

Állatorvostudományi Egyetem  
Belgyógyászati Tanszék és Klinika

**Tapasztalatok a  $^{13}\text{C}$ -urea kilégzési teszt alkalmazásával  
kapcsolatban a gyomorban előforduló *Helicobacter* fajok  
kimutatására gasztroszkópiára érkezett kutyákból**

**Készítette:** Mózes Borbála

**Témavezető:** Dr. Psáder Roland, PhD

ÁTE, Belgyógyászati Tanszék és Klinika, egyetemi adjunktus, kisállatgyógyász  
szakállatorvos

Budapest

2017.

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	4
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. A <i>Helicobacter</i> genus általános jellemzése .....	6
3.2. Nomenklatúra.....	6
3.3. A <i>Helicobacter</i> ek humán egészségügyi jelentősége.....	7
3.4. A <i>Helicobacter</i> genus jelentősége kutyák esetében.....	8
3.5. A <i>Helicobacter</i> fajok kimutatásának lehetőségei.....	9
3.5.1. Kórszövettani vizsgálat és fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH).....	9
3.5.2. PCR.....	10
3.5.3. Gyors ureáz teszt (RUT).....	11
3.5.4. Tenyésztés.....	11
3.5.5. Szerológia és antigén-kimutatás.....	12
3.5.6. UBT.....	13
4. Anyag és módszer.....	15
4.1. Betegszelekció.....	15
4.2. Gasztroszkópia és mintavétel.....	16
4.3. Kórszövettani vizsgálat.....	17
4.4. PCR-rel történő kimutatás.....	17
4.5. <sup>13</sup> C-UBT alkalmazása <i>Helicobacter</i> -kimutatásra.....	18
4.6. Terápia és kontroll.....	20
4.7. Statisztikai értékelés.....	21
5. Eredmények.....	22
5.1. UBT eredmények.....	22
5.2. Kórszövettani eredmények.....	22
5.3. PCR eredmények.....	23
5.4. Statisztikai eredmények.....	23
5.5. Kontroll UBT eredmények.....	26
6. Megbeszélés.....	27
7. Összefoglalás.....	32
8. Summary.....	34
9. Irodalom.....	36
10. Köszönetnyilvánítás.....	40

## 1. Rövidítések jegyzéke

AHDS – acute haemorrhagic diarrhoea syndrome, akut vérzések hasmenés szindróma

BHI – brain-heart infusion, szív-agy táptalaj

DOB – delta over baseline, az alapérték és a mért érték különbsége

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat

FISH – fluorescent in situ hybridization, fluoreszcens in situ hibridizáció

GHLO – gastric *Helicobacter*-like organism, a gyomorban lévő *Helicobacter*-szerű organizmusok

HGE – haemorrhagiás gasztroenteritisz

IBD – inflammatory bowel disease, gyulladásszerű bélbetegség

MALT – mucosa-associated lymphoid tissue, mukóza-asszociált limfoid szövet

NCBI - National Center for Biotechnology Information

PCR – polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció

ROC - Receiver Operating Characteristic

rRNS – riboszomális ribonukleinsav

RUT – rapid urease test, gyors ureáz teszt

T<sub>m</sub> – melting temperature, olvadáspont

UBT – urea breath test, karbamid kilégzési teszt

## 2. Bevezetés

A hányással küzdő kutya gyakori páciens a kisállatpraxisokban, e problémával való találkozást egyetlen ilyen területen gyakorló állatorvos sem kerülheti el. A hányásnak, mint elsősre hétköznapi látszó tünetnek azonban több, mint 200 ismert oka lehet, így a probléma értelmezése, a diagnózis felállítása és a terápia megtervezése is felkészültséget és szakértelmet igényel.

Az adott kutya esetében először el kell döntenünk, hogy akut vagy krónikus hányásról van-e szó. Akut esetben a legfontosabb felismerni az életet veszélyeztető állapotokat, melyek azonnali beavatkozást kívánnak. A hirtelen fellépő, akár véres hányás, párosulva elesettséggel, dehidrációval, kóros testhőmérséklettel vagy pulzussal, abnormális hastapintási lelettel (ileus, invagináció), esetleg tudatzavarral és görcsökkel életet potenciálisan veszélyeztető helyzetre utal. A háttérben állhat pl. idegen test jelenléte, gyomorfekély, gyomorcsavarodás, AHDS (régiben HGE), fertőző oka lehet pl. parvovírus, szopornyica vagy *Leptospira*-fertőzés, illetve a hányás más szervi elváltozás tüneteiként is jelentkezhethet, pl. hasnyálmirigy-gyulladás, vese- vagy májelégtelenség, pyometra, hashártyagyulladás, Addison-krízis vagy diabéteszes ketoacidózis.

Nem életveszélyes, önkorlátozó folyamatról beszélhetünk akut hányás esetén, ha a fent leírt tünetek hiányoznak, tehát hányás mellett a páciens jó általános állapotú, élénk, klinikai alapértékei élettani tartományban vannak. Ilyen állapotot kiválthat pl. táplálási zavar, utazási betegség, parazitózis (*Giardia*), heveny gyomorgyulladás vagy gyógyszer mellékhatás.

Krónikusnak tekintjük a betegséget, ha elhúzódóan visszatér a hányás (~3 héten túl), a beteg állapota és az étvágya hullámzik, romlik a kondíció. Ennek oka szintén lehet emésztőszervi vagy más szervrendszert érintő betegség. Gyomor eredetű a tünet gyulladás, nyálkahártya hypertrophia, polip vagy tumor esetén. Vékonybélbeli megbetegedés vagy rendellenesség is állhat a háttérben, pl. subileus, daganat, IBD, mikózis, parazitózis. Krónikus vastagbélgyulladás és obstipáció is okozhat hányást. Metabolikus okai között megemlítendő a vese, máj és hasnyálmirigy betegségei, a cukorbetegség és az Addison-kór. Krónikus hányás lehet a tünete idegrendszeri tumornak, a vestibularis rendszer elváltozásának vagy a kemoreceptor trigger zóna ingerlésének, illetve kapcsolódhat epilepsziához. Ezeken túl az akut hányás okai között említett fertőző ágensek krónikus lefolyású megbetegedést is okozhatnak.

A kutyák krónikus hányásának kórokai között felmerül a *Helicobacter* fajok jelentősége, melyek jelenléte a kutyák gyomrában széleskörűen igazolt, de patogén szerepük nem bizonyított. Miután a baktérium szerepet játszhat a gyomorgyulladás kialakításában, s ezáltal hányás előidézésében, kimutatása gyomorpanaszokkal küzdő kutyákban elősegíti mind a páciens szintjén történő diagnózist és terápiát, mind pedig az állatorvosi gasztroenterológia előrelépését a kórokozó megismerése terén.

A GHLO fertőzés diagnosztizálására számos kimutatási módszer rendelkezésünkre áll, amelyek különböző előnyökkel és limitáló tényezőkkel bírnak. Az invazív módszerek közé tartozik a kórszöveti vizsgálat, a polimeráz láncreakció, a baktériumtenyésztés és a gyors ureáz teszt, amelyeket közvetlenül a gyomorból vett mintából végeznek, így gasztroszkópos vizsgálatot tesznek szükségessé. Ez a hátrányuk egyben előny is, mert a beavatkozás során a gyomor közvetlen megtekintése is lehetségessé válik. A humán orvoslásban a *Helicobacter pylori* általi fertőzés gyanújakor első körben a nem invazív tesztek részesítik előnyben, ezek a szerológia, az ürülő antigének kimutatása és az urea kilégzési tesztek. A 35 éven aluli humán gyomorbeteg vizsgálatának kiemelt – és sokszor első – eszköze a kilégzési teszt, azonban Magyarországon az állatorvoslásban ezelőtt nem volt precedens az alkalmazására. A kutyák körében előforduló gyomorpanaszok gyakoriságát és a kilégzési teszt eddig leírt diagnosztikai értékét tekintve úgy gondoljuk, hogy szükséges ezzel az itthon ezelőtt fel nem térképezett területtel, a <sup>13</sup>C-urea kilégzési teszt állatorvosi alkalmazásával foglalkoznunk.

Munkánk célja, hogy Magyarországon elsőként bevezessük a klinikai gyakorlatba a <sup>13</sup>C-UBT-t a kutyák gyomrában előforduló *Helicobacter* fajok kimutatására. Vizsgálatunk során az ÁTE Kisállatklinikájára hányás vagy dyspepsia tüneteivel érkező kutyák egy részében elvégeztük a <sup>13</sup>C-UBT-t, és eredményeinket összevetettük ugyanezen kutyákból gasztroszkópia során vett gyomorbiopsziák – *Helicobacter* fajok kimutatására irányuló – kórszöveti és PCR vizsgálatok eredményeivel. A betegek klinikai ellátása során az eradikációs kezelés után lehetőség szerint elvégeztük a kontroll UBT-t is. Adatainkat statisztikai módszerek segítségével értékelve következtetéseket vonhatunk le a <sup>13</sup>C-UBT gyakorlati alkalmazhatóságával és diagnosztikai értékével kapcsolatban.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A *Helicobacter* genus általános jellemzése

A *Helicobacter* 2-10 µm hosszú, hajlott pálcá alakú, spórát nem képző Gram-negatív baktériumok. Polárisan helyeződő csillók segítségével mozgásra képesek. Mikroaerofil körülmények között tenyészthetők, oxigén hatására a *Campylobacter*ekhez hasonlóan coccoid alakot vesznek fel. Igényes, nehezen tenyészthető baktériumok, a tenyésztéshez 5-10% vért tartalmazó agar, Brucella-agar vagy BHI szükséges.

A *Helicobacter* nemzetség tagjai elsődleges előfordulási helyüknek megfelelően két csoportba sorolhatók. A gyomorban előfordulók a gasztrikus csoport tagjai, melyek jellemzően ureázt termelnek. Az enzim segítségével karbamidból ammóniát és szén-dioxidot állítanak elő, ezzel közvetlen környezetükben csökkentik a savas kémhatást, majd a károsított gyomorfal gyulladására miatt több karbamid lép ki a lumenbe, így még több baktérium képes megtelepedni (Fodor et al., 1999). Az enzimtermelő képességük teszi tehát lehetővé a gyomor kolonizációját (Eaton et al., 1991). A *Helicobacter*ek által termelt egyéb enzimek (kataláz, oxidáz, proteáz, foszfolipáz) és a fehérvérsejtek citokinjei is hozzájárulnak a gyomorfal gyulladásához, a kórokozó eliminációját és a savas környezet helyreállítását célzó fokozott gyomorsav-szekréció pedig további szövetkárosodást okoz. A gasztrikus csoportba tartozik többek között a *H. pylori*, a *H. mustelae*, a *H. felis*, a *H. bizzozeronii*, a *H. salomonis* és a "Candidatus *H. heilmanni*". Az intesztinális (vagy enterohepatikus) csoport tagjai elsődlegesen a vastagbélben fordulnak elő, de megtalálhatóak lehetnek a vékonybélben, májban és a gyomorban is. Ide sorolható például a *H. canis*, a *H. bilis*, a *H. cholecystis* és a *H. cinaedi*. Ureázt néhány kivételtől eltekintve nem termelnek (ilyen, ureáztermelő intesztinális fajok a *H. bilis*, *H. troglodytes*, *H. muridarum*, *H. hepaticus* és a *Flexispira rappini*), azonban morfológiai és genetikai hasonlóságuk miatt diagnosztikai problémát okozhatnak.

A *Helicobacter*ekkel való fertőződés szájon át történik, leggyakrabban a bélsárral ürülő baktériumok kerülnek felvételre, de előfordulhat az oro-orális fertőzési mód is, illetve iatrogén úton is terjedhet (pl. endoszkópon átvitel). Bár a *Helicobacter*ek ellenállóképessége gyenge, coccoid alakot felvéve napokig túlélhetnek nedves környezetben (Fodor et al., 1999).

#### 3.2. Nomenklatúra

A *H. pylori* leírása óta a *Helicobacter* nemzetség több, mint 32 bejegyzett fajjal rendelkezik, azonban az évtizedek során a további bakteriológiai kutatások eredményeképp és a baktérium nehéz tenyészthetőségéből következő korlátozott vizsgálati lehetőségek miatt

jelentős nevezéktani probléma merült fel. A páciensektől vett gyomorbiopszátumokban a *H. pylori* enyhén hajlott pálca alakjától kissé eltérő morfológiájú, hosszú, spirális baktériumokat találtak. Ezeket elsőként McNulty és munkatársai írták le 1987-ben, majd 1989-ben a “*Gastrospirillum hominis*” nevet adták nekik (Dent et al., 1987; McNulty et al., 1989).

A baktérium 16S rRNS génjének elemzése azonban a *Helicobacter* nemzetségbe sorolta az ekkor még egy fajnak hitt fajokat, így a *H. heilmanni* nevet kapták Konrad Heilmann német patológus után, aki elsőként foglalkozott a non-*H. pylori* *Helicobacter* okozta gyomorgyulladásal (Heilmann és Borchard, 1991a). A 16S rRNS gén további vizsgálata két csoport elkülönítését tette szükségessé a *H. heilmanni* fajon belül: az 1-es és a 2-es típusét. Mivel az 1-es típus genetikai és morfológiai egyezést is mutatott a sertések gyomrában megtalálható spirális baktériummal, ezt *Helicobacter suis*-szá nevezték át (Baele et al., 2008a). A 2-es típus ezzel ellentétben nem egyetlen fajnak felel meg, hanem egy csoportnak, amibe több faj is tartozik., Ezek a fajok többek között a kutyák és macskák gyomrából izolálható *H. felis*, a *H. bizzozeronii* és a *H. salomonis*. Kutyák gyomrából kimutatásra került továbbá a *H. cynogastricus* (Van den Bulck et al., 2006), macskákból pedig a *H. baculiformis* (Baele et al., 2008b). A taxonómiai és nevezéktani zavart fokozza, hogy leírtak egy egyelőre tenyésztetetlennek bizonyuló baktériumfajt, ami emberek, macskafélék és kutyák gyomrában is megtalálható, és a “*Candidatus Helicobacter heilmanni*” nevet kapta (O’Rourke et al., 2004). A 16S rRNS gén szekvenálásával csak a *H. suis* különíthető el, a régebbi *H. heilmanni* 2-es típusba tartozó fajcsoport egyes fajait nem tudjuk ilyen módszerrel azonosítani, ehhez más gének vizsgálatára van szükség (Dewhirst et al., 2005).

