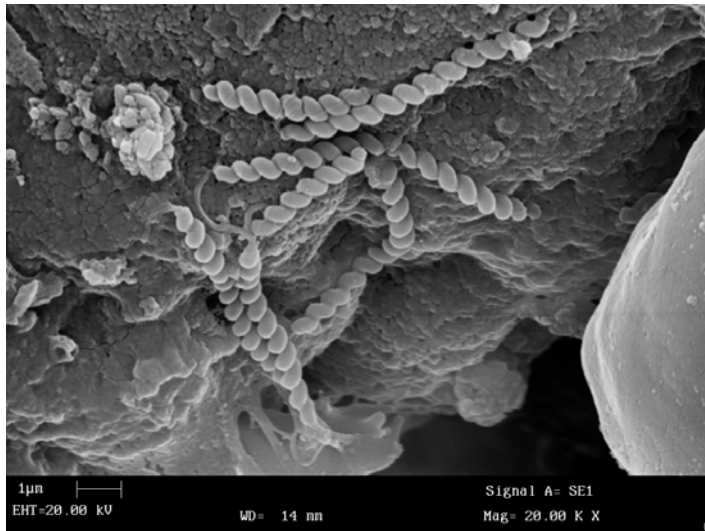
Fig. B. Chronic gastritis in pyloric part, visible intensive lymphocytic infiltration affecting the whole mucosa thickness and lymph nodules so-called lymphoid hyperplasia. Giemsa staining. Magnification x 100



Ryc. C. Kolonizacja *Helicobacter* w świetle gruczołu żołądka. Barwienie met. Giemsy.
Powiększenie x 400
Fig. C. *Helicobacter* colonization in gastric gland lumen. Giemsa staining. Magnification x 400



Ryc. D. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej trzonu żołądka stopnia ciężkiego (system Sydney).
Barwienie H-E. Powiększenie x 100
Fig. D. Chronic gastritis in corpus – severe grade (Sydney system). H-E staining. Magnification x 100



Ryc. A



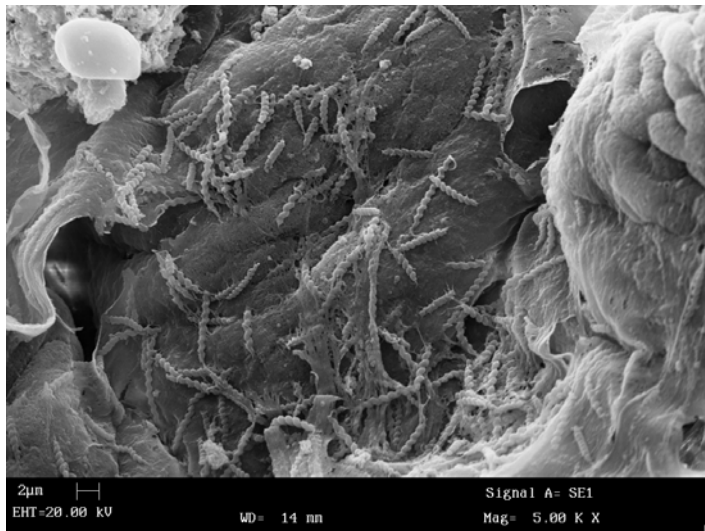
Ryc. B



Ryc. C

Ryc. A, B i C. Bakterie o morfologii *Helicobacter* spp. kolonizujące błonę śluzową żołądka psa. Zdjęcia wykonano w mikroskopie scanningowym

Fig. A, B and C. Bacteria of *Helicobacter* spp. Morphology colonizing gastric mucosa in dog. Photos taken with scanning microscope



Ryc. D. Bakterie o morfologii *Helicobacter* spp. kolonizujące błonę śluzową żołądka psa.

Widoczne dwa gatunki różniące się morfologicznie (*H. heilmannii* oraz *H. felis*).

Zdjęcie wykonano w mikroskopie scanningowym

Fig. D. Bacteria of *Helicobacter* spp. Morphology colonizing gastric mucosa in dog. Two morphologically different species (*H. heilmannii* and *H. felis*) visible. Photo taken with scanning microscope