

# Przeciwciała w zakażeniach *Helicobacter* spp. u psów

GRAŻYNA GOŚCINIĄK, MONIKA BIERNAT, KRZYSZTOF KUBIAK\*,  
KATARZYNA PAWLUS, JOANNA GRABIŃSKA, MARCIN JANKOWSKI\*

Katedra i Zakład Mikrobiologii AM, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław

\*Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, Pl. Grunwaldzki, 50-366 Wrocław

Gościniak G., Biernat M., Kubiak K., Pawlus K., Grabińska J., Jankowski M.

## Serum antibodies to *Helicobacter* spp. in dogs

### Summary

The aim of the study was to evaluate the frequency of the presence of antibodies to *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis* antigens in dogs. One hundred thirty two dogs of different age and sex were included in the study and divided in two groups. Serum samples and gastric biopsy specimens were taken during gastrointestinal endoscopy. The examined group consisted of 102 dogs with dyspeptic symptoms and pathological changes in gastric mucosa. The control group contained 30 clinically healthy animals. In the examined group *Helicobacter* spp. infection was established by direct microscopy and urease test. It was detected in 89.2% of the dogs, whereas in the control group, in 96.7% animals. In the culture of gastric biopsy specimens *Helicobacter felis* was the most frequently isolated strain. The anti-*H. pylori* IgG antibodies were detected in 24.5% serum samples of the examined dogs. The anti-*H. felis* IgG antibodies were identified in 30.4% samples of animals with gastritis and in 20% of healthy animals respectively. Antibodies of *H. pylori* antigens were not evaluated in healthy dogs. The antibodies to *H. pylori* and *H. felis* antigens were detected more frequently in dogs with gastritis than in healthy dogs.

**Keywords:** dogs, *Helicobacter* spp., antibodies

Pierwsze informacje o występowaniu bakterii spiralnego kształtu w żołądkach zwierząt pochodzą z końca XIX wieku (12, 14). W 1892 r. włoski badacz Giulio Bizzozero opisał spiralne bakterie w żołądku psów. W późniejszym okresie również inni autorzy Salomon (1896), Jaworski (1899), Krienitz (1906), Weber (1958) stwierdzili drobnoustroje o podobnym wyglądzie w żołądku ludzi i zwierząt. Dominował jednak pogląd, iż w związku z wydzielaniem kwasu solnego w świetle żołądka panują sterylne warunki i sama obecność kwasu wystarcza do uszkodzenia błony śluzowej, w myśl stwierdzenia Schwarza – no acid no ulcer, czyli nie ma wrzodu bez kwasu. Dopiero po wyizolowaniu w 1983 r. przez Warrena i Marshalla drobnoustrojów kształtu spiralnego, nazwanych później *Helicobacter pylori*, naukowcy szerzej zajęli się ich patogennym wpływem na przewód pokarmowy człowieka i zwierząt (1, 4, 18). Rozwój nauki z wykorzystaniem technik molekularnych i mikroskopii elektronowej, pozwolił na identyfikację wielu gatunków drobnoustrojów należących do rodzaju *Helicobacter*. W żołądku psów zidentyfikowano *H. felis*, *H. heilmannii* (dawniej nazwane *Gastrospirillum hominis*), *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. canis*, *H. cynogastricus* (1, 4, 8, 17).

Przewlekłe zapalenie żołądka występuje u psów dość często. Do tej pory rzadko dociekano przyczyn stanu zapalnego u tych zwierząt, wiążąc go zazwyczaj z obecnością pasożytów, reakcją na antygeny bakteryjne, aler-

gią lub nietolerancją na pokarmy. Wielu badaczy sugeruje, że wyjaśnieniem etiologii stanu zapalnego może być obecność bakterii z rodzaju *Helicobacter* w żołądku zwierząt (13). Poznanie związku między zakażeniem *Helicobacter* spp. a zapaleniem żołądka u psów utrudnia fakt, że diagnostyka bakteriologiczna jest procedurą inwazyjną, wymagającą pobrania w trakcie badania endoskopowego wycinków śluzówki żołądka. Dlatego poszukiwanie nieinwazyjnych metod diagnostycznych potwierdzających zakażenie *Helicobacter* jest sprawą wciąż aktualną (11).

