

Voorkomen van gastrale helicobacters in speeksel en feces van honden en katten

Presence of gastric Helicobacter spp. in feces and saliva from dogs and cats

H. Berlamont, M. Joosten, R. Ducatelle, *F. Haesebrouck, *A. Smet

Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Helena.Berlamont@UGent.be
Annemieke.Smet@UAntwerpen.be
* shared senior authorship

SAMENVATTING

In de maag van meer dan de helft van de honden en katten worden *Helicobacter*-bacteriën aangetroffen, zowel bij dieren zonder klinische tekens als bij dieren met chronische maagproblemen. Deze bacteriën kunnen tevens ernstige maagpathologieën veroorzaken bij de mens. Hoe gastrale helicobacters overgedragen worden tussen dieren en van dieren naar mensen is nog niet volledig opgehelderd, maar er wordt gesuggereerd dat direct contact een rol kan spelen. Om na te gaan of speeksel en feces zouden kunnen fungeren als bron van transmissie, werd de aanwezigheid nagegaan van gastrale *Helicobacter*-species in orale swabs en feces van honden en katten.

In deze studie werden 155 speekselstalen en 141 fecesstalen verzameld van 106 honden en 58 katten. Van 22 honden werd bovendien een maagbiopt verzameld om na te gaan of de *Helicobacter*-species aanwezig in het speeksel en/of de feces ook terug te vinden zijn in de maag van deze dieren. Alle stalen werden onderzocht op het voorkomen van *Helicobacter*-DNA via species-specifieke qPCRs en sequentieanalysebepalingen van de bekomen amplicons.

Bij 43% van de honden en 41% van de katten werden één of meer positieve stalen gevonden. *Helicobacter*-species werden gedetecteerd in 29% van de speekselstalen, 37% van de fecesstalen en 41% van de maagbiopten. Bovendien bleek dat honden en katten met meer dan één *Helicobacter*-species tegelijkertijd geïnfecteerd konden zijn. Er kon echter geen duidelijke correlatie aangetoond worden tussen de aanwezigheid van een bepaalde *Helicobacter*-species in de maag van honden en de detectie ervan in hun speeksel en feces. De hier gebruikte testen lieten evenmin toe om na te gaan of het gedetecteerde DNA afkomstig was van leefbare *Helicobacter*-kiemen. Bijkomende studies zijn bijgevolg noodzakelijk om het belang van speeksel en feces als besmettingsbron voor andere dieren en mensen met gastrale *Helicobacter*-species te bevestigen.

ABSTRACT

Gastric *Helicobacter* species are present in the stomach of more than 50% of dogs and cats. These bacteria have also been associated with severe gastric pathologies in humans. The route of transmission between pets and from pets to humans remains unclear, but it has been suggested that direct contact might play a role. In order to determine whether transfer might occur through contact with saliva and feces, the presence of *Helicobacter* DNA was determined in oral swabs and feces of dogs and cats.

In this study, 155 saliva samples and 141 fecal samples were collected from 106 dogs and 58 cats. From 22 dogs, a gastric biopsy sample was also collected, aiming to investigate whether the same *Helicobacter* species found in saliva and/or feces could also be detected in the stomach of these animals. All samples were screened for the presence of DNA from gastric *Helicobacter* species associated with dogs and cats, using species-specific qPCRs and amplicon sequencing.

In 43% of the dogs and 41% of the cats, one or more positive samples were found. *Helicobacter* DNA was detected in 29% of the saliva samples, 37% of the fecal samples and 41% of the gastric biopsies. Several dogs and cats were infected with more than one *Helicobacter* species. No clear correlation between the presence of a *Helicobacter* species in the stomach of dogs and the detection of this species in their saliva and/or feces was shown. Moreover, the present study did not allow to determine whether the detected *Helicobacter* DNA originated from viable *Helicobacter* bacteria, highlighting the need of additional studies in order to determine the importance of saliva and feces in transfer of these gastric *Helicobacter* species between animals and from animals to humans.

