

**KUNĢA *HELICOBACTER SPP.* IZPLATĪBA JENOTSUŅIEM  
KOREJAS REPUBLIKAS ČONBUKAS PROVINĒ**

**PREVALENCE OF GASTRIC *HELICOBACTER SPP.* IN FERAL  
RACCOON DOGS IN REPUBLIC OF KOREA, CHONBUK PROVINCE**

**Bērziņa Dace, Birģele Edīte**

LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

Faculty of Veterinary Medicine, LUA, Latvia

[daceberzina@yahoo.co.uk](mailto:daceberzina@yahoo.co.uk)

**ABSTRACT**

This study was done to evaluate the prevalence of *Helicobacter* like organisms in the stomach of feral raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Chonbuk province at the Southwest part of Korea. Mucosal samples were taken from several places of stomach (*fundus, corpus, antrum*), oesophagus and duodenum to detect *Helicobacter spp.* with urease test, brush cytology, light histological investigation and polimerase chain reaction (PCR). All sampled animals showed positive urease test and the presence of tightly spiraled *Helicobacter* like organisms. Positive urease test was observed in 73,0% of all examined samples. *Helicobacter* like microorganisms were demonstrated in 96,7% of all examined samples by brush cytology and 82,9% - by histological examination. In comparison of gastric regions, the fundus of stomach is the most affected site. Almost all of the examined samples (100%) by used detection methods were positive for *Helicobacter spp.* in the *fundus* of stomach. Urease test results were controled after 10, 30 and 60 minutes. Amount of positive samples increased with the checking time, so it is advisable to read the results of the test after 60 minutes of reaction. All of stomach samples taken for PCR assay showed positive for *Helicobacter* genus specific primer *Hcom1* and *Hcom3*. This is the first investigation of the presence of *Helicobacter spp.* in the stomach of wild raccoon dogs in Republic of Korea.

**KEY WORDS:** *Helicobacter* like organisms, gastric mucosa, feral raccoon.

## IEVADS

*Helicobacter spp.* konstatētas gan cilvēku, gan dzīvnieku gastrointestinālajā traktā. Daudzas no tām tiek uzskatītas par patogēnām, kas var izraisīt dažādas kuņģa, zarnu un aknu patoloģijas, visbiežāk kuņģa čūlas, gastroeneterītu, audzējus un hepatītu. Savukārt citas *Helicobacter spp.* baktērijas tiek uzskatītas kā normāla zarnu mikroflora. Pirmo reizi patogēno *Helicobacter pylori* izolēja 1984. gadā cilvēkiem, kas slimoja ar kuņģa čūlu un gastrītu (Marshall, Warren, 1984). Vēlāk dažādas helikobaktēriju sugas atklātas arī dzīvniekiem: suņiem, kaķiem, cūkām, gepardiem, seskiem, polārlāčiem, delfīniem, pērtiķiem, jūras lauvām, grauzējiem (Bronson, 1991, Lee, 1992, Eaton, 1993, Fox, 1995, Eaton 1996, Jalava, 1997, Neiger, 1998, Oxley, 2004).

Noskaidrots, ka *Helicobacter spp.* galvenokārt ir fakultatīvi anaerobas, gramnegatīvas, spirālveida baktērijas ar multiplām terminālām viciņām un augstu ureāzes aktivitāti, kas ļauj tām izdzīvot skābā vidē. Uzskata, ka baktēriju avots pamatā ir kontaminēta barība vai fekālijas, kas tiek uzņemtas perorāli (Bussac, 1999).

Lai noteiktu *Helicobacter pylori* klātbūtni gremošanas traktā tiek izmantotas dažādas diagnostikas metodes. Izmanto t.s. invazīvās metodes, pie kurām pieder ātrais ureāzes tests, gļotādas virsmas noburzumu citoloģija, histoloģiskā izmeklēšana, elektronmikroskopija, kultivēšana uz barotnēm, DNS izolēšana no gļotādas parauga un noteikšana ar polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR). Izmanto arī t.s. neinvazīvās metodes - seroloģiju, urīnvielas elpas testu, *H. pylori* antigēna noteikšanu fekāliju paraugā (Happonen, 1996).

