

Påvisande av *Helicobacter* spp hos hund

- En metodologisk studie

Claire Nicol

**Handledare: Gunilla Trowald-Wigh
Avd. för bakteriologi och livsmedelshygien, BVF.
Biträdande handledare: Anna Aspán
Avd. för Bakteriologi, SVA.**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ORDLISTA	3
ABSTRACT	4
SAMMANFATTNING	5
INLEDNING	6
Metoder för detektion av <i>Helicobacter</i> spp	7
SYFTE MED DENNA STUDIE	9
MATERIAL OCH METODER	10
Djurmaterial	10
Rening av DNA från faecesprov	10
Rening av DNA från munprov	10
Rening av DNA från biopsier	11
Spektrofotometer	11
PCR	11
Elektrofores	12
Sekvensering	13
Multiplex PCR	13
Kapillärelektrofores	16
RESULTAT	18
Helicobacterförekomst	18
Förekomst av <i>H. pylori</i>	18
Förekomst av <i>H. bizzozeronii</i>, <i>H. felis</i> och <i>H. salomonis</i>	19
Multiplex PCR och kapillärelektrofores	19
DISKUSSION	21
LITTERATURFÖRTECKNING	24

ORDLISTA

16SrRNA: Ribosomen innehåller rRNA och här sker proteinsyntesen. Hos prokaryota celler och eukaryota mitokondrier finns tre distinkta storleksdelar av rRNA. Detta är 5S, 16S och 23S. Där S står för enheten Svedberg. Ribosomen delas in i två subenheter där den lilla subenheten innehåller 16S rRNA och den stora subenheten innehåller 5S och 23S rRNA. Ribosomalt RNA har som funktion att möjliggöra avkodandet av mRNA till aminosyror samt interagerar med tRNA under translantationen.

Sekvensering: Innebär att man bestämmer ordningsföljden av baser i DNA eller ordningsföljden av aminosyror i protein.

Supernatant: Den vätska som ligger ovanför ett lager av utfällt olösligt material

Eluat: Produkt som fås genom eluering, dvs då pulveriserade substanser blandas med vatten för att kunna separera de tyngre partiklarna från de lättare.

Templat: DNA- ELLER RNA- strängar som används som mall för att syntetisera nya strängar.

Mastermix: Blandning innehållande de beståndsdelar som behövs till en PCR reaktion.

Amplikoner: DNA-bitar som syntetiserats genom amplifikationsteknik. Tex produkter av Polymerase Chain Reaction (PCR) eller Ligase Chain Reaction (LGR).

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop a reliable molecular-genetic method to determine the different species of helicobacter in dogs. The study is part of a larger project to map the prevalence of *Helicobacter* spp in healthy and sick dogs in Sweden, and to determine the possible connection of *Helicobacter* spp infection with gastrointestinal diseases in dogs.

Several published studies have reported on the prevalence of *Helicobacter* spp in dogs. The problem is that three of the most common species are so alike that a 16SrRNA-PCR with sequencing is not able to differentiate between them. In this study, DNA has been purified from samples and then a Multiplex PCR has been performed. Multiplex PCRs use multiple primers in one single PCR. The primers have been attached with fluorescent markers, and capillary electrophoresis is used to illustrate the results. In this way, very similar species can be differentiated from each other.

This paper also includes a short review of previous studies made in this field and the different methods used for diagnosis of infection with *Helicobacter* spp.

Samples from 17 dogs were collected and analyzed. Multiplex PCR was used on 12 healthy dogs. For the Multiplex PCR non-invasively collected samples were used, namely faeces and mouth swabs. The remaining 5 dogs were patients with different gastrointestinal problems. From these dogs, in addition to faeces and mouth swab samples, biopsies were taken from the stomach and duodenum.

The study shows that the Multiplex PCR works well, but that the capillary electrophoresis is not able to illustrate the results. Also, all samples from all dogs were analyzed in a helicobacteria-specific 16SrRNA PCR and this showed *Helicobacter* spp in nearly all samples, the frequency of mixed helicobacter-infection being as common in mouth swabs as it was in faeces samples. This unexpected result further emphasises the need to develop the Multiplex PCR-technology, as normal sequencing cannot be used in severe mixed infections. Thus, the Multiplex PCR should prove to be a diagnostically reliable method, but further development and testing are needed.

SAMMANFATTNING

Syftet med denna studie var att utveckla en molekylärgenetiskt pålitlig metod för att artbestämma helicobacterbakterier hos hund. Studien är en del av ett större projekt där man avser kartlägga helicobacterförekomsten hos friska och sjuka hundar i Sverige samt undersöka bakteriens betydelse för uppkomsten av gastrointestinala sjukdomar hos hund.

Ett flertal studier har rapporterat om förekomst av *Helicobacter* spp hos hundar, men ett stort problem är att de allra vanligaste arterna är så pass lika varandra att en vanlig 16S rRNA-PCR (*Polymerase Chain Reaktion*) med sekvensering ej kan skilja dem åt. Detta arbete beskriver hur DNA har renats fram från provmaterial varpå en Multiplex-PCR metod med multipla primrar tillämpats i en enda PCR-reaktion. Dessa primrar innehåller fluorescerande ämnen som kan åskådliggöras med hjälp av kapillärelektrofores. Härigenom kan arter som liknar varann skiljas åt. Arbetet ger även en kort inblick i tidigare studier som gjorts inom området, samt de olika metoder som finns för diagnos av infektion med *Helicobacter* spp.

Prov från 17 hundar analyserades och Multiplex-PCR utfördes på 12 friska hundar. Till Multiplex-PCR-reaktionen användes icke-invasivt tagna prover, faecesprov samt munskrapprov. De övriga fem hundarna var patienthundar som inkom till kliniken för olika gastrointestinala störningar. Från dessa hundar analyserades, förutom faeces- och munskrapprov, även biopsier från magsäck och duodenum.

Resultaten visar att Multiplex-PCR-reaktionen fungerar bra men att kapillärelektroforesen ej kan åskådliggöra resultatet. Sammanfattningsvis kommer Multiplex-PCR vara en diagnostiskt pålitlig metod men vidare utveckling och studier krävs. Samtliga prover från samtliga hundar analyserades i en helicobacterspecifik 16S rRNA PCR och det visade sig finnas *Helicobacter* spp hos nästan alla de hundar som provtogs. Dessutom var frekvensen blandinfektion i munprov liknande den som ses i faecesprov, vilket ej var förväntat. Detta accentuerar ytterligare behovet av att utveckla Multiplex-PCR metoden då vanlig sekvensering inte kan användas vid kraftiga blandinfektioner.

INLEDNING

Helicobacter spp är s-formade eller spiral-formade och ca 3,0x0,5x0,9µm stora. De är besläktade med *Campylobacter* spp och *Arcobacter* spp. *Helicobacter* spp är gramnegativa, mikroaerofila, oxidaspositiva, icke-sackarolytiska, samt förutom undantaget *H. canis*, även katalaspositiva. De är svårodlade och kräver speciella, berikade medier som tex *Skirrow agar*. Gastriska och enteriska helicobacterbakterier hittar man i magsäckens eller tarmens mucosa hos både människor och djur. (Quinn et al., 2002)

Man har formellt namngett åtminstone 26 olika arter av *Helicobacter* spp (Johansson et al 2006). *H. pylori* har rönt stor uppmärksamhet på humansidan där man fastställt att den kan orsaka gastrit, magsår samt duodenala sår. *H. pylori*-infektioner anses vara en bidragande orsak till utvecklande av adenocarcinom i magsäcken. *H. pylori* är ett ovanligt fynd hos hund och fram tills år 2003 hade den aldrig påträffats. Då lyckades dock Buczolits et al (2003) sekvensera fram *H. pylori* i biopsier från två av fyra hundar. Hundarnas hälsostatus och tidigare sjukdomshistoria är okänd. *H. pylori* förekommer även hos katt (Neiger et al., 2000).

