

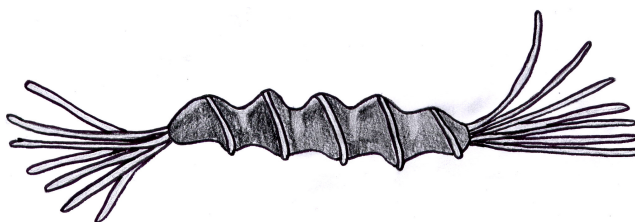
Förekomst av *Helicobacter* spp. hos hund

Samband med hepatit/pankreatit?

Linda Larnefeldt

**Handledare: Gunilla Trowald-Wigh
Institutionen för KM Smådjur**

**Biträdande handledare: Elisabet Ekman
BVF, avd. för patologi**



INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Abstract.....	1
Sammanfattning.....	2
Inledning	3
Allmänt om <i>Helicobacter</i>	3
Historik	3
Beskrivning av bakterien och dess patogenitetsmekanismer	4
<i>Helicobacter pylori</i> – patogenes hos människa	4
Sjukdomar i lever och pankreas hos människa och djur associerade med <i>Helicobacter</i>	6
<i>Helicobacter</i> hos hund	8
Hur påvisas <i>Helicobacter</i> ?	10
Antikroppar mot <i>Helicobacter</i> , människa – djur.....	12
Zoonosrisk	13
Det kliniska problemet: hepatit och pankreatit	13
Syfte med studien.....	14
Material och metoder	15
Prover.....	15
<i>Helicobacter</i> DNA i biopsier och avföring	16
Antikroppar mot <i>Helicobacter</i> i serum.....	18
Resultat.....	21
<i>Helicobacter</i> DNA i avföring.....	21
<i>Helicobacter</i> DNA i biopsier och vävnadsprover.	21
ELISA	22
Immunoblot.....	23
Diskussion.....	26
Tackord	28
Referenslista	29

ABSTRACT

To date, the genus *Helicobacter* consist of 26 different species and even more species are yet to be characterized. *Helicobacter* has been detected in connection with diseases in the liver and pancreas in humans and animals.

Helicobacter spp. are gram negative, curved, S-shaped or spiral shaped bacteria. They are microaerophilic and have flagella that make them motile. *Helicobacter*, present in the gastric mucosa neutralize the gastric acid through production of urease that hydrolyses urea to ammonia and bicarbonate. Ammonia has toxic effects on the gastric epithelium. The bacteria make way through the gastric mucus layer and adhere to epithelial cells in the gastric mucosal layer. The flagella and the urease are essential for enabling colonization. It is likely that it is strong resistance to bile that enables some species to colonize the liver.

The purpose of this study was to evaluate a possible association between hepatitis/pancreatitis and *Helicobacter* infection. Furthermore to find out if it is possible to measure antibodies against *Helicobacter* in dogs and if it is possible to use serology as a diagnostic method in dogs. The aim of the study was also to compare presence of *Helicobacter* spp. in faeces to serology in healthy dogs.

Tissue samples from healthy dogs and dogs with diagnosed pancreatitis/hepatitis, as well as stool samples from healthy dogs, were analysed by PCR regarding occurrence of *Helicobacter* DNA. Content of antibodies in serum from 51 healthy dogs was analysed by immunoblot and ELISA.

DNA from *Helicobacter* could not be detected in any of the tissue samples. DNA from *Helicobacter* was detected in all stool samples, in most samples *Helicobacter canis* and in some *Helicobacter. sp. flexispira*. Immunoblot and ELISA results points to overall very high antibody reactivity against *Helicobacter canis* and *Helicobacter bilis*.

Further work is needed to find out whether *Helicobacter* can cause hepatitis and pancreatitis in dogs and it is also important to improve the method for evaluation of antibodies against *Helicobacter* spp. in dogs.

SAMMANFATTNING

Idag finns det åtminstone 26 namngivna *Helicobacter*arter och ännu fler som ännu inte är namngivna. *Helicobacter* har påvisats i samband med sjukdomar i lever och pankreas på både människa och djur.

Helicobacter är gramnegativa, böjda, S-formade eller spiralformade bakterier. De är mikroaerofila och har flageller som gör dem rörliga. De arter som lever i magsäcken neutraliserar magsyran genom produktion av ureas som hydrolyserar urea till ammoniak och bikarbonat. Ammoniak är toxiskt för magslemhinnan. Bakterierna tar sig genom mukuslagret i magsäcken och adhererar till epitelceller på slemhinnan. Flagellerna och ureasen är essentiella för att kolonisation ska kunna ske. För arter som kan påvisas i levern är det troligen kraftig motståndskraft mot galla som möjliggör kolonisering av levern.

Syftet med detta arbete var att söka svar på om det hos hund finns ett samband mellan hepatit/pankreatit och *Helicobacter*infektion samt om det går att mäta antikroppar mot *Helicobacter* hos hund och om det är möjligt att nyttja antikroppsserologi som diagnostisk metod på hund. Arbetet syftade också till att ta reda på hur förekomsten av *Helicobacter* i tarmen ser ut och hur den speglas av antikroppssvaret.

Vävnadsprov från friska hundar och hundar med diagnosticerad pankreatit/hepatit och avföringsprov från kliniskt friska hundar analyserades med PCR avseende innehåll av *Helicobacter* DNA. Förekomst av antikroppar i serum från 51 friska hundar analyserades med immunoblot och ELISA.

DNA från *Helicobacter* kunde inte påvisas i något av vävnadsproverna. DNA från *Helicobacter* hittades i samtliga avföringsprover, i de flesta proverna fanns *Helicobacter canis* och i några *Helicobacter sp. flexispira*. Immunoblot och ELISA resultaten tyder på överlag väldigt hög antikropsreaktivitet mot *Helicobacter canis* och *Helicobacter bilis*.

Det behövs ytterligare studier för att ta reda på om *Helicobacter* kan orsaka hepatit/pankreatit på hund, samma sak gäller frågeställningarna angående antikroppar på hund.

INLEDNING

Allmänt om *Helicobacter*

Det finns två grundläggande typer av *Helicobacter*, gastriska som koloniserar magsäcken och enteriska som främst koloniserar bakre delen av tarmen men även gallgångar och lever (Nilsson, H.-O., 2004). Gastriska arter är ureaspositiva medan enteriska ofta är ureasnegativa.

På grund av kraftiga morfologiska likheter mellan många arter av *Helicobacter* som ännu ej namngivits används begreppet Gastric Helicobacter Like Organisms (GHLO) det vill säga *Helicobacter* liknande bakterier som påvisas i magsäcken (Vajner et al., 2000).

Hur smittspridning av *Helicobacter* sker är oklart. En hypotes är fekal-oral smittväg, *Helicobacter*arter har ju kunnat påvisas i avföring (Dunn et al., 1997; Fox et al., 1996c). En annan teori är oral-oral smittväg. *Helicobacter pylori* kan påvisas i saliven på infekterade människor (Dunn et al., 1997) och har påvisats i munhålan på experimentellt infekterade hundar. Detta berodde ej på kontamination vid endoskopering eftersom prov togs innan dess och inte heller på kräkning då bakterierna kunde påvisas även efter 24 veckor (Rossi et al., 1999). Vattenburen infektion skulle kunna vara en viktig smittväg eftersom *H. pylori* har isolerats från ytvatten i USA och Sverige (Hegarty et al., 1999; Hulten et al., 1998). *Helicobacter salomonis* kan överföras från tiken till valparna under laktationsperioden (Hänninen et al., 1998).

Historik

Att man kan hitta spiralformade bakterier i djurs magsäckar har varit känt i mer än ett århundrade. *H. pylori* identifierades för första gången i magsäcksbiopsier från människa 1983 (Warren och Marshall, 1983). Bakterien (tillsammans med flera andra *Helicobacter*arter) antogs till en början tillhöra genus *Campylobacter*. Sedan dess har man kommit fram till att det finns ett samband mellan infektion med *H. pylori* och kronisk ytlig gastrit hos alla infekterade människor och att bakterien kan orsaka magsår. Den är också en bidragande orsak till magsäckskarcinom (Parsonnet et al., 1991) och lymfom i magsäcken (Wotherspoon et al., 1991). Stora spiralformade GHLO påvisades i magsäcksmukosan på människa en kort tid efter upptäckten av *H. pylori*. Bakterien fick det provisoriska namnet "*Gastrospirillum hominis*" (McNulty et al., 1989).

Denna art har senare efter 16S rDNA sekvensering fått namnet *Helicobacter heilmannii* (Solnick et al., 1994). Fortsättningsvis kommer det senare namnet att användas när denna bakterie åsyftas.

Den första stora GHLO som kunde odlas fram var *Helicobacter felis*, bakterien fick sitt namn eftersom den isolerades första gången från en katts magsäck (Lee et al., 1988).

En grupp bakterier som ursprungligen isolerades från aborterade fårfoster (Kirkbride et al., 1985) fick det provisoriska namnet "*Flexispira rappini*" (Bryner et al., 1987; Hänninen et al., 2005). Senare visades dessa bakterier tillhöra genus *Helicobacter* (Dewhirst et al., 2000). Flexispiragruppen inkluderar *Helicobacter bilis* (Fox et al., 1995), *Helicobacter trogontum* (Mendes et al., 1996), *Helicobacter muridarum* (Lee et al., 1992), *Helicobacter aurati* (Patterson et al., 2000) och flera ännu ej namngivna taxa som fått de provisoriska namnen *Helicobacter sp. flexispira* taxa 1-8 och 10 (Dewhirst et al., 2000). Hänninen et al.

(2005) visade att *H. sp. flexispira* taxa 2, 3, 8, vissa flexispirastammar hos hund och katt samt *H. bilis* utgör en art.

Man har på senare år identifierat ett förhållandevis stort antal nya *Helicobacter*arter. Idag finns det åtminstone 26 namngivna arter. Ännu fler bakteriearter med karakteristiska typiska för *Helicobacter* har beskrivits men alla är inte namngivna (Whary et al., 2004).

Beskrivning av bakterien och dess patogenitetsmekanismer

Helicobacter är gramnegativa, böjda, S-formade eller spiralformade bakterier, som i vissa fall kan anta en kockoid form. De är mikroaerofila, rörliga (har flageller som de tar sig fram med) och de flesta är katalaspositiva.

Här följer en mer ingående beskrivning av utseendet hos några av de *Helicobacter*arter som har påvisats hos hund. *H. felis* har sparsamt fördelade periplasmära fibrer, enstaka eller i grupper om 2, 3 eller 4, på kammen (kristan) av den spiralformade kroppen. *Helicobacter bizzozeronii* saknar periplasmära fibrer (Hänninen et al., 1996). *H. salomonis* har en kortare och tjockare cellkropp (Jalava et al., 1997). *H. sp. flexispira* är omvirad med periplasmära fibrer som ser ut att täcka hela ytan (Eaton et al., 1996). Stora spiralformade organismer som saknar periplasmära fibrer eller har en liten fiber i dalen på den spiralformade cellkroppen är kanske de vanligaste GHLO hos hundar (Norris et al., 1999). *H. heilmannii* tillhör denna grupp och saknar periplasmära fibrer, har upp till 14 uni- eller bipolära flageller och 3-8 spirallingar (Stoffel et al., 2000). De ovanstående arterna är alla stora ($0,5 \times 5-10 \mu\text{m}$) spiralformade organismer. *H. pylori* är mycket mindre ($0,5 \times 1,5-3 \mu\text{m}$) och böjda eller S-formade (Neiger och Simpson, 2000). *H. pylori* kan också anta en kockoid form (Bode et al., 1993a).

De arter som lever i magsäcken neutraliserar magsyran genom sin produktion av ureas som sker på bakterieytan och i cytoplasman. Ureas hydrolyserar urea till ammoniak och bikarbonat. Ammoniak är toxiskt för magslemhinnan. Bakterierna tar sig genom mukuslagret i magsäcken och adhererar till epitelceller på slemhinnan. Flagellerna och ureasen är essentiella för att kolonisation ska kunna ske.

För arter som kan påvisas i levern (*Helicobacter hepaticus*, *H. bilis*, *Helicobacter canis* och *Helicobacter pullorum*) är det troligen kraftig motståndskraft mot galla som möjliggör kolonisering av levern (Fox et al., 1995; Stanley et al., 1993; Stanley et al., 1994).

I en studie på hund har man kommit fram till att ammoniak stimulerar basal sekretion av pankreaszymer, troligen via den ökade frisättningen av gastrin. Samtidigt har ammoniak dock också en inhiberande verkan på sekretionen detta sker via direkt verkan på pankreas acini (Jaworek et al., 2000).

***Helicobacter pylori* – patogenes hos människa**

Det speciella med *H. pylori* är att bakterien kan kolonisera magsäcken trots dess låga pH. Före upptäckten av *Helicobacter* trodde man inte att bakterier kunde leva och föröka sig i en sådan miljö. Bakterierna är ofta ojämnt fördelade i magsäckens mukosa (Bayerdorffer et al., 1989).