Mūsu **pētījuma mērķis** bija noskaidrot *Helicobacter spp.* sastopamību savvaļas jenotsuņiem (*Nyctereutes procyonoides*), izmantojot dažādas diagnostikas metodes.

### **Darba uzdevumi:**

1. Izpētīt *Helicobacter spp.* sastopamību jenotsuņu kuņģa dažādās vietās - *fundus*, *corpus* un *antrum* daļā;
2. Noskaidrot, vai jenotsuņiem *Helicobacter spp.* ir sastopamas barības vadā pie ieejas kuņģī, kā arī divpadsmitpirkstu zarnā pie *pylorus* sfinktera;
3. IZANALIZĒT *Helicobacter spp.* izplatību kuņģa dažādajās daļās, salīdzinot un nosakot jutīgākās un labāk izmantojamās *Helicobacter spp.* diagnostikas metodes.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Materiāls noņemts no 8 dažāda vecuma un dzimuma jenotsuņu līķiem, kurus ievada no Korejas Savvaļas Dzīvnieku Centra. Šie dzīvnieki, kuru biežākais nāves cēlonis bija dažādas traumas, centrā nogādāti no Čonbukas provinces (Korejas dienvidrietumu daļā). Gļotādas paraugus ņēma no stingri noteiktām kuņģa daļām: *fundus* (4 vietās), *corpus* (8 vietās) un *antrum* (5 vietās), kā arī vienu paraugu - no barības vada pie ieejas kuņģī un vienu paraugu - no divpadsmitpirkstu zarnas pie *pylorus* sfinktera, tādejādi kopā iegūstot 19 gļotādas paraugus no katra dzīvnieka. Kopumā izanalizēti 152 gļotādas paraugi.

Visiem gļotādas paraugiem vispirms veica ureāzes testu, tad virsmas noburzumu citoloģiju un pēc tam - histoloģisko izmeklēšanu. Kā pēdējo veica PĶR paraugiem, ko atlasīja tikai no gļotādas vietām, kurās, veicot iepriekšējos izmeklējumus, rezultāti bija pozitīvi.

Ureāzes testu veica ne vēlāk kā 2 stundas pēc dzīvnieku nāves. Gļotādas paraugus šim testam noņēma ar grieznēm un nekavējoties ievietoja speciālās platēs, kur tiem pievienoja 1ml 10% urīnvielas šķīduma destilētā ūdenī kopā ar fenolsarkanā indikatoru (pH 6,3). Rezultātus nolasīja 10, 30 un 60 minūtes pēc reaģentu pievienošanas. Krāsas maiņa no dzeltenas uz sarkanu tika uzskatīta par pozitīvu rezultātu uz *Helicobacter spp.* klātbūtni.

Gļotādas virsmas noburzumu citoloģijai (*brush cytology*) paraugus ieguva ar steriliem vates kociņiem, paberzējot tos pa gļotādas virsmu. Iegūto saturu izsmērēja uz priekšmetstikliņiem, gaisā nožāvēja un krāsoja ar t.s. *Diff-Quik* krāsošanas metodi, tālāk preparātus mikroskopēja gaismas mikroskopā eļļas imersijā 1000 reižu lielā palielinājumā.

Histoloģiskajai izmeklēšanai gļotādas paraugus fiksēja 10% buferētajā neitrālajā formalīna šķīdumā. Parafīna bloku sagatavošanai izmantoja ASV ražoto *Shandon* firmas autoprocisoru *Citadel 69810040*. Tālāk preparātus sagrieza mikrotomā 5 μm biezus griezumus un krāsoja, izmantojot *Diff-Quik*, kā arī hematoksilīna un eozīna krāsošanas metodi.