Helicobacter spp verkar kunna finnas hos många djur utan att ge upphov till någon sjukdom. Enligt Wiinberg et al (2005) är prevalensen helicobacterinfektion hos friska hundar 67-100 %. *H. bizzozeronii* rapporteras vara den mest frekvent förekommande arten hos hund enligt vissa författare (Van den Bulck et al., 2005). Transmission av helicobacterbakterier verkar ffa vara fekal/oral och oral/oral (Carter et al., 2004). *H. pylori* infektion hos människa ger upphov till produktion av de pro-inflammatoriska cytokinerna IL-1β, IL-6, IL-8 och TNF-α. Dessa har visat sig orsaka förändringar i gastrin- och somatostatinhalterna och därmed syrautsöndringen. Detta leder till gastrit och så småningom ulcera. (Neiger et al., 2000) Alla de helicobacterarter som koloniserar magsäcksmucosan, ger karaktäristiskt upphov till en kraftig ureas-reaktion då det är denna ureas-producerande egenskap som gör att de kan överleva i magsäckens extremt sura miljö. (Quinn et al., 2002) Genom att bryta ner urea produceras ammoniak och koldioxid som då ger upphov till en pH-höjning som möjliggör överlevnad (Carter et al., 2004).

Betydelsen av *Helicobacter* spp som orsak till gastrointestinala störningar hos katt och hund är ej ännu helt klarlagt och det pågår mycket debatt om detta. De arter som man kopplat till fall av gastrisk sjukdom hos katt är *H. felis*, *H. pylori*, *H. canis* och *H. heilmannii*. Hos hund är det ffa arterna *H. bizzozeroni*, *H. felis*, *H. canis*, *H. bilis*, *H. salomonis* och *H. rappini* som man misstänker kan orsaka sjukdom. (Carter et al., 2004)

Det råder varierande åsikter om zoonos-risken men man har rapporterat om fall där humanpatienter med gastrisk sjukdom har samma typ av helicobacterorganism som sina husdjur (Baele et al., 2004 och De Groote et al., 2005). Fynd som detta har lett till intresse att fastställa vilka arter det är man kan hitta hos våra husdjur.

Cirka 0,25-1,7 % av alla människor som lider av gastrit, ulcera och magsäckscancer härbärgerar *Helicobacter* spp av annan art än *H. pylori*. Dessa bakterier benämns oftast "*Helicobacter heilmannii*"- liknande organismer (HHLO). Nu har man delat in *H. heilmannii* i två genotypiskt olika typer. *H. heilmannii* typ 1 är väldigt lik *Candidatus H. suis* som man sett orsaka ulcera hos svin och *H. heilmannii* typ 2 är väldigt lik de andra *Helicobacter* spp som vi ser hos katter och hundar, ffa *H. felis*, *H. bizzozeronii* och *H. salomonis*. (De Groote et al., 2005) Enligt Priestnall et al (2004) är människor ffa infekterade med *H. heilmannii* typ 1 och att den zoonotiska risken från hund och katt därför borde vara liten då de ffa härbärgererar *H. heilmannii* typ 2.

Ett problem är att *H. felis*, *H. bizzozeronii* och *H. salomonis*, som faktiskt är de allra vanligaste helicobacterarterna hos hund och katt, är så pass lika fenotypiskt och fylogenetiskt att en vanlig 16S rRNA PCR ej kan skilja de åt. Andra gener måste därför användas för att artbestämma dem. Detta har man lyckas med genom Multiplex-PCR med flertal primrar riktade mot olika sekvenser följt av kapillärelektrofores. (Baele et al., 2004) Med Multiplex-PCR kan man skilja på dessa nära besläktade arter i en enda reaktionsmix till skillnad från andra PCR-metoder där endast en art eller en samling av arter kan identifieras (Van den Bulck et al., 2005). Baele et al (2004) utförde Multiplex-PCR-analys på magsäcks-biopsier från 17 avlivade hundar och 16 av dessa blev positiva och typning lyckades. Samtliga hundar hade *H. bizzozeronii*-infektion och tre av dessa hade blandinfektion med *H. felis*. Hundarnas hälsostatus var okänd. Van den Bulck et al (2005) fann i sin studie att av de 110 hundar som de hade tagit biopsier från var 91 positiva för någon art i Multiplex-PCR-analysen. Även här var *H. bizzozeronii* infektion vanligast men då ffa i blandinfektion. Tjugotvå av 91 hundar hade infektion med endast *H. bizzozeronii* och 55 av 91 hundar hade blandinfektion med *H. bizzozeronii*. Fjorton hundar hade infektion med övriga arter där *H. felis* var den vanligaste. Dessa hundar hade avlivats av olika anledningar och tycks ej vara primära fall av gastrointestinala störningar.

Metoder för detektion av *Helicobacter* spp

H. pylori har väckt störst intresse inom humanmedicinen och därför har den mesta forskningen gjorts på denna art. De flesta av de olika diagnostiska metoderna är endast utprovade på *H. pylori*.

Det finns ett flertal både invasiva och icke-invasiva metoder för detektion av *H. pylori*. De invasiva innebär ofta gastroskopi med uppsamlande av biopsier från olika regioner i mag-tarmkanalen. Oftast går man in med gastroskopet och letar efter ett område som ser ut att vara inflammatoriskt förändrat och tar sitt prov därifrån. Dock kan bakterierna vara oregelbundet utspridda i mucosan och därför kan man missa att få med sig de vid provtagning (Sharma et al., 1999). De ligger ofta i djupa kryptor så man får heller inte vara för ytlig i sin provtagning (Ogata et al., 2001).

En klar nackdel med de invasiva metoderna är att de är just invasiva. Det är ett större ingrepp för patienten samt kräver narkos som utgör en risk i sig. Det är ofta mer kostsamt och tidskrävande. De icke-invasiva metoderna är betydligt skonsammare för patienten, mindre tidskrävande och i många fall billigare. Dock har de oftast inte samma specificitet som de invasiva och man får inte chans att bedöma de skador infektionen orsakat. En stor fördel vid gastroskopi är att man får en god bild av omfattningen av magslemhinnans skador. (Dzierzanowska-Fangrat et al., 2006)

Positivt med de icke-invasiva testerna *Urea Breath Test* och *Stool Antigen Test* är att det ger en sk global bild, dvs man får ett prov som återspeglar en mer utbredd bild av infektionsläget i magsäcksmukosan. Dessutom slipper man risken för fel vid provtagning och att man då missar den infektionsdrabbade delen, något som kan ske vid biopsitagning. (Hirschl et al., 2005)

Ett positivt resultat på *Urea Breath Test* och *Stool Antigen* ska konfirmeras med annan provtagning medan ett negativt resultat bedöms som pålitligt (Hirschl et al., 2005).

Här beskrivs kort de vanligast förekommande metoderna.

Invasiva metoder:

1. BIOPSITAGNING MED HISTOLOGI

Detta är i dagsläget den provtagning som man oftast använder för att fastställa diagnos av *H. pylori* infektion. Detta görs oftast ihop med *Rapid Urease Test*, *RUT*. Histologi kräver att man har en duktig patolog som avläser proverna samt att man fått med bakterier i sitt prov. Det är möjligt att i normal färgning samt i specialfärgning se *Helicobacter* spp i histologiska snitt. Elektronmikroskopi ger tydligare information om bakteriens utseende och möjliggör en viss typning.

2. BIOPSITAGNING FÖLJT AV *RAPID UREASE TEST*

Biopsimaterial läggs i en lösning som innehåller destillerat vatten, röd fenol samt urea. Ureaset bryter ner urea till ammoniak vilket höjer pH. Ett positivt prov ger upphov till ett färgskifte från gult till rött. (Ogata et al., 2001)

En svaghet i provtagningen är att andra ureas-producerande bakterier som *Proteus* spp kan ge falskt positiva svar (Neiger et al., 2000).