Virulensfaktorer

Framkallande av inflammation i magsäcken

- Interleukin-8 (IL-8) är en potent inflammationsmediator som drar till sig och aktiverar neutrofiler. *H. pylori* kan framkalla utsöndring av IL-8 från epitelceller i magsäcken (Sharma et al., 1995).
- Ett *H. pylori* protein ökar neutrofilernas adhesion till endotelceller (Evans et al., 1995).
- *H. pylori* producerar ureas på bakterieytan (Bode et al., 1993b; Dunn et al., 1990) men en viss produktion sker också i cytoplasman (Bode et al., 1993b; Phadnis et al., 1996). Ureas stimulerar aktiveringen av mononukleära fagocyter och inflammatorisk cytokinproduktion (Harris et al., 1996).
- *H. pylori* framkallar inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) i makrofager in vitro (Wilson et al., 1996). iNOS syntetiserar kvävedioxid som i sin tur är en bidragande orsak till allmän immunologisk aktivering (Dunn et al., 1997). Man har även visat att om man har behandlat bort *H. pylori* reduceras iNOS i magsäcksepitelceller (Manick et al., 1996).
- *H. pylori*s lipopolysackarider har en låg proinflammatorisk aktivitet (Muotiala, 1992).
- "Platelet Activating Factor (PAF) är en fosfolipidmediator som är ett potent sårframkallande ämne. PAF stimulerar magsyrasekretion via specifika parietalcellreceptorer. Lyso-PAF produceras normalt av mukosaceller i magsäcken som svar på gastrin. *H. pylori* kan metabolisera prekursorerna lyso-PAF till PAF (Sobhani et al., 1996).

Skadlig verkan på magsäckens mukosabariär

- *H. pylori* producerar fosfolipas som skadar slemhinnan genom att bryta ner fosfolipider i membranet.
- Toxinet Vac A orsakar vakuolisering av slemhinnans epitel och celledöd. Ungefär hälften av *H. pylori* stammarna producerar detta toxin in vitro (Leunk et al., 1988).
- Ammoniak som produceras av ureas är toxiskt för magsäckens epitelceller (Smoot et al., 1990).
- Lipopolysackarider producerade av *H. pylori* stör magsäckens mukuslager genom att påverka samspelet mellan mucin och dess mukosareceptorer (Dunn et al., 1997).
- *H. pylori* inducerar syntes av "Reactive Oxygen Metabolites" (ROS) i magsäcksmukosan. Det finns ett positivt samband mellan mängden ROS, infektionsmängden av *H. pylori* och skada i magsäcksmukosan (Davies et al., 1994).
- *H. pylori* förefaller framkalla apoptos av epitelceller i magsäcken (Manick et al., 1996; Moss et al., 1996) och orsaka DNA-skada, inducerad av fria syreradikaler i infekterad magsäcksmukosa (Baik et al., 1996).

Förändring av magsäckens fysiologi

H. pylori minskar sekretionen av det syrainhiberande hormonet somatostatin och ökar sekretionen av det syrastimulerande hormonet gastrin (Calam, 1995).

Kolonisationsfaktorer

- Rörlighet är en essentiell kolonisationsfaktor. Normalt har *H. pylori* två till sex polära, flageller som gör bakterierna rörliga. Dessa behövs för att bakterierna ska kunna ta sig igenom mukuslagret innan de adhererar till slemhinnan.
- Ureas är också essentiellt för kolonisation. Ureas hydrolyserar urea till ammoniak och bikarbonat så att pH neutraliseras.
- *H. pylori* adhererar till receptorer i magsäckens epitel med hjälp av specifika adhesiner.
- Katalas och superoxid dismutas produceras av *H. pylori*. Enzymerna kan eventuellt förhindra att neutrofiler fagocyterar och avdödar bakterierna (Dunn et al., 1997).

Påverkan på pankreas

Via ammoniak, lipopolysackarider, aktivering av leukocyter och frisättning av proinflammatoriska cytokiner skulle *H. pylori* teoretiskt kunna påverka pankreas fysiologi och påverka sjukdomsförloppet vid sjukdomar i exokrina pankreas (Manes et al., 2003). Ammoniak stimulerar basal sekretion av pankreasenzymer troligen via den ökade frisättningen av gastrin men inhiberar stimulerad sekretion troligen via en direkt verkan på pankreas acini (Jaworek et al., 2000).

Exokrin pankreassekretion inhiberas av somatostatin (Domschke et al., 1977; Hanssen et al., 1977) vars sekretion ju inhiberas av *H. pylori*. Detta ger att *H. pylori* indirekt stimulerar exokrin pankreassekretion. Den ökade syrahalten i duodenum kan stimulera pankreassekretion genom frisättning av sekretin (Hamlet och Olbe, 1996). Savarino et al. (2000) har dock visat att magsäckens pH-variationer hos patienter med kronisk pankreatit inte skiljer sig från mönstret hos normala individer.

Sjukdomar i lever och pankreas hos människa och djur associerade med *Helicobacter*

På senare år har olika *Helicobacter*arter hittats i levern och pankreas hos människor och djur, med olika grader och former av sjukdomstillstånd i dessa organ. Det behövs ytterligare studier för att utreda om *Helicobacter*arter kan vara orsak till dessa sjukdomar eller inte.

H. pullorum har isolerats från levern på kycklingar med hepatit (Stanley et al., 1994). *Helicobacter cinaedi* har isolerats från levern på en rhesusapa med hepatit (Fox et al., 2001). Det har visats att *H. bilis* infekterar levern hos gnagare och närvaron av bakterien har varit förenad med hepatit och leverneoplasi (Fox et al., 1995). Shomer et al. (2001) visade att experimentell infektion med en ny ureasnegativ *Helicobacter*art kan orsaka bland annat hepatisk flebotrombos, hepatit och kolangiohepatit på möss. *H. sp. flexispira* har isolerats från två aborterade lamm med fokal levernekros (Dewhirst et al., 2000; Kirkbride et al., 1985). En *Helicobacter*art har via PCR påvisats i levern på flera illrar med kronisk

kolangiohepatit med cellulär proliferation (från hyperplasi till neoplas). Illrarna var inte besläktade men levde i samma miljö (Garcia et al., 2002).

H. hepaticus är en ny Helicobacterart som infekterar levern hos möss. Bakterien har visats ha samband med kronisk hepatit och levertumörer (Fox et al., 1994; Ward et al., 1994). Kronisk infektion med bakterien har visats påskynda utvecklingen av levertumörer, öka antalet tumörer samt påskynda utveckling från benigna till maligna tumörer (Diwan et al., 1997). När Ihrig et al. (1999) inokulerade möss med *H. hepaticus* kunde de visa att det finns en genetisk disposition för mottaglighet för Helicobacterinducerad leversjukdom. Bakterien orsakar en multifokal leverskada med fokal nekros, fokal nonprulent inflammation, fokal kolangit och vaskulit som ledde till gallgångshyperplasi, hepatomegali, hepatocellulär proliferation och på gamla möss hepatom eller hepatocellulärt karcinom (Fox et al., 1996a; Ward et al., 1994). Bakterierna fanns vanligtvis i gallgångarna. Både vid naturlig och experimentell infektion var sjukdomsförloppet långsamt och smygande (Ward et al., 1994).

Från gallblåsan på hamstrar med kolangiofibros och centrilobulär pankreatit har *Helicobacter cholecystus* isolerats (Franklin et al., 1996). *Helicobacter marmotae* har identifierats från levern på skogsmurmeldjur. Flera av skogsmurmeldjuren hade hepatocellulärt karcinom (HCC) som är associerat med hepatitvirusinfektion (Fox et al., 2002).

De senaste åren har det kommit ökade bevis för att infektion med *H. pylori* kan påverka pankreas (Manes et al., 2003). Infektion med *H. pylori* på råttor gör ischemiinducerad pankreatit allvarligare och förvärrar störningar i pankreas mikrocirkulation vid akut pankreatit (Warzecha et al., 2002).

Undersökningsresultat indikerar att Helicobacterarter kan finnas i levern på humanpatienter med primärt leverkarcinom men deras eventuella roll i karcinogenesen, även om den är trolig, bevisades inte i studien (Avenaud et al., 2000). *H. pylori* och andra Helicobacterarter har även senare med PCR påvisats i levern på humanpatienter med kolangiokarcinom och hepatocellulärt karcinom (Nilsson, H.-O. et al., 2001).

Med hjälp av PCR kunde Helicobacterarter (*H. bilis*, *H. sp. flexispira* respektive *H. pullorum*) påvisas i 13 av 23 gallprover och 9 av 23 gallblåsvävnadsprover från humanpatienter med kronisk kolekystit. Detta stödjer teorin om ett samband mellan gallresistenta Helicobacterarter och gallblåsesjukdom (Fox et al., 1998).

I en studie av Murata et al. (2004) påvisades *H. bilis* hos 4 av 14 humanpatienter med gallgångscancer. Författarna drog slutsatsen att *H. bilis* infektion kan spela en roll vid gallgångscancer. I en annan studie påvisades *H. bilis* med PCR i en signifikant högre incidens i galla från humanpatienter med gallgångs och gallblåsecancer än från patienter med gallsten/kolekystit eller pankreassjukdomar. Det antogs att *H. bilis* infektion i gallan kan påverka risken för cancer i gallgångar och gallblåsa (Matsukura et al., 2002).

Silva et al. (2003) fann genom resultaten i sin studie stöd för hypotesen att *Helicobacter* är associerad med patogenesen av human kolelitiasis (gallstenslidande) och kolekystit. DNA från *Helicobacter* kan påvisas med PCR i gallan hos humanpatienter med gallgångssjukdomar (Roe et al., 1999).

H. pylori har visats vara associerad med bland annat primär skleroserande kolangit, primär gallgångscirros, autoimmun hepatit och hepatit C virus relaterad leversjukdom som triggar autoimmuna följsjukdomar. Gensekvenser från Helicobacterarter och *H. pylori* påvisades i human levervävnad med PCR och DNA sekvensering hos patienter med kolestatisk leversjukdom (primär

skleroserande kolangit och gallgångscirros), men var sällsynta vid icke kolestatisk levercirros (Nilsson, H.-O. et al., 1999). Primär gallgångscirros karakteriseras av en immunologisk process mot gallgångsepitel. Dohmen et al. (2002) visade att *H. pylori* infektion kan inducera autoimmunt svar i utvecklingen av primär gallgångscirros. Påvisande av *Helicobacter*arter var i en studie signifikant vanligare hos patienter med kolestatisk sjukdom (primär skleroserande kolangit eller primär gallgångscirros) än hos patienter med andra sjukdomar och friska personer (Nilsson, H.-O. et al., 2000). Prevalensen av serumantikroppar mot *H. pullorum*, *H. bilis* och *H. hepaticus* var signifikant högre hos patienter med autoimmuna kroniska leversjukdomar (primär skleroserande kolangit och autoimmun hepatit) än hos friska personer (Nilsson, I. et al., 2003). Kronisk hepatit kan utvecklas till cirros och hepatocellulärt karcinom. Dore et al. (2002) konfirmerar i sin studie närvaron av *H. pylori* i human lever. Deras resultat pekar dessutom mot ett samband mellan *Helicobacter* spp. och hepatit C virus relaterad kronisk leversjukdom. Autoimmun pankreatit förekommer i nästan 60 % av fallen samtidigt som de andra autoimmuna sjukdomarna ovan. *Helicobacter* antas inducera autoimmunitet och apoptos (Kountouras et al., 2005).

*Helicobacter*arter har påvisats i pankreas hos humanpatienter med pankreaskancer (Nilsson, H.-O. et al., 2002). Dock har man i studier kommit till slutsatsen att *H. pylori* inte är mer prevalent vid kronisk pankreatit än hos den övriga populationen (Manes et al., 1998; Savarino et al., 2000). Detta stämmer överens med resultatet av en studie som syftade till att ta reda på om humanpatienter med kronisk pankreatit hade *H. pylori* i pankreasvätskan. Inga *H. pylori* ureas-C gener kunde detekteras i pankreasvätskan. Författarna påpekade dock att det är möjligt att infektion med andra *Helicobacter*arter förekommer vid kronisk pankreatit (Di Campli et al., 2000).

Helicobacter hos hund

***Helicobacter*infektion hos hund**

GHLO har visats vara vanliga (nästan allmänt förekommande) på både till synes friska hundar och hundar med gastrointestinal sjukdom (Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1998; Hermanns et al., 1995; Strauss-Ayali, 1999). Däremot kan *Helicobacter*arter endast isoleras genom odling hos en minoritet av hundarna. Utifrån det kan slutsatsen dras att majoriteten av hundarnas GHLO inte är odlingsbara med konventionella metoder (Buczolits et al., 2003; Cattoli et al., 1999).

De flesta GHLO som hittas på hund är stora spiralformade organismer ($0,5 \times 5-10 \mu\text{m}$) och kan inte särskiljas med hjälp av ljusmikroskopering (Neiger och Simpson, 2000).

