

Badania drobnoustrojów o morfologii *Helicobacter* w żołądku psów

RAFAŁ SAPIERZYŃSKI, ELŻBIETA MALICKA

Zakład Patologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Nowoursynowska 159c, 02-766 Warszawa

Sapierzyński R., Malicka E.

Helicobacter-like organisms in the stomach of dogs

Summary

The aim of the study was to estimate ultrastructural aspects of GHLO infection in dogs, evaluate GHLO morphology and prevalence, as well as the interaction between microorganisms and the hosts' cells. Electron microscopic examination of mucosae of gastric body samples of 20 dogs with recognized GHLO infection was conducted. GHLO presence was detected in 65% samples of gastric tissue. The ultrastructural examination of the samples led to the identification of two different forms of *Helicobacter*, specifically *Helicobacter bizzozeroni*-like and *Helicobacter felis*-like. Microorganisms were observed on the surface of gastric mucosae and in the superficial gastric mucous layer, but were also observed within gastric glands and parietal cells. Adhesion and other interactions between GHLO and the hosts' cells were not observed, which may explain the lack of damage of gastric tissue in dogs with GHLO infection.

Keywords: dog, stomach, *Helicobacter*

Choroby żołądka psów stwierdzane są dość często i to zarówno przyżyciowo, jak i w badaniach sekcyjnych (16, 17, 24). Bardzo często nie udaje się ustalić ich przyczyny, a stwierdzone objawy przypisuje się błędom żywieniowym, reakcjom immunologicznym itp. U ludzi ważną przyczyną zapalenia żołądka, wrzodów dwunastnicy i żołądka, a także nowotworów żołądka jest przewlekłe zakażenie *Helicobacter pylori*. Chorobotwórcze działanie bakterii z rodzaju *Helicobacter* wykazano także u fretek, gepardów i chomików syryjskich, a prawdopodobieństwo takiego wpływu istnieje u lwów, tygrysów, świń i kotów (12, 18).

Zakażenie drobnoustrojami o morfologii *Helicobacter* (GHLO – gastric *Helicobacter*-like organism) u psów jest rozpowszechnione i w zależności od badanej populacji waha się w granicach 61-100% (2, 9, 22, 27, 28). Dotychczas z żołądka psów wyizolowano 3 różne gatunki bakterii z rodzaju *Helicobacter*: *H. felis* (18), *H. bizzozeroni* (4) i *H. salomonis* (13). Mimo iż badania skutków zakażenia GHLO u psów prowadzone są już od 20 lat, nadal brak jest zgodności autorów na temat ich patogenego oddziaływania (6, 23, 25, 26, 28). GHLO stwierdzano zarówno u psów klinicznie zdrowych, jak i chorych z objawami chorób ze strony układu pokarmowego (28) oraz u zwierząt z potwierdzonym badaniem mikroskopowym zapaleniem żołądka (22). Eksperymentalne zakażenie psów *H. felis* doprowadziło do wystąpienia u nich miejscowej i ogólnej odpowiedzi immunologicznej (25).

Celem badań była ocena występowania bakterii o morfologii *Helicobacter* w żołądku psów, ich szczegółowej budowy, częstości występowania poszczególnych form

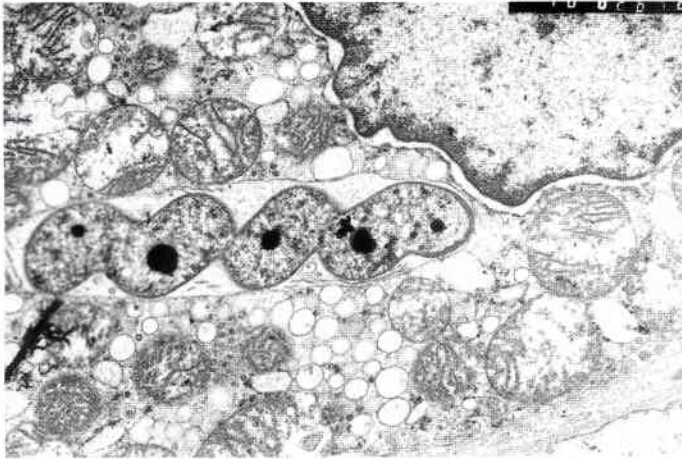
oraz interakcji zachodzących pomiędzy drobnoustrojami a komórkami gospodarza.