3. BIOPSITAGNING FÖLJT AV ODLING

Helicobacter spp är mycket svårödlade och kräver berikad agar med tillsats av antibiotika som tex vancomycin. Odlingstiden kan vara upp till 7 dygn eller längre. Dock är specificiteten mycket hög med detta test eftersom man får ett ganska typiskt utseende mikroskopiskt med spiralformade bakterier. De ska även vara oxidias-, katalas- och ureas-positiva. (Ogata et al., 2001)

H. heilmannii som är vanlig hos både hund och katt har man inte lyckats odla fram på medier och *H. felis* har rapporterats vara mycket svårt att isolera och identifiera på agar (Carter et al., 2004).

4. BIOPSITAGNING FÖLJT AV PCR

Primrarna som oftast används är baserade på ureas-generna eller på 16S-genen (Neiger et al., 2000). PCR analys har en otroligt hög sensitivitet vilket gör den mycket känslig för kontamination. Man måste vara noga med att få fram så rena PCR-produkter som möjligt samt att undvika all kontamination. (Fermér et al., 2002) En nackdel vid blandinfektioner är att 16S PCR metoden är kompetitiv och därför får man eventuellt bara utslag på den art som finns i störst mängd. Som konsekvens av detta kommer endast den arten att detekteras vid sekvenseringsanalysen. (Johansson et al., 2006)

Icke-invasiva metoder:

1. *STOOL-ANTIGEN TEST*

Detta bygger på att man använder antikroppar för att detektera *H. pylori*-antigen i faeces. Resultatet analyseras med spektrofotometri. (Manes et al., 2005)

Stool Antigen Test finns baserade både på monoklonala och polyklonala antikroppar. Man har sett att de monoklonala testen har en betydligt större sensitivitet och specificitet. En stor fördel med *Stool Antigen Test* är att det inte kräver någon större medverkan från patienten. (Hirschl et al., 2005)

2. PCR ANALYS AV ICKE-INVASIVT TAGNA PROV

I en studie där man utförde PCR på DNA renat från biopsi samt på DNA renat från faeces, visade det sig att båda proverna hade lika antal positiva resultat. Faeces-prov var därför lika säkert i denna studie. (Fermér et al., 2002)

Dock rapporteras i en jämförelse (Haggerty et al., 2005) mellan *Stool Antigen Test* och PCR för faeces-prover, att PCR hade en relativt låg sensitivitet (25-50 %).

3. UREA BREATH TEST

Urea Breath Test anses vara det mest pålitliga icke-invasiva testet för *H. pylori*-infektion. Patienten dricker en mix innehåller urea med en radioaktiv isotop, ^{14}C , löst i vatten. Ureas producerat av *Helicobacter* spp klyver urean till ammoniak och kolatomerna frigörs. Dessa kolatomer tas upp i cirkulationen och andas sedan ut. Utandningsprov tages efter standardiserade tidsintervall och man mäter då mängden $^{14}\text{CO}_2$ / mmol CO_2 i procent av mängden given urea. (Sharma et al., 1999). *UBT* rapporteras ha en sensitivitet på 98,9 % och specificitet på 99,5 %. *UBT* är dock en dyr metod. (Manes et al., 2005)

Det kräver en viss medgörlighet att utföra *UBT* och det är inte alltid möjligt med djurpatienter. En klar nackdel med *UBT* är att man utsätter patienten för radioaktivitet (Sharma et al., 1999).

4. SEROLOGI AVSEENDE ANTIKROPPAR

Vanligen använder man *ELISA*-diagnostik för att detektera cirkulerande IgG i serum riktade mot *H. pylori*. Den är dock inte att rekommendera för att kontrollera behandlingsresultat eller aktiv infektion då antikroppstitern kvarstår under mycket lång tid. Sensitivitet rapporteras ligga mellan 67-90 % och specificitet på 75-91 %. (Hahn et al., 2000) Den varierande graden av sensitivitet kan göra testet opålitligt. Serologi är särskilt användbart vid infektioner med få bakterier, överväxt av andra bakterier samt vid epidemiologiska studier. (Hirschl et al., 2005)

5. CONFOCAL ENDOMIKROSKOPI (DIREKT IN VIVO *H.PYLORI* OBSERVATION UNDER ENDOSKOPI)

På humansidan har man provat att använda *Confocal Laser Endoskopi*. Med denna metod gör man mikroskopering av vävnaden samtidigt som man endoskoperar och behöver då inte ta ut några biopsier. Lasern på mikroskopet penetrerar samtliga lager av den gastriska mucosan. Dessutom kan ett färgämne sprutas från endoskopet som färgar in epitellagret och åskådliggör vita *helicobacter*kolonier. (Kiesslich et al., 2005)

SYFTET MED DENNA STUDIE

Denna studie är en del av ett större projekt med följande frågeställningar:

1. Vilka *helicobacter*arter finns normalt i den svenska hundpopulationen respektive hos svenska hundar med gastrointestinal sjukdom?
2. Är vissa *helicobacter*arter associerade med gastrointestinal sjukdom hos hund medan andra är normalflörebakterier?
3. Har hundar samma *helicobacter*arter i saliv, magsäck, duodenum och faeces?

Målet i föreliggande delstudie var att arbeta fram en molekylärgenetisk och pålitlig metod för artbestämning av *Helicobacter* spp, då detta behövs för att kunna besvara ovanstående frågeställningar. Eftersom det är känt att hundar ofta har blandinfektioner, är det viktigt att få fram en metod som kan särskilja de olika arterna. Lyckas man identifiera arter på de icke-invasivt tagna faeces- och salivproverna som stämmer med artförekomsten som typas fram från biopsier, så kan man eventuellt utesluta de invasiva biopsierna vid framtida diagnosställande.

MATERIAL OCH METODER

Djurmaterial

Faecesprov och munskrapprov togs från 12 kliniskt friska hundar (nr 1-7 samt 9-13). Av dessa var 8 tikar och 4 hanar och i åldern 1-8 år. Hundarna kom från helt skilda miljöer och var familjehundar. Djurägaren fick fylla i ett frågeformulär angående sin hund vid provtagningen och resultatet av dessa besvarade enkäter diskuteras i ett annat EEF-arbete (Lindell 2006). Proverna togs samma dag. Faeces- och munprov frystes in vid -70°C tills det var dags för provuppbearbetning.

Förutom dessa 12 hundar analyserades även prover från 5 patienthundar (nr P1-P5) som led av gastrointestinala störningar. Av dessa hundar var två tikar och tre var hanar. De var 2-7 år gamla. Från patienthundarna togs förutom faecesprov och munskrapprov även biopsier. Biopsierna togs vid gastroskopi. Två biopsier togs från varje hund, en från magsäcken och en från främre delen av duodenum.

Rening av DNA från faecesprov

Till detta användes *QIAamp DNA Stool Mini Kit* från *QIAGEN*.

Cirka 200 mg faecesprov löstes upp i ASL buffert med hjälp av vortex-maskin. Genom noggrann vortexning så maximerar man mängden renad DNA som kommer i det slutliga eluatet. Ytterligare ASL buffert tillsattes och sedan lyserades bakterierna i 70°C. Även detta görs för att få ut så mycket DNA som möjligt. Genom centrifugering kunde de större faecespartiklarna separeras från supernatanten. Till supernatanten tillsattes en InhibitEX tablett som binder upp inhibitorerna i supernatanten. När dessa inhibitorer är uppbundna, är det möjligt att avlägsna dessa genom centrifugering. Supernatanten pipetterades upp till ett nytt rör. Efter ytterligare centrifugering tillsattes Proteinase K samt AL buffert. Proteinaset bryter ner många av de proteiner som finns i faeces och som stör framningen av DNA. Detta inkuberades i 70°C och sedan tillsattes etanol. Spinnkolonner med filter användes och med hjälp av etanol binder DNA till filtret. Tillsats av tvättbuffert AW1 och AW2 och centrifugering utfördes för att rena filtret och få bort vätskan. Filtret flyttades över till nya kolonner efter varje centrifugering. Slutligen tillsattes AE elueringsbuffert vilka gör att DNA lossnar från filtret och det färdiga eluatet som ska användas som PCR templat är klart.