GHLO har hittats i hundars magsäckar i eller under mukos på ytan i foveolae gastricae, körtlar och parietalcellscanaliculi (Eaton et al. 1996; Henry et al., 1987; Yamasaki et al., 1998). Henry et al. (1987) hittade bakterierna i störst antal i kardia och området vid fundus-pylorusövergången. De morfologiska förändringar som sågs i hundarnas magsäckar var lymforetikulär hyperplasi, dilatation av parietalcellscanaliculi och degeneration av individuella parietalceller (Henry et al., 1987). Eaton et al. (1996) påvisade bakterierna i kardia, fundus och de främre regionerna av magsäcken. Från vissa av hundarnas magsäckar lyckades de odla fram specifika *Helicobacter*arter, bland annat *H. felis* och *H. bilis*.

Kliniskt friska hundar hade en högre prevalens av GHLO än sjuka hundar i en studie av Yamasaki et al. (1998). Neiger och Simpson (2000) trodde att det kunde bero på att de sjuka hundarna nyligen behandlats med antibiotika eller att de hade ett väldigt aktivt immunförsvar.

Hundarnas levnadsförhållanden kan vara en faktor av betydelse med tanke på att en högre prevalens av GHLO kan ses hos hundar som lever exempelvis på en kennel än hos hundar som är husdjur (Eaton et al., 1996).

Gnotobiotiska hundar som experimentellt infekterats med *H. pylori* var persistent infekterade i magsäckens mukosa åtminstone 1 månad. Det visades också att *H. pylori* kan överföras via kontakt mellan hundar (oralt-oralt eller fekalt-oralt) (Radin et al 1990).

I en studie fann man *H. felis* på mukosaytan, i foveolae gastricae och i körtelepitelceller (Hazirolu et al., 1995). I en annan studie påvisades *H. felis* magsäcksmukos intill eller ovanpå de inflammerade områdena. Ibland kunde bakterierna dock ses i parietalcellernas canaliculi (Lee et al., 1992).

Det förekommer saminfektioner med flera *Helicobacter*arter på hundar (Happonen et al., 1996b; Jalava et al., 1998). Å andra sidan har *H. salomonis* infektion hos valpar experimentellt kunnat undertryckas med *H. bizzozeronii* (Hänninen et al., 1998).

Att *H. canis* kan påvisas i avföring, är galltolerant och saknar ureasaktivitet visar att bakterien koloniserar tarmen och inte magsäcken (Stanley et al., 1993). När *H. canis* påvisades i levern på en hundvalp med hepatit fanns bakterierna i utkanten av leverlesionen och verkade vara lokaliserade i gallgångarna (Fox et al., 1996b).

Förekomst av *Helicobacter* hos hund, olika arter

Ett flertal arter av *Helicobacter* har hittills påvisats på hund.

H. felis har av Paster et al. (1991) visats vara en ny art, arten hade isolerats från magsäcken på hundar och katter. Denna art har sedan isolerats från magsäcken på hundar vid ett flertal tillfällen (Cattoli et al., 1999; Eaton et al 1996; Hazirolu et al., 1995).

H. bizzozeronii isolerades som en ny art för första gången från magsäcksbiopsier på hund av Hänninen et al. (1996). Sedan har *H. bizzozeronii* isolerats vid fler tillfällen (Cattoli et al., 1999; Happonen et al., 1998; Jalava et al., 1998).

H. salomonis isolerades som en ny art för första gången av Jalava et al. (1997) i magsäcken på hundar. Bakterien har också isolerats senare (Happonen et al., 1998; Jalava et al., 1998,).

H. heilmannii har isolerats från hundars magsäckar (Happonen et al., 1996b; Priestnall et al., 2004; Thomson et al., 1994).

H. sp. flexispira är en grupp *Helicobacter* som har isolerats från hundars magsäcksmukosa (Jalava et al, 1998). Bakterierna har också isolerats från hundavföring (Misawa et al., 2002). *H. bilis*, en art ingående i denna grupp, har isolerats av Eaton et al (1996) från magsäcken på hundar.

H. pylori isolerades för första gången på hund av Buczolits et al. (2003).

H. canis har isolerats från hundavföring (Stanley et al., 1994). *H. canis* har också isolerats från hundlever (Fox et al., 1996b). *H. cinaedi* har isolerats från hundavföring vid flera tillfällen (Kiehlbauch et al., 1995; Misawa et al., 2002).

Sjukdom hos hund på grund av *Helicobacter*

Helicobacter har påvisats hos hundar med flera olika sjukdomar men när det gäller flertalet av dessa har det hittills inte kunnat fastställas huruvida bakterien är orsak till dessa tillstånd eller inte. *Helicobacter* kan ju också påvisas hos många helt friska individer.

H. canis har kunnat isoleras från en hundlever med multifokal nekrotiserande hepatit. Det är troligt men inte bevisat att valpen hade smittats in utero (Fox et al, 1996b). Arten har också isolerats från avföring hos hundar med diarré men även från friska hundar (Stanley et al, 1994).

Hos hundar infekterade med *Helicobacter* är det vanligt att mild gastrit med lymfocyter och plasmaceller ses (Happonen et al., 1996b; Eaton et al., 1996). Eaton et al. (1996) ansåg utifrån sin studie att det är möjligt att GHLO kan leda till gastrit hos vissa individer eller att vissa bakteriearter leder till gastrit. De ansåg dock att det är troligt att inte ens stora mängder GHLO är kliniskt signifikanta hos friska hundar utan underliggande sjukdom. Henry et al (1987) ansåg det vara troligt att GHLO ingår i normalfloran i hundmagsäckar eftersom bakterierna i deras studie var så vanliga hos friska hundar.

Infektion med *H. felis* är enligt Lee et al. (1992) en trolig orsak till lymfocellulär gastrit. Gastrit associerad med *H. felis* har hittats hos hund (Hazirolu et al., 1995). Peyrol et al. (1998) visade att adherens av *H. felis* liknande bakterier till epitelceller och intracellulär penetration kunde orsaka fokal nekros och körtelatrofi. På Specific Pathogen Free (SPF) hundar som experimentellt infekterats med *H. felis* kunde dock inga patologiska förändringar av betydelse påvisas (Simpson et al., 1999).

H. heilmannii har orsakat gastrit på hund (Thomson et al., 1994).

Hundar som experimentellt infekterats med *H. pylori* utvecklade kronisk, aktiv gastrit (Radin et al 1990). I en studie på beaglehundar av Rossi et al. (1999) orsakade experimentellt inducerad infektion med *H. pylori* både akuta symtom (kräkningar och diarré i 1-2 veckor) och kronisk gastrit.

Peyrol et al (1998) fann att *H. bizzozeronii* liknande bakterier verkade vara ickepatogena på beaglehundar. Däremot så visade de att adherens av bakterier liknande *H. felis* till epitelceller och intracellulär penetration kunde orsaka fokal nekros och körtelatrofi.

Vajner et al. (2000) kom fram till att sår i magsäcksslemhinnan blev allvarligare ju djupare i magsäcksslemhinnan mikroberna var lokaliserade. I motsats till Peyrol et al (1998) ansåg han dock inte att bakteriens art hade betydelse.

Happonen et al. (1996b) kunde i sin studie inte visa på något statistiskt signifikant samband mellan GHLO och inflammationsparametrar. Inte heller Hermanns et al (1995) kunde med säkerhet fastställa att bakterierna var orsak till de histopatologiska förändringar som de hittade på hundarna i sin studie.

Hur påvisas *Helicobacter*?

Prevalensen av GHLO hos hundar är beroende av teknikerna som används för att påvisa bakterierna. I studier som använder flera diagnostiska tester eller inkluderar en analysmetod med hög sensitivitet som exempelvis PCR kan en högre prevalens ses (Neiger och Simpson, 2000; Eaton et al., 1996; Happonen 1998).

Invasiva tester

Invasiva tester kräver biopsitagning eller vävnadsprov. Vid biopsitagning från magsäck är det viktigt att djuren fastas innan för att minska antalet kontaminerande organismer (Jalava et al., 1998).

Odling

Helicobacter spp. är svårodlade men ett antal olika arter kan odlas fram om rätt isoleringsmetoder används (Jalava et al., 1998). Odling har två huvudsakliga fördelar, möjliggör kontroll av behandlingsresistens och de erhållna isolaten kan karakteriseras i detalj (Dunn et al., 1997). Taxonomisk klassifiering kan grunda sig på odling med konventionella fenotypiska analyser (Jalava et al., 1998) eller PCR (se nedan) (Neiger och Simpson, 2000).

Touch cytologi

Touch cytologi med Gram eller Diff Quik (Dade, Düringen, Schweiz) färgning är ett enkelt, snabbt och sensitivt test för påvisning av GHLO (Happonen et al., 1998; Neiger och Simpson 2000).

Transmissionselektronmikroskopi

Elektronmikroskopi har använts för att skilja på *Helicobacter*arter med hjälp av typiska morfologiska kriterier (Eaton et al., 1996; Hänninen et al., 1996 och Peyrol et al., 1998). Detta är (om används ensamt) inte ett helt säkert sätt att särskilja olika arter (Neiger och Simpson, 2000) eftersom bakteriemorfologin varierar in vivo och in vitro (Eaton et al., 1996 och Jalava et al., 1998).

Snabbureastest

Nästan alla gastriska *Helicobacter*arter producerar ureas (Happonen et al., 1996a). När snabbureastest genomförs inkuberas biopsimaterial i ureabuljong innehållande fenolrött som pH-indikator. När urea bryts ner till ammoniak stiger pH och en färgförändring sker. Diagnos hos djur fås normalt inom 1-3 timmar (Neiger och Simpson, 2000).

Histopatologi

När man gör histopatologisk undersökning kontrollerar man om det går att se *Helicobacter* bakterier i biopsimaterialet. Flera biopsier från olika delar krävs eftersom bakterierna kan vara väldigt ojämnt fördelade (Neiger och Simpson, 2000).

Man kan använda sig av specialfärgningar som silverfärgning -Warthin-Starry (Eaton et al., 1996), Giemsa (Hermanns et al., 1995) eller toluidinblått (Happonen et al., 1996b) för att göra bakterierna synligare. En sensitiv färgningsteknik som kombinerar H & E, Steiner silverfärg och alcian blue har utvecklats (Genta et al., 1994).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Det finns idag möjlighet att med hjälp av PCR identifiera ett stort antal *Helicobacter*arter (Eaton et al., 1996; Strauss Ayali et al., 1999b). Taxonomisk klassifiering grundar sig huvudsakligen på 16SrRNA och 23S rRNA sekvensen samt DNA hybridisering (Neiger och Simpson, 2000; Jalava et al., 1999). I en

nyligen genomförd studie identifierades bland annat proteiner specifika för *H. bilis* och *H. hepaticus*. Primers designade från dessa gener kan användas vid PCR-identifikation som är simultan och specifik för arterna (Feng et al., 2005).

16S rRNA gensekvensanalys fungerar inte för artidentifiering när det gäller vissa *Helicobacter*arter (Hänninen et al., 2005; Jalava et al., 1998). Exempelvis så har *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. heilmannii* och *H. salomonis* 16S rDNA-sekvenser som kan vara mer än 98 % lika (Jalava et al., 1997).

En ny specifik och känslig 16S rDNA-baserad PCR analys har utvecklats. Metoden baseras på amplifiering av ett fragment på 78-baspar (primers valdes från regioner på den 16S rRNA-kodande genen, som har det aktuella fragmentet som mål) som är unikt för *H. bizzozeronii*, *H. felis* och *H. salomonis*. Analysmetoden fungerar på biopsier som infrusits i färskt skick och formalinfixerade paraffinbäddade magsäcksbiopsier. Inte heller denna metod kan särskilja de tre arterna (De Groot et al., 2001).

Icke invasiva tester

Urea andningstest och blodtest

Vid ureatest av utandningsluft och blod används urea märkt med isotopiskt stabil ^{13}C eller radioaktiv ^{14}C . Ureas som producerats av *Helicobacter* klyver peroralt intagna märkta ureamolekyler till ammoniak. De frigjorda, märkta kolatomerna absorberas till blodet och följer med utandningsluften. Utandningsluften samlas upp och analyseras. Det är också möjligt att analysera blodprov avseende kolatomer (Dunn et al., 1997).

Detektion av antikroppar

Serologiska tester är snabba och lätta att utföra och kan automatiseras (Nilsson, I. et al., 1997). Antikroppsreaktivitet mot *Helicobacter* kan mätas med serologi såsom Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eller immunoblot. Serologi som analysmetod på hund kompliceras av att hundar kan vara infekterade med flera olika *Helicobacter*arter samtidigt (Jalava et al., 1998). Strauss-Ayali et al (1999) anser att en kombination av serologiska metoder (immunoblot och ELISA) för diagnos av infektion med gastriska *Helicobacter* verkar lovande. Kombinationen är en väldigt specifik och måttligt sensitiv indikator på infektion. När man startar upp en ny ELISA eller immunoblot analys behövs serumprov från sant positiva och negativa fall för att man ska kunna definiera brytpunktsvärden och specificitet (Kornilovska et al., 2002).

Jalava et al. (1998) rekommenderar SDS-PAGE (en form av elektrofores som används för att separera extraherade ytproteiner) för artidentifiering av gastriska *Helicobacter*arter.