A genus fent leírt jellegzetességei, a diagnosztikai és elkülönítési nehézségek és az adott *Helicobacter* fajok által jellemzően kialakított klinikai kép alapján humán páciensek esetében az előzőleg *H. heilmanni* 2-es típusnak nevezett csoportba tartozó fajokat “non-*H. pylori Helicobacter*”-eknek nevezzük (Haesebrouck et al., 2009). Kutyák esetében viszont, miután ebben a fajban nem elsődleges kórokozó a *H. pylori*, összefoglaló néven GHLO-ként, azaz “gastric *Helicobacter*-like organisms”-ként utalunk a gyomrot kolonizáló spirális baktériumokra.

### **3.3. A *Helicobacter*ek humán egészségügyi jelentősége**

Emberek esetében a *Helicobacter* nemzetség leglényegesebb patogén faja a *Helicobacter pylori*, ami a legelterjedtebb emberi gasztrointesztinális kórokozó (Rác, 1996). Marshall és Warren írták le elsőként, hogy az emberi gyomorfekély kialakulásának hátterében bakteriális fertőzés áll (1984). A baktériumot kezdetben morfológiai és tenyésztési

tulajdonságai miatt *Campylobacter pylori*-nak nevezték, majd genetikai és biokémiai jellemzői alapján került át a *Helicobacter* nemzetségbe (Goodwin et al., 1989). Teljes mértékben az emberhez adaptálódott, néhány esetben azonban macskákból is kimutatásra került (Handt et al., 1994; Fox et al., 1995).

Jelenléte a gyomorban okozhat gyomorgyulladást, gyomorfekélyt, illetve adenocarcinómát és MALT lymphómát is (Kusters et al., 2006). A baktérium a gyomor nyálkarétegében sajtharanghoz hasonló buborékot kialakítva távol tartja a gyomorsavat, majd a gyomorfalba fúródva szöveti károsodást idézhet elő: atrófiás gyomorgyulladás alakul ki, ami intesztinális metapláziához vezethet, ez pedig 3-5-szörösre növeli a gyomordaganat kialakulásának valószínűségét (Axon, 1993). A baktérium általi tüneteket okozó és tünetmentes fertőzés is kimondottan elterjedt: a fejlődő országok lakosságának 80%-a érintett már fiatal gyermekkorban is, a fejlett országok esetében ez a szám 40% alatt marad, de jelentősen magasabb a fertőzöttek aránya a felnőtt és idősödő lakosság körében, mint a fiatalokéban (Pounder és Ng, 1995). Ez a jelenség magyarázható az évtizedekkel ezelőtti hiányos higiéniai viszonyokkal és a hosszú baktériumhordozással. A *H. pylori* fertőzés az esetek többségében azonban nem nyilvánul meg tünetekben, ez részben függ a baktérium virulenciájától, de szerepet játszanak egyéb hajlamosító tényezők és szimultán jelentkező betegségek is (Fodor et al., 1999).

Zoonotikus szempontból fontos eredmény, hogy krónikus aktív gyomorgyulladásban szenvedő emberi páciensekből non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter*ek is kimutatásra kerültek, feltehetően állati eredetű fertőzésből, bár ezek klinikai vonatkozása egyelőre nem tisztázott (De Groote et al., 2005). A *Helicobacter*ek okozta gyomorbetegségek 1-5%-ban *H. bizzozeronii*-t mutattak ki (Heilmann és Borchard, 1991b), de ennek alacsonyabb patogenitása miatt a klinikai jelentősége is kisebb (Fodor et al., 1999). Az emberi gyomrot a "Candidatus *H. heilmanni*", *H. felis* és a *H. salomonis* is kolonizálhatja (Haesebrouck et al., 2009).

### **3.4. A *Helicobacter* genus jelentősége kutyák esetében**

Az emberek *Helicobacter*-fertőzéséhez képest fontos eltérés, hogy a kutyák gyomrából leggyakrabban kimutatott különböző fajok általában nem kerülnek azonosításra, hanem összefoglaló néven Gastric *Helicobacter*-like Organisms-ként utalunk rájuk (GHLO). Ez a kifejezés jelzi, hogy több fajról van szó, amik általában kevert fertőzést okoznak, és megkülönböztetésük fénymikroszkópos kórszöveti vizsgálatokkal nem lehetséges. Jelenlétük a kutyák gyomrában nem minden esetben okoz megbetegedést, az egészséges és tüneteket mutató populációkban is hasonlóan gyakori lehet a fertőzöttség. Klinikailag egészséges kutyák



67-86%-ában, míg krónikus hányásban szenvedő kutyák 61-100%-ában vannak jelen a kórokozók (Hermanns et al., 1995; Hwang et al., 2002).

Pontos szerepük a betegségek kialakításában nem tisztázott, bár feltételezhető, hogy krónikus gyomorgyulladás kialakításában játszhatnak szerepet, és a kialakított kórforma és annak súlyossága akár faj- vagy törzsfüggő is lehet. Az emberektől eltérően a kutyák *Helicobacter*-fertőzése nem hozható összefüggésbe fekélyek megjelenésével a gyomorban és a duodenumban, bár ezek előfordulása háziállatainkban egyébként is ritkább, mint humán esetekben (Brown et al., 2007).

A *Helicobacter*ek általában a kutya gyomrának fundus és corpus részén telepednek meg (Happonen et al., 1996). A *H. felis* kutyából és macskából is gyakran kimutatható, a gyomor mirigyeiben mélyen fordul elő, így nehéz az antibiotikummal történő eradikációja (Fodor et al., 1999). Ez az egyetlen *Helicobacter* faj, amelyet kizárólag krónikus aktív gyomorgyulladással diagnosztizált kutyák gyomrából mutattak ki, egészségesekéből nem (Diker et al., 2002). Fajspecifikus PCR vizsgálatokon alapulva több kutatás is alátámasztja, hogy a kutyák gyomrát kolonizáló *Helicobacter*ek közül a *H. bizzozeronii* a leggyakrabban előforduló faj (Priestnall et al., 2004; Van den Bulck et al., 2005). Hasonlóképpen gyakran izolálható *H. felis* és „Candidatus *H. heilmanni*”, azonban a *H. salomonis* csak sporadikusan kerül kimutatásra, a *H. cynogastricus* prevalenciája pedig egyelőre ismeretlen (Van den Bulck et al., 2005).

### **3.5. A *Helicobacter* fajok kimutatásának lehetőségei**

A *Helicobacter* fajok kimutatására több diagnosztikai eljárás is rendelkezésre áll. A legelterjedtebb módszer a kórszövetteni vizsgálat, de gold standardnak a PCR-rel történő kimutatás tekinthető. Emellett elérhető citológiai vizsgálat, gyors ureáz teszt (RUT), baktériumtenyésztés, kilégzési teszt és egyéb kimutatási lehetőségek. Az alábbiakban e módszerek rövid jellemzésére kerül sor.

#### **3.5.1. Kórszövetteni vizsgálat és fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)**

A gyomorból vett biopátum kórszövetteni vizsgálatának eredménye GHLO-pozitívnak tekinthető, ha a metszeten a tipikus morfológiájú baktériumok azonosíthatók. A metszet festéséhez többek között Giemsa, Whartin-Starry, ezüstimpregnáció, akridin narancs és immunfluoreszcens festékeket alkalmaznak (Patel et al., 2014). Egyszerűségének, magas szenzitivitásának és kedvező árának köszönhetően a leggyakrabban alkalmazott festék a Giemsa (Rotimi et al., 2000). A kórszövetteni vizsgálat szenzitivitását befolyásolja a

gyomorból vett minták mérete, száma és a mintavétel helye, mivel az inhomogén kolonizáció fals negatív eredményhez vezethet. Patel és munkatársai a kórszövettannal történő *H.pylori*-kimutatás szenzitivitását 66%-100%-ra, specificitását 94%-100%-ra értékelték (2014). A módszer magas specificitása a *Helicobacterek* sajátos megjelenésének és a gyomornyálkahártyához közeli elhelyezkedésének köszönhető (Rugge és Genta, 2005), azonban fals pozitívítás merülhet fel hasonló morfológiájú baktériumfajok (pl. *Pseudomonas fluorescens*) jelenlétekor (Patel et al., 2013). További limitáló tényező, hogy az eredményt befolyásolja az eljárást végző személy szakmai tapasztalata és egyéni megítélése. Bár humán gyógyászatban a *H. pylori* fertőzés megállapításakor a kórszövettani vizsgálat számít gold standardnak, jelentős eltérések lehetnek a módszer szenzitivitásában a vizsgálatot végző patológus személyétől függően (el-Zimaity et al., 1996; Nagy, 2016).

A fent említett problémákat a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) képes kiküszöbölni. A fluoreszcens molekulákkal jelölt, a *Helicobacterek* 16S és 23S rRNS-ére specifikus oligonukleotidok nem kötődnek más baktériumfajokhoz, viszont a jelenlévő *Helicobacter* fajok könnyebben detektálhatóvá válnak a jelölés következtében. A *H. pylori* törzseinek megkülönböztetése és a törzsek közötti különbségek megállapítása lokalizáció és virulencia terén is a FISH segítségével vált valóra (Fontenete et al., 2013), illetve e módszer tette lehetővé az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatát is ebben a nehezen tenyészthető fajban (Morris et al., 2005).

### 3.5.2. PCR

Ez a nukleinsav kimutatásán alapuló diagnosztikai módszer a baktérium jelenlétének igazolásán túl bizonyos fajspecifikus gének azonosításában és az antibiotikum-rezisztencia megállapításában is jelentős segítséget nyújt (Patel et al., 2014). A 16S és 23S rRNS génekre tervezett primer segítségével a *H. suis* elkülöníthető más, nem *H. pylori*-*Helicobacterektől*, azonban ezek között a – kutyák gyomrában is megtalálható – *Helicobacterek* között nem képes különbséget tenni (Dewhirst et al., 2005). Ezen fajok azonosítására a Hsp60 gén (Mikkonen et al., 2004) és az ureáz A és B gének (O'Rourke et al., 2004) szekvenálása által van lehetőség. Két fontos tényező csökkenti a PCR használhatóságát: a mintában esetlegesen jelen lévő polimeráz enzim-inhibitorok (Thoreson et al., 1999), és a kontamináció lehetősége a mintagyűjtéstől kezdve, az amplifikáción keresztül a dokumentálásig, az egész folyamat ideje alatt. Ezek kivédhetők speciális kitek használatával és az eljárás egésze alatti fokozott és szigorúan vett sterilitás megtartásával (Patel et al., 2014). Klinikai szempontból hátrányosnak tekinthető a PCR anyagi vonzata és időigénye, azonban magas, 75%-100%-os szenzitivitása és

84%-100%-os specificitása miatt jelenleg ezt a módszert tartják a gold standardnak *Helicobacter* kimutatás terén (Patel et al., 2014). A szenzitivitás tovább növelhető nested PCR alkalmazásával (Singh et al., 2008), amely egyrészt alacsony számban is megbízhatóan képes kimutatni a baktériumot (pl. eradikációs terápia után), másrészt a hagyományos PCR esetén fals pozitivitást okozó kontamináló flóra zavaró hatását is kiküszöböli. A nem invazív *H. pylori* kimutatási módszerek közé tartozik a bélsármintából végzett PCR vizsgálat, melyet eredményesnek találtak a fertőzés kimutatásában a tervezett terápia elvégzése előtt, ekkor szenzitivitása 72,5%-nak, specificitása 100%-nak bizonyult. A bélsár-PCR vizsgálat ugyanezen értékei eradikáció után alkalmazva 60% és 97,1% (Mishra et al., 2008). A PCR alapú kimutatási eljárások további előnye, hogy a különböző bakteriális gének amplifikációjával számos törzs elkülöníthető, így más módszerekkel ellentétben lehetővé teszi az újrafertőződés és a fertőzés kiújulásának elkülönítését (Patel et al., 2014).

### **3.5.3. Gyors ureáz teszt (RUT)**

A gasztrikus *Helicobacter* fajok ureáz-termelésére alapul ez a kimutatási mód. A karbamidból enzimatis bontás következtében szén-dioxid és ammónia keletkezik, ez utóbbi emeli a tesztközeg pH-ját, és egy indikátor segítségével színreakciót hoz létre. A RUT oldat és szilárd médium formájában is elérhető, elsősorban endoszkóppal rendelkező klinikák számára praktikus és gyors eredményt adó diagnosztikai eszköz, mivel lehetővé teszi a gasztroszkópia során vett bioptátumok azonnali vizsgálatát (Puetz et al., 1997). A teszt érzékenységét befolyásolja a mintában lévő baktériumok sűrűsége, és bár a kórszövettani vizsgálathoz viszonyítva a szenzitivitás 89%-nak, a specificitás 88%-nak bizonyult (Chou et al., 1997), az eradikációs kezelés után a kis számban visszamaradt kórokozók miatt a teszt szenzitivitása 60%-ra csökken (Nishikawa et al., 2000). A módszer hatékonyságát korlátozza, hogy egyes páciensek gyomrát eleve kis sűrűségben kolonizálják a baktériumok (Mégraud, 1996), továbbá a gyomorvérzés, H<sub>2</sub>-receptor antagonisták és protonpumpagátlók használata is csökkentheti a megbízhatóságát, mivel ezek a szerek csökkentik az ureáztermelést és az enzim működését (Lerang et al., 1998). Mindezek ellenére az alacsony költsége, gyors és egyszerű használata miatt az ureáz teszt fontos szerepet tölt be a *Helicobacter*-fertőzés diagnózisában, időigény terén megelőzi a kórszövettani vizsgálatot és gyakorlatias alkalmazhatóságban a tenyésztést is (Patel et al., 2014).