Rening av DNA från munprov

Proverna togs med 0,8 mm *Apoliva Mellanrumsborstar* från *Apoteketsbolaget*. Tandkött, tänder, gom och tunga borstades med samma borste. Det var viktigt att man borstade noga och bestämt då sättet att ta provet starkt påverkade mängden DNA som sedan kom fram efter bearbetning.

Borsten klipptes av i ett eppendorfrör innehållande 0,9 % NaCl som skakades i termomixer i rumstemperatur under 15 minuter. Materialet lossnade från borsten och borsten avlägsnades. Efter detta centrifugerades röret och en svart klump blev synlig i botten av vätskan. Detta innehöll bakterier. Vätskan pipetterades upp och avlägsnades och pelleten behölls. TE buffert tillsattes och bakterierna lyserades i termomixer vid 96°C. Röret kylde på is under en kort tid, följt av en slutlig centrifugering som gav ett färdigt supernatant.

Rening av DNA från biopsier

Biopsierna fördes över till eppendorfrör. Till varje rör tillsattes 50 µl Proteinase K och 150 µl G2-Buffer. Biopsierna lyserades i termomixer vid 56°C i ca 40-60 minuter. Biopsin måste vara helt upplöst. DNA extraherades med *EZ1 robot*. Varje rör i roboten kräver 50 µl eluat.

Spektrofotometer

Samtliga eluat analyserades i en spektrofotometer för att ge indikation om mängd DNA som finns i provet samt hur rent provet är. De värden som fås fram i spektrofotometern är:

- Absorbansen vid 260 och 280 nm.
- A_{260} / A_{280}
- Renhet, dvs om nukleinsyrapreparationen är förorenad av protein.
- DNA koncentrationen

PCR

Med PCR-teknik kan man amplifiera en specifik gen och sedan analysera dessa fragment genom elektrofores. *Polymerase Chain Reaction* går till på så sätt att DNA-templat inkuberas med två stycken korta DNA oligomerer, sk *primers*, ett värmestabil DNA polymeras, nukleotider och buffert. Primrarna komplementerar slutändarna på en känd genetisk sekvens i organismens DNA. I detta fall användes helicobacterspecifika primers H276f (primersekvens 5'-CTA TGA CGG GTA TCC GGC-3') och H676r (primersekvens 5'-ATT CCA CCT ACC TCT CCC A-3') för 16S rRNA. Primrarna fäster till den passande DNA sekvensen och fungerar som startsignal för polymeraset. Polymeraset använder nukleotiderna som byggstenar och kopierar detta segment. Blandningen hettas sedan upp för att denaturera DNA så att kedjorna i dubbelhelixen kan separeras. Efter detta kyls provet och då fäster primrarna till nytt DNA. Varje DNA-kopia blir alltså ett nytt templat. Processen upprepas 20-40 gånger.(Brooks et al., 2004)

Varje PCR reaktion innehöll en mastermix som bestod av:

- 34,4µl Σ - vatten
- 5µl 10x PCR-buffert II (stamlösning 10x)
- 5µl MgCl₂ (25 mM)
- 2µl dNTP mix (10mM, 2,5 mM av varje bas)

- 0,7µl primer H276f (10 pmol/ µl)
- 0,7µl primer H676r (10 pmol/ µl)
- 0,2µl AmpliTaq Gold (5 U/ µl)

Till varje PCR reaktion tillsattes 2 µl templat och ytterligare 5 µl Σ-vatten. Den totala volymen blev 50 µl.

En 16S rRNA PCR användes.

PCR programmet bestod av:

1. Preinkubation vid 94°C i 10 minuter
2. 40 cykler med 30 sekunder vid 94°C, 30 sekunder vid 55°C och 30 sekunder vid 72°C
3. Avslutning vid 72°C i 5 minuter
4. Kylning ner till 4°C

Faecestemplaten analyserades förutom i originalkoncentration även i spädningar på 1:10 och 1:100.

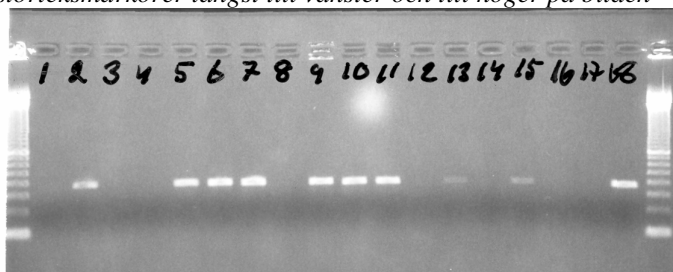
Elektrofores

De färdiga PCR produkterna analyserades genom elektrofores.

Elektroforesgelen består av agaros samt etidiumbromid. Agarosen håller en temperatur på ca 65°C. Gelen får stelna med kamrar som trycks in och ger de brunnar som proverna sedan pipetteras ner i. Varje brunn fylls med 10 µl prov samt 2,5 µl PCR gel-laddningsbuffer. Vid sidan om varje brunnrad sätts 7,5 µl storleksmarkör som ger bandmönstret som ses vid elektrofores. Varje band motsvarar i detta fall ca 100 baspar, men detta varierar beroende på storleksmarkör. Med ovanstående primrar erhålles amplikon med en storlek på 376 baspar. Dock ger det ej indikation om vilken art det handlar om.

Agarosgelen placeras i ett elektriskt fält och eftersom DNA är negativt laddat så dras det mot pluspolen och därför ”vandrar” proverna. Kortare segment, dvs färre antal baspar, vandrar längre än de större segmenten.

Figur 1. Exempel på fotografi av elektrofores med olika prover, ett positivt kontrollprov (No 18) samt storleksmarkörer längst till vänster och till höger på bilden



Sekvensering

De prover som funnits positiva för *Helicobacter* spp i elektroforesen sekvenserades. DNA renades ytterligare innan sekvenseringen kördes. Detta gjordes genom att först fästa DNA till speciella filter med hjälp av en buffert innehållande bla etanol, och sedan tillsätta tvätt-buffert och centrifugera torrt. Slutligen eluerades filtret med Σ -vatten.

Två mastermixar blandades till. En innehöll en reverse primer och en innehöll en forward primer. Detta ger en läsning från motsatta ändar av DNA-strängarna och görs för att få en säkrare och mer pålitlig sekvens. Båda mastermixar innehöll *BigDye* som hjälper till att fluorescera i sekvenseringsprocessen.

Ytterligare reaktion utfördes, sk sekvenseringsreaktion, följt av centrifugeringar och filtertvätt med tvätt-lösning. Slutligen vakuumentvättades proverna, därefter utfördes sekvensering.

Proverna analyserades över natten i sekvenseringsmaskinen *ABI Prism Genetic Analyzer*.

Efter en genomgången sekvensering får man upp grafer som visar innehåll och ordning av baspar i det DNA som analyserats. För detta användes *ABI 310 GeneScan Analysis Software*. Graferna omvandlas till DNA sekvenser med hjälp av ett program som heter *Vector NTI*.

De erhållna sekvenserna sänds ut på en internationell databas (*GenBank*) för sekvenslikhetssökningar.