Celem badań było określenie częstości występowania przeciwciał skierowanych przeciw antygenom *H. pylori* i *H. felis* u psów.

## Materiał i metody

Ogółem badaniami objęto 132 psy, od których próbki surowic oraz wycinki śluzówki żołądka pobrano w Katedrze Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów przy Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu.

Trzydzieści psów zaliczono do grupy kontrolnej (zwierzęta zdrowe), u których na podstawie wywiadu, badania klinicznego, wyników badań hematologicznych i biochemicznych krwi nie stwierdzono żadnych zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu, a podczas badania endoskopowego (ocena makroskopowa) nie obserwowano zmian w błonie śluzowej, uznając ją za prawidłową. Grupę badaną stanowiły 102 zwierzęta z objawami dyspeptycznymi, wskazującymi na choroby żołądka (wy-

mioty, zmniejszony lub brak apetytu, *fetor ex ore*, postępująca utrata masy ciała, bolesność okolicy żołądka). Do grupy badanej włączono także zwierzęta, u których nie zanotowano opisanych objawów, ale u których podczas gastroskopii stwierdzano makroskopowe zmiany w błonie śluzowej, wskazujące na zapalenie żołądka.

Z pobranych wycinków błony śluzowej żołądka wykonano: test na produkcję ureazy, badanie bakteriologiczne, badania histopatologiczne i preparat bezpośredni mikrobiologiczny barwiony metodą Grama.

Wycinki błony śluzowej żołądka, bezpośrednio po pobraniu, nakładano na bibułowy krążek szybkiego testu urazowego (producent – Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie). Zasada testu urazowego opiera się na ocenie zdolności produkcji przez drobnoustroje z rodzaju *Helicobacter* dużej ilości ureazy, która hydrolizuje w krótkim czasie (30-60 minut) zawarty w krążku bibułowym mocznik do dwutlenku węgla i amoniaku, powodując alkalizację środowiska, a tym samym, zmianę zabarwienia wskaźnika.

Do badań bakteriologicznych przeznaczano następne wycinki, które poddawano homogenizacji i posiewano na podłoża wzrostowe: Columbia agar z dodatkiem 7% zhemolizowanej krwi końskiej, Columbia agar z dodatkiem 7% zhemolizowanej krwi końskiej oraz selektywnym suplementem według Denta (firmy Oxoid), Brucella agar z dodatkiem 7% zhemolizowanej krwi końskiej i suplementem zawierającym: wankomycynę, polimiksynę i trimetoprim. Hodowlę inkubowano w 37°C przez 7-14 dni w warunkach mikroaerofilnych (10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> i 5% O<sub>2</sub>). Wyizolowane szczepy *Helicobacter* różnicowano biochemicznie (Api Campy firmy BioMerieux).

Badanie serologiczne w kierunku obecności przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciw *H. pylori* i *H. felis* wykonano w surowicach zwierząt rozcieńczonych 1 : 400 przy zastosowaniu metody ELISA opisanej przez Gościński i wsp. (5). Wyniki odczytywano przy długości fali 450 nm na czytniku Dynatech MR500. Próbę uznawano za dodatnią, jeżeli wartość ekstynkcji wynosiła 0,45 i powyżej.