### **3.5.4. Tenyésztés**

A *Helicobacter* genus tagjai igényes, nehezen tenyészthető baktériumok, összetett táptalajra van szükségük a szaporodáshoz (Goodwin és Worsley, 1993), 37°C, 5-10% oxigén

és 5-10% szén-dioxid biztosítása mellett. A legjobb eredményt gyomorbiopsziákhoz, antibiotikumok hozzáadásával létrehozott szelektív táptalajon, 5-7 napos tenyésztéssel érték el *H. pylori* esetében (Patel et al., 2014). A tenyésztés érzékenysége nagyban változó a laboratóriumoktól függően, még a jobb eredményekkel rendelkező intézmények is csak 50-70%-ban tudják izolálni a baktériumot biztosan fertőzött mintákból (Glupczynski, 1998; Grove et al., 1998). A baktériumtenyésztés időigényes és bonyolult módja a *Helicobacter*-fertőzés megállapításának, és napjainkban a rutin diagnosztika során a megbízhatóbb noninvazív tesztek szükségtelessé tették a használatát (Glupczynski, 1998). Ettől függetlenül a *H. pylori*-val kapcsolatos kutatásokban a tenyésztés értékes információkat nyújtott az antibiotikum-érzékenység, a gazda-kórokozó kapcsolat és a vakcinafejlesztés terén (Lee, 1998).

Mivel a *Helicobacter*-fertőzés feltételezett leggyakoribb útja az oro-fekális átadás, felmerült a baktérium izolálásának lehetősége bélsármintákból. Az eredmények azonban a gyomorból vett mintákból történő izolálásnál is gyengébbnek bizonyultak. Ennek oka lehet a baktériumok fokozott érzékenysége az epesavakra (Hänninen, 1991), a bélsárban megtalálható számos baktériumfaj közötti kompetíció, és annak valószínűsége, hogy a bélsárban a *Helicobacter* életképes, de nem tenyészthető formában vannak jelen. Ebből következik, hogy a bélsár-tenyésztés, mint nem invazív kimutatási mód nem terjedt el a *Helicobacter*-diagnosztikában (Patel et al., 2014).

### **3.5.5. Szerológia és antigén-kimutatás**

*H. pylori*-fertőzött páciensek szérumját vizsgálva megállapították, hogy több baktérium-antigén is képes immunválaszt indukálni, többek között a sejtfelszíni lipopoliszacharidok, hősokk proteinek, ureáz komponensek, kataláz, stb (Torres et al., 2002). A *Helicobacter*-fertőzés krónikus jellege miatt az IgG a domináns ellenanyag (Mitchell et al., 1987). A baktérium nagyfokú antigénvariabilitással bír, különböző földrajzi egységekre jelentősen eltérő antigénszerkezettel rendelkező törzsek jellemzőek (Raymond et al., 2004), amit alátámaszt a páciensekből immunoblottal kimutatott ellenanyag-profil diverzitása is (Mayo et al., 1998). Ennek áthidalására a helyben előforduló törzsekre alapozott kitek használata ajánlott (Hoang et al., 2004), illetve olyan közös antigének keresése és alkalmazása, ami globálisan az összes törzsben előfordul (Marchildon et al., 2003). A kutatások alapján a *H. pylori* kimutatására használt szerológiai módszerek szenzitivitása és specificitása 80-90% között mozog, azonban a gazda immunválasza jelentősen eltérő lehet egyénenként, és függ a fertőzésnek való kitettség időtartamától, tápláltságtól és antigénrokonságban álló baktériumokkal (pl. *Campylobacter*) való keresztreakcióktól (Patel et al., 2014). Az

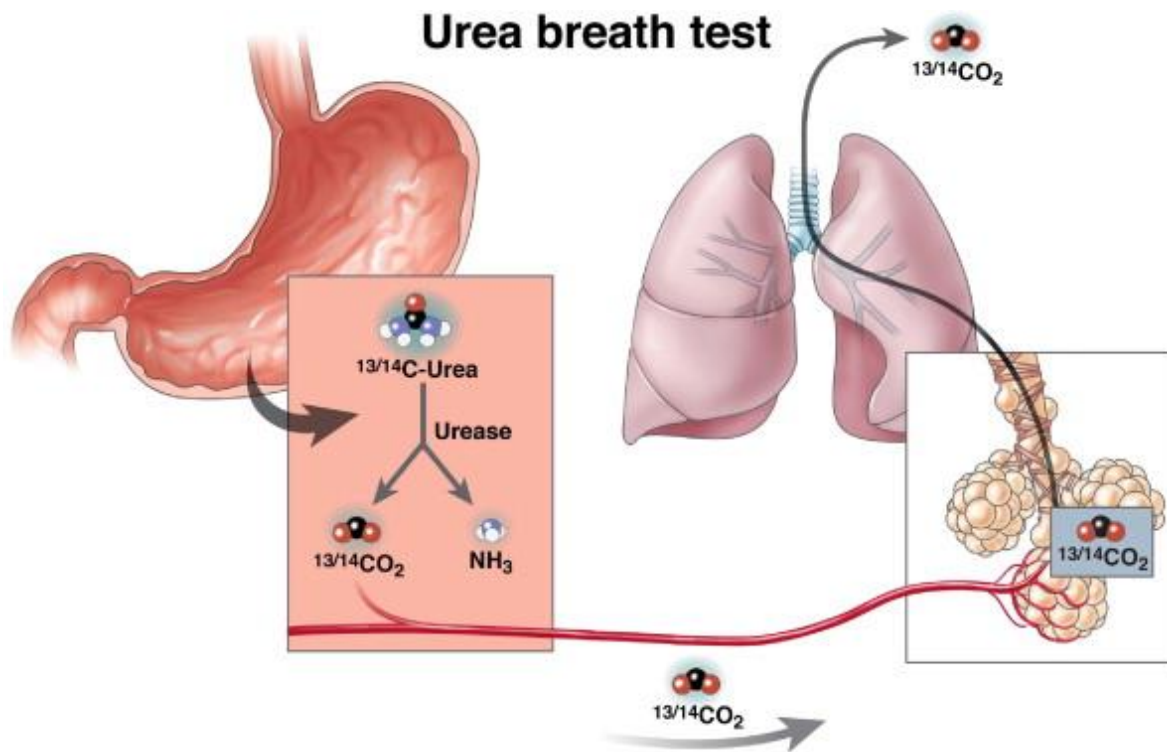
immunoblot próba magasabb specificitással bír, azonban szenzitivitása elmarad az ELISA-étól (Nilsson et al., 1997), továbbá magas költséggel jár és az értékelés nehézsége miatt nem terjedt el a klinikai diagnosztikában. A szerológiai tesztek alkalmazása ellen szóló legerősebb érv, hogy nem lehetséges az aktív és a már lezajlott fertőzés elkülönítése, ugyanis a kórokozó eliminációja után is sokáig perzisztálnak a termelt ellenanyagok (Vaira és Vakil, 2001). Vaira és munkatársai a bélsárból való antigénkimutatás szenzitivitását és specificitását is 90% felettinek találták (1999), azonban az antigénmennyiség csökkenésével a fals negatív eredmények száma rohamosan nő, továbbá az antigénürítés mértéke a fertőzés fennállása alatt ingadozhat, és a bélen való áthaladás is az antigének degradációját okozza. A vizelet *H. pylori*-antigén tartalmának mérése is egy noninvazív, gyors, olcsó és egyszerű módja a diagnózisnak, azonban az alacsony koncentrációban jelenlévő ellenanyag fals negatív, a vizelet nagy mennyiségű nem specifikus IgG tartalma pedig fals pozitív eredmény okozhat (Shimizu et al., 2003).

### 3.5.6. UBT

Az urea kilégzési teszt a humán orvoslásban elsődlegesen alkalmazandó *H. pylori* kimutatására 35 év alatti páciensek esetében. Ennek során  $^{13}\text{C}$  (nem sugárzó) vagy  $^{14}\text{C}$  (sugárzó) atommal jelzett karbamidtablettát fogyaszt a páciens, melyet a gyomorban lévő *Helicobacter* ureáz enzime ammóniára és jelölt hidrogén-karbonátra bont. A hidrogén-karbonát a vérbe kerül, majd a tüdön keresztül jelölt szén-dioxid formájában, kilélegezve ürül (Kajiwara et al., 1997) (1. ábra). A kifújt levegőből vett mintát a  $^{13}\text{C}$  atom esetében infravörös spektrométerrel, a  $^{14}\text{C}$  atomot használva pedig szcintillációs számlálóval vizsgálják, a jelölt szénatom mennyiségéből következtetve a *Helicobacter* jelenlétére. Bár a sugárzó izotópos vizsgálat sugárterhelése töredéke egy röntgenvizsgálaténak, a nem sugárzó  $^{13}\text{C}$ -UBT használata az elterjedtebb (Opekun et al., 2005). Előnye, hogy nem invazív, gyors, biztonságos, és az aktuálisan fennálló állapotról tájékoztat. Gisbert és Pajares áttekintő cikkükben (2004) a humán pácienseknél alkalmazott UBT eredményeket értékelve 90% feletti szenzitivitásról és specificitásról számoltak be. Egyéb kimutatási eljárásoktól eltérően az UBT a terápia utáni vizsgálatkor is magas érzékenységgel rendelkezik, illetve enyhe és egyenlőtlen eloszlású kolonizáció esetén is megbízhatóan működik. Az eredmények azonban fals pozitívak lehetnek, ha más ureáz-pozitív baktériumok vannak jelen a gyomorban, és fals negatívak, ha protonpumpagátlókkal vagy antibiotikumokkal kezelték a beteget a teszt elvégzése előtt (Patel et al., 2014). A  $^{13}\text{C}$ -UBT-t állatorvosi célra használva Kubota és munkatársai (2013)

laboratóriumi kutyákat vizsgálva meghatározták a módszer referenciatartományát, és klinikai beteganyagon alkalmazva a tesztet, kiszámították a szenzitivitását és specificitását.

1. ábra - Az UBT mechanizmusa (www.kibion.com)



## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Betegszelekció

A mintáinkat az ÁTE Kisállatklinikájának Belgyógyászati Klinikáján 2016. júniustól 2017. októberig megvizsgált 24 kutyából gyűjtöttük, melyekből kettő a klinika tulajdonát képező, gyakorlati oktatásra tartott beagle, a többi pedig magántulajdonban lévő, kedvtelésből tartott kutya (7 kan, 17 szuka), átlagéletkoruk 6 év 3 hónap (7 hónapostól 14 év, 1 hónaposig).

Sorszám	Törzsszám	Fajta	Kor	Nem	Kórszövettan	PCR
1	241535	border collie	7 év 10 hó	kan	+	+
2	252371	yorkshire terrier	14 év 1 hó	szuka	+	
3	255958	havanese jellegű	2 év 9 hó	szuka	+	+
4	253570	szamojéd	4 év	kan	+	+
5	240429	keverék	8 év 5 hó	szuka	+	+
6	257069	yorkshire terrier	2 év 3 hó	szuka	+	
7	257264	bichon bolognese	7 év 2 hó	szuka	+	
8	196127	yorkshire terrier	8 év 9 hó	szuka	+	
9	257964	amerikai akita	8 hó	szuka		
10	257954	keverék	2 év 6 hó	szuka		
11	249889	beagle	5 év 2 hó	szuka	+	+
12	256328	shiba-inu	7 év	szuka		+
13	257916	mini bullterrier	2 év 8 hó	szuka	+	+
14	253166	beagle	4 év 2 hó	kan		
15	258572	staffordshire terrier	7 hó	szuka	+	
16	258744	labrador retriever	3 év 11 hó	kan	+	+
17	253924	golden retriever	1 év 8 hó	szuka		
18	260114	golden retriever	8 év	szuka		
19	246892	közép schnauzer keverék	12 év 5 hó	szuka		
20	260330	keverék	11 év	szuka		
21	239194	parson russel terrier	8 év 4 hó	kan		
22	253880	golden retriever	11 év 9 hó	szuka	+	+
23	262958	keverék	4 év 2 hó	kan	+	+
24	263003	törpe uszár	10 év 10 hó	kan	+	+

1. táblázat – Az UBT-vel vizsgált kutyák listája és az elvégzett kórszövettani és PCR vizsgálatok

A 24 kutya közül 15 gyomor eredetű panaszok miatt került endoszkópos vizsgálatra. A gasztroszkópia során minden kutya gyomrából történt biopsziás mintavétel, amely kórszövettani vizsgálatra került. 11 állat esetében a mintából PCR vizsgálatot kértünk a kórszövettani értékelésen túl (1. táblázat). UBT-t mind a 24 kutyánál végeztünk. 9 állat esetében azért nem került sor gasztroszkópiára, mert ezek az állatok tünetmentesek voltak, de fennállt a fertőzöttség valószínűsége, mert együtt tartották őket bizonyítottan fertőzött kutyákkal, így a tulajdonosok kérésére végeztük el a gyors és nem invazív UBT-t, azonban az altatással járó és költséges endoszkópos vizsgálat nem volt indokolt.

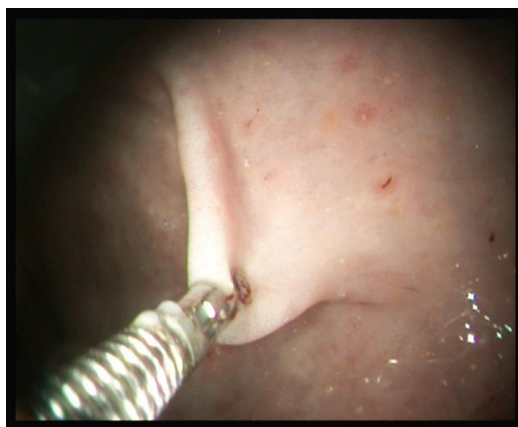
## 4.2. Gasztroszkópia és mintavétel

Az endoszkópiára 12 órás koplaltatás után érkeztek a páciensek. A tulajdonosok tájékoztatása és a beavatkozás előtti vizsgálat után altatásban került sor a gasztroduodenoszkópiára.