Material i metody

Materiał do badań stanowiły wycinki błony śluzowej trzonu żołądka pochodzące od 20 psów poddanych eutanazji w klinikach weterynaryjnych z różnych wskazań lekarskich, u których badaniem histopatologicznym oraz szybkim testem ureazowym wykazano zakażenie GHLO (23). Wycinki utrwalano w 2,5% aldehydzie glutarowym w buforze kakodylowym o pH 7,4, a następnie w 1% roztworze czterotlenku osmu w tym samym buforze. Odwadniano w alkoholach i tlenu propylenu i zatapiano w Eponie 812. Skrawki cienkie barwiono 1% roztworem błękitu toluidyny w 4% roztworze boraksu, a następnie wybierano bloczek do wykonania skrawków ultracienkich. Te ostatnie kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Dokumentację sporządzono w mikroskopie elektronowym transmisyjnym Jeol JEM 1220.

Wyniki i omówienie

Drobnoustroje o cechach morfologicznych *Helicobacter* stwierdzono u 13 na 20 (65%) badanych psów. Badania z użyciem mikroskopu elektronowego transmisyjnego pozwoliły na wykazanie dwóch różnych morfologicznie form bakterii należących do rodzaju *Helicobacter*, a mianowicie *H. bizzozeroni*-like (ryc. 1) i *Helicobacter felis*-like. Pierwszy z nich stwierdzono we wszystkich 13 przypadkach, drugi w 2 przypadkach. W obu przypadkach w materiale, w którym stwierdzono obecność *Helicobacter felis*-like stwierdzono też występowanie drobnoustrojów o cechach *Helicobacter bizzozeroni*-like (ryc. 2). *H. bizzozeroni*-like miały spiralną morfologię,

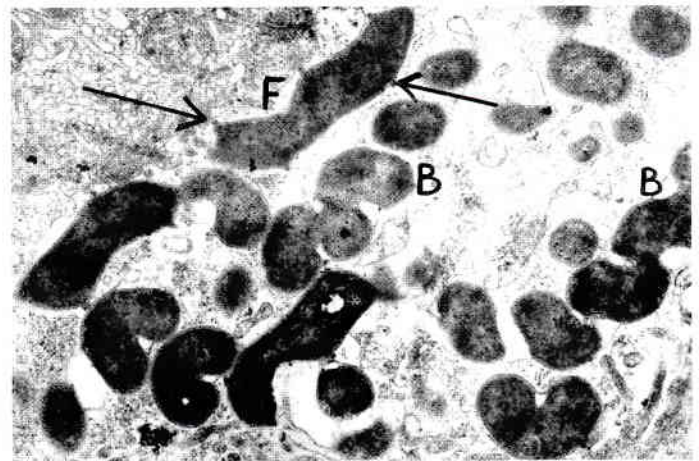


Ryc. 1. *Helicobacter bizzozeroni*-like w komórce okładzinowej w żołądku psa; mikroskop elektronowy transmisyjny, pow. 10 000 ×

posiadały 5-8 zwojów, nie posiadały włókienek okołoplazmatycznych, długość komórki mieściła się w granicach 5-7 μm , szerokość zaś 0,3-0,9 μm . *Helicobacter felis*-like cechowały się mniej spiralną budową, miały 5-6 zwojów na komórkę oraz włókienka okołoplazmatyczne występujące pojedynczo bądź w parach. Długość komórki bakteryjnej wynosiła 4,5-5 μm , a szerokość 0,4 μm .

Badania ultrastrukturalne były w przeszłości stosowane do wstępnego różnicowania różnych gatunków GHLO w wycinkach błony śluzowej żołądka pobranych od psów przyżyciowo w trakcie endoskopii, jak i pośmiertnie w badaniach sekcyjnych (4, 5, 9, 18, 23, 25, 26). W badaniach własnych na podstawie cech morfologicznych, takich jak długość komórki bakteryjnej, liczba zwojów, a także brak obecności lub obecność włókienek okołoplazmatycznych stwierdzono występowanie dwóch form drobnoustrojów określanych mianem *Helicobacter felis*-like i *Helicobacter bizzozeroni*-like. W innych badaniach ultrastrukturalnych z użyciem mikroskopu elektronowego transmisyjnego obie omawiane tutaj formy morfologiczne bakterii cechowały się podobną budową. Najczęściej stwierdzano występowanie *H. felis* z jednym lub dwoma włókienkami, jakkolwiek opisywano też formy z potrójnymi włókienkami, jak i bezwłókienkowe (6). Badanie w mikroskopie świetlnym nie pozwala na tak precyzyjną diagnostykę.