Multiplex-PCR

Multiplex-PCR metoden går ut på att man använder ett flertal olika primrar som innehåller fluorescerande ämnen. Beroende på *Helicobacter* art, färgar dessa in med olika färger vid olika fragment-längd, dvs basparsantal. För att åskådliggöra detta används kapillärelektrofores. (Baele et al., 2004)

De prover som valdes ut var de som varit positiva för *Helicobacter* spp i vår tidigare *Helicobacter* specifika PCR. Om fler än ett av faeces-spädningarna varit positiv så valdes den som visade det starkaste bandet på elektroforesen. Det blev totalt 21 prover samt kontroller. Före användning av de fluorescerande primrarna utfördes två PCR-reaktioner med artspecifika primrar.

Två mastermixar blandades ihop som skulle användas till var sin PCR-reaktion.

Mastermix 1 innehöll primer HPf och HPr. Dessa primrar är specifika för *H. pylori*. Primersekvens HPf, 5'-TTA TCG GTA AAG ACA CCA GAA A-3' och HPr, 5'-ATC ACA GCG CAT GTC TTC-3'(He et al., 2002).

Mastermix 2 innehöll primer CAR577f och CAR636r. Dessa primrar är specifika för ett 78 baspar långt fragment som finns i 16S hos *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* och *H. felis*. Dessa tre arter är exakt lika på detta fragment och kan därför inte urskiljas en och en då man använder dessa primrar. Primersekvens CAR577f, 5'-TGC GTA GGC GGG GTT GTA AG-3' och CAR636r, 5'-CAG AGT TGT AGT TTC AAA TGC-3'(De Groote et al., 2001).

Varje prov innehöll 23,0 µl master mix som bestod av:

- 12,4 µl Σ-vatten
- 2,5 µl 10xPCR buffer II (stamlösning 10x)
- 3,0 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2,0 µl dNTPmix (10mM, 2,5 mM av varje bas)
- 2,0 µl Glycerol (4 %)
- 0,1 µl AmpliTaqGold (5 U/ µl)
- 0,15 µl av utvald forward primer (10 pmol/ µl)
- 0,15 µl av utvald reverse primer (10 pmol/ µl)

Till varje PCR-reaktionsrör tillsattes 23 µl mastermix och 2 µl templat.

PCR-programmet för primrar HPf och HPr bestod av:

1. Preinkubation vid 95°C i 10 minuter. Detta aktiverar AmpliTaqGold.
2. 40 stycken amplifieringscykler som bestod av 30 sekunder vid 94°C, 30 sekunder vid 54°C och 30 sekunder vid 72°C.

PCR-programmet för primrar CAR577f och CAR636r bestod av:

1. Preinkubation vid 94° i 9 minuter.
2. 35 stycken amplifieringscykler som bestod av 30 sekunder vid 94°, 30 sekunder vid 60° och 45 sekunder vid 72°.
3. Slutlig primerextension vid 72° i 5 minuter

Efter avslutade PCR-program analyserades samtliga PCR-reaktioner genom elektrofores. Agarosgelen höll en högre koncentration än tidigare, 1,75 % istället för 1,5 %, och andra PCR laddningsbuffert och storleksmarkörer användes.

Till varje brunn tillsattes 1,5 µl *6xOrange Loading Dye Solution* och 10 µl prov. På vardera sida om brunnraderna tillsattes 5 µl av storleksmarkören *50bp DNA Ladder 0,1 µg/µl*.

De 21 prover som valts ut till föregående PCR-reaktioner skulle nu användas till Multiplex-PCR-reaktionen.

Fyra stycken primer-par märkta med fluorescerande markörer TET, HEX eller NED användes. Dessa var:

- T3B(TET)- HT135R, Primer sekvens T3B, 5'-ACG TCG CGGG GTT CGA ATC C-3' och HT135r, 5'-ACC ACC TGG GCT AAG CGA CC- 3'. Target på en sekvens i tRNA-generna. (Baele et al., 2004)
- Bi1F(HEX)-Bi2R. Primer sekvens Bi1f, 5'-AAC CAA YAG CCC CAG CAG CAG CC-3' och Bi2R, 5'-TGG TTT TAA GGT TCC AG CGC-3'. Target på en sekvens i ureasgenen tillhörande *H. bizzozeronii*. (Baele et al., 2004)
- Fe1F(NED)- Fe3R. Primer sekvens Fe1f, 5'-TTT GGT GCT CAC TAA CGC CCT C-3' och Fe3r, 5'-TTC AAT CTG ATC GCG TAA AG-3'. Target på en sekvens i ureasgenen tillhörande *H. felis*. (Baele et al., 2004)
- V832f(NED)- V1281r. Primer sekvens V832f, 5'-TTG GGA GGC TTT GTC TTT CCA-3' och V1281r, 5'- GAT TAG CTC TGC CTC GCG GCT-3'. Target på 16SrRNA-genen på *Candidatus H. suis*. (He et al., 2002)

En ny mastermix blandades till. Denna innehöll:

- 25,5 µl Σ-vatten
- 5,0 µl 10x PCR Buffer II (Stamlösning 10x)
- 6,0 µl MgCl₂ (25 mM)
- 3,0 µl dNTP mix (10mM, 2,5 mM av varje bas)
- 0,5 µl Polymerase Taq Platinum (5 U/ µl)
- 1,0 µl av varje primer (10 pmol/ µl)

Till varje PCR reaktion togs 48 µl Mastermix och 2,0 µl prov. Ett PCR-program utfördes som bestod av:

1. Denaturering i 5 minuter vid 95°C.
2. Reaktionscykler i 1 minut vid 94°C, 1 minut vid 58°C, 1 minut vid 72°C. Detta upprepades 3 gånger.
3. Reaktionscykler i 1 minut vid 94°C, 1 minut vid 60°C, 1 minut vid 72°C. Detta upprepades 35 gånger.
4. Slutlig primer-extension i 7 minuter vid 72°C.

Elektrofores:

Efter avslutat PCR-program analyserades proverna genom elektrofores. Även denna gång var agarosgelen av högre koncentration, 1,75 %.

Varje brunn innehöll 1,5 µl *6xOrange Loading Dye Solution* och 10 µl prov. 5 µl av storleksmarkören *50bp DNA Ladder 0,1 µg/µl* användes vid sidan om varje brunnrad.

Kapillär-elektrofores

PCR produkterna från föregående PCR-reaktion användes. PCR produkterna blandades med 12 µl formamid, som förebygger sammanbindning av amplikoner, samt med storleksmarkörer:

- 0,2 µl GeneScan 500 ROX standard
- 0,3 µl GeneScan 400HD ROX size standard

Till denna tillsattes 1,0 µl av varje prov. Proverna täcktes, centrifugerades och hettades sedan upp i PCR maskin till 95°C i 3 minuter följt av kylning ner till 4°C.

Proverna laddades sedan i en *ABI Prism Genetic Analyzer*. Resultat visades med *ABI 310 GeneScan Analysis Software*.