PQR paredzētos paraugus glabāja sasaldētus -70°C temperatūrā. DNS izolēja, izmantojot Vācijā ražotos *Qiagen* firmas *Dneasy Tissue Kit* reaģentus. Iegūtos DNS tālāk noteica ar PQR, izmantojot *Helicobacter spp.* raksturīgos praimerus *Hcom1* un *Hcom3* (izmērs 1099bp). Metodes precizēšanai izmantoja divus kontroles veidus: pozitīvo kontroli - 2μm *H. pylori* genomisko DNS (KCTC12083, Korejas biozinātņu un biotehnoloģiju zinātniskais institūts, Daejeon, Koreja) un negatīvo kontroli - 2μm destilētu ūdens šķīdumu.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Visiem mūsu izmeklējumiem jenotsuņiem atklāja *Helicobacter spp.* klātbūtni. Izmeklēšanas metožu rezultāti atspoguļoti pirmajā tabulā. Redzams, ka vislielāko pozitīvo gadījumu skaitu- 147 no 152 paraugiem, t.i. 96,7%, ieguva, izmeklējot gļotādas paraugus ar virsmas noberzumu citoloģiju. Preparātos konstatēja *Helicobacter spp.* raksturīgās spirālveida baktērijas. Histoloģiski izmeklējot uz *Helicobacter spp.*, gļotādas preparātos pozitīvus rezultātus atklāja 126 gadījumos, t.i. 82,9%, bet ureāzes tests bija pozitīvs tikai 111 paraugiem, t.i. 73,0%.

1. tabula / Table 1

**Pozitīvo paraugu daudzums izmantojot dažādas noteikšanas metodes**  
**Amount of positive samples by different detection methods**

| Jenotsuņa numurs/<br>Number of raccoon dog   | Ureāzes tests/<br>Urease test | Virsmas nober-<br>zumu citoloģija/<br>Brush cytology | Histoloģija/<br>Histology |
|--|-------------------------------|--|---------------------------|
| 1  | 11                            | 17   | 15                        |
| 2  | 17                            | 19   | 18                        |
| 3  | 17                            | 19   | 17                        |
| 4  | 13                            | 18   | 17                        |
| 5  | 13                            | 18   | 16                        |
| 6  | 11                            | 19   | 12                        |
| 7  | 10                            | 19   | 14                        |
| 8  | 19                            | 18   | 17                        |
| <b>Pozitīvo paraugu kopskaits/<br/>Total amount of positive<br/>samples</b>            | 111                           | 147  | 126                       |
| <b>Izmeklēto paraugu kopskaits/<br/>Total amount of all examined<br/>samples</b>       | 152                           | 152  | 152                       |
| <b>Pozitīvo paraugu<br/>procentuālais daudzums/<br/>Percentage of positive samples</b> | 73,0%                         | 96,7%  | 82,9%                     |

Jāatzīmē, ka literatūrā ir norāde par to, ka no daudzajām *Helicobacter spp.* noteikšanai izmantotajām un pētītajām metodēm, gļotādas virsmas noburzumu citoloģija ir viena no jutīgākajām. Turklāt šī metode raksturota arī kā tāda, kas ir relatīvi vienkārša, ātra, un tai nav nepieciešams speciāls aprīkojums (Happonen, 1996)