Antikroppar mot *Helicobacter*, människa – djur

Antikroppsreaktiviteten mot *Helicobacter* spp. kan som tidigare nämnts mätas med ELISA eller immunoblot. Det har visats att flera olika *Helicobacter*arter kan ge upphov till antikroppssvar. Två veckor efter infektion hade fem infekterade hundar detekterbara IgM och IgG serum antikroppar mot *H. felis* (Lee et al., 1992). Serokonvertering kunde också påvisas på SPF-hundar som experimentellt infekterats med *H. felis* (Simpson et al., 1999).

Hos hundar som experimentellt infekterats med *H. pylori* kunde specifika IgG-titrar uppmätas med hjälp av ELISA (Radin et al., 1990; Rossi et al., 1999). *H. hepaticus* ger kraftigt förhöjda antikroppstitrar på möss (Ward et al., 1994). Det har visats att prevalensen av serumantikroppar mot *H. pullorum*, *H. bilis* och *H. hepaticus* var signifikant högre hos humanpatienter med autoimmuna kroniska leversjukdomar än hos friska personer (Nilsson, I. et al., 2003).

Zoonosrisk

Thomson et al. (1994) visade att *H. heilmannii* överförts från en sällskapshund till en 12-årig flicka. Bakterien orsakade behandlingsbar gastrisk sjukdom hos dem båda.

I en studie visade Stolte et al. (1994) att en majoritet av patienter infekterade med *H. heilmannii* hade haft kontakt med djur. Författarna ansåg att detta indikerade att *H. heilmannii* överförs till människa från djur. Meining et al (1998) visade i enkätbaserad studie på ett signifikant samband mellan *H. heilmannii* infektion på människa och kontakt med hundar, katter eller grisar. Deras slutsats var att grisar, katter och hundar verkar vara reservoarer vid transmission av *H. heilmannii*. I en annan studie fann man en hög prevalens av *H. heilmannii* infektion med samtidig gastrit hos människor. Det fanns statistiskt signifikanta skillnader mellan människor boende på landet respektive i stadsmiljö. Prevalensen var högst på landet. Författarna ansåg att detta skulle kunna bero på överföring av infektionen från djur, eftersom kontakt mellan människor och djur är vanligare i byar än städer. (Svec et al., 2000) I en studie var hundarna infekterade med stammar av *H. heilmannii* som skiljer sig från dem som infekterar människa och svin, författarna ansåg det därför troligt att risken för överföring av infektion från hund till människa är liten (Priestnall et al. 2004).

Kliniskt friska hundar skulle kunna vara en potentiell reservoar för GHLO-infektion på människa eftersom de visades vara vanliga på friska hundar (Yamasaki et al., 1998). Risken för överföring av stora GHLO till människor är troligen ganska liten (Eaton et al., 1996; Neiger och Simpson, 2000), med tanke på att över 90 % av hundar och mindre än 0,5 % av människor härbärgerar GHLO. Hygien är ändå viktig för att minska riskerna för infektion (Neiger och Simpson, 2000).

H. felis har påvisats i magsäcksbiopsi från människa (Germani et al., 1997). *H. bilis* har med tanke på dess breda värdspektrum kapacitet för zoonotisk överföring (Hänninen et al., 2005). I och med att *H. pylori* har isolerats på hund (Buczolits et al. 2003) finns det ju också en risk för överföring av denna bakterie.

Det kliniska problemet: hepatit och pankreatit

Akut hepatit och pankreatit är vanliga medicinska problem hos hund. Dessutom finns en uttalad recidivrisk. Etiologin är ofta okänd. En teori är att infektion med Helicobacterarter skulle kunna ha samband med de båda sjukdomstillstånden.

Pankreatit

Normalt aktiveras inte digestionsenzymerna (amylas, lipas, fosfolipas A och elastas) förrän de kommer ut i tarmen. Man tror att pankreatit utvecklas när digestionsenzymer aktiveras i pankreas med resulterande autodigestion av pankreas. Det är framför allt fosfolipas A och elastas som står för autodigestionen av pankreas.

Akut

Djurägare med hundar som drabbats av pankreatit söker veterinär på grund av att hunden är dämpad, inte äter, kräks och ibland har diarré. Vid allvarlig pankreatit kan hunden gå in i chock och kollapsa.

Vid klinisk undersökning finner man smärta vid bukpalpation (dock ej hos alla hundar), mild till måttlig dehydrering och feber. Ibland kan en resistens i främre delen av buken palperas och hunden kan ha mild ascites. Alla åldrar kan drabbas, men hundarna är vanligen medelålders eller äldre, ibland feta och symtomen kan ha kommit efter intag av en stor mängd fet mat.

Kronisk

Kronisk pankreatit karakteriseras av irreversibla morfologiska förändringar som kan leda till bestående funktionsförsämring. Symtomen är väldigt varierande och ospecifika. Kronisk pankreatit kan hos hund sägas vara akut recidiverande pankreatit.

Hepatit

Hepatit är inflammation i levern som kan bero på för levern toxiska ämnen (diskuteras ej i denna uppsats) eller infektion. Utifrån inflammationens utbredning kan man ofta avgöra hur inflammationen har uppstått. Hematogen infektion brukar ge multifokala lesioner. Infektioner ascenderande via gallgångarna ger i inledningsskedet kolangit och så småningom kolangiohepatit.

Hundar med akut hepatit får symtom som feber, nedsatt allmäntillstånd, kräkningar och buksmärter.

Syfte med studien

Detta arbete är en pilotstudie med följande frågeställningar:

- Finns det hos hund ett samband mellan hepatit/pankreatit och förekomst av *Helicobacter* spp?
- Kan vi mäta antikroppar mot *Helicobacter* hos hund och går det att nyttja antikroppsserologi som diagnostisk metod på hund?
- Finns det en skillnad avseende antikropps-förekomst hos friska hundar respektive hundar med hepatit/pankreatit?
- Hur ser förekomsten av *Helicobacter* i tarmen ut och hur speglas den av antikroppssvaret?

MATERIAL OCH METODER

Prover

Alla prover skickades till Avdelningen för Medicinsk Mikrobiologi vid Lunds Universitet för analys.

Avföringsprov

Avföringsprov togs från 17 kliniskt friska hundar av olika åldrar och raser. Proverna placerades i provrör och förvarades sedan vid - 20°C.

Vävnadsprov

Alla vävnadsprov var fixerade i 10 % buffrat formalin och paraffinbäddade.

Lever

Försöksgrupp

Följande kriterie behövde vara uppfyllt för att en leverbiopsi/ett levervävnadsprov skulle få ingå:

- Patologanatomisk diagnos skulle vara fastställd och kunde vara akut hepatit, kronisk dissekerande hepatit eller kronisk kolangiohepatit.

Leverbiopsi togs från en hund som inkom till KM Smådjur med kliniska tecken på hepatit. Diagnosen kronisk, dissekerande hepatit ställdes. Sex stycken biopsier med diagnoserna akut purulent hepatit, kronisk kolangiohepatit med gallstas, kronisk dissekerande hepatit (två stycken) och akut hepatit (två stycken) valdes ut efter sökning i arkiven på avdelningen för patologi, farmakologi och toxikologi, SLU.

Kontrollgrupp

Följande kriterie behövde vara uppfyllt för att ett levervävnadsprov skulle få ingå:

- Provet skulle ha genomgått histopatologisk undersökning utan att några sjukliga förändringar påvisats.

Två vävnadsprover togs från hundar som dött eller avlivats av annan orsak än sjukdom i lever och pankreas.

Pankreas

Försöksgrupp

Följande kriterie behövde vara uppfyllt för att ett pankreasvävnadsprov skulle få ingå:

- Patologanatomisk diagnos skulle vara fastställd och kunde vara akut pankreatit, akut nekrotiserande pankreatit eller kronisk pankreatit.

Efter sökning i arkiven på avdelningen för patologi, farmakologi och toxikologi, SLU valdes två stycken vävnadsprover med diagnoserna akut pankreatit och akut nekrotiserande pankreatit ut.

Kontrollgrupp

Följande kriterie behövde vara uppfyllt för att ett pankreasvävnadsprov skulle få ingå:

- Provet skulle ha genomgått histopatologisk undersökning utan att några sjukliga förändringar påvisats.

Fyra vävnadsprover togs från hundar som dött eller avlivats av annan orsak än sjukdom i lever och pankreas.

Blodprov för serologi

Blodprov togs med vacutainer, serumrör användes. Blodet centrifugerades varefter serumet pipetterades upp och fördes över till 5 ml plaströr. Dessa förvarades sedan vid -20°C.

Prov togs på 51 friska hundar som inte drabbats av hepatit, pankreatit eller gastrit. De fick ej heller stå på immunosupprimerande behandling (exempelvis kortison).

Helicobacter DNA i biopsier och avföring

Biopsierna och avföringen analyserades med avseende på innehåll av Helicobacter DNA.

Extraktion av DNA...

... från avföringsprover

DNA extraherades från 200 mg avföring med hjälp av QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) enligt tillverkarens instruktioner. Proceduren innefattade:

- Lysering av bakterierna med hjälp av upphettning i 5 minuter.
- Tillsats av InhibitEX tablett för absorption av DNA-skadande ämnen och PCR-inhibitorer.
- Tillsats av proteinas K och en s.k. detergent (natriumlaurylsulfat) för vidare nedbrytning av bakterier och proteiner.
- Tillsats av lysat till silica-kolonn för immobilisering (bindning av nukleinsyramolekyler) till silica-kolonnen.
- Rening av lysatet med tvättning av silica-kolonnen. Lysatet tvättades med två buffertar och centrifugering. Silicakolonnen var vid varje centrifugering placerad i ett rör som slängdes (tillsammans med filtratet) efter varje centrifugering, silicakolonnen placerades i ett nytt rör inför nästa centrifugering.
- Eluering av DNA: t från silica-kolonnen med hjälp av en buffert med låg salthalt eller vatten.

Extraherat DNA förvarades vid -20°C.

... från lever och pankreasbiopsier

De paraffinbäddade vävnadsproverna skars loss från paraffinet och värmdes vid 60°C i tio minuter för att smälta kvarvarande paraffin. Därefter överfördes proverna under aseptiska förfaranden till mikrocentrifugrör och tvättades i xylene i 2 × 5 minuter. Proverna återfuktades med etanol (99 % och 95 % i 2 × 5 minuter och 70 % i 5 minuter). Slutligen tvättades de i 5 minuter i dubbeldestillerat vatten.

Proverna homogeniserades i 170 mM fosfatbuffrad NaCl med pH 7.2, en mortelstöt anpassad för plastmikrocentrifugrör användes. Vävnadsprover från pankreas homogeniserades vid 1 % (vikt/volym) och leverproverna vid 4-5 % (vikt/volym). DNA extraherades från 100 µl av varje homogenat med hjälp av QIAamp[®] DNA Mini Kit Tissue protocol (Qiagen) enligt tillverkarens instruktioner. Proceduren innefattade:

- Lysering med hjälp av Proteinase K och detergent.
- Tillsats av buffertar för att uppnå optimal bindning av DNA till silicakolonnen.
- Rening av lysatet med hjälp av tvättning och centrifugering på samma sätt som beskrivits ovan för avföringsprov.
- Eluering av DNA: t från silica-kolonnen med hjälp av en buffert med låg salthalt eller vatten.

Extraherat DNA förvarades sedan vid -20°C.

PCR

Amplifiering utfördes med hjälp av en GeneAmp PCR System 2700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) och *Helicobacter* genusspecifika primers. En "semi-nested" PCR metod i två steg användes.

Steg 1

Reaktionsmixturen för det första steget (25 µl) innehöll 0.5 µM av varje primer. Primers 1F: position 254-271, 5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3' och 1R: position 1018-1035, 5'-CTCACG ACACGAGCTGAC-3' (Goto et al., 2000), 0.2 mM av varje dNTP (Amersham Biosciences, Uppsala, Sverige), 1 × Chelating buffert, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 % (w/v) Bovint Serum Albumin (BSA), 1.25 U r*Tth* DNA polymeras (Applied Biosystems) och 5 µl extraherat DNA.

Amplifieringen innefattade initial denaturering vid 94°C i 2 minuter följt av 30 denatureringscykler vid 94°C i 30 sekunder, härdning vid 55°C i 30 sekunder och utvidgning vid 72°C i 30 sekunder, slutligen inkubering vid 72°C i 5 minuter.

Steg 2

Reaktionsmixtur för det andra steget (25 µl) innehöll 0,5 µM av varje primer (1F: 254-271, 5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3' och 2R: 667-686, 5'-TCGCCTTCGCAATGAGTTT-3' (Goto et al., 2000)), 0.2 mM av varje dNTP, 1 × buffert II, 2.5 mM MgCl₂, 1.0 U AmpliTaq Gold DNA polymeras (Applied Biosystems) och 2 µl 10 × utspädd PCR produkt från det första steget.

Amplifieringen innefattade initial denaturering vid 95°C i 10 minuter följt av 35 denatureringscykler vid 94°C i 30 sekunder, härdning vid 55°C i 30 sekunder och utvidgning vid 72°C i 30 sekunder, slutligen inkubering vid 72°C i 5 minuter.