INLEIDING

Helicobacter spp. zijn gramnegatieve, microaërofiële bacteriën die het gastro-intestinale stelsel van zowel zoogdieren als vogels kunnen koloniseren. Sommige van deze bacteriën zijn gastheerspecifiek, terwijl andere er een brede waaier van reservoirs op nahouden (Whary en Fox, 2004). Gastrale *Helicobacter*-species kunnen de maag van mens en dier koloniseren (Haesebrouck et al., 2011). *H. pylori* is de meest bekende gastrale *Helicobacter*-species die van nature de maag van de mens koloniseert en geassocieerd wordt met gastritis, maagulcera, adenocarcinoma en mucosageassocieerde, lymfoïd weefsel (MALT) lymfomen (Haesebrouck et al., 2009). Naast *H. pylori* zijn er ook andere gastrale *Helicobacter*-species die ziekte bij de mens kunnen veroorzaken. Deze diergerelateerde, niet-*H. pylori*-helicobacters (NHPH) zijn lange, spiraalvormige bacteriën, terwijl *H. pylori* meestal de vorm heeft van een licht gebogen staafje. NHPH worden bij de mens geassocieerd met gastritis, maagulcera en MALT-lymfomen van de maag (McNulty et al., 1989; Haesebrouck et al., 2009, 2011). Vroeger werden ze aangeduid als *H. heilmannii* type 1 en 2 op basis van verschillen in de nucleotidesequentie van de *16S* en *23S rRNA*-genen (Solnick et al., 1993; Haesebrouck et al., 2009). *H. heilmannii*-type 1 is evenwel identiek aan *H. suis*. Dit zoönotisch agens komt voornamelijk voor bij varkens en apen (De Grootte et al., 1999; Haesebrouck et al., 2009; Bosschem et al., 2016). Het vroegere *H. heilmannii*-type 2 omvat een groep van verschillende bacteriële species die de maag van honden en katten kan koloniseren. Een overzicht wordt gegeven in Tabel 1. Voor het aanduiden van gastrale NHPH wordt soms de term *H. heilmannii* sensu lato gebruikt, terwijl *H. heilmannii* sensu stricto (s.s.) betrekking heeft op de in 2011 beschreven species *H. heilmannii* (Haesebrouck et al., 2011). Verder in dit artikel wordt de taxonomisch correcte naam *H. heilmannii* enkel gebruikt om de species *H. heilmannii* s.s. aan te duiden. Van de in Tabel 1 vermelde gastrale NHPH werden tot op heden enkel *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* en *H. heilmannii* aangetoond bij de mens.

De analyse van het *16S rRNA*-gen wordt frequent gebruikt voor de detectie van gastrale helicobacters. De sequentie van dit gen laat echter niet toe om on-

derscheid te maken tussen de *Helicobacter*-species van honden en katten. Bijgevolg worden deze microorganismen meestal van elkaar onderscheiden op basis van verschillen in de nucleotidesequentie van de *ureAB*-genen (Haesebrouck et al., 2011). Het is opmerkelijk dat de recent beschreven species, *H. ailurogastricus*, niet kan gedifferentieerd worden van zijn nauwste verwant, *H. heilmannii*, op basis van de *ureAB*-genesequenties. Joosten et al. (2015) differentieerden deze species aan de hand van de vergelijking van volledige genoomsequenties. Voor differentiatie tussen deze twee species kunnen onder andere de sequenties van het *iceA*- en *lpsA*-gen gebruikt worden.