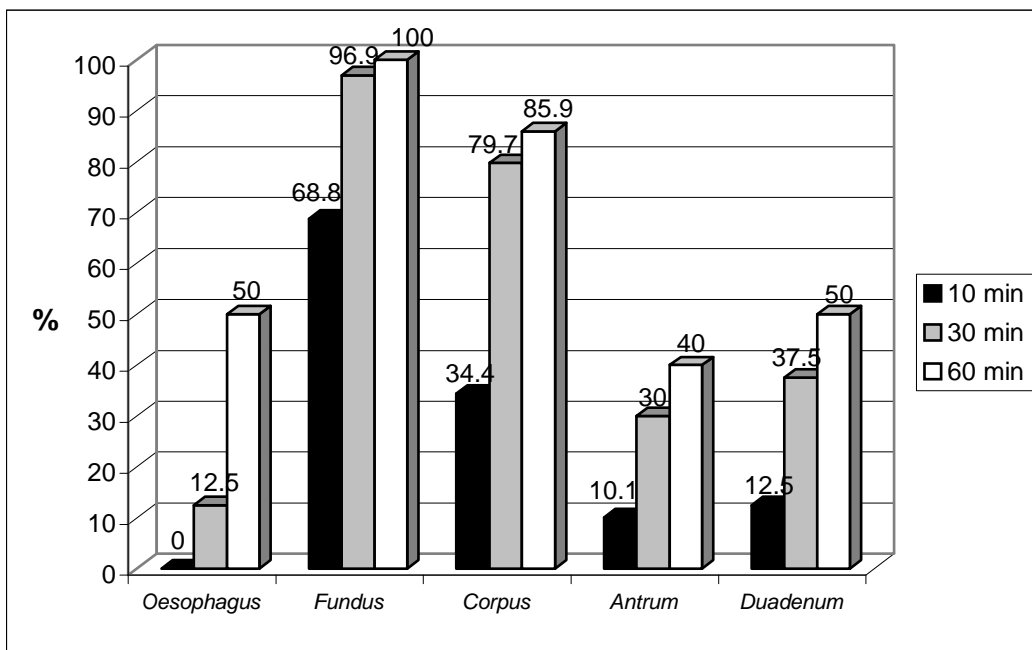
Mūsu iegūtie ureāzes testa rezultāti atspoguļoti pirmajā attēlā. Tie parādīja, ka, pagarinot reakcijas nolasīšanas laiku no 10 minūtēm līdz 30 un 60 minūtēm, attiecīgi paaugstinājās pozitīvo gadījumu skaits. Tā, pēc 10 minūtēm ureāzes tests bija pozitīvs 49 gadījumos no 152 izmeklētajiem paraugiem, t.i. 32,2%, pēc 30 minūtēm, attiecīgi jau 92 gadījumos, t.i. 60,5%, un pēc 60 minūtēm ar ureāzes testu pozitīvi uz *Helicobacter spp.* izrādījās 111 paraugi, t.i. 73,0%.

Pēc 60 minūšu ekspozīcijas laika ar ureāzes testu visaugstāko pozitīvo paraugu skaitu ieguva kuņģa *fundus* daļas gļotādā, praktiski 100% paraugos. No kuņģa *corpus* daļas gļotādas pēc 60 minūtēm *Helicobacter spp.* pozitīvi bija 85,9% paraugi, bet kuņģa *antrum* daļā – 40,0% paraugi (sk. 1.att.). Šie mūsu pētījumu rezultāti attiecībā uz jenotsuņiem zināmā mērā atšķiras no tiem, kas konstatēti mājas suņiem (Happonen, 1996), kur *Helicobacter spp.* vairāk konstatētas tieši kuņģa *corpus* daļā nekā *fundus* un *antrum* daļā.

Attiecībā uz *Helicobacter spp.* jenotsuņu barības vada gļotādā, jāatzīmē, ka ureāzes tests pēc 60 minūšu ekspozīcijas laika bija pozitīvs 50% paraugos, pēc 30 minūtēm – 12,5% paraugos, bet pēc 10 minūtēm – nevienā no paraugiem. Savukārt divpadsmitpirkstu zarnas gļotādas paraugiem, izmeklējot tos ar ureāzes testu, pēc 60 minūtēm konstatēti 50% pozitīvi paraugi, pēc 30 minūtēm – 37,5% paraugi, bet pēc 10 minūtēm – tikai 12,5% paraugi (sk. 1.att.).