Som positiv kontroll användes 0.1 ng *H. pylori* CCUG 17874T DNA som tillsattes till reaktionsmixturen. Millipor filtrerat, dejoniserat vatten användes som negativ kontroll. PCR produkten färgades med loading buffert (trisEDTA, bromfenolblått och sackaros).

Det andra steget repeterades (med 1F-GC istället för 1F) inför en ytterligare elektrofores och inför DGGE.

Elektrofores

PCR-produkten separerades med elektrofores i 1.5 % agarosgel som innehöll etidiumbromid (0.5 µg/ml) och 1 × Tris Acetat EDTA (TAE). Visualisering skedde sedan med hjälp av ett GelFotosystem (Techtum Lab, Klippan, Sverige).

Denaturerande Gradient Gel Elektrofores (DGGE)

DNA extraherat från *Helicobacter* referensstammar användes som mall för att amplifiera V6-7 regionen av 16S rDNA genom att använda primers 1F-GC: (5'-GCGGCCCGCCCGTCCC GCCGCCCGCCCGCCCGCGG CCGCCTATGACGGGTATCCGGC-3') och 2R (667-686, 5'-TCGCCTTCGCAATGAGTTT-3') (Goto et al., 2000). DGGE analys av amplifieringsprodukterna (15 µl) utfördes på 9 % polyakrylamid geler som innehöll en 15-30 % urea/formamid gradient (Al-Soud et al., 2003). Elektrofores utfördes i 0.5 × TAE vid 200 V och 60°C i 4 timmar med ett DCode System för DGGE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gelerna färgades med etidiumbromid under 15 minuter och migrationen visualiserades med hjälp av GelFotoSystem (Techtum Lab, Klippan, Sverige).

DNA-sekvensanalys

De separerade DNA fragmenten skars ut från agarosgelerna med en skalpell och renades med hjälp av Montage DNA Gel Extraction Kit (Millipore). Ett prov på 2 µl användes som mall i en PCR mixtur (25 µl) som innehöll primers 1F (0.5 µM) och 2R (0.5 µM), 0.2 mM av varje dNTP, 1 × buffert II, 2.5 mM MgCl₂, 1.0 U AmpliTaq Gold DNA polymeras (Applied Biosystems). Amplifieringsförhållanden: 95°C i 10 minuter; 35 cykler med 94°C i 30 sekunder, 55°C i 30 sekunder och 72°C i 30 sekunder, slutligen 72°C i 5 minuter. Således en upprepning av det andra PCR-steget.

Helicobacter genusspecifika PCR produkter togs fram från agarosgelerna med hjälp av Ultrafree-DA centrifugrör (Millipore). Sekvensering av båda DNA-strängarna gjordes med ABI 310 PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit version 3.0 (Applied Biosystems). Sekvenserna kontrollerades med BioEdit mjukvara (<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/Bioedit.html>). Sedan analyserades sekvenserna i BLAST sekvens homologi sökprogrammet (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>).

Antikroppar mot *Helicobacter* i serum

Antikroppar i serum analyserades med ELISA och immunoblot.

Antigener för ELISA och immunoblot

Cellyteantigen extraherades med hjälp av en sur glycinbuffert, (0, 2 M), pH 2,2, från odlade *H. canis* (CCUG (Culture Collection University of Gothenburg) 33835), *H. bilis* (CCUG 38995), *H. pylori* (CCUG 17874) och *Campylobacter jejuni* (ATCC (American Type Culture Collection) 33560). Samma antigen användes i båda analysmetoderna.

ELISA

Cellyteproteiner från *H. canis*, *H. bilis*, *H. pylori* och *C. jejuni* användes för laddning av brunnarna, 100 µl/brunn med en proteinkoncentration av 5 µg/ml.

Antigen tillsattes i två brunnar för varje bakteriesort (Maxisorp immunoplates, NUNC, Roskilde, Danmark) och inkuberades i 16 timmar vid + 8°C. Plattorna tvättades sedan två gånger i PBS-T (fosfat NaCl buffert, pH 7,2 med 0,05 % Tween 20). Brunnar blockerades i 1,5 timme vid 22°C med 3 % bovin serum albumin löst i PBS-T. För att utvärdera vilken spädning av sera som var optimal testades olika spädningar av samma serum med ELISA. Spädda sera (1/100, 1/200, 1/400, 1/800) tillsattes och plattorna inkuberades i 60 minuter vid 37°C. Spädningen 1/800 valdes. Som standardreferens användes humant gammaglobulin (Pharmacia & Upjohn, Stockholm, Sweden). Efter upprepade tvättningar tillsattes en alkaliskt fosfatas-märkt antihund IgG antikropp, spädd 1/1000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, Pennsylvania, USA). Efter nya tvättar tillsattes en substratbuffert innehållande 1 mg p-nitrofenyl fosfat (Sigma, St. Louis, MO, USA) per ml i en dietanolamin buffert, pH 9,8.

Absorbans mättes i spektrofotometer vid våglängden 405_{nm} efter ungefär 30 minuters inkubation i 37 grader. Resultaten uttrycks som korrigerade medelabsorbansvärden som erhöles med hjälp av följande ekvation:
$$\mu = \frac{\omega_1 + \omega_2}{2} - \omega_3$$

μ är det korrigerade medelabsorbansvärdet, ω_1 och ω_2 är absorbansvärdena för de två brunnarna med antigen och serum och ω_3 är absorbansvärdet för bakgrundsbrunnen, utan antigen.

Brytpunktsvärden

Brytpunktsvärden beräknades med hjälp av $\mu + \sigma$ där μ = medelvärdet och σ = standardavvikelsen.

Absorptionsexperiment

Till 0,3 ml lyserade celler av vardera *H. canis*, *H. bilis*, *H. pylori* och *C. jejuni* (1 ml lyserade *H. pylori* celler för immunoblot) tillsattes 3 μ l (10 μ l för immunoblot) serum som sedan inkuberades i 2,5 timmar vid 22°C med konstant skakning. Cellerna avlägsnades med centrifugering och supernatanten (den överstående lösningen) sparades för serologianalyserna.(Nilsson, I. et al., 2003)

Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE utfördes under reducerande förhållanden (Laemmli-70) med hjälp av en Criteron cellTM elektrofores utrustning (BioRad, Richmond, CA, USA). Extraherade ytproteiner från de olika *Helicobacter* arterna separerades med en gradient gel (8 % - 16 %) och en 5 % "stacking gel" (Criteron precast gels, BioRad). Proteiner (ungefär 100 μ g/gel) och M_r standard varierande från 14.4 till 97 kDa (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) späddes i provbuffert (0.5 Tris-HCl, pH 6.8, 0,5% bromfenol blått, 8 % glycerol, 4 % SDS, 4 % 2-mercaptoetanol), upphettades vid 95°C i 3 minuter. Proteiner tillsattes till gelen och separerades inledningsvis under 20 minuter vid 50 V, 150 mA och därefter vid 200 V tills den blå linjen nådde nederkanten av gelen. (Nilsson, I. et al., 1997)

Immunoblot

Separerade *Helicobacter* proteiner överfördes via elektrofores till ett polyvinylidene difluoride (PVDF) membran (porstorlek, 0.45 μ m; Micron Separations Inc. Westborough, MA, USA) i en semidry electroblotter utrustning (Ancos, Vig, Danmark) under 90 minuter vid en konstant laddning på 1 mA/cm².

Membranen mättades genom inkubation 2×15 minuter i blockerande buffert I och II. Sedan sköljdes membranet under 10 minuter i en tvättbuffert och skars i remsor. Remsorna inkuberades med sera, utspätt 1/100 i tvättbuffert, under varsam skakning i 16 timmar vid $+4^{\circ}\text{C}$. Remsorna sköljdes sedan 3×5 minuter och inkuberades i 2 timmar vid 4°C med horseradish peroxidasmärkta anti-hundantikroppar (Jackson ImmunoResearch Laboratories) som späts 1/5000. Efter upprepad sköljning kunde membranbundna antikroppar detekteras genom en reaktion i en 50 mM natriumacetat buffert innehållande 0,04 % 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma Chemical) och 0,015 % H_2O_2 . (Nilsson, I. et al., 1997)

Immunoblot utfördes på alla sera utan absorption och 10 sera som absorberades. De relativa molekylärmassorna (M_r) för de separerade proteinerna uppskattades genom jämförelse med standardproteinmarkörerna.

RESULTAT

Helicobacter DNA i avföring

DNA från *Helicobacter* hittades i samtliga 17 avföringsprover vid elektroforesen. DGGE utfördes på dessa men fungerade inte. Urea/formamidgradienten etablerades aldrig i gelen. På 10 av proverna utfördes direktsekvensering (utifrån DNA: t från elektroforesen) för att få fram vilka *Helicobacter*arter som fanns i hundavföringen. Sekvenseringen visade att det i de flesta proverna fanns *H. canis* och i några prover *H. sp. flexispira* (tabell 1).

Tabell 1. *Helicobacter*arter i hundavföring

Hund	Art	Accessionnr	Identiteter* (baspar)
1. Norwich-terrier	<i>H. canis</i>	AY631946	100 % (349/349)
2. Norwich-terrier	<i>H. canis</i>	AY631946	99 % (361/362)
3. Norwich-terrier	<i>H. canis</i>	AY631946	99 % (387/388)
4. Boxer	<i>H. canis</i>	AY631946	100 % (347/347)
5. Papillon	<i>H. canis</i>	HCU65102	99 % (348/349)
6. Rottweiler	<i>H. canis</i>	AF177475	99 % (340/342)
7. Berner sennen	<i>F. rappini</i>	AY192528	100 % (349/349)
8. Schäfer	<i>H. canis</i>	AY631946	99 % (327/328)
9. Bichon frisé	<i>F. rappini</i>	AY192528	99 % (302/304)
10. Vorsteh	<i>H. canis</i>	HCU65102	99 % (348/349)

* andel överensstämmande (med del av sekvensen för den aktuella arten och stammen) baspar för DNA som påvisats i avföringen.

Helicobacter DNA i biopsier och vävnadsprover.

DNA från *Helicobacter* kunde inte påvisas i någon av biopsierna/vävnadsproverna – det skedde alltså ingen migration på agarogelen vid elektroforesen (förutom av den positiva kontrollen). Därför gjordes inte någon DGGE och sekvensanalys på dessa prover.

ELISA

Antikroppsreaktiviteten mot *H. bilis* och *H. canis* vid olika spädningar av sera (se tabell 2 respektive 3) var hög. Detta visade att det var lämpligast att välja spädningen 1/800 för de följande analyserna för att späda bort korsreagerande antikroppar. (Tabell 2 och 3)

Tabell 2. Antikroppsreaktivitet mot *H. bilis* mätt med ELISA vid olika spädningar av sera

(A ₄₀₅ nm)	1/100	1/200	1/400	1/800
Antal prover	7	8	7	8
Medel	2,0	1,4	0,8	0,5
Median	2,0	1,4	0,8	0,5
Bakgrundsmedel	0,3	0,3	0,3	0,3
Bakgrundsmedian	0,3	0,3	0,3	0,3

Tabell 3. Antikroppsreaktivitet mot *H. canis* mätt med ELISA vid olika spädningar av sera

(A ₄₀₅ nm)	1/100	1/200	1/400	1/800
Antal prover	7	8	7	8
Medel	1,3	0,7	0,3	0,1
Median	1,3	0,7	0,2	0,1
Bakgrundsmedel	0,2	0,2	0,2	0,1
Bakgrundsmedian	0,2	0,2	0,2	0,1

Trots att serumspädningen 1/800 valdes blev antikroppsreaktiviteterna som uppmättes mot *H. bilis* och *H. canis* höga. Absorptionsexperiment utfördes därför med syfte att avlägsna ospecifika antikroppar och enbart få kvar specifika antikroppar. Antikroppsreaktiviteten mot *H. bilis* och *H. canis* före och efter absorption med lysat av olika *Helicobacter*arter och *C. jejuni* mättes med ELISA (Tabell 4 och 5).