A kutyák vénakanülön keresztül diazepamot (Seduxen inj., Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország) (0,2-0,5 mg/kg), dexmedetomidint (Dexdomitor 0,1 mg/ml, ORION Pharma Kft, Budapest, Magyarország) (0,05 mg/kg) kaptak premedikáció, majd propofolt (Diprivan 1%, Astra Zeneca, Canada Inc., Mississauga, Kanada) (2-3 mg/kg, hatás szerint) indukció céljából. Mandzsettás endotrachealis (2-12 mm átmérőjű) tubus behelyezését követően a narkózis fenntartása 1,5-4,0 V/V%-os izoflurán (Isofluran CP, CPPharma, Burgdorf, Németország) és oxigén lélegeztetésével történt. Karl Storz 60914 PKS típusú flexibilis videogasztroszkóp (Karl Storz Company, Tuttlingen, Németország) használatával került sor a gyomor megtekintésére, mely 140 cm hosszú, külső átmérője 9,8 mm és munkacsatornája 2,8 mm. A mintavételhez MediGlobe GBF-21-23-180 típusú biopsziás fogót (átmérő 2,3 mm, hossza 180 cm) használt a vizsgáló, aki minden esetben Dr. Psáder Roland volt.

Kórszövettani vizsgálat céljából a gyomorból anatómiai régióként (corpus ventriculi, fundus ventriculi, antrum pyloricum) 3-3 mintavételre került sor (2. ábra). A mintákat 4%-os pufferolt formaldehid oldatba helyeztük, egyedileg megjelöltük és szobahőmérsékleten tároltuk. PCR vizsgálatra a corpusból és az antrumból 2-2 mintára volt szükség, ezek steril fiziológiás sóoldatba (Salsol inf., Teva Gyógyszergyár Zrt., Debrecen, Magyarország) kerültek, és -80°C-on tároltuk őket felhasználásig (Sanyo VIP Series Ultra-Low, Panasonic Healthcare Company of North America, Secaucus, NJ, USA).

2. ábra - Gyomorbiopszia kutya gyomrából (Dr. Psáder Roland gyűjteményéből)

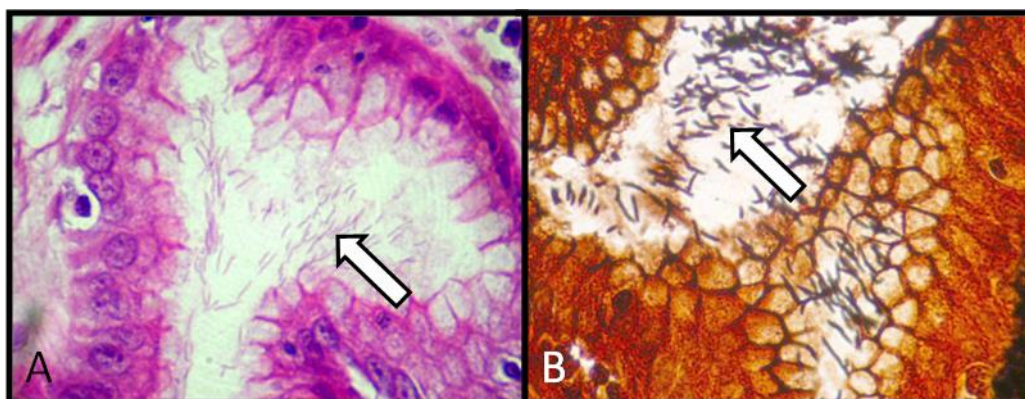




### 4.3. Kórszövettani vizsgálat

A kórszövettani vizsgálat céljából vett minták feldolgozása és elbírálása az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékén történt. A 24 órás formalinos fixálás és a paraffinos beágyazás után 4 µm vastagságú kórszövettani metszeteket készítettek. A GHLO kimutatása céljából alkalmazott festési módszerek a hematoxilin-eozin, a módosított Giemsa, illetve szükség esetén egy speciális festés, a Warthin-Starry volt. Festés után lehetővé vált a minták morfológiai (pl. gyulladásos) elváltozásának értékelése és a baktériumok azonosítása (3. ábra). Az elbírálás egységessége végett a WSAVA által a gyomorbiopsziák kórszövettani értékeléséhez ajánlott szempontrendszert használták (Day et al., 2008), kiegészítve a GHLO-jelenlét vizsgálatával (Psáder, 2014). Ennek megfelelően a nyálkahártyán mutakozó limfocitás-plazmasejtes, eozinofil sejtes vagy neutrofil sejtes beszűrődést és a limfoid folliculáris hiperpláziát 0-3-ig terjedő skálán jelölték (nincs, enyhe, közepes, súlyos). A GHLO-fertőzöttség osztályozására is ezt a skálát használta a patológus, empirikus alapon.

3. ábra - GHLO-pozitív kórszövettani minták, a nyilak jelölik a baktériumokat (bal oldal: hematoxilin-eozin festés, jobb oldal: Whartin-Starry festés)(Dr. Psáder Roland gyűteményéből)



### 4.4. PCR-rel történő kimutatás

A fiziológias sóoldatban fagyasztott minták PCR-vizsgálata a budapesti Vet-Med-Laborban (Állatorvosi Diagnosztikai Labor & Állatorvosi Műszercentrum, 1141 Budapest, Szugló utca 89.) történt.

A kimutatáshoz a *Helicobacter* 16S riboszómális RNS génjére egyedileg tervezett specifikus primert használtak, (Integrated DNA Technologies, Inc., San Diego, USA). Ez egy univerzális szakasza a génnek, mely minden *Helicobacter* fajban megegyezik. A primer neve *Helicobacter* 1 (forward és reverse). A primer alapjául az NCBI génbank gb|DQ062213.1 azonosítószámú szekvenciája szolgált (2. táblázat). A két primer (forward és reverse) Tm érték

(olvadáspont) különbsége 0,2 °C. Ez kisebb, mint 0,5°C, tehát ez egy jól megtervezett primer. Pozitív kontrollként *Helicobacter pylori* törzset alkalmaztak (Csepi, 2016).

Gén/Génbank azonosító száma	Primer	Szekvencia	Forward/ Reverse	Tm (C°)
Helicobacter 16S riboszómális RNS DOI: gb DQ062213.1	Helicobacter 1f	5'-CAA TCA GCG TCA GGT AATG-3'	Forward	51,0
	Helicobacter 1r	5'-TAA AGA GAT CAG CCT ATG TCC-3'	Reverse	51,2

2. táblázat - A *Helicobacter 1* primer adatai (Csepi, 2016)

A pozitív kontroll (*H. pylori*) Tm-értékét viszonyítva a minták értékeihez meg tudjuk állapítani, hogy jelen volt-e GHLO a mintában, tehát pozitív vagy negatív a PCR eredmény (Csepi, 2016).

#### 4.5. <sup>13</sup>C-UBT alkalmazása *Helicobacter*-kimutatásra

A kilégzési tesztre a kutyák 12 órás koplaltatás és 8 órás vízmegvonás után érkeztek. Abban az esetben, ha gyógyszeres kezelés alatt álltak a teszt elvégzését megelőzően, az antibiotikumok, savszekréció-gátlók és gyomornyálkahártya-bevonók adását egy hétre felfüggesztették, annak érdekében, hogy ezek ne befolyásolják a teszt eredményét.

Első lépésként a reagens beadása előtt egy lélegzetmintát vettem az állattól (T<sup>0</sup>), humán diagnosztikában is használt gyűjtőballonba (TECOBAG for gas analysis, Tesseraux Spezialverpackungen GmbH, Bürstadt, Németország). Ez egy műanyag maszkon keresztül történt, amit egyenirányító szeleppel láttunk el, hogy az állat ne tudja visszalélegezni a levegőt a ballonból (4. ábra). A ballon megtöltése után lecsatlakoztattam azt a mintagyűjtő maszkról, és lezártam, majd a reagens szájon át történő beadása következett. A reagens egy 75 mg karbamidot tartalmazó tablettá, amely a szén 13-as számú izotópját tartalmazza (<sup>13</sup>C-urea tablettá, Izinta Kereskedelmi Kft., Budapest, Magyarország). Gazdasági okokból a 12 kg alatti tömegű kutyák egy fél tablettát kaptak, az afelettiék egy egészet, 50 ml almalében feloldva. Az almalé biztosítja a savas közeget, amelyben a *Helicobacterek* által termelt ureáz enzim optimálisan működik, helyette használható narancslé vagy hígított citromsav is. Dr. Nagy Edit humán gasztroenterológus ajánlása alapján és a kutyáknak való beadhatóság szempontjából

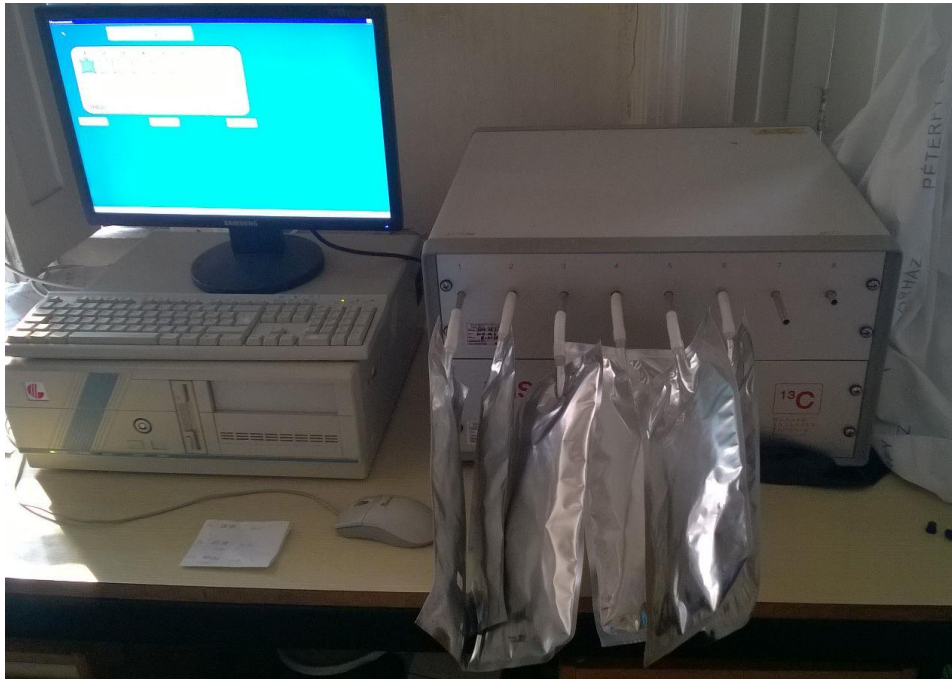
döntöttünk a kereskedelmi forgalomban kapható, 12%-os almalé mellett. Az oldat térfogata emellett lassítja a gyomorürülést és maximalizálja a karbamid eloszlását a gyomorban (Wang et al., 2013). A reagens beadása után 30 perccel ismételt mintavétel történt ( $T^{30}$ ), a  $T^0$  mintával megegyező módon (Kubota et al., 2013). A gyűjtőballonban lévő minták hónapokig tárolhatók (a  $^{13}\text{C}$  stabil izotóp) és mivel a mérés csupán kis térfogatot használ fel, többször újramérhetők.

4. ábra - A mintavétel folyamata



A mintákat IRIS infravörös izotóp spektrométerrel vizsgáltam (Wagner Analysen Technik GmbH, Bréma, Németország), mely a Belgyógyászati Tanszéken elérhető volt, így a mintavételek után azonnal el tudtam végezni a mérést (5. ábra). A spektrométer többek között egy infravörös sugárforrásból és egy akusztiko-optikus detektorból áll. Az infravörös sugár áthalad az analizálni kívánt gázt tartalmazó cellán és részben elnyelődik, ami hőmérsékletemelkedést, ezt követően nyomásemelkedést okoz. Ezt a változást érzékeli a spektrométer kondenzátor mikrofonja (Haisch et al., 1994). A teszt azon alapul, hogy a  $^{12}\text{CO}_2$  és a  $^{13}\text{CO}_2$  különbözőképpen nyelik el az infravörös sugárzást (Mion et al., 2001). A minta elnyelését és a két gáz egyedi elnyelését (amelyek a gép két másik cellájában vannak jelen) egy szoftver hasonlítja össze (Coelho et al., 1999).

5. ábra - Az IRIS spektrométer mérés közben



Az analízis eredménye az ezrelékben (‰) kifejezett delta ( $\delta$ ) érték, ami megadja a minta izotóp aránya ( $R_{\text{minta}}$ :  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  arány a mintában) és egy referencia anyag izotóp aránya ( $R_{\text{ref}}$ :  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  arány a referencia anyagban) közötti különbséget ( $\delta = 1,000(R_{\text{minta}} - R_{\text{ref}})/R_{\text{ref}}$ ) (Wang et al., 2013). A referencia anyag egy kaliforniai mészkőtömb. A páciens  $T^0$  és  $T^{30}$  mintáinak  $\delta$  értéke közötti különbséget a DOB (delta over baseline) számszerűen fejezi ki. A DOB az UBT értékelendő eredménye, ennek referenciatartománya humán orvoslásban a mérést végző intézménytől függően változó. Kubota és munkatársai kutyák esetén a negativitás felső határát 2,5 ezrelékben határozták meg, az afeletti mintákat tekintették pozitívnak (2013), mi is ezzel a referencia értékkel dolgoztunk.