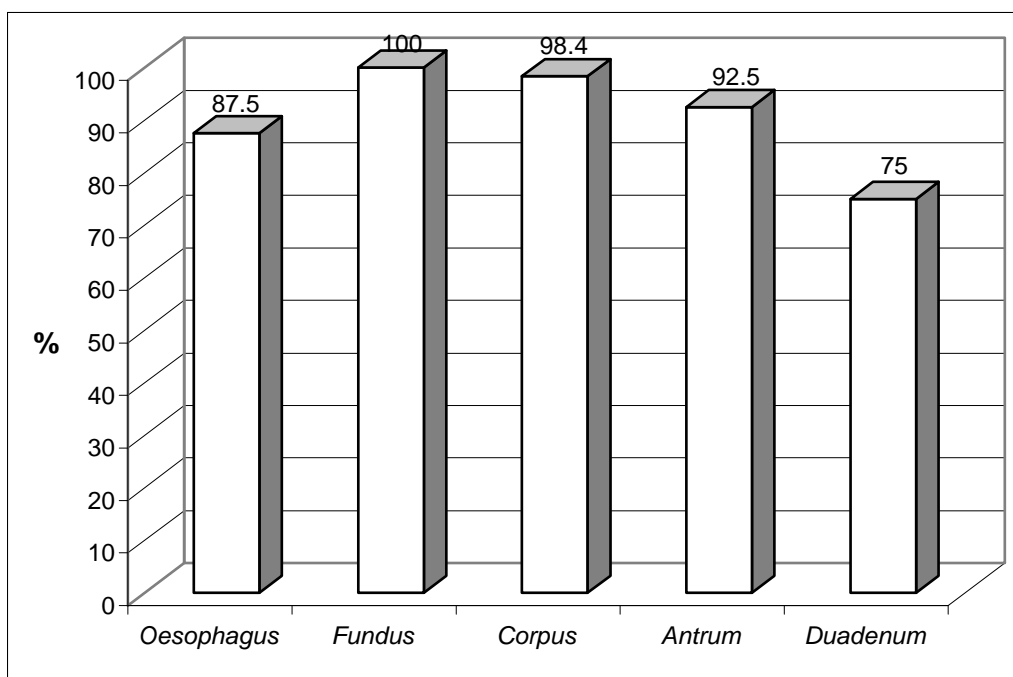
Gļotādas virsmas noburzumu citoloģijas rezultāti atspoguļoti otrajā attēlā. Tie parāda, ka kuņģa *fundus* daļā ir augstākais pozitīvo paraugu daudzums, praktiski 100% gadījumos, bet kuņģa *corpus* daļā nedaudz mazāk - 98,4% paraugos un *antrum* daļā – 92,5% paraugos. Šie mūsu dati saskan ar citos pētījumos iegūtajiem rezultātiem par *Helicobacter spp.* izplatību suņu kuņģī (Happonen, 1996). Jāatzīmē, ka no visiem mūsu izmeklētajiem barības vada gļotādas paraugiem *Helicobacter spp.* konstatētas 87,5% gadījumos, bet divpadsmitpirkstu zarnas gļotādā – 75,0% gadījumos (sk. 2.att.) Tātad, izmantojot gļotādas virsmas noburzumu citoloģiskās izmeklēšanas metodi, rezultāti par *Helicobacter spp.* lokalizācijas vietu kuņģī iegūti līdzīgi kā, izmantojot ureāzes testu.

Līdzīgus rezultātus ieguvām arī ar histoloģisko metožu palīdzību, kas atspoguļoti trešajā attēlā. Mūsu pētījumi liecina, ka *Helicobacter spp.* līdzīgi kā pēc gļotādas virsmas noburzumu citoloģiskās izmeklēšanas, visvairāk sastopamas tieši kuņģa *fundus* daļā, praktiski 100% gadījumos. Kuņģa *corpus* daļā *Helicobacter spp.* konstatēja 95,3% gadījumos, bet *antrum* daļā - 77,5% gadījumos. Savukārt barības vadā un divpadsmitpirkstu zarnā baktērijas konstatētas tikai 12,5% gadījumos (sk. 3.att.). Jāatzīmē, ka histoloģiskā izmeklēšana palīdz novērtēt arī gļotādas morfoloģisko stāvokli, un vienlaicīgi palīdz atklāt patoloģiskas izmaiņas tās struktūrā (Megraud, 1996), tomēr tā ir salīdzinoši dārgāka un sarežģītāka (Chu, 1997).