W dwóch przypadkach, w których stwierdzono obecność *H. felis* z włókienkami okołoplazmatycznymi stwierdzono także występowanie *H. bizzozeroni*, bez włókienek, co świadczy o często opisywanym zakażeniu mieszanym, z udziałem dwóch różnych gatunków *Helicobacter* (6, 18, 26). W badaniach z użyciem mikroskopu elektronowego transmisyjnego zdecydowanie częściej wykazywano w błonie śluzowej żołądka psów bakterie o morfologii *H. bizzozeroni* niż *H. felis*, co przemawia za tym, że w badanej populacji ten gatunek może być bardziej rozpowszechniony. Podobnie niskie rozpowszechnienie zakażenia *Helicobacter felis* stwierdził Hwang i wsp. (11), który badając skrawki błony śluzowej żołądka stwierdził obecność tego gatunku bakterii jedynie u 4,8% badanych psów. Wyniki innych prac, w których oceniano częstość występowania poszczególnych gatunków *Helicobacter* spp. u psów poprzez zastosowanie



Ryc. 2. Zakażenie mieszane z udziałem dwóch form morfologicznych GHLO: *Helicobacter bizzozeroni*-like (B) oraz *Helicobacter felis*-like (F) w świetle gruczołów właściwych w żołądku psa, widoczne włókienka okołoplazmatyczne; mikroskop elektronowy transmisyjny, pow. 6600 ×

hodowli bakteryjnej (6, 14) i metody PCR (19) także wskazują na częstsze występowanie u psów naturalnego zakażenia z udziałem *H. bizzozeroni*/*H. salomonis* niż *H. felis*.

Bakterie stwierdzono zarówno w śluzie powierzchniowym pokrywającym błonę śluzową żołądka, w śluzie dołeczków żołądkowych, w świetle gruczołów właściwych żołądka i gruczołów części odźwiernikowej żołądka, jak i w kanalikach wydzielniczych komórek okładzinowych i w cytoplazmie tych komórek. Drobnoustroje o lokalizacji wewnątrzkomórkowej bywały otoczone błoną lub leżały luźno w cytoplazmie komórki pomiędzy organellami komórkowymi lub niekiedy blisko jądra komórkowego. Nie stwierdzono bakterii w innych niż komórki okładzinowe komórkach nabłonka żołądka ani też w obrębie błony śluzowej właściwej żołądka. Podobną lokalizację opisują inni autorzy (6, 9, 25, 26). Niekiedy bakterie widoczne były jedynie w świetle gruczołów, w innych przypadkach gruczoły żołądkowe nie były zasiedlone.

W obrębie komórek okładzinowych stwierdzano obecność zarówno *Helicobacter felis*-like, jak i *Helicobacter bizzozeroni*-like. Badania innych autorów wskazują, że komórki okładzinowe kolonizowane przez *Helicobacter* często wykazywały cechy zwyrodnienia przejawiające się wakuolizacją cytoplazmy i zmianami dotyczącymi jądra komórkowego, jednakże nie rozstrzygnięto czy bakterie powodują te zmiany, czy też zasiedlają one komórki, które wcześniej uległy zwyrodnieniu (28). Peyrol i wsp. (21) stosując badania z użyciem mikroskopu elektronowego transmisyjnego zaobserwowali, że u zwierząt z naturalnym zakażeniem *H. felis*-like uszkodzenia komórek okładzinowych były większe niż u zwierząt z naturalnym zakażeniem *H. bizzozeroni*-like. Dotychczas nikt jednak nie potwierdził tych obserwacji, podobnie w badaniach własnych takich różnic nie stwierdzono. Nie stwierdzono też, aby komórki okładzinowe kolonizowane przez GHLO częściej wykazywały zmiany zwyrodnieniowe niż komórki okładzinowe bez kolonizacji bakteryjnej, podobne obserwacje poczynił Henry i wsp. (9). Cechy zwyrodnienia stwierdzano także w komórkach nie skolonizowanych

przez drobnoustroje, nawet u zwierząt bez zakażenia GHLO. Nie wydaje się więc prawdopodobne, aby te drobnoustroje były przyczyną uszkodzenia komórek gruczołowych żołądka.