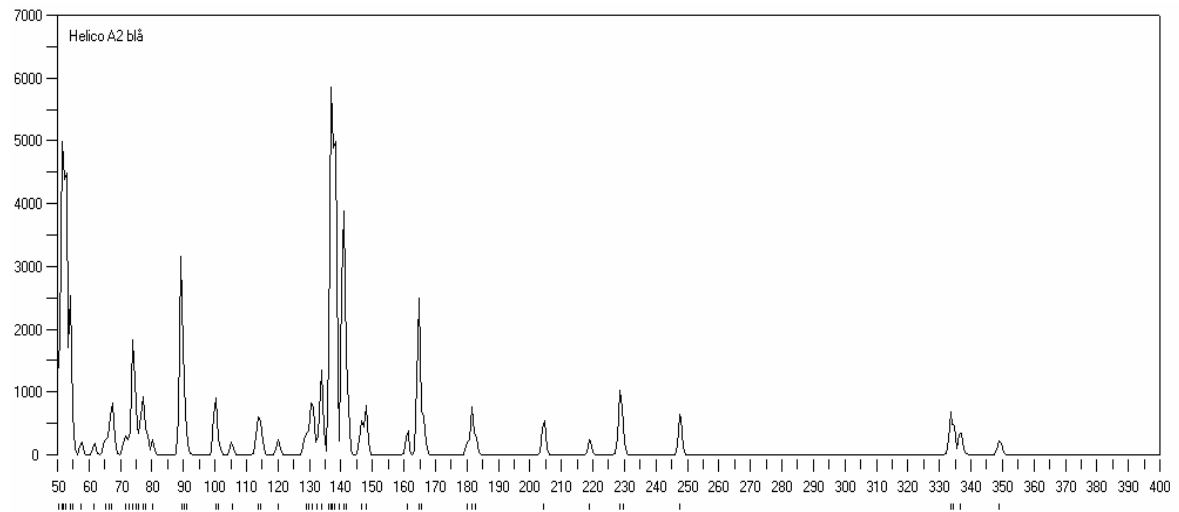
Mjukvaran ger grafer i olika färger. Varje topp korrelerar med ett basparsantal som avläses på x-axeln. De olika arterna som man kontrollerar för har olika baspars-antal på olika färger.

Tabell 1. Fragmentlängder och primrar för de olika *Helicobacter* spp i Multiplex-PCR-reaktionen

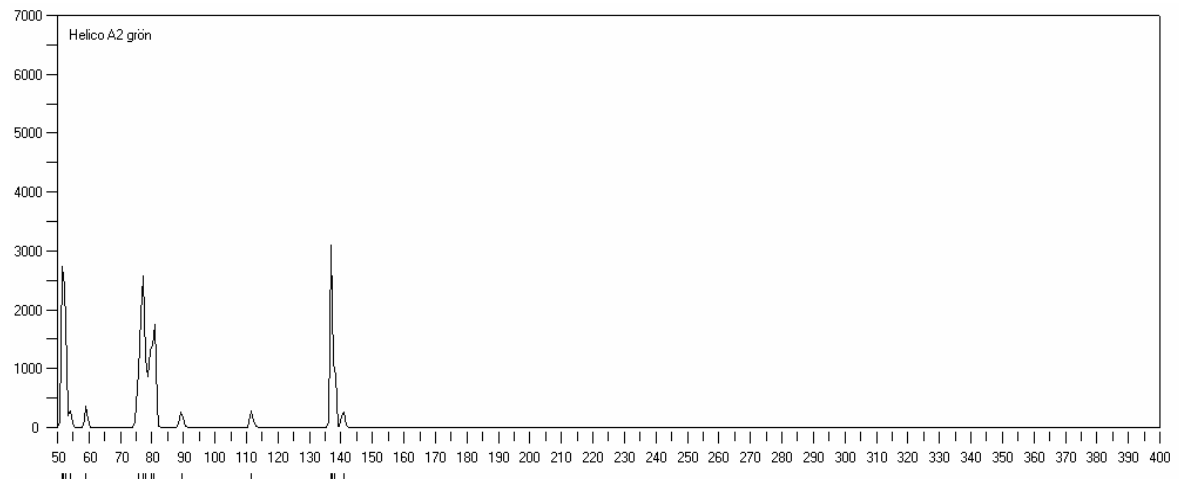
	Blå (TET)	Svart (NED)	Grön (HEX)
	Primrar: T3B-HT135R	Primrar: Fe1F-3R och V832f-V1261r	Primrar: Bi1F- Bi2R
<i>H. felis</i>	137 baspar	434 baspar	
<i>H. bizzozeronii</i>	136 baspar		373 baspar
<i>H. salomonis</i>	134 baspar		

Figur 2A och B. Exempel på erhållna grafer vid kapillärelektrofores. X-axel korrelerar med ett basparsvärde som är artspecifikt.

A Blå graf



B Grön graf



RESULTAT

Totalt analyserades prover från 17 hundar. Multiplex-PCR med kapillärelektrofores utfördes på faecesprov och munskrapprov från de första 12 hundarna. Biopsier togs från fem hundar och de analyserades endast för *Helicobacter* spp förekomst.

Helicobacterförekomst

Hund nr 1-13 (nr 8 utgick) var positiva för *Helicobacter* spp i något av provmaterialet som analyserades i den initiala PCR-reaktionen där en allmän helicobacterspecifik primer H276f och H676r användes. Hund P1-P5 var positiva i något av proverna och hund P5 var negativ i samtliga. Samtliga magsäcksbiopsier, förutom den från hund nr P5, var positiva. Se tabell 2.

Tabell 2. Förekomst av *Helicobacter* spp i analyserade prov (tomma rutor visar på ej tagna prov). Den spädning på faecesproverna som gett det starkaste bandet på el-foresen visas inom parentes.

	Mun	Faeces	Biopsi magsäck	Biopsi duodenum
Hund nr 1	+	+(1:10)		
Hund nr 2	+	+		
Hund nr 3	+	-		
Hund nr 4	+	+(1:10)		
Hund nr 5	-	+(1:10)		
Hund nr 6	+	+		
Hund nr 7	+	+		
Hund nr 9	+	+		
Hund nr 10	+	+		
Hund nr 11	-	+(1:10)		
Hund nr 12	+	+(1:100)		
Hund nr 13	+	+		
Hund nr P1	-	+(1:10)	+	-
Hund nr P2	+	+(1:100)	+	-
Hund nr P3	+	+	+	-
Hund nr P4	+	-	+	-
Hund nr P5	-	-	-	-

Förekomst av *H. Pylori*

Innan Multiplex PCR kördes, utfördes en PCR reaktion med *H. pylori*-specifik primer, HPf och HPr, på de 12 första hundarna. Detta var negativt för samtliga prover.

Förekomst av *H. bizzozeronii*, *H. felis* och *H. salomonis*

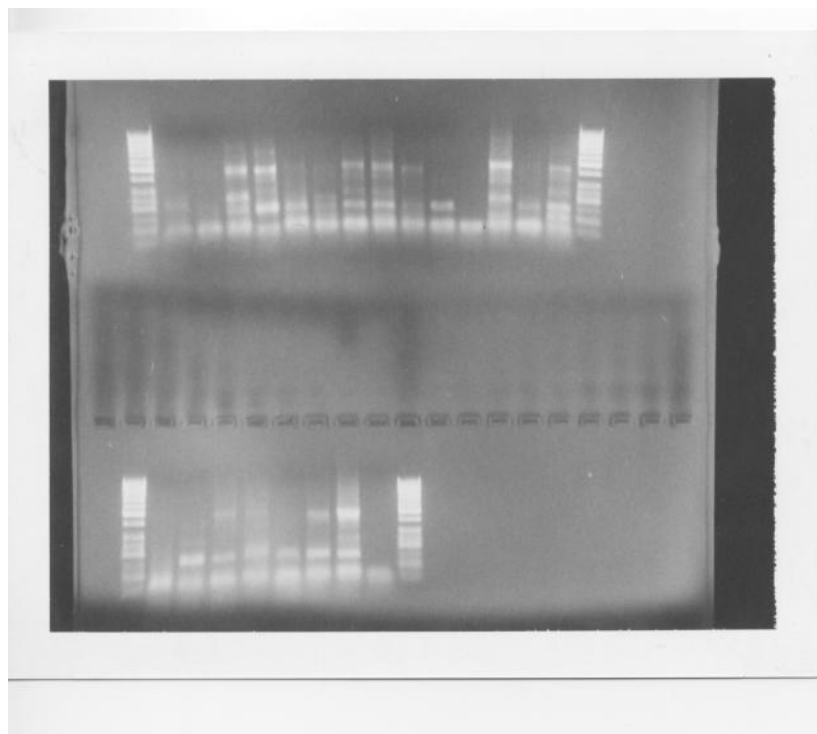
Ytterligare en PCR reaktion utfördes före Multiplex-PCR-reaktionen. Denna gång användes primer, CAR577f och CAR636r, som detekterar *H. bizzozeronii*, *H. felis* och *H. salomonis*. Ett prov som är positivt i denna PCR-reaktion innehåller en eller flera av dessa tre arter men man kan inte urskilja vilken av dem det är. I denna PCR var 2 av hundarna positiva:

- Munprov från hund nr 3
- Faeces-prov från hund nr 13.