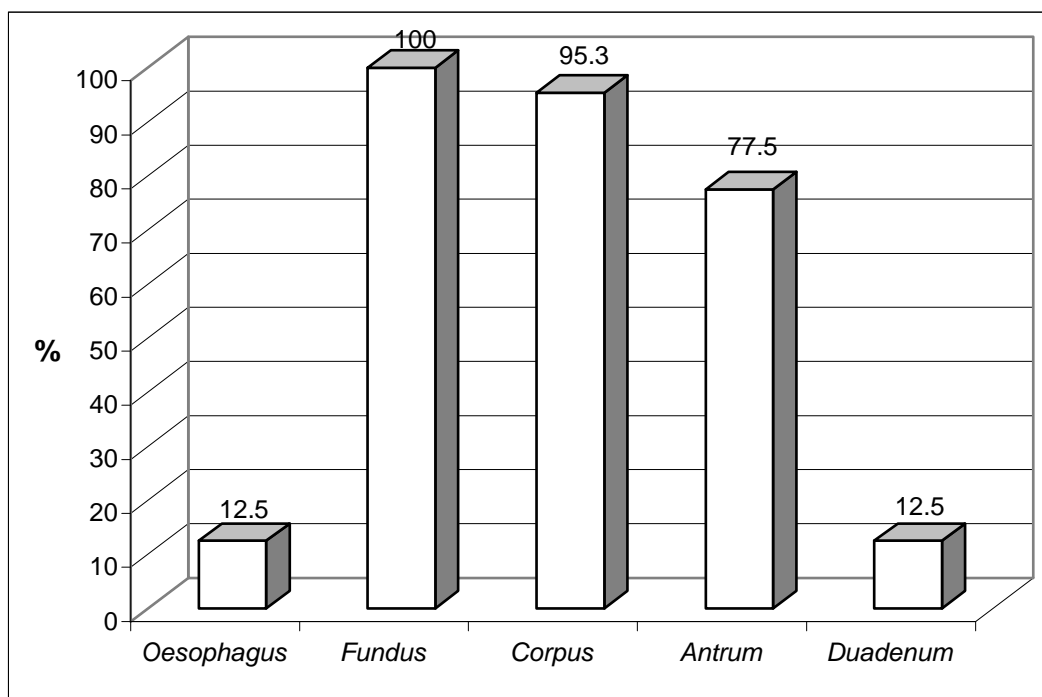
1.attēls. Pozitīvo rezultātu procentuālais daudzums dažādos gļotādu paraugos, izmantojot ureāzes testu

Figure 1. Percentage of positive mucosal samples of different sites by urease test



2. attēls. Pozitīvo rezultātu procentuālais daudzums dažādos gļotādu paraugos, izmantojot gļotādas virsmas noberzumu citoloģiju

Figure 2. Percentage of positive mucosal samples of different sites by brush cytology



3. attēls. **Pozitīvo rezultātu procentuālais daudzums dažādos gļotādas paraugos, izmantojot histoloģiskās izmeklēšanas metodes**

Figure 3. **Percentage of positive mucosal samples of different sites by histological examination**

Attiecībā uz PĶR, mūsu rezultāti parādīja, ka visi izmeklētie paraugi bija pozitīvi, izmantojot *Helicobacter spp.* specifiskos praimerus *Hcom1* un *Hcom3* ar izmēru 1099bp. Tas pierāda, ka dzīvniekiem atklātās baktērijas satur *Helicobacter spp.* raksturīgo DNS. Lai tālāk noskaidrotu, vai baktēriju genoma satstāvā ir patogēno *Helicobacter spp.* DNS, ir nepieciešams veikt PĶR ar specifisko *Helicobacter pylori*. Jāatzīmē, ka PĶR plašāk izmanto arī, lai diferencētu *Helicobacter spp.* sugas (Hwang, 2002).