W żadnym z badanych przypadków z zastosowaniem mikroskopu elektronowego transmisyjnego nie stwierdzono adhezji ani asocjacji GHLO z jakimkolwiek typem komórek nabłonka żołądka. Wydaje się to o tyle dziwne, że obserwowano bakterie wewnątrz komórek okładzinowych leżące luźno w cytoplazmie i nie otoczone przez żadne błony. Wiadomo, że *Helicobacter pylori* posiada zdolność adhezji do komórek nabłonka żołądka człowieka (1, 7, 15), a *Helicobacter mustelae* reaguje w ten sam sposób z komórkami nabłonka żołądka fretek (20). Adhezja jest jednym z czynników patogenności bakterii i w przypadku *Helicobacter* spp. jest ona zależna od ilości fosfatydyletanolaminy w komórkach nabłonkowych i od różnic profilu kwasów tłuszczowych budujących lipidy tych komórek (3). W warunkach *in vitro* bakterie najbardziej intensywnie przylegają do komórek nabłonka części odzwiernikowej żołądka człowieka, ale także małą i świń (15).

Wydaje się, że adhezja bakterii do komórek gospodarza nie tylko ułatwia długotrwałe utrzymywanie się *H. pylori* w żołądku, ale też odgrywa istotną rolę w patogeniezie zmian destrukcyjnych błony śluzowej (20). Hassey i wsp. (7) stwierdzili, że adhezja dużej liczby komórek *H. pylori* do komórek nabłonka żołądka związana była z większym nasileniem zmian uszkodzeniowych dotyczących komórek nabłonka żołądka.

W badaniach własnych adhezji GHLO do komórek błony śluzowej żołądka nie obserwowano. Brak tego typu interakcji pomiędzy bakteriami a komórkami gospodarza może w znacznym stopniu ograniczać szkodliwe działanie GHLO na organizm psów. Podobne wnioski w odniesieniu do zakażenia ludzi *Helicobacter heilmanni*, drobnoustrojem, który morfologicznie bardzo przypomina stwierdzane u psów GHLO, można wyciągnąć z innych badań. Autorzy ci nie obserwowali adhezji bakterii do komórek nabłonka żołądka człowieka, co według nich może być związane z brakiem zmian uszkodzeniowych dotyczących komórek i zdecydowanie słabiej wyrażonymi zmianami patologicznymi, mniej nasilonym odczynem zapalnym przy zakażeniu ludzi *Helicobacter heilmanni* w stosunku do zakażenia *Helicobacter pylori* (8, 10). W badaniach własnych naciek komórkowy zapalny łagodny bądź umiarkowanego stopnia stwierdzono jedynie w 3 przypadkach, w których obserwowano obecność GHLO. W większości przypadków (pozostałych 10 psów) w błonie śluzowej żołądka psów brak było stanu zapalnego mimo potwierdzonej kolonizacji tych bakterii (23).

Reasumując należy zaznaczyć, że badania z użyciem mikroskopu elektronowego transmisyjnego pozwalają poznać szczegółową morfologię GHLO, wstępnie różnicować poszczególne gatunki tych bakterii, oceniać ultrastrukturę komórek błony śluzowej oraz interakcje zachodzące pomiędzy komórkami gospodarza, a bakteriami. Brak adhezji bakterii do komórek nabłonka żołądka może w znacznym stopniu ograniczać szkodliwe działanie GHLO na organizm psów.