#### 4.6. Terápia és kontroll

A pozitív UBT eredményű kutyákat eradikációs terápiában részesítettük. 10 esetben a protokoll a következőkből állt: 7 napon át naponta  $2 \times 20$  mg/kg amoxicillin-klavulánsav,  $2 \times 8$ - $10$  mg/kg klaritromicin és  $1 \times 0,7$ - $1$  mg/kg omeprazol, és 6 héten át naponta kétszer egy késhegynyi magisztrálisan kevert bizmut por, per os adva. Ezt a protokollt egy humán gastroenterológus ajánlotta, megegyezik az embereknél *H. pylori* fertőzés esetén sikerrel alkalmazott kezeléssel. További 6 alkalommal 14 napos omeprazol, amoxicillin-klavulánsav, klaritromicin kezelést adtunk a fenti ajánlással megegyező dózisban,  $2 \times 15$  mg/kg metronidazollal kiegészítve (4 eset) vagy enélkül (2 eset), és a bizmut port napi  $3 \times$  adtuk 6 héten át változatlan dózisban.

#### 4.7. Statisztikai értékelés

Az értékelés során összevetettük az egyes kutyákból elvégzett UBT, kórszövettani és PCR eredményeket. Az értékelést a Biomatematikai és Számítástechnikai Tanszék munkatársa, Dr. Harnos Andrea végezte. Mivel tanulmányunkat klinikai beteganyagon végeztük, a korábban ismertetett okokból nem készült minden kutyából minden vizsgálat, ezért elemzésünk a következők szerint alakult:

1.  $n=11$  kutya eredményei alapján a PCR eredményeket gold standardnak véve meghatároztuk az UBT szenzitivitását, specificitását, pozitív és negatív prediktív értékét.
2.  $n=15$  kutya kórszövettani és UBT eredményét felhasználva a kórszövettani vizsgálat eredményéhez viszonyítva is kiszámoltuk az UBT fent említett értékeit.
3.  $n=13$  kutya eredményeinek összehasonlító elemzésében a nemzetközi gyakorlatban gold standardnak elfogadott PCR módszer eredményeit (legyen az pozitív vagy negatív) és azokat a pozitív kórszövettani eredményeket vettük alapul, melyekből nem készült PCR, ehhez viszonyítva határoztuk meg az UBT fent említett értékeit. Ennek az összehasonlításnak az alapja egy korábbi hazai tanulmány, mely leírja, hogy a kórszövettani vizsgálat szenzitivitása alacsony GHLO-ra nézve (20%), de specificitása 100% (Nagy, 2016).
4. A PCR-t, vagy annak hiányában a pozitív kórszövettani eredményt véve alapul, ROC görbe analízis segítségével kiszámítottuk az UBT módszer ajánlott vágási pontját, tehát a negatív és a pozitív tartomány határértékét.
5. Spearman-féle rangkorreláció módszert alkalmazva vizsgáltuk, hogy az UBT számszerű eredménye korrelál-e a kórszövettani eredmény négyfokú skálájával (negatív, enyhe, közepes, súlyos).

## 5. Eredmények

### 5.1. UBT eredmények

A 24 elvégzett kilégzési teszt 17 esetben adott pozitív eredményt (>2,5‰), a vizsgált kutyák 70,8%-a bizonyult *Helicobacterrel* fertőzöttnek. A pozitív eredmények 3,0-55,2‰ közötti tartományba estek, az átlaguk 17,8‰. Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

Törzsszám	Fajta	Kor	Nem	<sup>13</sup> C-UBT	UBT értékelés
241535	border collie	7 év 10 hó	kan	3,0‰	+
252371	yorkshire terrier	14 év 1 hó	szuka	24,7‰	+
255958	havanese jellegű	2 év 9 hó	szuka	1,0‰	-
253570	szamojéd	4 év	kan	22,1‰	+
240429	keverék	8 év 5 hó	szuka	11,4‰	+
257069	yorkshire terrier	2 év 3 hó	szuka	1,7‰	-
257264	bichon bolognese	7 év 2 hó	szuka	2,1‰	-
196127	yorkshire terrier	8 év 9 hó	szuka	25,4‰	+
257964	amerikai akita	8 hó	szuka	11,9‰	+
257954	keverék	2 év 6 hó	szuka	15,4‰	+
249889	beagle	5 év 2 hó	szuka	5,9‰	+
256328	shiba-inu	7 év	szuka	0,4‰	-
257916	mini bullterrier	2 év 8 hó	szuka	9,4‰	+
253166	beagle	4 év 2 hó	kan	4,4‰	+
258572	staffordshire terrier	7 hó	szuka	27,2‰	+
258744	labrador retriever	3 év 11 hó	kan	1,5‰	-
253924	golden retriever	1 év 8 hó	szuka	14,5‰	+
260114	golden retriever	8 év	szuka	9,7‰	+
246892	közép schnauzer keverék	12 év 5 hó	szuka	1,9‰	-
260330	keverék	11 év	szuka	55,2‰	+
239194	parson russel terrier	8 év 4 hó	kan	33,2‰	+
253880	golden retriever	11 év 9 hó	szuka	6,1‰	+
262958	keverék	4 év 2 hó	kan	1,2‰	-
263003	törpe uszkár	10 év 10 hó	kan	22,5‰	+

3. táblázat - A vizsgált kutyák UBT eredményei

### 5.2. Kórszövettani eredmények

15 kórszövettani vizsgálatunk közül 5 esetben kaptunk pozitív eredményt (33,3%). Ezek közül 2 enyhe, 2 közepes és 1 súlyos fertőzést állapított meg a vizsgálat. Ez az 5 kutya UBT módszerrel is pozitívnak bizonyult (4. táblázat).

### 5.3. PCR eredmények

11 esetben küldtünk mintát PCR vizsgálatra, ezek közül 3 esetben volt kimutatható *Helicobacter*-fertőzöttség (27,3%). Mindhárom kutya UBT eredménye szintén pozitív. A PCR-rel negatív 8/11 állat közül (72,8%) UBT-vel 4 lett negatív (4. táblázat, a pozitív eredmények szürke háttérrel kiemelve).

Törzsszám	C13-UBT	Kórszövettan	PCR
241535	3,0‰	negatív	pozitív
252371	24,7‰	enyhe	n.a.
255958	1,0‰	negatív	negatív
253570	22,1‰	negatív	negatív
240429	11,4‰	közepes	negatív
257069	1,7‰	negatív	n.a.
257264	2,1‰	negatív	n.a.
196127	25,4‰	súlyos	n.a.
249889	5,9‰	negatív	pozitív
256328	0,4‰	n.a.	negatív
257916	9,4‰	negatív	pozitív
258572	27,2‰	közepes	n.a.
258744	1,5‰	negatív	negatív
253880	6,1‰	negatív	negatív
262958	1,2‰	negatív	negatív
263003	22,5‰	enyhe	negatív

4. táblázat - UBT, kórszövettani és PCR eredmények (n.a. jelentése: nem történt vizsgálat)

### 5.4. Statisztikai eredmények

1. n=11 mintában a PCR eredményeket gold standardnak tekintve az UBT módszer szenzitivitása 100%, specificitása 50%, pozitív prediktív értéke 42,9% és negatív prediktív értéke 100% (5. táblázat).

		PCR eredmény		
		+	-	
UBT eredmény	+	<b>Valódi pozitív</b> (VP) = 3	<b>Fals pozitív</b> (FP) = 4	<b>Pozitív prediktív érték</b> = $VP / (VP + FP)$ = $3 / (3+4)$ = <b>42,9%</b>
	-	<b>Fals negatív</b> (FN) = 0	<b>Valódi negatív</b> (VN) = 4	<b>Negatív prediktív érték</b> = $VN / (FN + VN)$ = $4 / (0+4)$ = <b>100 %</b>
		<b>Szenzitivitás</b> = $VP / (VP + FN)$ = $3 / (3+0)$ = <b>100%</b>	<b>Specificitás</b> = $VN / (FP + VN)$ = $4 / (4+4)$ = <b>50%</b>	

5. táblázat - Az UBT értékelése a PCR eredmények alapján

2. n=15 mintában az UBT eredményét a kórszövetteni eredményekhez viszonyítva az UBT módszer szenzitivitása 100%, specificitása 50%, pozitív prediktív értéke 50% és negatív prediktív értéke 100% (6. táblázat).

		Kórszövetteni eredmény		
		+	-	
UBT eredmény	+	<b>Valódi pozitív</b> (VP) = 5	<b>Fals pozitív</b> (FP) = 5	<b>Pozitív prediktív érték</b> = $VP / (VP + FP)$ = $5 / (5+5)$ = <b>50%</b>  <b>Negatív prediktív érték</b> = $VN / (FN + VN)$ = $5 / (0+5)$ = <b>100 %</b>
	-	<b>Fals negatív</b> (FN) = 0	<b>Valódi negatív</b> (VN) = 5	
		<b>Szenzitivitás</b> = $VP / (VP + FN)$ = $5 / (5+0)$ = <b>100%</b>	<b>Specificitás</b> = $VN / (FP + VN)$ = $5 / (5+5)$ = <b>50%</b>	

6. táblázat - Az UBT értékelése a kórszövetteni eredmények alapján

3. n=13 kutya esetében az UBT eredményeket viszonyítottuk a PCR eredményeket és azokat a kórszövettenal pozitív mintákat tartalmazó csoporthoz, melyekből nem készült PCR. Itt az UBT módszer szenzitivitása 100%, specificitása 60%, pozitív prediktív értéke 80% és negatív prediktív értéke 100% (7. táblázat).

		PCR eredmények és azok a kórszövettenal pozitív minták, melyekből nem készült PCR		
		+	-	
UBT eredmény	+	<b>Valódi pozitív</b> (VP) = 8	<b>Fals pozitív</b> (FP) = 2	<b>Pozitív prediktív érték</b> = $VP / (VP + FP)$ = $8 / (8+2)$ = <b>80%</b>  <b>Negatív prediktív érték</b> = $VN / (FN + VN)$ = $3 / (0+3)$ = <b>100 %</b>
	-	<b>Fals negatív</b> (FN) = 0	<b>Valódi negatív</b> (VN) = 3	
		<b>Szenzitivitás</b> = $VP / (VP + FN)$ = $8 / (8+0)$ = <b>100%</b>	<b>Specificitás</b> = $VN / (FP + VN)$ = $3 / (2+3)$ = <b>60%</b>	

7. táblázat - Az UBT értékelése a PCR eredmények és a PCR eredménnyel nem rendelkező egyedek pozitív kórszövetteni eredményei alapján

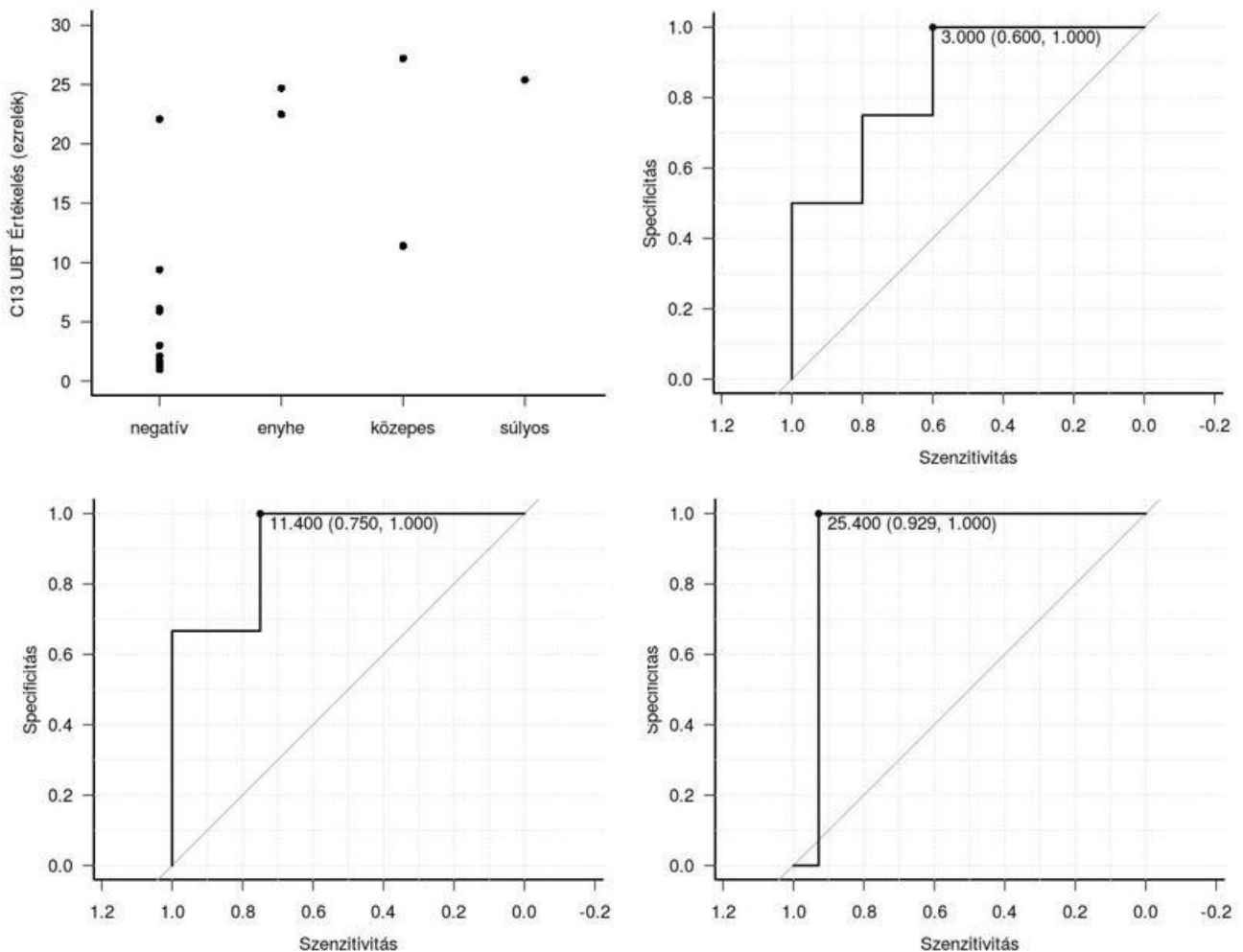
4. A 3. pontban leírt PCR és kórszövetteni vizsgálat kombinált eredményei alapján ROC görbe analízissel meghatározva az UBT módszer ajánlott vágási pontja 1,5 és 3% között van. Ez azt jelenti, hogy ebbe a tartományba esik a pozitivitás és negativitás határa, mert a szenzitivitás és a specificitás számszerű értékének összege ebben a tartományban a legnagyobb.