Nobeidzot jāuzsver, ka šis pētījums ir pirmais, kas veikts jēnotsuņiem Korejas Republikā, un darbs tiks turpinās, lai pētītu *Helicobacter spp.* šiem dzīvniekiem.

## SECINĀJUMI

1. Visiem pētījumā iekļautajiem savvaļas jēnotsuņiem gremošanas trakta gļotādā konstatētas *Helicobacter spp.* baktērijas;
2. Salīdzinot *Helicobacter spp.* lokalizāciju dažādās kuņģa vietās, *fundus* daļā šīs baktērijas ir visplašāk izplatītas;
3. Gļotādas virsmas noburzumu citoloģiskā izmeklēšana uz *Helicobacter spp.* kopumā izrādījās jutīgāka, salīdzinot tās rezultātus ar ureāzes testa un gļotādas histoloģiskās izmeklēšanas rezultātiem;
4. Izmeklējot gļotādas paraugus ar ureāzes testu, jāņem vērā, ka rezultāti būtu jānolasa vismaz pēc 60 minūtēm;
5. Lai tālāk pētītu un identificētu dzīvniekiem sastopamo *Helicobacter pylori* un to saistību ar patoloģiskām izmaiņām kuņģī, jāveic specifiskas baktēriju DNS analīzes un vienlaicīgi jānovērtē gļotādas morfoloģiskais stāvoklis.

## LITERATŪRA

1. Bussac G. *Helicobacter pylori* and the oral environment. - Pract Periodontics Aesthet Dent, 1999;11(8): 918, 920, 922.

2. Chu K.M., Poon R., Tuen H.H., Law S.Y., Branicki F.J., Wong J. A prospective comparison of locally made rapid urease test and histology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. - *Gastrointestinal Endosc*, 1997;46(6): 503-6
3. 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(12)3: 165-70
4. Eaton K.A., Dewhirst F.E., Radin M.J., Fox J.G., Paster B.J. Krakowka S., Morgan D.R. *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. - *Int J Syst Bacteriol*, 1993;43(1): 99-106
5. Fox J.G., Batchelder M., Marini R., Yan L., Handt L., Li X., Shames B., Hayward A., Campbell J., Murphy J.C. *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. - *Infect Immun*, 1995;63(7): 2674-81
6. Fox J.G., Lee A. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. - *Lab Animal Sci*, 1997; 47(3): 222-55
7. Happonen I., Saari S., Castren L., Tyni O., Hanninen M.L., Westermarck E. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats. - *J Comp Pathol*, 1996;115(2): 117-27
8. 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(2): 123-33
9. Jalava K., Kaartinen M., Utriainen M., Happonen I., Hanninen M.L. *Helicobacter salmonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. - *Int J Syst Bacteriol*, 1997;47(4): 975-82
10. Lee A., Krakowka S., Fox J.G., Otto G., Eaton K.A., Murphy J.C. Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. - *Vet Pathol.*, 1992;29(6): 487-94.
11. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. - *Lancet.*, 1984 16;1(8390): 1311-5
12. Megraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. - *Scand J Gastroenterol Suppl.*, 1996;215: 57-62
13. Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. - *Scand J Gastroenterol Suppl.*, 1996;214:44-6: 57-60
14. Neiger R., Dieterich C., Burnens A., Waldvogel A., Cortesy – Theulaz I., Halter F., Lauterburg B., Schmassmann A. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. - *J Clin Microbiol.*, 1998; 36: 634-637
15. Oxley A.P., Powell M., McKay D.B. Species of the family *Helicobacteraceae* detected in an Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) with chronic gastritis. - *J Clin Microbiol.*, 2004;42(8): 3505-12