Multiplex-PCR och kapillärelektrofores

Efter genomgången Multiplex-PCR reaktion visade elektroforesen på dessa produkter ett mycket gott resultat. Klara bandmönster som kunde ses på nästan samtliga prover. Primrarna hade fungerat mycket bra. Elektroforesen kan dock inte åskådliggöra fluorescensen. Därför kan man inte urskilja exakt vilken helicobacterart man har då flera kan ligga runt ungefär samma baspars-antal. Tex så har *H. felis* cirka 438 baspar och *Candidatus H. suis* har 447 baspar. Dock sågs det att provmaterial från samma hund ofta visade samma bandmönster i faeces och saliv, vilket kan indikera att det finns samma arter i proverna.

Figur 3. Bild på elektroforesgel av Multiplex-PCR produkterna. Liknande bandmönster ses mellan flera av proverna



Munprov nummer 7 togs ej med i Multiplex-PCR-reaktionen då det fanns för lite eluat kvar. Analys av detta prov får vänta tills metoden är fullständigt utarbetad.

Graferna blev röriga och väldigt få har gett ett pålitligt resultat. När dessa grafer lästes av var det endast två prover vars art helt klart kunde fastställas. Fyra andra prover fick resultat med viss osäkerhet. Se tabell 3.

Tabell 3. Resultat av kapillärelektrofores på Multiplex-PCR-produkter

	Mun	Faeces
Hund nr 1		<i>H. salomonis</i>
Hund nr 4	<i>H. salomonis</i> *	<i>H. salomonis</i>
Hund nr 5		<i>H. bizzozeronii</i> *
Hund nr 9		<i>H. salomonis</i> *
Hund nr 12	<i>H. bizzozeronii</i> *	

* Provresultat som tolkades med viss osäkerhet.

DISKUSSION

Ett stort problem vid typning av *Helicobacter* spp hos hund är att de allra vanligaste arterna, *H. bizzozeronii*, *H. felis* och *H. salomonis*, är så pass lika fenotypiskt och fylogenetiskt att en vanlig 16S rRNA PCR ej kan skilja de åt. Detta problem gjorde att Baele et al (2004) utvecklade en Multiplex-PCR med fluorescerande primrar som kunde analyseras med hjälp av kapillärelektrofores. Baele et al (2004) lyckades med hjälp av denna metod typa *Helicobacter* spp i magsäcksbiopsier från 17 hundar. De fann i sin studie att *H. bizzozeronii* var den allra vanligast förekommande arten. De använde sig av 15 referens-stammar från *H. felis*, *H. bizzozeronii* och *H. salomonis* för att tillverka sina arts specifika primrar. För att bedöma specificiteten i deras Multiplex-PCR assay använde de 23 kända stammar från olika helicobacter- och campylobacterarter.

Van den Bulck et al (2005) fann i sin Multiplex-PCR baserade studie på magsäcksbiopsier från 110 hundar att blandinfektioner med *H. bizzozeronii* och *H. felis* var vanligast.

Båda dessa studier visar att Multiplex-PCR metoden fungerar bra till att typa *Helicobacter* spp.

I föreliggande studie analyserades faeces och munprover från hund. En 16S rRNA PCR med helicobacterspecifik primer utfördes på samtliga prover. Innan sekvenseringen påbörjades av de prover som blev positiva i denna PCR antogs att det skulle vara mindre förekomst av blandinfektioner med flera helicobacterarter i munproverna än i faecesproverna. Det borde därför ha varit lättare att sekvensera DNA från munproverna. Det visade sig dock vara lika hög frekvens blandinfektioner i båda proverna. Graferna som kom upp i sekvenseringsprogrammet var svåra att tyda och inga rena arter gick att få fram. Därför beslutades att sekvensering inte kunde användas för att få fram vilka helicobacterarter hundarna var infekterade med. Nästa steg blev därför Multiplex-PCR.

Före Multiplex-PCR, utfördes en PCR med en primer som är specifik för ett 78 baspar långt segment som finns i 16S rRNA-genen hos *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* och *H. felis*. Detta gjordes för att påvisa eventuell förekomst av just dessa 3 arter innan Multiplex-PCR utfördes på dem. Det var dock bara 2 prover som blev positiva. Resultatet var oväntat då man kunde anta att betydligt fler skulle ha blivit positiva med tanke på vad Multiplex-PCR resultatet sedan visade. Någon förklaring till detta har ännu ej framkommit.

Elektroforesen som användes för att analysera Multiplex-PCR produkterna visade på klara och fina bandmönster som indikerade att primrarna fungerat mycket väl. Man kan emellertid inte typa fram arter enbart från detta. Kapillärelektrofores måste användas. Dock sågs att mun- och faecesprov från samma hund ofta visade liknande bandmönster. Detta kan indikera att det finns samma arter i proverna och att det då rimligen även kan vara samma arter i biopsierna. Detta samband skulle man behöva undersöka närmare i en studie av större omfattning. Om så är fallet kan man i större utsträckning slippa ta invasiva biopsier för artbestämning.

Kapillärelektroforesen gav otillfredsställande resultat. Något i själva fluorescensprocessen har inte fungerat och ytterligare metodarbete krävs för att komma fram till orsaken. Elektroforesresultatet var så pass bra att det var väldigt förvånande att kapillär-elektroforesen inte givit bättre resultat. Slutsatsen är att primrarna i Multiplex-PCR metoden fungerar bra, men att något brister i fluorescenssteget och därför blir resultatet ofullständigt och opålitligt.

En annan möjlighet är att använda en agaros-gel av högre koncentration vid elektrofores. Då kan man eventuellt få en klarare separation av banden vilket kan ge en bättre möjlighet till att fastställa exakta basparsantal och då lyckas identifiera några av arterna. (Anna Aspan, personligt meddelande)

I tidigare studier har man haft tillgång till bra positiva kontroller för att kontrollera att PCR-metoden uppehåller den standard och analys-känslighet som behövs. Vi hade inga positiva kontroller för våra PCR reaktioner. Det är ett tidskrävande arbete att rena fram de stammar som behövs för kontrollerna och det fanns det inte möjlighet till i detta arbete. Vid fortsatta studier inom projektet så bör detta göras.

Ett annat problem som uppstod under laborerandet, var att det många gånger var mycket liten mängd DNA som renades fram från munproverna. Metoden för provtagningen måste ses över och eventuellt behövs det hårdare borstar i fortsättningen än de som använts. Däremot bör nämnas att själva processen av att rena fram DNA är väsentligt lättare att utföra från munprover än det är från faecesprover. Ytterligare en negativ faktor med faecesproverna, förutom den mycket tidskrävande faktorn, är att det i faeces finns ämnen som kan störa PCR-reaktionerna. Därför måste faecestemat många gånger spädas innan PCR-reaktion kan utföras. Lyckas man utveckla munprovtagningen ytterligare så är detta att föredra som provtagningsmetod.