5. Spearman-féle rangkorreláció alapján az UBT eredménye és a kórszövettani eredmény súlyossága között pozitív korreláció igazolható. A korrelációs együttható ( $\rho$ ) 0,78. Az eredmény szignifikáns, a p-érték 0,0006. 15 kutyából származó eredményeink alapján a kórszövettani vizsgálat négyfokú skálájához igazodó javasolt UBT határértékek a következők (6. ábra):

- a. negatív – 0-3‰
- b. enyhe – 3-11,4‰
- c. közepes – 11,4-25,4‰
- d. súlyos – 25,4‰ felett

6. ábra - Statisztikai eredmények. Bal fent: Spearman rangkorreláció eredménye. Jobb fent és lent: Kórszövettani eredmények alapján javasolt UBT határértékek a súlyosság értékelésére



## **5.5. Kontroll UBT eredmények**

8 esetben a kezdetben alkalmazott egy hetes amoxicillin-klavulánsav-klaritromicin-omeprazol-6 hét bizmut protokoll után végeztünk kontroll vizsgálatot, ez mindegyik esetben pozitív lett (3,1-68,1%, átlag: 17,26%). 2 kutyánál végeztünk kontroll vizsgálatot a metronidazollal kiegészített két hetes kezelés után, az egyik esetben pozitív (15,0%), a másikban negatív (2,4%) eredményt kaptunk.

## 6. Megbeszélés

Munkánk célja a hányás vagy dyspepsia tüneteivel érkező kutyák esetén *Helicobacter* fajok  $^{13}\text{C}$ -UBT-vel történő kimutatása volt. Ennek keretein belül tapasztalatokat szereztünk a módszer technikai alkalmazhatóságával kapcsolatban, és a vizsgálatok eredményei alapján következtetéseket vontunk le az UBT diagnosztikai értékét illetően.

Kijelenthető, hogy a kilégzési teszt probléma nélkül beilleszthető a rutin klinikai munkába. Míg a humán diagnosztikában a páciensek egy mélyebb kilégzéssel töltik fel a mintagyűjtő ballont, a kutyák esetében ennek kivitelezhetetlensége áthidalható egy maszk és egy egyenirányító szelep használatával. Egy-egy ballon feltöltése kb. fél percet vett igénybe, ennek során nem tapasztaltunk számottevő ellenállást a kutyák részéről. Az almalében oldott reagens itatása is megoldható csupán a tulajdonos segítségével. A mintavétellel aktívan töltött idő kb. 5 perc egy kutya esetén, a teszt gyorsasága és egyszerűsége is lehetővé teszi a rendszeres állatorvosi alkalmazását. Mivel a klinika épületén belül rendelkezésünkre állt a mérés elvégzéséhez szükséges spektrométer, a mintavétel után pár percen belül megkaptuk a teszt eredményét. Ennek hiányában a mintát megfelelő felszereltségű laboratóriumba kell küldeni, ez a szolgáltatás elérhető az országban. Összességében elmondható, hogy a  $^{13}\text{C}$ -UBT technikai szempontból sikerrel alkalmazható a kisállatpraxisban.

A 24 esetben elvégzett kilégzési teszt 70,8%-ban adott pozitív eredményt, ez egyezik a szakirodalomban leírt prevalenciával (Haesebrouck et al., 2009). A kérdésre, hogy a kutyák GHLO-fertőzése okoz-e tüneteket és megbetegedést, munkánk – a kísérleti elrendezésből következően – nem keres választ.

A 11 elvégzett PCR vizsgálatból csak 3 lett pozitív, mely feltűnően alacsony a szakirodalomban olvasható prevalenciához képest. Ebből 7/11 esetben kaptunk pozitív eredményt kórszövettani vizsgálattal vagy UBT-vel. Patel és munkatársai a humán *H. pylori* fertőzések diagnosztikájában a PCR-t javasolták, mint gold standard módszer, így a kísérleti elrendezésünkben mi is a PCR eredményekhez viszonyítjuk az UBT eredményeket, ennek alapján meghatározva az UBT diagnosztikai értékét (2014). Azonban a markánsan nagy számú negatív PCR eredmény felvetette annak lehetőségét, hogy esetünkben analitikai hiba áll fenn. Ennek gyanúját erősíti, hogy a 3 pozitív mintánk az első mintaküldés során a laborba juttatott 6 minta közül került ki, a második alkalommal beküldött 5 mintánk PCR eredménye mind negatív lett, így nem kizárható, hogy az utóbbi 5 minta küldése vagy feldolgozása során valamilyen hiba történt. Az a tény is a PCR eredmény fals negativitása felé mutat, hogy olyan

kutyák is negatívak lettek PCR-rel, amelyek kórszövettani eredménye pozitív. Nagy Otília szakállatorvosi dolgozatában az állatorvos patológus által GHLO detektálása céljából végzett kórszövettani vizsgálat érzékenységét 20%-nak állapította meg, specificitása azonban 100% (2016). Így valószínűtlennek tűnik, hogy két olyan kutya is van az általunk vizsgált 11 között, amelyek az alacsony szenzitivitású kórszövettani vizsgálatnál pozitív eredményt adtak, viszont a magas szenzitivitással bíró PCR vizsgálatnál negatívak. Az esetleges labormethodikai hiba mellett a fals negatív PCR eredmény oka lehet az is, hogy a gyomorban gyakran nem egyenletes a GHLO eloszlása, így az adott biopátum fennálló fertőzés mellett is lehet baktériummentes. Eredményeink értékelése során azonban a szakirodalmi adatok alapján a PCR eredményeket vesszük alapul, a módszer hibalehetőségeinek további feltárására nem volt lehetőségünk.

A PCR és UBT eredményeket összevetve az UBT szenzitivitása 100%, a PCR-rel pozitív 3 kutya UBT-vel is pozitív volt. Mivel csupán 3 pozitív PCR eredmény állt rendelkezésünkre, ez alapján kellett megállapítanunk a teszt érzékenységét, és az adatok kis száma jelentősen csökkenti az eredmény hitelességét, nagyobb mintaszámon alapuló számításra van szükség. Hasonlóan meggyőző, 100%-os szenzitivitás értékeket kaptunk, ha az UBT eredményeket a kórszövettani vizsgálat eredményével vetettük össze. Eredményeink alapján az UBT nagyon érzékeny módszer a GHLO kimutatására, ha jelen van a fertőzés a kutya gyomrában, ezzel az eszközzel szinte biztosan ki tudjuk mutatni. A PCR-rel negatív 8 esetből az UBT 4 esetben adott negatív eredményt, specificitása 50%. A másik két csoportot is figyelembe véve (akár a kórszövettanhoz, akár a PCR és pozitív kórszövettani eredményekhez hasonlítva) az UBT specificitása 50-60% között mozog, pozitív prediktív értéke 42,9-80% közé esik. Felmerül a kérdés, hogy mi okozza a magas számú fals pozitív eredményt. Ennek legvalószínűbb oka más ureáztermelésre képes baktériumok jelenléte a szájüregben vagy a gyomorban, amelyek szintén képesek a  $^{13}\text{C}$  atommal jelölt szén-dioxidot felszabadítani a karbamid molekulából. Ilyen baktériumok a *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* és *Staphylococcus aureus* (Osaki et al., 2008). A humán diagnosztika során ennek a hatásnak a kiküszöbölése érdekében a teszt elvégzése előtt alapos fogmosást kérnek a páciensektől, ennek lehetősége esetleg felmerül a kutyák esetén is. Kubota és munkatársai kutatásuk során 30 percet vártak a reagens beadása után a mintavételig (2013), mi is ezt a hatásidőt alkalmaztuk, de érdemes lehet megvizsgálni, hogy csökkenti-e a fals pozitív eredmények számát, ha ezt az időt csökkentjük. Az UBT negatív prediktív értéke azonban mindhárom csoportban 100%, tehát tanulmányunk alapján a negatív eredmény minden esetben fertőzésmentes állapotot jelent.

A GHLO kimutatásra irányuló PCR szenzitivitása és specificitása is 90% feletti (Patel et al., 2014), és az állatorvos patológus által végzett kórszövettani vizsgálat specificitása 100% (Nagy, 2016). Ezek alapján a pozitív és negatív PCR, valamint a pozitív kórszövettani eredményeket is „igaznak” tekintve és figyelembe véve az UBT specificitása 60%, és a pozitív prediktív érték is magasabb (80%) a másik két csoporthoz képest. Az utóbbi két paraméter emelkedése ebben az értékelési módban annak köszönhető, hogy a PCR és kórszövettani eredményeket kombináltan figyelembe véve több kutyát értékeltünk ténylegesen pozitívnak, tehát az előző számításokban fals pozitívnak vett UBT eredmények itt nem mondanak ellent a viszonyítási alapnak, nem falsak. Az UBT, mint GHLO kimutatási módszer diagnosztikai értékének meghatározását akkor tekinthetnénk teljesen megbízhatónak, ha biztosan tudnánk, melyik kutya valóban fertőzött, és melyik nem, és ehhez viszonyítva mérhetnénk fel, milyen módon és mennyire „téved” az UBT. Viszont mivel a másik két általunk alkalmazott diagnosztikai módszer sem hibátlan, fenntartással kell kezelnünk ezeket az értékeket. Az ebből adódó pontatlanságok kiküszöbölhetők, ha a kutatás során nagy mintaszámmal van lehetőség dolgozni, és sok egyed eredményeiből vonhatunk le következtetéseket. Vizsgálatunk fő limitáló tényezője, hogy anyagi korlátok és a klinikai munkavégzés sajátosságai miatt alacsony betegszám állt rendelkezésünkre, így a statisztikai eredményeink hitelessége kisebb.

További megállapításunk az UBT vágási pontjával kapcsolatos. Kubota és munkatársai az UBT állatorvosi alkalmazásakor 2,5‰ feletti értékeket vettek pozitívnak (2013), mi is ekképpen jártunk el. A PCR eredményeink alapján ROC görbe analízissel bebizonyosodott, hogy az optimális vágási pont 1,5‰ és 3‰ között van, ha ebből a tartományból választunk határértéket, akkor érjük el, hogy a módszer szenzitivitásának és specificitásának összege a legnagyobb legyen. A humán orvoslásban a <sup>13</sup>C-UBT vágási pontja általában 3-4‰ között van (Mauro et al., 2006; Li et al., 2017). A későbbiekben érdemes lehet a javasolt tartomány felső határát választani (3‰), így még nem csökkentjük a módszer diagnosztikai értékét, miközben kevesebb lehet a fals pozitív eredmények mennyisége, azonban ennek alátámasztására nagyobb mintaszámra van szükség.

Továbbra sem megválaszolt kérdés, hogy az UBT eredmény összefüggésben áll-e a fertőzés vagy az elváltozások súlyosságával. A kezelés szempontjából nem tettünk különbséget a pozitív UBT eredmények között azok nagysága alapján, azonban lehetőségünk nyílt a négyfokú kórszövettani eredmény és az UBT nagysága közötti korrelációt vizsgálni. Az összefüggés szignifikánsnak bizonyult, ami felveti a lehetőséget, hogy az UBT eredményt a jövőben a fertőzés súlyosságának besorolására is használjuk. Az eddigi adatok alapján a négy

súlyossági fokozathoz tartozó UBT határértékek is meghatározhatók voltak. Ennek segítségével egyszerűbben nyomon követhetővé válhat a GHLO eradikációs terápiájának ellenőrzése, pl. annak megállapításával, hogy alacsonyabb súlyossági kategóriába került-e az állat a kezelés hatására. Az UBT eredmény tünetekkel való összefüggésének mélyrehatóbb vizsgálata nagyobb mintaszámot és az elváltozások súlyosságának pontos megítélését teszi szükségessé, pl. gyomortükrözés által.

Tanulmányunknak eredetileg nem volt célja az alkalmazott kezelés hatékonyságának értékelése, de mivel klinikai kutatásról van szó, a fertőzöttnek diagnosztizált betegeket minden esetben kezeltük, és az ezzel kapcsolatos tapasztalataink is leírásra érdemesek. Az elsőként alkalmazott egy hetes amoxicillin-klavulánsav-klaritromicin-omeprazol és 6 héten át adott bizmut kezelés után továbbra is pozitív UBT eredményeket kaptunk, azonban a tulajdonosok a tünetek csökkenéséről vagy megszűnéséről számoltak be. A később alkalmazott két hetes amoxicillin-klavulánsav-klaritromicin-metronidazol-omeprazol-6 hét bizmut protokoll után az elvégzett kilégzési teszt egyik esetben negatív, a másikban pozitív volt, a kutyák tünetei megszűntek. Ebből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a humán *Helicobacter*-protokoll nagy valószínűséggel nem eradikálja a kutyák GHLO fertőzését, azonban továbbra sem ad választ arra a kérdésre, hogy szükség van-e egyáltalán eradikációra. Megfigyeltük, hogy az eradikáció sikertelensége esetén is javult a kutyák állapota, ennek két indoka is lehet. Az egyik, hogy valójában sikerült megszüntetnünk a fertőzést, viszont az UBT fals pozitív eredményű lett minden esetben. A másik lehetséges ok, hogy tényleg nem sikerült az eradikáció, viszont nem a *Helicobacter* fajok okozták a tüneteket, és az antibiotikumok bélflóra-moduláló- és a protonpumpagátló szer gyomorvédő hatásának köszönhetően szűntek meg a panaszok. A gyógyszeres kezelés hatékonyságának vizsgálatához célzott kutatásokra van szükség.