## Wyniki i omówienie

W ciągu ostatnich lat w żołądku psów zidentyfikowano wiele różnych gatunków z rodzaju *Helicobacter* oraz wykazano współwystępowanie kilku różnych gatunków tych drobnoustrojów u jednego zwierzęcia (3, 8, 9, 16). Interesujące jest, że często zakażenie tymi bakteriami nie powoduje żadnych objawów klinicznych, a częstość występowania infekcji *Helicobacter spp.* jest podobna

u zwierząt chorych, jak i u zwierząt bez żadnych dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego (6, 7, 12). W piśmiennictwie nie brak jest danych potwierdzających związek zakażenia *H. felis*, jednego z głównych gatunków wykrywanych w żołądku psów i kotów, z powstawaniem zmian zapalnych żołądka oraz wywoływaniu raka żołądka, podobnie jak ma to miejsce w przypadku zakażenia *H. pylori* u ludzi (10). Pomimo prowadzonych w licznych ośrodkach badań wiele pytań dotyczących udziału drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* u zwierząt pozostaje wciąż bez odpowiedzi.

Wyniki badań własnych wykazały, że w grupie badanej 102 psów zakażenie *Helicobacter species* na podstawie preparatu bezpośredniego oraz testu ureazowego wykazano u 89,2%, natomiast w grupie kontrolnej 30 psów, bez żadnych dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego oraz bez żadnych zmian zapalnych w obrębie błony śluzowej żołądka, wyniki testów ureazowych oraz preparat bezpośredni były dodatnie u 96,7% zwierząt (tab. 1). Wyniki te są zbliżone z danymi z piśmiennictwa. Sapieryński i wsp. (14) otrzymali nieco niższy wynik testu ureazowego, który był dodatni u 85,1% badanych psów. Natomiast Jalava i wsp. (9) u 95 psów, gdzie 54 były to psy zdrowe, 23 – z objawami klinicznymi, a 18 zostało poddanych eutanazji z różnych przyczyn, otrzymali pozytywny wynik testu ureazowego u 100% zwierząt. Dane te wskazują, że w biopatach pobranych z żołądka drobnoustroje wytwarzające ureazę, do których należy większość gatunków z rodzaju *Helicobacter*, występują powszechnie tak u zwierząt zdrowych, jak i chorych (2).

Częstość występowania różnych gatunków z rodzaju *Helicobacter* została określona przy użyciu metod hodowlanych. Spośród 25 dodatnich hodowli najczęściej stwierdzano wzrost *H. felis* (tab. 2). O trudnościach w zastosowaniu mikrobiologicznych metod hodowlanych donosiło wielu autorów. Happonen i wsp. (6) pozytywne wyniki hodowli otrzymali u 3 spośród 8 przebadanych psów i u 1 spośród 6 przebadanych kotów, przy czym najczęściej izolowanymi gatunkami były: *Helicobacter heilmannii* like organisms oraz *Helicobacter felis*. Z przeprowadzonej analizy uzyskanych wyników oraz na podstawie danych z piśmiennictwa można wnioskować, iż metody hodowlane są trudne, czasochłonne, wymagają specjalnych podłoży hodowlanych, warunków temperaturowych i atmosferycznych i pomimo spełnienia tych wymogów bardzo często kończą się niepowodzeniem.

Tab. 1. Częstość występowania drobnoustrojów z rodzaju *Helicobacter* w błonie śluzowej żołądka psów z różnym rozpoznaniem klinicznym

Rozpoznanie kliniczne	Grupa badana			Grupa kontrolna		
	Liczba zwierząt	<i>Helicobacter spp.</i> w preparacie bezpośrednim	Dodatni test ureazowy	Liczba zwierząt	<i>Helicobacter spp.</i> w preparacie bezpośrednim	Dodatni test ureazowy
Zapalenie błony śluzowej żołądka	73	66 (90,4%)	66 (90,4%)	0	0	0
Wrzód żołądka	4	3 (75,0%)	4 (100%)	0	0	0
Rak żołądka	4	4 (100%)	4 (100%)	0	0	0
Błona śluzowa prawidłowa	21	18 (85,7%)	17 (81,0%)	30	29 (96,7%)	29 (96,7%)
Suma	102	91 (89,2%)	91 (89,2%)	30	29 (96,7%)	29 (96,7%)

W celu określenia charakteru odpowiedzi immunologicznej u badanych zwierząt wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA. Opierając się na badaniach prowadzonych u ludzi z zakażeniem *H. pylori*, dotyczących obecności przeciwciał anty-*H. pylori* w surowicy zakażonych