Tabell 4. Antikroppsreaktivitet mot *H. bilis* mätt med ELISA före och efter absorption med *H. bilis*, *H. canis*, *H. pylori* och *C. jejuni*

(A ₄₀₅ nm)	Före absorption	<i>H. bilis</i>	<i>H. canis</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. jejuni</i>
Antal prover	50	15	15	48	30
Medel	1,2	0,2	0,2	0,4	0,4
Median	1,1	0,2	0,1	0,3	0,3
Bakgrundsmedel	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3
Bakgrundsmedian	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2

Tabell 5. Antikropsreaktivitet mot *H. canis* mätt med ELISA före och efter absorption med *H. bilis*, *H. canis*, *H. pylori* och *C. jejuni*

(A ₄₀₅ nm)	Före absorption	<i>H. bilis</i>	<i>H. canis</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. jejuni</i>
Antal prover	50	15	15	48	30
Medel	1,1	0,3	0,2	0,2	0,3
Median	1,0	0,3	0,2	0,2	0,3
Bakgrundsmedel	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2
Bakgrundsmedian	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2

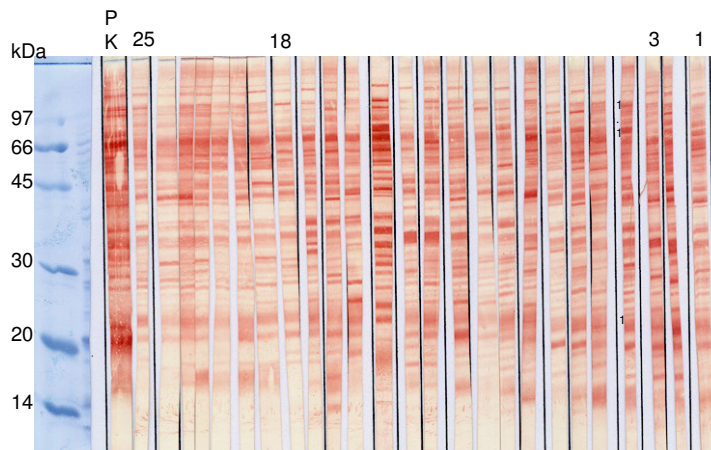
Värden ovanför brytpunktsvärdena som beräknades (Tabell 6) innebär ökad halt cirkulerande antikroppar.

Tabell 6. Beräknade brytpunktsvärden

Typ av antigen	Icke absorberade	Absorberade med <i>H. pylori</i>
<i>H. bilis</i>	2,3	0,8
<i>H. canis</i>	2,3	0,5

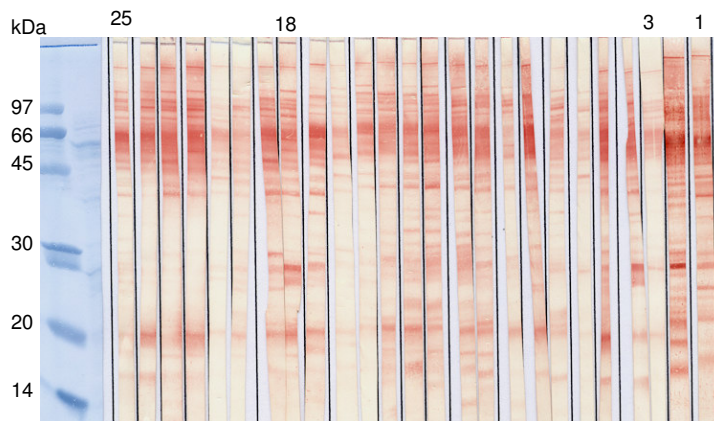
Immunoblot

Bandfrekvensen på remsorna blev överlag väldigt hög för både *H. bilis* (Figur 1) och *H. canis* (Figur 2). Den höga bandfrekvensen tyder på väldigt hög antikropsreaktivitet mot ytproteiner från dessa två species.



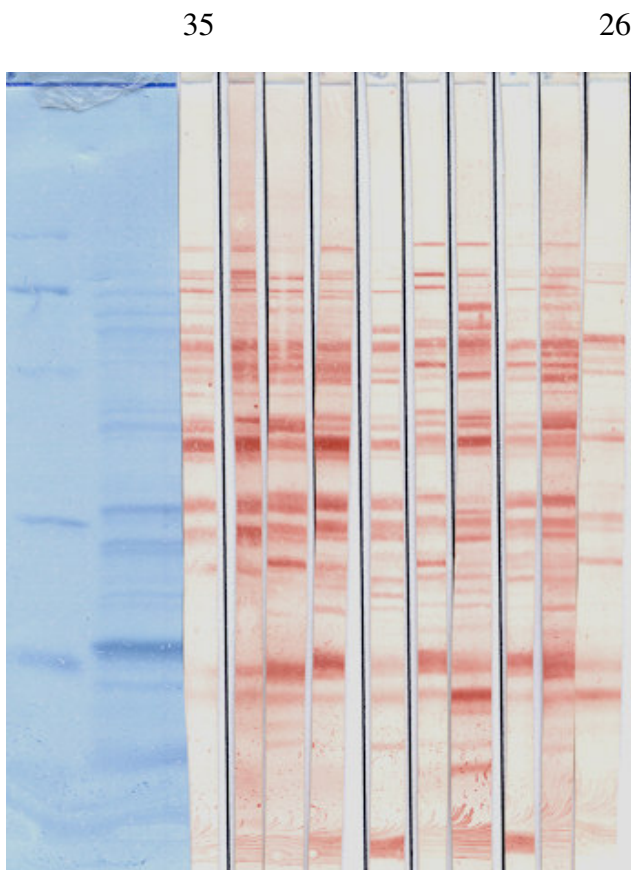
Figur 1. *H. bilis* immunoblot med sera från hund nr 1-25, före absorption.

PK = Positiv kontroll

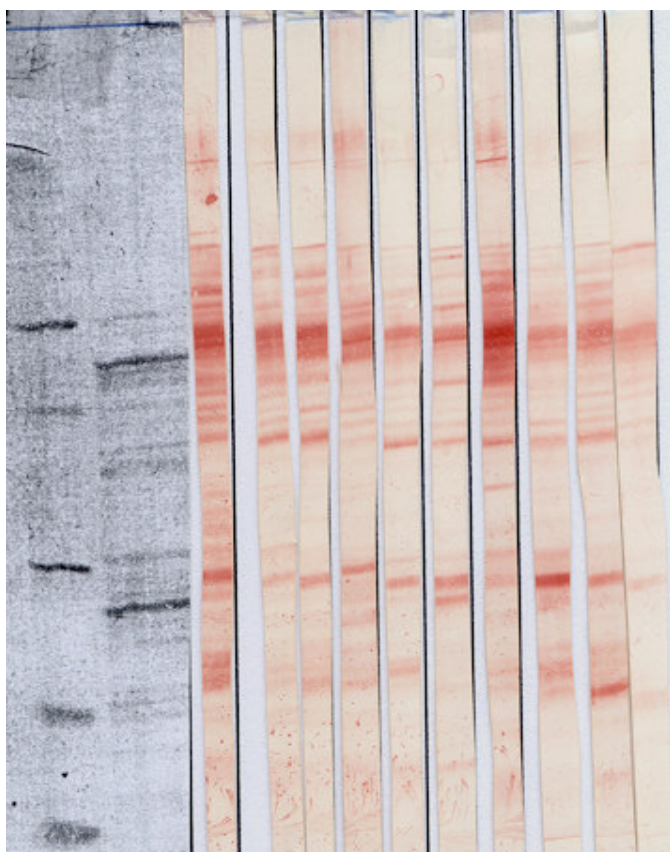


Figur 2. *H. canis* immunoblot med sera från hund nr 1-25, före absorption.

Även efter att sera absorberats med lyserade *H. pylori* celler var bandfrekvensen hög för både *H. bilis* (Figur 3) och *H. canis* (Figur 4).



Figur 3. *H. bilis* immunoblot med sera från hund nr 26-35. Sera absorberades före analysen med lyserade *H. pylori* celler.



Figur 4. *H. canis* immunoblot med sera från hund nr 26-35. Sera absorberades före analysen med lyserade *H. pylori* celler.

På några hundar har både avföringsprov och serumprov analyserats dessa resultat har jämförts med varandra (tabell 7). Ingen av hundarna uppvisade antikroppstitrar som översteg brytpunktsvärdena, vid ELISA, för de bakterier som påvisades i deras avföring. Vad gäller immunoblotresultaten så är dessa hundars serum enbart analyserat före absorption. Ingen av hundarna hade ökad styrka eller frekvens när det gäller band för den art som påvisats i deras avföring.

Tabell 7. Analysresultat för de hundar som både avföringsprov och serumprov togs på

Nr på avföringen	Nr på serumet	Avföring, PCR	Serum, ELISA	Serum, IB - före absorption
4	3	<i>H. canis</i>	Under brytpunktsvärden.	Hög akreativitet mot <i>H. bilis</i> , låg mot <i>H. canis</i>
8	18	<i>H. canis</i>	Över brytpunktsvärde för <i>H. bilis</i> e. absorption.	<i>H. canis</i> : måttlig <i>H. bilis</i> : måttlig
9	1	<i>H. sp. flexispira</i>	Under brytpunktsvärden.	<i>H. canis</i> : hög <i>H. bilis</i> : måttlig

DISKUSSION

DNA från *Helicobacter* hittades i samtliga 17 avföringsprover. Sekvensering utav 10 av proverna visade att det i majoriteten av proverna fanns *H. canis* och i ett fåtal *H. sp. flexispira*. Dessa resultat tyder på att *Helicobacter* är väldigt vanliga i tarmen på hundar. När det gäller DGGE:n så var det troligen fel på någon av kemikalierna som var orsak till att urea/formamidgradienten aldrig etablerades i gelen. Med tanke på den rikliga förekomsten av *Helicobacter* i tarmen på hundar vore det intressant att i kommande studier undersöka om det finns skillnader mellan friska hundar och hundar med gastrointestinal sjukdom avseende *Helicobacter*art och mängd bakterier. Både *H. sp. flexispira* (Misawa et al., 2002) och *H. canis* (Stanley et al., 1994) har tidigare isolerats från hundavföring.

DNA från *Helicobacter* kunde inte påvisas i någon av biopsierna/vävnadsproverna. Att *Helicobacter* inte skulle kunna påvisas i proverna från de friska hundarna var väntat. Vad gäller proverna från de sjuka hundarna så går det inte att utifrån de här resultaten dra slutsatsen att *Helicobacter* inte var orsak till deras sjukdomstillstånd. Det går definitivt inte heller att uttala sig om huruvida *Helicobacter* kan orsaka hepatit och pankreatit eller inte. Hundarna kan ha varit infekterade med *Helicobacter* (detta gäller naturligtvis även de friska hundarna) men det skulle exempelvis kunna vara så att metoden inte fungerade på grund av paraffinbäddningen, det kan därför vara lämpligt att analysera prover som frysts in i färsk form. Det skulle också kunna vara så att bakterierna var lokaliserade på andra platser i organen än varifrån proverna togs. Trots att *Helicobacter* ej kunde påvisas i biopsier och vävnadsprov från lever och pankreas i denna studie är det fortfarande intressant att analysera fler. Dels på grund av att så få biopsier/vävnadsprover analyserades i denna studie men också på grund av att gallresistenta bakterier, som *H. canis* (Stanley et al., 1993) är så vanliga i hundavföring. För gallresistenta bakterier är det ju åtminstone teoretiskt möjligt att infektera levern. *H. canis* har ju också tidigare kunnat isoleras från en hundlever med multifokal nekrotiserande hepatit (Fox et al, 1996b).

Trots att serumspädningen 1/800 valdes blev antikroppsreaktiviteterna som uppmättes mot *H. bilis* och *H. canis* höga. ELISA resultat som ligger ovanför de beräknade brytpunktsvärdena innebär förhöjda nivåer av cirkulerande antikroppar. En sådan förhöjning sågs hos flera av hundarna. Det säger dock ingenting om sambandet med hundens infektionsstatus. Det är mycket möjligt att nästan alla hundar är infekterade med någon *Helicobacter*art (särskilt med tanke på PCR-resultaten för avföringen – *H. canis*) vilket då skulle göra att brytpunktsvärdena för den arten skulle ligga alldeles för högt i förhållande till nivån som egentligen indikerar infektion. För att få fram ett brytpunktsvärde som stämmer behövs ju serum från både sant positiva och negativa fall (Kornilovska et al., 2002). Därför bör hundar som man tar serum från också kontrolleras på något annat sätt så att deras infektionsstatus blir känd. Ett sätt är att använda sig av gnotobiotiska hundar. Gnotobiotiska hundar som infekterades med *H. felis* hade efter två veckor detekterbara IgM och IgG serum antikroppar mot bakterien (Lee et al., 1992). Serokonvertering kunde också påvisas med ELISA på SPF-hundar som experimentellt infekterats med *H. felis* (Simpson et al., 1999). På hundar som experimentellt infekterats med *H. pylori* kunde specifika IgG-titrar uppmätas med hjälp av ELISA (Radin et al., 1990; Rossi et al., 1999). För övrigt skulle det vara bra att absorbera med flera bakteriearter samtidigt och att prova fler spädningar.

Bandfrekvensen på immunoblotremorna blev överlag väldigt hög för både *H. bilis* och *H. canis* vilket tyder på väldigt hög antikroppsreaktivitet mot ytproteiner från dessa två species. Även efter att sera absorberats med lyserade *H. pylori* celler var bandfrekvensen hög för båda arterna. Det skulle vara bra att absorbera med fler bakteriearter och gärna flera samtidigt för att lättare kunna avläsa remsorna. När det gäller denna analysmetod skulle det vara bra att analysera serum från hundar som är känt infekterade så att bandfrekvenserna kan jämföras. Då skulle man också kunna komma fram till vilka molekyllärmassor hos banden som förekommer hos både oinfekterade och infekterade. Detta har gjorts av Strauss-Ayali et al (1999) när det gäller *H. felis*, *H. pylori* och *H. bizzozeronii*. Serologi på hund kompliceras av att hundar kan vara infekterade med flera olika *Helicobacter*arter samtidigt (Eaton et al., 1996; Jalava et al., 1998; Simpson et al., 1999; Strauss-Ayali et al., 1999).