De helicobacterspecifika PCR-reaktioner som analyserats har alla visat på förekomst av *Helicobacter* spp i varierande mängd. Alla magsäcksbiopsierna förutom från undantaget hund nr P5, visade på förekomst av *Helicobacter* spp. Denna hund med symptom på gastrointestinal sjukdom, hade heller inte *Helicobacter* spp i saliv eller avföring, dock visade sig den vara antibiotikabehandlad före provtagningen. Endast 5 av de 17 hundarna rapporterades lida av gastrointestinala störningar. Även denna studie visar således att det finns *Helicobacter* spp i saliv och faeces hos friska hundar.

Biopsierna är endast några millimeter tjocka och därmed inte ett helt representativ provmaterial. Dessutom är det svårt att veta varifrån man ska ta sitt prov då det hos hund sällan ses förändrade områden vid gastrointestinala lidanden (Gunilla Trowald-Wigh, personligt meddelande). Lokalisationen för provtagning blir därför slumpmässig. Happonen et al (1995) fann att störst förekomst av *Helicobacter* spp fanns i magsäckens corpus- och fundusdel. Till föreliggande studie togs därför samtliga magsäcksbiopsier från corpusområdet. Trots slumpmässig lokalisering för provtagningen visade våra prover på stor helicobacterförekomst. Man kan då anta att det totalt sett i den gastrointestinala mucosan finns *Helicobacter* spp i riklig mängd. Optimalt vore om man kunde utveckla en fungerande in vivo provtagningsmetod där man borstar magslemhinnan för att få med så mycket material som möjligt och inte bara ett stickprov som man nu får vid biopsitagning.

Olika arter av *Helicobacter* spp rapporteras ha olika grad av patogenicitet (Neiger et al., 2000). En väl fungerande Multiplex-PCR med kapillärelektrofores, skulle möjliggöra typning av *Helicobacter* spp från ett stort antal friska hundar samt hundar som lider av gastrointestinala störningar. Eventuellt kan det finnas skillnad i vilka arter som finns hos friska hundar jämfört med sjuka. Fynden av *Helicobacter* spp hos friska hundar är ett viktigt argument mot att i nuläget sätta in antibiotikabehandling på hundar där man funnit *Helicobacter* spp vid patologanatometisk undersökning av biopsier.

Ytterligare studier skulle även kunna innefatta provtagning från djurägare för att se om djur och djurägare härbärger samma arter. Man kan misstänka att många av dessa har samma

arter som sina hundar utan att få symptom av det. De få fall som rapporterats om människor som insjuknat av "djur"-helicobacterbakterier kan ha samband med djurägarens immunstatus.

Sammanfattningsvis visar denna studie på att det finns ett behov av fortsatt arbete med utveckling av Multiplex-PCR då de flesta av hundarna i denna studie har förekomst av helicobacterbakterier både i mun och faeces. Det är av stor klinisk betydelse att kunna artbestämma *Helicobacter* spp från saliv, faeces och magsäck-tarm från ett stort antal hundar med gastrointestinal sjukdom samt från friska hundar.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Baele M, Van den Bulck K, Decostere A, Vandamme P, Hänninen ML, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2004. Multiplex PCR Assay for Differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1115-1122.
- Baele M, Vanechoutte M, Storms V, Butaye P, Devriese LA, Verschraegen G, Gillis M, Haesebrouck F. 2000. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4201-4207.
- Buczolits S, Hirt R, Rosengarten R, Busse HJ. 2003. PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa. *Veterinary Microbiology*, 95: 259-270.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2004. I: Ransom J, Foltin J, Holton B., *Medical Microbiology*, 23 upplaga. 179. USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Carter GR, Wise DJ, 2004. I: Carter GR., *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*, 6 upplaga. 158-159. Iowa: Iowa State Press/Blackwell Publishing.
- De Groote D, Haesebrouck F, Van Doorn LJ, 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 Groote D, Van Doorn LJ, Van den Bulck K, Vandamme P, Vieth M, Stolte M, Debongnie JC, Burette A, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2005. Detection of Non-pylori *Helicobacter* Species in " *Helicobacter heilmannii*" - Infected Humans. *Helicobacter* 10: 398-406.
- Dzierzanowska-Fangrat K, Lehours P, Megraud F, Dzierzanowska D. 2006. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 11: 6-13.
- Fermér C, Lindberg AV, Feinstein RE. 2002. Development and Use of a Simple Polymerase Chain Reaction Assay to Screen for *Helicobacter* spp. And *H. hepaticus* in Intestinal and Fecal Samples from Laboratory Mice. *Comparative Medicine* 52: 518-522.
- Haggerty TD, Perry S, Sanchez L, Perez-Perez G, Parsonnet J. 2005. Significance of Transiently Positive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Results in Detection of *Helicobacter pylori* in Stool Samples from Children. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2220-2223.
- Hahn M, Fennerty B, Corless CL, Magaret N, Lieberman DA, Faigel DO. 2000. Noninvasive tests as a substitute for histology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gastrointestinal Endoscopy* 52: 20-26.
- Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hänninen ML, Westermarck E. 1996. Occurrence and Topographical Mapping of Gastric *Helicobacter*-like Organisms and Their Association with Histological Changes in Apparently Healthy Dogs and Cats. *J. Vet. Med. A.* 43: 305-315.
- He Q, Wang JP, Osato M, Lachman LB. 2002. Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3720-3728.
- Hirschl AM, Makrathatis. 2005. Non-invasive *Helicobacter pylori* diagnosis: Stool or breath tests? *Digestive and Liver Disease* 37: 732-734.

- Johansson SK, Feinstein RE, Johansson KE, Lindberg AV. 2006. Occurrence of *Helicobacter* Species other than *H.hepaticus* in Laboratory Mice and Rats in Sweden. *Comparative Medicine* 56: 110-113.
- Kiesslich R, Goetz M, Burg J, Stolte M, Siegel E, Maeurer M, Thomas S, Strand D, Gall PR, Neurath MF. 2005. Diagnosing *Helicobacter pylori* In Vivo by Confocal Laser Endoscopy. *Gastroenterology* 128: 2119-2123.
- Lindell E. 2006. Kronisk Gastroenterit hos hund med avseende på histopatologisk bild och förekomst av *Helicobacter* spp. EEF-arbete, SLU.
- Manes G, Zanetti MV, Piccirillo MM, Lombardi G, Baizano A, Pieramico O. 2005. Accuracy of a new monoclonal stool antigen test in post-eradication assessment of *Helicobacter pylori* infection: Comparison with the polyclonal stool antigen test and urea breath test. *Digestive and Liver Disease* 37: 751-755.
- Neiger R, Simpson KW. 2000. *Helicobacter* Infection in Dogs and Cats: Facts and Fiction. *J Vet Intern Med* 14: 125-133.
- Ogata SK, Kawakami E, Patricio FRS, Pedrosa MZ, Santos AM. 2001. Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children and adolescents. *Sao Paulo Medical Journal* 119: 67-71.
- Prietsnall SL, Wiinberg B, Spohr A, Neuhaus B, Kuffer M, Wiedmann M, Simpson KW. 2004. Evaluation of "*Helicobacter heilmannii*" Subtypes in the Gastric Mucosae of Cats and Dogs. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2144-2151.
- Sharma BC, Bhasin DK, Pathak CM, Sinha SK, Ray P, Vaiphei K, Singh K. 1999. [14 C]- Urea breath test to confirm eradication of *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 14: 309-312
- Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, Driessen A, Debonzie JC, Burette A, Stolte M, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2005. Identification of Non-*Helicobacter pylori* Spiral Organisms in Gastric Samples from Humans, Dogs and Cats. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2256-2260.
- Wiinberg B, Spohr A, Dietz HH, Egelund T, Greiterwilke A, McDonough SP, Olsen J, Priestnall S, Chang YF, Simpson KW. 2005. Quantitative Analysis of Inflammatory and Immune Responses in Dogs with Gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. *Infection. J. Vet. Intern. Med.* 19: 4-14.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. 2002. I: Carter., *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 1 upplaga. 213-214. Oxford: Blackwell Science.