Tab. 2. Częstość występowania różnych gatunków *Helicobacter* u psów

Grupa zwierząt	Badanie bakteriologiczne <i>Helicobacter</i>				Przeciwciała IgG anty- <i>Helicobacter</i>	
	<i>pylori</i>	<i>heilmannii</i>	<i>felis</i>	<i>spp</i> *	<i>pylori</i>	<i>felis</i>
Badana 102	0	0	17 (16,7%)	2 (2%)	25 (24,5%)	31 (30,4%)
Kontrolna 30	0	0	6 (20,0%)	0	0	6 (20%)
Suma 132	0	0	23 (17,4%)	2 (1,5%)	25 (18,9%)	37 (28%)

Tab. 3. Występowanie przeciwciał skierowanych przeciw antygenom *Helicobacter spp.* u psów

Rozpoznanie kliniczne	Przeciwciała IgG	
	anty- <i>H. pylori</i>	anty- <i>H. felis</i>
Zapalenie błony śluzowej żołądka	28,4%	29,63%
Błona śluzowa prawidłowa	3,92%	17,65%

Tab. 4. Występowanie przeciwciał anty-*Helicobacter spp.* w zależności od wieku psów

Wiek	Obecność przeciwciał skierowanych przeciw	
	<i>H. pylori</i>	<i>H. felis</i>
< 1	16,7%	33,3%
1-5	24,4%	26,8%
> 5	18,2%	36,4%

chorych, przyjęto założenie, że w surowicy zwierząt również występują przeciwciała anty-*Helicobacter*. W niniejszych badaniach wykryto przeciwciała klasy IgG przeciw antygenom *H. pylori* u 25 (24,5%) chorych psów. Dodatnią reakcję z antygenami *H. felis* stwierdzono u 31 (30,4%) zwierząt z grupy badanej i u 6 (20%) z grupy kontrolnej. W grupie zdrowych psów nie wykryto przeciwciał skierowanych przeciw antygenom *H. pylori* (tab. 2).

W grupie psów z objawami dyspeptycznymi i zmianami w obrębie błony śluzowej żołądka obecność przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi *H. pylori* wykryto u 28,4% psów, a przeciw antygenom *H. felis* u 29,63%. U zwierząt z dolegliwościami ze strony przewodu pokarmowego, ale z prawidłową błoną śluzową przeciwciała dla *H. pylori* stwierdzono w 3,92%, a dla *H. felis* w 17,65% badanych surowic (tab. 3). W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest publikacji dotyczących tego zagadnienia u zwierząt. Strauss-Ayali i wsp. (15) badali częstość występowania przeciwciał IgG przeciw antygenom *H. pylori* i *H. felis* u psów z objawami gastrycznymi i u psów zdrowych. Wykazali wyższą częstość występowania przeciwciał w grupie chorych zwierząt niż w grupie kontrolnej. Natomiast Wiinberg i wsp. (19) nie stwierdzili korelacji pomiędzy infekcją *Helicobacter spp.* a ekspresją cytokin prozapalnych, stopniem nasilenia zmian zapalnych w żołądku i poziomem przeciwciał obecnych w surowicy badanych psów.

Biorąc pod uwagę podział badanych psów na grupy wiekowe, stwierdzono, iż częstość występowania prze-

ciwciał skierowanych przeciw antygenom *H. felis* była najwyższa u psów poniżej pierwszego roku życia oraz powyżej 5 lat (tab. 4). Wyniki te stanowią w pewnym stopniu potwierdzenie obserwacji poczynionych przez Sapierzyńskiego i wsp. (14), którzy izolowali drobnoustroje z rodzaju *Helicobacter* najczęściej od zwierząt do 6 miesiąca życia i powyżej 5 lat.

Wyniki badań własnych wskazują na występowanie znacznie częściej podwyższonego poziomu przeciwciał skierowanych przeciw antygenom *Helicobacter felis* u psów z zakażeniem tym drobnoustrojem i z objawami dyspeptycznymi niż u zwierząt zdrowych.