NHPH komen zeer frequent voor (> 50%) bij honden en katten, zowel bij dieren zonder ziekte tekens als bij dieren met chronische maagdarmklachten (Neiger en Simpson, 2000; Amorim et al., 2014). Vaak gaat het hier om menginfecties met verschillende *Helicobacter*-species (Van den Bulck et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009). De meest voorkomende helicobacters bij honden zijn *H. bizzozeronii*, *H. felis* en *H. salomonis*. Bij katten treft men vooral *H. felis* en *H. heilmannii* aan (Haesebrouck et al., 2009). De prevalentie van *H. cynogastricus*, *H. baculiformis* en *H. ailurogastricus* bij deze dieren is momenteel niet bekend. Over de pathogene betekenis van gastrale helicobacters bij honden en katten is er nog veel onduidelijkheid en niet alle *Helicobacter*-species zijn even virulent. Zo werd bijvoorbeeld aangetoond dat *H. heilmannii* pathogener is dan *H. ailurogastricus* (Joosten et al., 2015). Allicht kan er ook variatie in virulentie optreden tussen verschillende stammen die behoren tot eenzelfde *Helicobacter*-species (Haesebrouck et al., 2009).

NHPH worden aangetoond in maagbiopsieën van 0,2-6% van mensen met maagklachten (Baele et al., 2009; Bento-Miranda en Figueiredo, 2014). Dit is allicht een onderschatting. De diagnose van deze infecties is namelijk niet eenvoudig, onder andere omdat ze, in tegenstelling tot *H. pylori*, de maag van de mens zeer focaal koloniseren. Bij het nemen van een biopsie is de kans dan ook reëel dat het staal genomen wordt op een plaats waar de kiem zich niet bevindt (Heilmann en Borchard, 1991; Haesebrouck et al., 2009; Bento-Miranda en Figueiredo, 2014; Blaecher et al., 2016).

Er zijn duidelijke aanwijzingen dat gezelschapsdieren kunnen fungeren als bron voor maaginfecties

Tabel 1. Gastrale *Helicobacter*-species bij hond en kat (Haesebrouck et al., 2009; 2011; Joosten et al., 2013; 2015).

Species	Natuurlijke gastheer	Zoönotisch potentieel
<i>H. felis</i>	Hond en kat	Ja
<i>H. heilmannii</i>	Hond en kat	Ja
<i>H. ailurogastricus</i>	Hond en kat	Onbekend
<i>H. bizzozeronii</i>	Hond en kat	Ja
<i>H. salomonis</i>	Hond en kat	Ja
<i>H. baculiformis</i>	Kat	Onbekend
<i>H. cynogastricus</i>	Hond	Onbekend

met deze bacteriën bij de mens. Hoe de NHPH van hond en kat in de maag van de mens kunnen terechtkomen, is nog niet volledig opgehelderd, maar er wordt gesuggereerd dat de overdracht door direct contact, zoals via het speeksel en/of de feces kan gebeuren (Haesebrouck et al., 2009; Recordati et al., 2007).

In de huidige studie werd nagegaan in welke mate DNA van zoönotische NHPH van hond en kat (*H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii*) terug te vinden is in het speeksel en de feces van deze dieren. Hoewel voor *H. ailurogastricus* nog geen zoönotisch potentieel kon worden aangetoond, werd ook de aanwezigheid van deze species in speeksel en feces onderzocht en dit om een idee te krijgen van de prevalentie bij deze dieren. Daarnaast werd er ook nagegaan of er een verband is tussen de aanwezigheid van NHPH in de maag van deze dieren en de aanwezigheid van deze species in hun speeksel en feces.

MATERIAAL EN METHODEN

Staalname

Speeksel- en fecesstalen werden verzameld van 106 honden en 58 katten. De speekselstalen werden bekomen door gebruik te maken van droge swabs. De feces werd telkens vers genomen na spontane defecatie. De leeftijd van deze dieren varieerde tussen 2 maanden en 16 jaar (gemiddeld 6 jaar). De dieren waren afkomstig uit België, Nederland, Duitsland en Frankrijk. De eigenaars van de betreffende honden stemden in het onderzoek toe. De 106 honden konden onderverdeeld worden in 23 proefhonden (beagles van de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Merelbeke, België) en 83 gezelschapshonden. Eén van de proefhonden en 37 gezelschapshonden vertoonden gastro-intestinale stoornissen. Bij 22 gezelschapshonden met maagproblemen werd er naast