Összességében elmondható, hogy a <sup>13</sup>C-UBT sikeresen alkalmazható a kutyák GHLO fertőzésének detektálására. Gyors, egyszerű, elérhető árú és nagyon érzékeny diagnosztikai eszköz. Ezzel együtt fontos hangsúlyozni, hogy nem helyettesítheti az endoszkópos vizsgálatot, ami a gyomor közvetlen megtekintését és a biopsziás mintavételt is lehetővé teszi, és segítségével számos egyéb gyomorbetegség is diagnosztizálható (pl. gyomordaganat, fekély, gyulladás). Eddigi tapasztalataink alapján az UBT elsősorban a *Helicobacter* eradikációs terápia utáni kontrollvizsgálat legfontosabb eszköze lehet, mivel nagy szenzitivitással rendelkezik és nem invazív, könnyen elvégezhető. A kezelés hatékonysága ismételt gasztroszkópiával is ellenőrizhető, azonban ez többszörös többletköltséget és az általános anesztézia újbóli alkalmazását tenné szükségessé, és a kapott információtöbblet nem oly

mértékben releváns, hogy a páciens és a tulajdonost másodjára is kitegyük ennek a beavatkozásnak.

## 7. Összefoglalás

A gyomor *Helicobacter*-szerű baktériumainak (GHLO) pontos szerepe a kutyák gyomordaganatainak és gyomorgyulladásainak kialakulásában egyelőre nem ismert, költséghatékony kimutatásuk a mindennapi klinikai gyakorlatban is fontos szempont. Munkánk célja a GHLO kimutatása gasztroszkópiára érkező kutyákból <sup>13</sup>C-UBT-vel (karbamid kilégzési teszt; Urea Breath Test). Eredményeinket összevetettük az endoszkópos gyomorbiopsziák GHLO kimutatására irányuló PCR és rutin kórszövettani vizsgálataival. További célunk, hogy a <sup>13</sup>C-urea kilégzési tesztet bevezessük a klinikai gyakorlatba, mert olcsóbb és kevésbé invazív, mint az endoszkópos mintavétel és a PCR vizsgálat.

Tanulmányunkban az Állatorvostudományi Egyetem Belgyógyászati Tanszék és Klinikájára gyomor-bél panaszokkal érkező kutyákból 24-ben (7 kan, 17 szuka; átlagéletkor 6 év, 3 hónap, koreloszlás 7 hónap - 14 év, 1 hónap) végeztük el a <sup>13</sup>C-UBT-tesztet. Ezekből 11 esetben (5 kan, 6 szuka; átlagéletkor 6 év 3 hónap, koreloszlás 8 hónap - 11 év, 9 hónap) végeztük el az endoszkópos gyomorbiopsziákból a GHLO kimutatására szolgáló PCR és kórszövettani vizsgálatot is. A minták rutin kórszövettani feldolgozása (HE. festés, módosított Giemsa festés) a Patológiai Tanszéken történt. A *Helicobacter* PCR-hez a 16S riboszómális RNS génre egyedileg tervezett, genus-specifikus primert, pozitív kontrollként *Helicobacter pylori* törzset használtunk. Az UBT mintákat infravörös izotóp spektrométerrel vizsgáltuk, a nemzetközi ajánlás szerinti küszöbértéket (2,5‰) véve alapul az elbírásáshoz. A kapott eredményekből kiszámoltuk a <sup>13</sup>C-UBT specificitását, szenzitivitását, pozitív és negatív prediktív értékét. Spearman-féle rangkorrelációval meghatároztuk az UBT és a kórszövettani vizsgálat eredménye közötti összefüggés mértékét.

Az UBT eredménye 17/24 (70,8%) esetben volt pozitív (3,0-55,2‰, átlag: 17,8‰). A PCR-rel 3/11 állat volt pozitív (27,3%), ezek UBT eredménye is pozitív, az UBT szenzitivitása 100%. A PCR-rel negatív 8/11 állat közül (72,8%) UBT-vel 4 lett negatív, az UBT specificitása 50%. A kórszövettani vizsgálat 5/11 esetben volt pozitív (45,5%), ezek közül 2 enyhe, 2 közepes és 1 súlyos fertőzöttséget állapított meg. Ezek az állatok UBT-vel is pozitívak. A kórszövettani vizsgálat alapján talált GHLO fertőzöttség mértéke és az UBT eredmény nagysága között korreláció igazolható ( $\rho=0,78$ ;  $p=0,0006$ ).

Munkánk során szerzett tapasztalataink alapján a <sup>13</sup>C-UBT sikeresen elvégezhető a mindennapi klinikai gyakorlatban. Egyszerű kivitelezése és magas szenzitivitása miatt fontos eszköz lehet a gyomorpanaszokkal küzdő kutyák vizsgálatában. A módszer nagyszámú fals



pozitív eredménye azonban határt szab a megbízhatóságának és nem helyettesíti a gyomortükrözést, valamint a gyomorbiopsziák kórszöveti vizsgálatát.

## 8. Summary

The exact role of gastric *Helicobacter*-like organisms (GHLO) in the pathogenesis of gastritis and gastric tumours in dogs is still unclear, a cost-effective method of proving their presence is important to have in daily clinical practice. The aim of our work is to detect GHLO using the <sup>13</sup>C-UBT (Urea Breath Test) in dogs undergoing gastroscopy. Our results were compared to the results of histopathologic and PCR examination of gastric biopsies obtained via endoscopy. Our further purpose was to introduce the <sup>13</sup>C-UBT into everyday clinical practice as a cheaper and less invasive method than endoscopic sampling and PCR.

During our study, we examined 24 dogs (7 males, 17 females; age: 7 months - 14 years and 1 month, mean: 6 years and 3 months) using <sup>13</sup>C-UBT. These dogs were referred to the Department and Clinic of Internal Medicine at the University of Veterinary Medicine with gastrointestinal symptoms. In 11 cases (5 males, 6 females, age: 2 years and 8 months – 11 years and 9 months, mean: 6 years and 3 months), gastroscopy and biopsy sampling were performed, histopathologic and PCR examinations were conducted to detect GHLO infection from the biopsies. The histological processing (modified Giemsa stain, hematoxylin and eosin staining) of the biopsies obtained during the endoscopic examination was performed at the Department of Pathology. An individually designed genus specific primer based on the 16S rRNA gene was used for the PCR, the positive control was a *Helicobacter pylori* strain. The UBT samples were examined with an infrared isotope spectrometer, using the internationally approved cut-off value (2,5‰) as basis for interpreting the results. Based on the outcome of the UBT, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were calculated. Correlation between the results of the UBT and the histopathologic examination was determined by Spearman's rank correlation method.

The UBT was positive in 17/24 (70,8%) cases (mean: 17,8‰, range: 3,0-55,2‰). 3/11 animals were positive by PCR (27,3%), the UBT result of these dogs was positive, too, the sensitivity of the UBT is 100%. From the 8/11 animals found negative by PCR (72,8%), 4 were negative by UBT as well, the specificity of the UBT is 50%. The histopathologic examination was positive in 5/11 cases (45,5%), among these, 2 mild, 2 medium and 1 severe infections were detected. Correlation is proven between the scale of infection determined by histopathology and the extent of the UBT result ( $\rho$ : 0.78;  $p$ : 0.0006).

Based on experiences from our study, <sup>13</sup>C-UBT can be successfully implemented during clinical practice and due to its simplicity and high sensitivity, it could become an important

diagnostic tool for GHLO detection in the examination and diagnosis of dogs having gastric problems. However, the high number of false positive results limits the reliability of the test and it cannot supersede gastroscopy and the histopathological analysis of gastric biopsies.

## 9. Irodalom

- AXON, A.T.R., 1993: *Helicobacter pylori* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 32, 61–68.
- BAELE, M., DECOSTERE, A., VANDAMME, P., CEELLEN, L., HELLEMANS, A., MAST, J., CHIERS, K., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F., 2008a: Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1350–1358.
- BAELE, M., DECOSTERE, A., VANDAMME, P., VAN DEN BULCK, K., GRUNTAR, I., MEHLE, J., MAST, J., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F., 2008b: *Helicobacter baculiformis* sp. nov., isolated from feline stomach mucosa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 357–364.
- BROWN, C.C., BAKER, D.C., BARKER, I.K., 2007: Alimentary system, in: MAXIE, M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. New York, Elsevier Saunders. 1–269.
- CHOU, C.H., SHEU, B.S., YANG, H.B., CHENG, P.N., SHIN, J.S., CHEN, C.Y., LIN, X.Z., 1997: Clinical assessment of the bacterial load of *Helicobacter pylori* on gastric mucosa by a new multi-scaled rapid urease test. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 1–6.
- COELHO, L.G., REBER, M., PASSOS, M.C., AGUIAR, R.O., CASAES, P.E., BUENO, M.L., 1999: Application of isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for the evaluation of the 13C-urea breath test: comparison with three concordant methods. *Braz J Med Biol Res* 32, 1493–1497.
- CSEPI, R., 2016: *Helicobacter* és circovírus kimutatás gyomortükrözésre érkezett kutyák endoszkópos gyomor- és bélbiopsziáumaiból : TDK-dolgozat.
- DAY, M.J., BILZER, T., MANSELL, J., WILCOCK, B., HALL, E.J., JERGENS, A., MINAMI, T., WILLARD, M., WASHABAU, R., World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group, 2008: Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J. Comp. Pathol.* 138 Suppl 1, S1-43.
- DE GROOTE, D., VAN DOORN, L.-J., VAN DEN BULCK, K., VANDAMME, P., VIETH, M., STOLTE, M., DEBONGNIE, J.-C., BURETTE, A., HAESEBROUCK, F., DUCATELLE, R., 2005: Detection of non-*pylori Helicobacter* species in “*Helicobacter heilmannii*”-infected humans. *Helicobacter* 10, 398–406.
- DENT, J.C., MCNULTY, C.A., UFF, J.C., WILKINSON, S.P., GEAR, M.W., 1987: Spiral organisms in the gastric antrum. *Lancet Lond. Engl.* 2, 96.
- DEWHIRST, F.E., SHEN, Z., SCIMECA, M.S., STOKES, L.N., BOUMENNA, T., CHEN, T., PASTER, B.J., FOX, J.G., 2005: Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics. *J. Bacteriol.* 187, 6106–6118.
- DIKER, K.S., HAZIROGLU, R., AKAN, M., CELIK, S., KABAKCI, N., 2002: The prevalence, colonization sites and pathological effects of gastric *Helicobacters* in dogs. *Turk J Vet Anim Sci* 26, 345–351.
- EATON, K.A., BROOKS, C.L., MORGAN, D.R., KRAKOWKA, S., 1991: Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 59, 2470–2475.
- EL-ZIMAITY, H.M., GRAHAM, D.Y., AL-ASSI, M.T., MALATY, H., KARTTUNEN, T.J., GRAHAM, D.P., HUBERMAN, R.M., GENTA, R.M., 1996: Interobserver variation in the histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. *Hum. Pathol.* 27, 35–41.
- FODOR, L., SZEREDI, L., VARGA, J., 1999: A *Helicobacter* nemzetség. *Magy. Állatorvosok Lapja* 121, 426–433.
- FONTENETE, S., GUIMARÃES, N., LEITE, M., FIGUEIREDO, C., WENGEL, J., FILIPE AZEVEDO, N., 2013: Hybridization-based detection of *Helicobacter pylori* at human body temperature using advanced locked nucleic acid (LNA) probes. *PLoS One* 8, e81230.
- FOX, J.G., BATCHELDER, M., MARINI, R., YAN, L., HANDT, L., LI, X., SHAMES, B., HAYWARD, A., CAMPBELL, J., MURPHY, J.C., 1995: *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. *Infect. Immun.* 63, 2674–2681.
- GISBERT, J.P., PAJARES, J.M., 2004: Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection -- a critical review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 1001–1017.
- GLUPCZYNSKI, Y., 1998: Microbiological and serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: an overview. *Br. Med. Bull.* 54, 175–186.
- GOODWIN, C.S., ARMSTRONG, J.A., CHILVERS, T., PETERS, M., COLINS, M.D., SLY, L., MCCONNELL, W., HARPER, W.E.S., 1989: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 397–405.
- GOODWIN, C.S., WORSLEY, B.W., 1993: Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 22, 5–19.