## Piśmiennictwo

- Andersen L. P.: New *Helicobacter* species in humans. Dig. Dis. 2001, 19, 112-115.
- Beale M., Van den Bulck K., Decostere A., Vandamme P., Hanninen M. L., Ducatelle R., Haesebrouck F.: Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 1115-1122.
- De Bock M., Van den Bulck K., Hellemans A., Daminet S., Coche J. C., Debongnie J. C., Decostere A., Haesebrouck F., Ducatelle R.: Peptic ulcer disease associated with *Helicobacter felis* in a dog owner. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2007, 19, 79-82.
- Fox J. G.: The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. Gut 2002, 50, 273-293.
- Gościński G.: IgG and IgA antibodies in *Helicobacter pylori* infections. Zntb. Bacteriol. 1992, 286, 494-502.
- Happonen I., Linden J., Saari S., Karjalainen M., Hanninen M. L., Jalava K., Westermarck E.: Detection and effects of *Helicobacter* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998, 213, 1767-1774.
- Hwang C. Y., Han H. R., Youn H. Y.: Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. J. Vet. Sci. 2002, 3, 123-133.
- Jalava K., Kaartinen M., Utriainen M., Happonen I., Hänninen M. L.: *Helicobacter salomonis* sp. Nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997, 47, 975-982.
- Jalava K., On S. L., Vandamme P. A., Happonen I., Sukura A., Hänninen M. L.: Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 3998-4006.
- Kobayashi M., Lee H., Schaffer L., Gilmartin T. J., Head S. R., Takaishi S., Wang T. C., Nakayama J., Fukuda M.: A distinctive set of genes is upregulated during the inflammation-carcinoma sequence in mouse stomach infected by *Helicobacter felis*. J. Histochem. Cytochem. 2007, 55, 263-274.
- Prachasilpchai W., Nuanualsuwan S., Chatsuwat T., Techanbamsuwan S., Wangnaitam S., Sailasuta A.: Diagnosis of *Helicobacter* spp. infection in canine stomach. J. Vet. Sci. 2007, 8, 139-145.
- Recordati C., Gualdi V., Tosi S., Facchini R. V., Pengo G., Luini M., Simpson K. W., Scanziani E.: Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. Vet. Microbiol. 2007, 119, 346-351.
- Sapierzyński R., Malicka E.: Effect of gastric *Helicobacter*-like organisms on gastric epithelial cell proliferation rate in dogs. Pol. J. Vet. Sci. 2004, 7, 275-281.
- Sapierzyński R., Malicka E., Bielecki W., Sendek H.: The presence of *Helicobacter*-like microorganisms in the gastric mucosa in dogs. Pol. J. Vet. Sci. 2003, 6, 247-252.
- Strauss-Ayali D. S., Simpson K. W., Schen A. H., McDonough P. L., Jacobson R. H., Valentine B. A., Peacock J.: Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* sp. and infected dogs. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 1280-1287.
- Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Driesse A., Debongnie J. C., Burette A., Stolte M., Ducatelle R., Haesebrouck F.: Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs and cats. J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 2256-2260.
- Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Vandamme P., Mast J., Ducatelle R., Haesebrouck F.: *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. J. Sys. Evl. Microbiol. 2006, 56, 1559-1564.
- Weber A. F., Hasa O. H., Sauter J. H.: Some observations concerning the presence of spirilla in the fundus glands of dogs and cats stomach. Am. J. Vet. Res. 1958, 19, 677-680.
- Wiinberg B., Spohr A., Dietz H. H., Egelund T., Greiter-Wilke A., McDonough S., Olsen J., Priestnall S., Chang Y. F., Simpson K. W.: Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. infection. J. Vet. Intern. Med. 2005, 19, 4-14.

Adres autora: dr hab. Grażyna Gościński, ul. Chalubińskiego 4, 50-368 Wrocław; e-mail: gosgra@mbio.am.wroc.pl