Piśmiennictwo

- Bartel H., Orkisz S., Chojnacki J., Kulig A.: Some ultrastructural aspects of *Helicobacter pylori* gastritis. Pat. Pol. 1992, 43, 16-18.
- Eaton K. A., Dewhirst F. E., Paster B. J., Tzellas N., Coleman B. E., Paola J., Sherding R.: Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs; animal and public health implications. J. Clin. Microbiol. 1996, 34, 3165-3170.
- Gold B. D., Dytoc M., Huesca M., Philpott D., Kuksis A., Czim S., Lingwood C. A., Sherman P. M.: Comparison of *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* adhesion to eucaryotic cells *in vitro*. Gastroenterology 1995, 109, 692-700.
- Hanninen M. L., Happonen I., Saari S., Jalava K.: Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. Int. J. Syst. Bacteriol. 1996, 46, 160-166.
- Happonen I., Saari S., Castrén L., Tyni O., Hanninen M.-L., Westermarck E.: Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. J. Vet. Med. 1996, 43, 305-315.
- Happonen I., Linden J., Saari S., Karjalainen M., Hanninen M.-L., Jalava K., Westermarck E.: Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998, 213, 1767-1774.
- Hassey S. J., Spencer J., Wyatt J. I., Sobala G., Hathbone B. J., Axon A. T. R., Dixon M. F.: Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter*-associated chronic gastritis. Gut 1990, 31, 134-138.
- Heilmann K. L., Borchard F.: Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrastructural findings. Gut 1991, 32, 137-140.
- Henry G. A., Long P. H., Burns J. L., Charbonneau D. L.: Gastric spirillitis in beagles. Am. J. Vet. Res. 1987, 48, 831-836.
- Holck S., Ingeholm P., Blom J., Norgaard A., Elsborg L., Adamsen S., Andersen L. P.: The histopathology of human gastric mucosa inhabited by *Helicobacter heilmannii*-like (*Gastrospirillum hominis*) organisms, including the first culturable case. APMIS. 1997, 105, 746-756.
- Hwang C. Y., Han H. R., Youn H. Y.: Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. (Abstr.) J. Vet. Sci. 2002, 3, 123-133.
- Jakob W., Stolte M., Valentin A., Schroder H.-D.: Demonstration of *Helicobacter pylori*-like organisms in the gastric mucosa of captive exotic carnivores. J. Comp. Path. 1997, 116, 21-33.
- Jalava K., Kaartinen M., Utriainen M., Happonen I., Hanninen M.-L.: *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeroni*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997, 47, 975-982.
- Jalava K., On S. L. W., Vandamme P.: Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosae. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 3998-4006.
- Janas B., Bartel H.: Ultrastrukturalne aspekty adhezji *Helicobacter pylori* do komórek śluzowych nabłonka żołądkowego. Gastroenterologia Pol. 1997, 4, 45-50.
- Kubiak K., Nicpoń J., Jankowski M., Nicpoń J., Spużak J.: Wrzody żołądka u psów. Medycyna Wet. 2004, 60, 708-710.
- Kubiak K., Jankowski M., Nicpoń J., Spużak J.: Gastroskopia w rozpoznawaniu nowotworów żołądka u psów. Medycyna Wet. 2004, 60, 836-838.
- Lee A., Hazell S. L., O'Rourke J., Koupach S.: Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. Infect. Immun. 1988, 56, 2843-2850.
- Neiger N., Tschudi M. E., Burnens A., Goke B., Schmassmann.: Diagnostic and identification of gastric *Helicobacter* species by polymerase chain reaction in dogs. Microbiol. Ecol. Health Dis. 1999, 11, 234-240.
- O'Rourke J., Fox J. G.: An ultrastructural study of *Helicobacter mustelae* and evidence of specific association with gastric mucosa. J. Med. Microbiol. 1992, 36, 420-427.
- Peyrol S., Lecoindre P., Berger I.: Differential pathogenic effect of two *Helicobacter*-like organisms in dog's gastric mucosa. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1998, 30, 425-433.
- Sapierzyński R., Malicka E., Bielecki W., Sendecka H.: The presence of *Helicobacter*-like microorganisms in the gastric mucosa in dogs. Pol. J. Vet. Sci. 2003, 6, 247-252.
- Sapierzyński R.: Patomorfologiczne badania błony śluzowej żołądka psów przy zakażeniu *Helicobacter* spp. Praca dokt., Wyd. Med. Wet. SGGW, Warszawa 2003.
- Sapierzyński R., Galanty M.: Wrzody żołądka u psów. Medycyna Wet. 2004, 60, 392-395.
- Simpson K. W., McDonough P. L., Strauss-Ayali D., Chang Y. F., Harpending P., Valentine B. A.: *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. Vet. Pathol. 1999, 36, 237-248.
- Simpson K. W., Strauss-Ayali D., McDonough P. L., Chang Y. F., Valentine B. A.: Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. infection. J. Vet. Intern. Med. 1999, 13, 507-515.
- Sobczyńska-Rak A., Różańska D.: *Helicobacter* u zwierząt i ludzi. Medycyna Wet. 2004, 60, 132-136.
- Yamasaki K., Suematsu H., Takahashi T.: Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998, 212, 529-533.

Adres autora: dr Rafał Sapierzyński, ul. Nowosynowska 159c, 02-776 Warszawa; e-mail: sapieh@onet.poczta.pl