- GROVE, D.I., KOUTSOURIDIS, G., CUMMINS, A.G., 1998: Comparison of culture, histopathology and urease testing for the diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis and susceptibility to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline. *Pathology* (Phila.) 30, 183–187.
- HAESEBROUCK, F., PASMANS, F., FLAHOUE, B., CHIERS, K., BAELE, M., MEYNS, T., DECOSTERE, A., DUCATELLE, R., 2009: Gastric *Helicobacters* in Domestic Animals and Nonhuman Primates and Their Significance for Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 202–223.
- HAISCH, M., HERING, P., FUSS, W., FABINSKI, W., 1994: A sensitive isotope selective nondispersive infrared spectrometer for <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> and <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> concentration measurements in breath samples. *Isot. Env. Health Stud* 30, 247–251.
- HANDT, L.K., FOX, J.G., DEWHIRST, F.E., FRASER, G.J., PASTER, B.J., YAN, L.L., ROZMIAREK, H., RUFO, R., STALIS, I.H., 1994: *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect. Immun.* 62, 2367–2374.
- HÄNNINEN, M.L., 1991: Sensitivity of *Helicobacter pylori* to different bile salts. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 515–518.
- HAPPONEN, I., SAARI, S., CASTREN, L., TYNI, O., HÄNNINEN, M.-L., WESTERMARCK, E., 1996: Occurrence and Topographical Mapping of Gastric *Helicobacter*-like Organisms and Their Association with Histological Changes in Apparently Healthy Dogs and Cats. *J. Vet. Med. Ser. A* 43, 305–315.
- HEILMANN, K.L., BORCHARD, F., 1991a: Further Observations on Human Spirobacteria, in: MENGE, H., GREGOR, M., TYTGAT, G.N.J., MARSHALL, B.J., MCNULTY, C.A.M: *Helicobacter Pylori 1990*. Springer, Berlin, Heidelberg, 63–70.
- HEILMANN, K.L., BORCHARD, F., 1991b: Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut* 32, 137–140.
- HERMANN, W., KREGEL, K., BREUER, W., LECHNER, J., 1995: *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J. Comp. Pathol.* 112, 307–318.
- HOANG, T.T.H., WHEELDON, T.-U., BENGTSSON, C., PHUNG, D.C., SÖRBERG, M., GRANSTRÖM, M., 2004: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Helicobacter pylori* Needs Adjustment for the Population Investigated. *J. Clin. Microbiol.* 42, 627–630.
- HWANG, C.-Y., HAN, H.-R., YOUN, H.-Y., 2002: Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. *J. Vet. Sci.* 3, 123–133.
- KAJIWARA, M., IIDA, K., TAKATORI, K., TANIGUCHI, Y., KIMURA, K., 1997: Validity of the <sup>13</sup>C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 45, 741–743.
- KUBOTA, S., OHNO, K., TSUKAMOTO, A., MAEDA, S., MURATA, Y., NAKASHIMA, K., FUKUSHIMA, K., UCHIDA, K., FUJINO, Y., TSUJIMOTO, H., 2013: Value of the <sup>13</sup>C-urea breath test for detection of gastric *Helicobacter* spp. infection in dogs undergoing endoscopic examination. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 1049–1054.
- KUSTERS, J.G., VAN VLIET, A.H.M., KUIPERS, E.J., 2006: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 449–490.
- LEE, A., 1998: Animal models for host-pathogen interaction studies. *Br. Med. Bull.* 54, 163–173.
- LERANG, F., MOUM, B., MOWINCKEL, P., HAUG, J.B., RAGNHILDSTVEIT, E., BERGE, T., BJØRNEKLETT, A., 1998: Accuracy of seven different tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the impact of H<sub>2</sub>-receptor antagonists on test results. *Scand. J. Gastroenterol.* 33, 364–369.
- LI, Z., HUANG, L.-L., LIU, C., FORMICHELLA, L., ZHANG, Y., WANG, Y.-M., ZHANG, L., MA, J.-L., LIU, W.-D., ULM, K., WANG, J.-X., ZHANG, L., BAJBOUJ, M., LI, M., VIETH, M., QUANTE, M., ZHOU, T., WANG, L.-H., SUCHANEK, S., PAN, K.-F., 2017: Cut-off optimization for C-urea breath test in a community-based trial by mathematic, histology and serology approach. *Sci. Rep.* 7.
- MARCHILDON, P.A., SUGIYAMA, T., FUKUDA, Y., PEACOCK, J.S., ASAKA, M., SHIMOYAMA, T., GRAHAM, D.Y., FUKADA, Y., 2003: Evaluation of the effects of strain-specific antigen variation on the accuracy of serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1480–1485.
- MARSHALL, B.J., WARREN, J.R., 1984: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1311–1315.
- MAURO, M., RADOVIC, V., ZHOU, P., WOLFE, M., KAMATH, M., BERCIK, P., CROITORU, K., ARMSTRONG, D., 2006: <sup>13</sup>C urea breath test for *Helicobacter pylori*: Determination of the optimal cut-off point in a Canadian community population. *Can. J. Gastroenterol.* 20, 770–774.
- MAYO, K., PRETOLANI, S., GASBARRINI, G., GHIRONZI, G., MEGRAUD, F., 1998: Heterogeneity of Immunoglobulin G Response to *Helicobacter pylori* Measured by the Unweighted Pair Group Method with Averages. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 70.
- MCNULTY, C.A., DENT, J.C., CURRY, A., UFF, J.S., FORD, G.A., GEAR, M.W., WILKINSON, S.P., 1989: New spiral bacterium in gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.* 42, 585–591.
- MÉGRAUD, F., 1996: Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 215, 57–62.

- MIKKONEN, T.P., KÄRENLAMPI, R.I., HÄNNINEN, M.-L., 2004: Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 753–758.
- MION, F., ECOCHARD, R., GUITTON, J., PONCHON, T., 2001: (13)CO(2) breath tests: comparison of isotope ratio mass spectrometry and non-dispersive infrared spectrometry results. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 25, 375–379.
- MISHRA, S., SINGH, V., RAO, G.R.K., JAIN, A.K., DIXIT, V.K., GULATI, A.K., NATH, G., 2008: Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens: comparative evaluation of nested PCR and antigen detection. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2, 206–210.
- MITCHELL, H.M., BOHANE, T.D., BERKOWICZ, J., HAZELL, S.L., LEE, A., 1987: Antibody to *Campylobacter pylori* in families of index children with gastrointestinal illness due to *C. pylori*. *Lancet Lond. Engl.* 2, 681–682.
- MORRIS, J.M., REASONOVER, A.L., BRUCE, M.G., BRUDEN, D.L., MCMAHON, B.J., SACCO, F.D., BERG, D.E., PARKINSON, A.J., 2005: Evaluation of seaFAST, a Rapid Fluorescent In Situ Hybridization Test, for Detection of *Helicobacter pylori* and Resistance to Clarithromycin in Paraffin-Embedded Biopsy Sections. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3494–3496.
- NAGY, O., 2016: *Helicobacterium* kimutatás kutyák gasztroszkópos gyomor biopsziáiból PCR módszerrel és kórszövettani vizsgálattal : [Szakállatorvosi szakdolgoz.]
- NILSSON, I., LJUNGH, A., ALELJUNG, P., WADSTRÖM, T., 1997: Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J. Clin. Microbiol.* 35, 427–432.
- NISHIKAWA, K., SUGIYAMA, T., KATO, M., ISHIZUKA, J., KAGAYA, H., HOKARI, K., ASAKA, M., 2000: A prospective evaluation of new rapid urease tests before and after eradication treatment of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, culture and 13C-urea breath test. *Gastrointest. Endosc.* 51, 164–168.
- OPEKUN, A.R., GOTSCHALL, A.B., ABDALLA, N., AGENT, C., TORRES, E., SUTTON, F.M., GRAHAM, D.Y., TSUCHIYA, K., 2005: Improved infrared spectrophotometer for point-of-care patient 13C-urea breath testing in the primary care setting. *Clin. Biochem.* 38, 731–734.
- O'ROURKE, J.L., SOLNICK, J.V., NEILAN, B.A., SEIDEL, K., HAYTER, R., HANSEN, L.M., LEE, A., 2004: Description of “Candidatus *Helicobacter heilmannii*” based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2203–2211.
- OSAKI, T., MABE, K., HANAWA, T., KAMIYA, S., 2008: Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Med. Microbiol.* 57, 814–819.
- PATEL, S.K., PRATAP, C.B., JAIN, A.K., GULATI, A.K., NATH, G., 2014: Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 12847–12859.
- PATEL, S.K., PRATAP, C.B., VERMA, A.K., JAIN, A.K., DIXIT, V.K., NATH, G., 2013: *Pseudomonas fluorescens*-like bacteria from the stomach: a microbiological and molecular study. *World J. Gastroenterol.* 19, 1056–1067.
- POUNDER, R.E., NG, D., 1995: The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 Suppl 2, 33–39.
- PRIESTNALL, S.L., WIINBERG, B., SPOHR, A., NEUHAUS, B., KUFFER, M., WIEDMANN, M., SIMPSON, K.W., 2004: Evaluation of “*Helicobacter heilmannii*” subtypes in the gastric mucosae of cats and dogs. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2144–2151.
- PSÁDER, R., 2014: Az endoszkópia szerepe és lehetőségei a gasztroenterológiai diagnosztika és terápia néhány területén kutyában : PhD-értekezés. Budapest.
- PUETZ, T., VAKIL, N., PHADNIS, S., DUNN, B., ROBINSON, J., 1997: The Pyloritek test and the CLO test: accuracy and incremental cost analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 92, 254–257.
- RÁCZ, I., 1996. A *Helicobacter pylori* és a fekélybetegség. *Orv. Hetil.* 137, 1459–1467.
- RAYMOND, J., THIBERGE, J.-M., CHEVALIER, C., KALACH, N., BERGERET, M., LABIGNE, A., DAUGA, C., 2004: Genetic and Transmission Analysis of *Helicobacter pylori* Strains within a Family. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1816–1821.
- ROTIMI, O., CAIRNS, A., GRAY, S., MOAYYEDI, P., DIXON, M.F., 2000: Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. *J. Clin. Pathol.* 53, 756–759.
- RUGGE, M., GENTA, R.M., 2005: Staging and grading of chronic gastritis. *Hum. Pathol.* 36, 228–233.
- SHIMIZU, T., YARITA, Y., HARUNA, H., KANEKO, K., YAMASHIRO, Y., GUPTA, R., ANAZAWA, A., SUZUKI, K., 2003: Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies in children. *J. Paediatr. Child Health* 39, 606–610.
- SINGH, V., MISHRA, S., RAO, G.R.K., JAIN, A.K., DIXIT, V.K., GULATI, A.K., MAHAJAN, D., MCCLELLAND, M., NATH, G., 2008: Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60. *Helicobacter* 13, 30–34.

- THORESON, A.C., BORRE, M., ANDERSEN, L.P., JØRGENSEN, F., KIILERICH, S., SCHEIBEL, J., RATH, J., KROGFELT, K.A., 1999: *Helicobacter pylori* detection in human biopsies: a competitive PCR assay with internal control reveals false results. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24, 201–208.
- TORRES, J., CAMORLINGA-PONCE, M., PEREZ-PEREZ, G., MUÑOZ, L., MUÑOZ, O., 2002: Specific Serum Immunoglobulin G Response to Urease and CagA Antigens of *Helicobacter pylori* in Infected Children and Adults in a Country with High Prevalence of Infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 97–100.
- VAIRA, D., MALFERTHEINER, P., MÉGRAUD, F., AXON, A.T., DELTENRE, M., HIRSCHL, A.M., GASBARRINI, G., O’MORAIN, C., GARCIA, J.M., QUINA, M., TYTGAT, G.N., 1999: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet Lond. Engl.* 354, 30–33.
- VAIRA, D., VAKIL, N., 2001: Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*. *Gut* 48, 287–289.
- VAN DEN BULCK, K., DECOSTERE, A., BAELE, M., DRIESSEN, A., DEBONGNIE, J.-C., BURETTE, A., STOLTE, M., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F., 2005: Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2256–2260.
- VAN DEN BULCK, K., DECOSTERE, A., BAELE, M., VANDAMME, P., MAST, J., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F., 2006: *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1559–1564.
- WANG, S., ZHANG, W.M., REINEKS, E., 2013: Breath tests for detection of *Helicobacter pylori* and *Aspergillus fumigatus*, in: TANG, Y.M., STRATTON, C.W: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer Science, New York, 13–30.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Nagyon sok embernek köszönhetem, hogy ez a dolgozat megszületett. Első sorban Dr. Psáder Rolandnak, aki szakértelmével, kreativitásával, kitartásával és humorával felejthetetlen élménnyé tette a munkafolyamatot, sokat tanultam tőle szakmailag.

Köszönöm a humán orvos kollégáknak a segítséget: Dr. Pap Ákosnak, aki az IRIS spektrométert rendelkezésünkre bocsátotta, és Dr. Nagy Editnek, aki ismertette a gép kezelésének lépéseit.

Dr. Harnos Andreának köszönöm az adataink statisztikai elemzését. Dr. Falus Fruzsínának köszönhetően az egyetemi beagle-ök részesülhettek a kezelésben. Az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének munkatársai végezték a kórszövettani elemzést, a Vet-Med Labor Állatorvosi Diagnosztikai Laboratórium dolgozói pedig a PCR vizsgálatokat. Köszönöm munkájukat.

Ignác Regínának és Nagy Tamásnak köszönöm a fényképezésnél nyújtott segítséget.

Munkánk az NKB kutatási pályázat támogatásával készült (NKB kutatási pályázat témaszáma: 2016 dologi/15827).



## NYILATKOZAT

Alulírott Mózes Borbála nyilatkozom, hogy szakdolgozatom, melynek címe: Tapasztalatok a  $^{13}\text{C}$ -urea kilégzési teszt alkalmazásával kapcsolatban a gyomorban előforduló *Helicobacter* fajok kimutatására gasztroszkópiára érkezett kutyákból tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2017. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2017.11.17.

Mózes Borbála



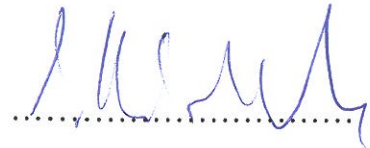
.....

a hallgató neve és aláírása

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Psáder Roland, mint témavezető nyilatkozom, hogy Mózes Borbála állatorvostan-hallgató „Tapasztalatok a  $^{13}\text{C}$ -urea kilégzési teszt alkalmazásával kapcsolatban a gyomorban előforduló Helicobacter fajok kimutatására gasztroszkópiára érkezett kutyákból” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2017. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2017.10.16.



témavezető

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: MOJES CORVILA  
Elérhetőség (e-mail cím): borislo.moxes@gmail.com  
A feltöltendő mű címe: Tapasztalatok a 13. C. évi ügyvéti tevékenységéről törvényességi közleményben a  
gyanúsított elbíráló Heltrehozott hírek kiadványában, gazdálkodás elhelyeztetéséről  
A mű megjelenési adatai: TPK, 2013. évi 13. sz. törvény  
Az átadott fájlok száma: 0

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtől PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyag rész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

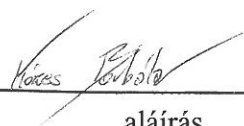


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2017. év ...*november*... hó ..*20*... nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.