På några hundar har både avföringsprov och serumprov analyserats och vid jämförelse av dessa resultat går det inte att säga att dessa stämmer överrens. Ingen av hundarna uppvisade med ELISA-metoden antikroppstitrar som översteg brytpunktsvärdena för de bakterier som påvisades i deras avföring. Ingen av hundarna uppvisade band med ökad styrka eller frekvens för den art som påvisats i deras avföring.

Teoretiskt borde hundarna som hade *H. canis* i avföringen ha uppvisat antikroppsreaktivitet motsvarande infektion för denna bakterie och hunden som hade *H. sp. flexispira* i avföringen skulle ha kunnat ha antikroppar mot *H. bilis* eftersom den arten tillhör gruppen *Helicobacter sp. flexispira*. Det kan ju emellertid också vara så att *Helicobacter* i tarmarna inte ger så höga antikropps nivåer. Det behövs ytterligare studier för att kunna dra några riktiga slutsatser.

Sammanfattningsvis så behövs det ytterligare studier för att svara på de frågeställningar som detta arbete hade i syfte att besvara. Skillnader i förekomst av *Helicobacter* i avföringen hos friska respektive hundar med gastrointestinal sjukdom behöver undersökas. Färskfrusna biopsier från lever och pankreas från hundar med hepatit respektive pankreatit samt från friska hundar bör undersökas avseende *Helicobacter*förekomst. När det gäller mätning av antikroppshalt i serum hos hund krävs ytterligare metodutveckling. För att få ut mera av en studie bör man vid samma tillfälle ta både avföringsprov och serum från hundarna i kontrollgruppen. Från sjuka djur bör både avföring, biopsier och serum analyseras med avseende på *Helicobacter*förekomst respektive förekomst av antikroppar mot *Helicobacter*.

TACKORD

Jag vill rikta ett stort tack till Åsa Ljung, Hans-Olof Nilsson och Ingrid Nilsson på Sektionen för medicinsk mikrobiologi vid Institutionen för laboriemedicin vid Lunds Universitet. Den tid jag tillbringade i Lund var oerhört värdefull och lärorik för mig. Tack för all hjälp med analyserna och med materialdelen i uppsatsen!

REFERENSLISTA

- Al-Soud, W. A., M. Bennedsen, S. L. On, I. S. Ouis, P. Vandamme, H. O. Nilsson, Å. Ljungh och T. Wadström. (2003). Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. *J. Med. Microbiol.* 52: 765-771.
- Avenaud, P., A. Marais, L. Monteiro, B. Le Bail, P. Bioulac Sage, C. Balabaud och F. Mégraud. (2000). Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer.* 89 (7): 1431-1439.
- Baik, S. C., H. S. Youn, M. H. Chung, W. K. Lee, M. J. Cho, G. H. Ko, C. K. Park, H. Kasai, K. H. Rhee. (1996). Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.* 56 (6): 1279-1282.
- Bode, G., F. Mauch och P. Malfertheiner. (1993a). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 111: 483-490.
- Bode, G., P. Malfertheiner, G. Lehnhardt, M. Nilius och H. Ditschuneit. (1993b). Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*. *Med. Microbiol. Immunol.* 182 (5): 233-242.
- Bryner, J. H., A. E. Ritchie, L. Pollet, C. A. Kirkbride och J. E. Collins. (1987). Experimental infection and abortion of pregnant guinea pigs with a unique spirillum-like bacterium isolated from aborted ovine fetuses. *Am. J. Vet. Res.* 48 (1): 91-95.
- Buczolits, S., R. Hirt, R. Rosengarten och H.-J. Busse. (2003). PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa. *Vet. Microbiol.* 95: 259-270.
- Calam, J. (1995). *Helicobacter pylori*, acid and gastrin. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (4): 310-317.
- Cattoli, G., R. van Vugt, R. G. Zanoni, V. Sanguinetti, R. Chiochetti, M. Gualtieri, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, W. Gaastra och J. G. Kusters. (1999). Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. *Vet. Microbiol.* 70: 239-250.
- Davies, G. R., N. Banatvala, C. E. Collins, M. T. Sheaff, Y. Abdi, L. Clements och D. S. Rampton. (1994). Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and

- reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 29 (5): 419-424.
- De Groote D., F. Haesebrouck, L.-J. van Doorn, P. Vandamme och R. Ducatelle. (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.
- Dewhirst, F. E., J. G. Fox, E. N. Mendes, B. J. Paster, C. E. Gates, C. A. Kirkbride och K. A. Eaton. (2000). 'Helicobacter sp. flexispira' strains represent at least 10 Helicobacter taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1781-7.
- Di Campli, C., R. Nocente, G. Costamagna, N. Gentiloni, R. Burioni, J. Wu, A. Armuzzi, M. A. Zern, G. Gasbarrini och A. Gasbarrini. (2000). No evidence of *Helicobacter pylori* sequences in pancreatic juices of patients affected by chronic pancreatitis. *Int. J. Pancreatol.* 28 (3): 181-185.
- Diwan, B. A., J. M. Ward, D. Ramljak och L. M. Andersson. (1997). Promotion by *Helicobacter hepaticus*-induced hepatitis of hepatic tumors initiated by N-nitrosodimethylamine in male A/JCr mice. *Toxicol. Pathol.* 25 (6): 597-605.
- Dohmen, K., H. Shigematsu, Y. Miyamoto, F. Yamasaki, K. Irie och H. Ishibashi. (2002). Atrophic corpus gastritis and *Helicobacter pylori* infection in primary biliary cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 47 (1): 162-169.
- Domschke, S., W. Domschke, W. Rosch, S. J. Konturek, W. Sprugel, P. Mitznegg, E. Wunsch och L. Demling. (1977). Inhibition by somatostatin of secretin-stimulated pancreatic secretion in man: a study with pure pancreatic juice. *Scand. J. Gastroenterol.* 12 (1): 59-63.
- Dore, M. P., G. Realdi, D. Mura, D. Y. Graham och A. R. Sepulveda. (2002). *Helicobacter* infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 47 (7): 1638-43.
- Dunn, B. E., G. P. Campbell, G. I. Perez-Perez och M. J. Blaser. (1990). Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 265 (16): 9464-9469.
- Dunn, B. E., H. Cohen och M. Blaser. (1997), *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol.* 10 (4): 720-741.

- Eaton, K. A., F. E. Dewhirst, B. J. Paster, N. Tzellas, B. E. Coleman, J. Paola och R. Sherding. (1996). Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *J. Clin. Microbiol.* 34: 3165-3170.
- Evans, D. J. Jr, D. G. Evans, T. Takemura, H. Nakano, H. C. Lampert, D. Y. Graham, D. N. Granger och P. R. Kviety. (1995). Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun.* 63 (6): 2213-2220.
- Feng, S., K. Ku, E. Hodzic, E. Lorenzana, K. Freet och S. W. Barthold. (2005). Differential Detection of Five Mouse-Infecting *Helicobacter* Species by Multiplex PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (4): 531-536.
- Fox, J. G., F. E. Dewhirst, J. G. Tully, B. J. Paster, L. Yan, N. S. Taylor, M. J. Collins, P. L. Gorelick, och J. M. Ward. (1994). *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1238-1245.
- Fox, J. G., L. Yan, R. F. E. Dewhirst, B. J. Paster, B. Shames, J. C. Murphy, A. Hayward, J. C. Belcher, och E. N. Mendes. (1995). *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers and intestines of aged, inbred mice. *J. Clin. Microbiol.* 33: 445-454.
- Fox, J. G., X. Li, L. Yan, R. J. Cahill, R. Hurley, R. Lewis och J. C. Murphy. (1996a). Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis. *Infect. Immun.* 64: 1548-1558.
- Fox, J. G., R. Drolet, R. Higgins, S. Messier, L. Yan, B. E. Coleman, B. J. Paster, och F. E. Dewhirst. (1996b). *Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2479-2482.
- Fox, J. G., S. E. Perkins, L. Yan, Z. Shen, L. Attardo och J. Pappo. (1996c). Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *H. pylori* in saliva, gastric fluid and faeces. *Immunology.* 88 (3): 400-406.
- Fox, J. G., F. E. Dewhirst, Z. Shen, Y. Feng, N. S. Taylor, B. J. Paster, R. L. Ericson, C. N. Lau, P. Correa, J. C. Araya och I. Roa. (1998). Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology.* 114 (4):755-763.

- Fox, J. G., L. Handt, B. J. Sheppard, S. Xu, F. E. Dewhirst, S. Motzel och H. Klein. (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 (4): 1580-1585.
- Fox, J. G., Z. Shen, S. Xu, Y. Feng, C. A. Dangler, F. E. Dewhirst, B. J. Paster and J. M. Cullen. (2002). *Helicobacter marmotae* sp. nov. Isolated from Livers of Woodchucks and Intestines of Cats. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2513-2519.
- Franklin, C. L., C. S. Beckwith, R. S. Livingston, L. K. Riley, S. V. Gibson, C. L. Besch-Williford och R. R. Hook, Jr. (1996). Isolation of a Novel *Helicobacter* Species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian Hamsters with Cholangiofibrosis and Centrilobular Pancreatitis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2952-2958.
- García, A., S. E. Erdman, S. Xu, Y. Feng, A. B. Rogers, M. D. Schrenzel, J. C. Murphy och J. G. Fox. (2002). Hepatobiliary inflammation, neoplasia, and argyrophilic bacteria in a ferret colony. *Vet. Pathol.* 39 (2): 173-179.
- Genta, R. M., G. O. Robason och D. Y. Graham. (1994). Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. *Hum Pathol.* 25 (3): 221-6.
- Germani, Y., C. Dauga, P. Duval, M. Huerre, M. Levy, G. Pialoux, P. Sansonetti och P. A. Grimont. (1997). Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. *Res. Microbiol.* 148 (4): 315-326.
- Goto K., H. Ohashi, A. Takakura och T. Itho. (2000). Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. *Curr. Microbiol.* 41 (3): 161-166.
- Hamlet, A. och L. Olbe. (1996). The influence of *Helicobacter pylori* infection on postprandial duodenal acid load and duodenal bulb pH in humans. *Gastroenterology.* 111 (2): 391-400.
- Hanssen, L. E., K. F. Hanssen och J. Myren. (1977). Inhibition of secretin release and pancreatic bicarbonate secretion by somatostatin infusion in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 12 (4): 391-394.
- Happonen, I., S. Saari, L. Castren, O. Tyni, M.-L. Hänninen och E. Westermark. (1996a). Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats. *J. Comp. Pathol.* 115 (2): 117-127.

- Happonen, I., S. Saari, L. Castren, O. Tyni, M.-L. Hänninen och E. Westermark. (1996b). Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. *J. Vet. Med. Assoc.* 43: 305-315.
- Happonen, I., J. Linden och S. Saari, (1998). Detection and effects of *helicobacters* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213 (12): 1767-1774.
- Harris, P. R., H. L. Mobley, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser och P. D. Smith. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology.* 111 (2): 419-425.
- Haziroglu, R., K. S. Diker, T. Guvenc, O. Kul. (1995). Canine gastritis associated with *Helicobacter felis*. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 102:474-6.
- Hegarty, J. P., M. T. Dowd och K. H. Baker. (1999). Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 87 (5): 697-701.
- Henry, G. A., P. H. Long, J. L. Burns och D. L. Charbonneau. (1987). Gastric spirillosis in beagles. *Am. J. Vet. Res.* 48: 831-836.
- Hermanns, W., K. Kregel, W. Breuer och J. Lechner. (1995). *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J. Comp. Pathol.* 112: 307-318.
- Hulten, K., H. Enroth, L. Nyström och L. Engstrand. (1998). Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *J. Appl. Microbiol.* 85 (2): 282-286.
- Hänninen, M.-L., I. Happonen, S. Saari, och K. Jalava. (1996). Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 160-166.
- Hänninen, M. L., I. Happonen och K. Jalava. (1998). Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. *Vet. Microbiol.* 1998 30;62 (1): 47-58.
- Hänninen M. L., R. I. Kärenlampi, J. M. K. Koort, T. Mikkonen och K. J. Björkroth. (2005). Extension of the species *Helicobacter bilis* to include the reference strains of *Helicobacter* sp. flexispira taxa 2, 3 and 8 and Finnish canine and feline flexispira strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (Pt 2): 891-898.

- Ihrig, M., M. D. Schrenzel, och J. G. Fox. (1999). Differential susceptibility to hepatic inflammation and proliferation in AXB recombinant inbred mice chronically infected with *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol.* 155 (2):571-582.
- Jalava, K., M. Kaartinen, U. Utriainen, I. Happonen och M.-L. Hänninen. (1997). *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 975-982.
- Jalava, K., S. L. W. On, P. A. R. Vandamme, I. Happonen, A. Sukura och M. - L. Hänninen. (1998). Isolation and Identification of *Helicobacter* spp. from Canine and Feline Gastric Mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3998-4006.
- Jalava, K., S. Hielm, U. Hirvi och M.-L. Hänninen. (1999). Evaluation of a molecular identification scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for differentiating canine and feline gastric *Helicobacter* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 28 (4): 269-274.
- Jaworek, J., J. Bilski, B. Jachimczak, M. Ciekowski, M. Kot och S. J. Konturek. (2000). The effects of ammonia on pancreatic enzyme secretion in vivo and in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.* 51 (2): 315-332.
- Kiehlbauch, J. A., D. J. Brenner, D. N. Cameron, A. G. Steigerwalt, J. M. Makowski, C. N. Baker, C. M. Patton och I. K. Wachsmuth. (1995). Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* 33 (11): 2940-2947.
- Kirkbride, C. A., C. E. Gastes, J. E. Collins och M. S. Ritchie. (1985). Ovine abortion associated with an anaerobic bacterium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186: 789-791.
- Kornilovska, I., I. Nilsson, M. Utt, Å. Ljungh och T. Wadström. (2002). Immunogenic proteins of *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter bilis* och *Helicobacter hepaticus* identified by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteomics.* 2: 775-783.
- Kountouras, J., C. Zavos och D. Chatzopoulos. (2005). A concept on the role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune pancreatitis. *J. Cell. Mol. Med.* 9 (1): 196-207.
- Lee, A., S. L. Hazell, J. L. O'Rourke och S. Kouprach. (1988). Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect. Immun.* 56: 2843-2850.

- Lee, A., M. W. Phillips, J. L. O'Rourke, B. J. Paster, F. E. Dewhirst, G. J. Fraser, J. G. Fox, L. I. Sly, P. J. Romaniuk och T. J. Trust. (1992a). *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 (1): 27-36.
- Lee, A., S. Krakowa, J. G. Fox, G. Otto, K. A. Eaton, J. C. Murphy. (1992b). Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. *Vet. Pathol.* 29: 487-494.
- Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft och D. R. Morgan. (1988). Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 26 (2): 93-99.
- Manes G., J. E. Dominguez-Muñoz, A. Hackelsberger, A. Leodolter, A. Rössner och P. Malfertheiner. (1998). Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Mucosal Abnormalities in Chronic Pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology.* 93 (7): 1097-1100.
- Manes, G., A. Balzano and D. Vaira. (2003). *Helicobacter Pylori* and Pancreatic Disease. *J. of the Pancreas.* 4: 111-116.
- Matsukura, N., S. Yokomuro, S. Yamada, T. Tajiri, T. Sundo, T. Hadama, S. Kamiya, Z. Naito och J. G. Fox. (2002). Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. *Jpn. J. Cancer. Res.* 93 (7): 842-847.
- McNulty, C. A., J. C. Dent, A. Curry, J. S. Uff, G. A. Ford, M. W. Gear och S. P. Wilkinson. (1989). New spiral bacterium in gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.* 42 (6): 585-591.
- Meining, A., G. Kroher och M. Stolte. (1998). Animal reservoirs in the transmission of *Helicobacter heilmannii*. Results of a questionnaire-based study. *Scand. J. Gastroenterol.* 33: 795-798.
- Mendes, E. N., D. M. Queiroz, F. E. Dewhirst, B. J. Paster, S. B. Moura och J. G. Fox. (1996). *Helicobacter trogontum* sp. nov., isolated from the rat intestine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (4): 916-921.
- Misawa, N., K. Kawashima, F. Kondo, E. Kushima och P. Vandamme. (2002). Isolation and characterization of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Anaerobiospirillum* strains from a puppy with bloody diarrhea. *Vet. Microbiol.* 87:353-64.

- Moss, S. F., J. Calam, B. Agarwal, S. Wang och P. R. Holt. (1996). Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut*. 38 (4): 498-501.
- Muotiala, A., I. M. Helander, L. Pyhala, T. U. Kosunen och A. P. Moran. (1992). Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 60 (4): 1714-1716.
- Murata, H., S. Tsuji, M. Tsujii, H. Y. Fu, H. Tanimura, M. Tsujimoto, N. Matsuura, S. Kawano och M. Hori. (2004). *Helicobacter bilis* infection in biliary tract cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 (Suppl 1): 90-94.
- Neiger R., K. W. Simpson. (2000). *Helicobacter* Infection in Dogs and Cats: Facts and Fiction. *J. Vet. Intern. Med.* 14. 125-133.
- Nilsson, H. O., M. Castedal, R. Olsson och T. Wadström (1999). Detection of *Helicobacter* in the liver of patients with chronic cholestatic liver diseases. *J. Physiol. Pharmacol.* 50 (5): 875-882.
- Nilsson, H. O., J. Taneera, M. Castedal, E. Glatz, R. Olsson, T. Wadström. (2000). Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Microbiol.* 38 (3): 1072-1076.
- Nilsson, H.-O., R. Mulchandani, K.-G. Tranberg, U. Stenram och T. Wadström. (2001). *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 120: 323-324.
- Nilsson, H.-O., U. Stenram, I. Ihse och T. Wadström. (2002). Re: *Helicobacter pylori* seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 94: 632-633.
- Nilsson, H.-O. (2004). Enteric *Helicobacter* and *H. Pylori* in chronic inflammation and cancer of the hepatobiliary tract and pancreas. Akad. avh. Lunds Universitet.
- Nilsson, I., Å. Ljungh, P. Aleljung och T. Wadström. (1997). Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J. Clin. Microbiol.* 35 (2): 427-432.
- Nilsson, I., I. Kornilovs´ka, S. Lindgren, Å. Ljungh och T. Wadström. (2003). Increased prevalence of seropositivity for non-gastric *Helicobacter species* patients with autoimmune liver disease. *J. Med. Microbiol.* 52: 949-953.

- Norris, C. R., S. L. Marks, K. A. Eaton, S. Z. Torabian, R. J. Munn och J. V. Solnick. (1999). Healthy cats are commonly colonized with "*Helicobacter heilmannii*" that is associated with minimal gastritis. *J Clin Microbiol.* 37 (1): 189-94.
- Parsonnet, J., G. D. Friedman, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelman, N. Orentreich och R. K. Sibley. (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325 (16): 1127-1131.
- Paster, B. J., A. Lee, J. G. Fox, F. E. Dewhirst, L. A. Tordoff, G. J. Fraser, J. L. O'Rourke, N. S. Taylor och R. Ferrero. (1991). Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1): 31-38.
- Patterson, M. M., M. D. Schrenzel, Y. Feng, S. Xu, F. E. Dewhirst, B. J. Paster, S. A. Thibodeau, J. Versalovic och J. G. (2000). *Helicobacter aurati* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species cultured from gastrointestinal tissues of Syrian hamsters. *J. Clin. Microbiol.* 38 (10): 3722-8.
- Peyrol, S., P. Lecoindre, I. Berger, J. Deleforge och M. Chevalier. (1998) Differential pathogenic effect of two *Helicobacter*-like organisms in dog gastric mucosa. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30 (3): 425-433.
- Phadnis, S. H., M. H. Parlow, M. Levy, D. Ilver, C. M. Caulkins, J. B. Connors och B. E. Dunn. (1996). Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.* 64 (3): 905-12.
- Priestnall, S. L., B. Winberg, A. Spohr, B. Neuhaus, M. Kuffer, M. Wiedmann och K. W. Simpson. (2004). Evaluation of "*Helicobacter heilmannii*" subtypes in the gastric mucosas of cats and dogs. *J. Clin. Microbiol.* 42 (5): 2144-2151.
- Radin, M. J., K. A. Eaton, S. Krakowka, D. R. Morgan, A. Lee, G. Otto och J. Fox. (1990). *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect. Immun.* 58 (8): 2606-2612.
- Roe, I. H., J. T. Kim, H. S. Lee och J. H. Lee. (1999). Detection of *Helicobacter* DNA in bile from bile duct diseases. *J. Korean Med. Sci.* 14 (2): 182-186.
- Rossi, G., M. Rossi, C. G. Vitali, D. Fortuna, D. Burrioni, L. Pancotto, S. Capecchi, S. Sozzi, G. Renzoni, G. Braca, G. del Giudice, R. Rappuoli, P. Ghiara och E. Taccini. (1999). A conventional Beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 67 (6): 3112-3120.

- Savarino V., G. S. Mela, P. Zentilin, C. Mansi, M. R. Mele, N. Pandolfo, V. Pugliese och S. Vigna. (2000). Circadian gastric acidity and *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 45: 1079-83.
- Sharma, S. A., M. K. Tummuru, G. G. Miller och M. J. Blaser. (1995). Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.* 63 (5): 1681-1687.
- Shomer, N. H., C. A. Dangler, M. D. Schrenzel, M. T. Whary, S. Xu, Y. Feng, B. J. Paster, F. E. Dewhirst och J. G. Fox. (2001). Cholangiohepatitis and inflammatory bowel disease induced by a novel urease-negative *Helicobacter* species in A/J and Tac: ICR: HascidfRF mice. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 226 (5): 420-428.
- Silva, C. P., J. C. Pereira-Lima, A. G. Oliveira, J. B. Guerra, D. J. Marques, L. Sarmanho, M. M. D. Á. Cabral och D. M. M. Queiroz. (2003). Association of the presence of *Helicobacter* in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis. *J Clin Microbiol.* 41 (12): 5615-5618.
- Simpson, K. W., P. L. McDonough, D. Strauss-Ayali, Y. F. Chang, P. Harpending och B. A. Valentine. (1999). *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. *Vet. Pathol.* 36 (3): 237-48.
- Smoot, D. T., H. L. Mobley, G. R. Chippendale, J. F. Lewison och J. H. Resau. (1990). *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 58 (6): 1992-1994.
- Sobhani, I., A. Bado, Y. Cherifi, L. Moizo, J. P. Laigneau, D. Pospai, M. Mignon och M. J. Lewin. (1996). *Helicobacter pylori* stimulates gastric acid secretion via platelet activating factor. *J. Physiol. Pharmacol.* 47 (1): 177-85.
- Solnick, J. V., J. O'Rourke, A. Lee och L. S. Tompkins. (1994). Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. *Infect. Immun.* 62 (5): 1631-1638.
- Stanley, J., D. Linton, A. P. Burnens, F. E. Dewhirst, R. J. Owen, A. Porter, S. L. W. On och M. Costas. (1993). *Helicobacter canis* sp. Nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2495-2504.
- Stanley, J., D. Linton, A. P. Burnens, F. E. Dewhirst, S. L. W. On, A. Porter, R. J. Owen och M. Costas. (1994). *Helicobacter pullorum* sp. Nov. – genotype and phenotype of

- a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology (Reading)* 140: 3441-3449.
- Stoffel, M. H., A. E. Friess, A. Burnens, A. Schmassmann och R. Neiger. (2000). Distinction of gastric *Helicobacter* spp. in humans and domestic pets by scanning electron microscopy. *Helicobacter*. 5 (4): 232-239.
- Stolte, M., E. Wellens, B. Bethke, M. Ritter och H. Eidt. (1994). *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals? *Scand. J. Gastroenterol.* 29: 1061-1064.
- Strauss-Ayali, D., K. W. Simpson, A. H. Schein, P. L. McDonough, R. H. Jacobson, B. A. Valentine och J. Peacock. (1999). Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* spp. and uninfected dogs. *J. Clin. Microbiol.* 37 (5): 1280-1287.
- Svec, A., P. Kordas, Z. Pavlis och J. Novotny. (2000). High prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated gastritis in a small, predominantly rural area: further evidence in support of a zoonosis? *Scand. J. Gastroenterol.* 35 (9): 925-928.
- Thomson, M. A., P. Storey, R. Greer och G. J. Cleghorn. (1994). Canine-human transmission of *Gastrospirillum hominis*. *Lancet* 343: 1605-1607.
- Vajner, L., V. Vortel, B. Sýkorová, A. Brejcha och J. Zocová. (2000). *Helicobacter* gastritis in beagle dogs. Review of 33 cases in a breeding colony. *Eur. J. Vet. Pathol.* 6 (2): 49-55.
- Ward, J. M., M. R. Anver, D. C. Haines och R. E. Benveniste. (1994). Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol.* 145 (4): 959-968.
- Warren, J. R. och B. J. Marshall. (1983). Unidentified curved bacilli of gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1: 1273-1275.
- Warzecha, Z., A. Dembinski, P. Ceranowicz, M. Dembinski, R. Sendur och W. W. Konturek SJ. (2002). Deleterious effect of *Helicobacter pylori* infection on the course of acute pancreatitis in rats. *Pancreatology*. 2: 386-395.
- Whary, M. T. och J. G. Fox. (2004). Natural and experimental *Helicobacter* infections. *Comp. Med.* 54 (2):128-158.
- Wilson, K. T., K. S. Ramanujam, H. L. Mobley, R. F. Musselman, S. P. James och S. J. Meltzer. (1996). *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase

expression and activity in a murine macrophage cell line. *Gastroenterology*. 111 (6): 1524-1533.

Wotherspoon, A. C., C. Ortiz-Hidalgo, M. R. Falzon och P. G. Isacsson. (1991). *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*. 338 (8776): 1175-1176.

Yamasaki, K., H. Suematsu och T. Takahashi. (1998). Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212 (4): 529-533.