een speeksel- en/of fecesstaal ook een maagbiopt genomen via gastroscopie. Deze dieren worden verder ‘gastroscopiehonden’ genoemd. De biopten werden genomen ter hoogte van het corpus of de fundus van de maag aangezien *Helicobacter* spp. bij de hond predilectie vertonen voor de pariëtale cellen van de fundus en corpus van de maag (Happonen et al., 1996; Lanzoni et al., 2011). Tijdens het verloop van dit onderzoek was er bij geen enkele kat een diagnostische gastroscopie nodig, waardoor geen maagbiopten van katten verkregen werden. De 58 katten die deelnamen aan dit onderzoek waren zowel strikte binnenhuis-katten (20) als katten die regelmatig buiten kwamen (38). Achttien katten vertoonden op het ogenblik van de staalname symptomen die gerelateerd kunnen zijn met gastritis, maagulcera en/of maagneoplasie

Alle stalen werden bewaard bij -20°C in afwachting van verdere analyse.

DNA-extractie en *Helicobacter*-species-specifieke kwantitatieve PCRs (qPCRs)

Voor DNA-extractie uit de verzamelde stalen werd er gebruik gemaakt van verschillende commerciële extractiekits volgens de richtlijnen van de producent. Voor speekselstalen was dit PrepMan® Ultra lysebuffer (Applied Biosystems, Woolston Warrington, UK), voor fecesstalen QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Nederland) en voor de maagbiopten ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline, Luchenvaalde, Duitsland).

Vervolgens werd het DNA geanalyseerd met behulp van *Helicobacter*-species-specifieke qPCR's. Een overzicht van de gebruikte primers en de gedetecteerde genen wordt gegeven in Tabel 2. Per staal werd 1 µl DNA-template toegevoegd aan de PCR-mix tot een eindvolume van 10 µl. Alle stalen werden in het dubbel getest en per *Helicobacter*-species werd er een standaardreeks, gaande van 10¹⁰ kopieën/µl tot

Tabel 2. Primers gebruikt voor realtime PCR.

<i>Helicobacter</i> -species	Primers (fw = forward, rv = reverse) (5'-3')	Gedetecteerd gen en lengte van het geamplificeerde fragment (baseparen)
<i>H. heilmannii</i>	fw: GTT TCC AAC CAA AAG ACT CA rv: ATT GCC TAG AGG TTG TGT TG	<i>iceA</i> -gen 135 bp
<i>H. ailurogastricus</i>	fw: CTT GAG TAC GGC GAT GTC AAT rv: GGG GAA AAA TGT GCT TGA AGT	<i>lpsA</i> -gen 136 bp
<i>H. felis</i>	fw: gCT ggT ggC ATC gAT ACg CAT rv: TTT TTA gAT Tag CgC gTC Cgg gA	deel van de <i>ureAB</i> - gencluster 154 bp
<i>H. bizzozeronii</i>	fw: CCA ACA AAT CCC CAC AgC ATT TgC Cag rv: AgT CCC ATC AgC Wgg WCC TgT TCC CCC	deel van de <i>ureAB</i> - gencluster 76 bp
<i>H. salomonis</i>	fw: CTC TTA TgA gTT ggA CTT ggT gCT CAC CAA rv: TTT gCC ATC TTT ATT TCC AAT gTC ggC	deel van de <i>ureAB</i> - gencluster 91 bp

Tabel 3. Primers gebruikt ter bereiding van de standaardreeks.

<i>Helicobacter</i> - species	Primers (fw = forward, rv = reverse) (5'-3')	Geamplificeerde genfragment + lengte (baseparen)
<i>H. heilmannii</i> s.s.	fw: GTG AGC AGC GAA TTT AAA GGG CAG TAT G rv: GTT TGG CTG TAA GTC TAA GTC CAC TTG	<i>iceA</i> -gen 551 bp
<i>H. ailurogastricus</i>	fw: CGA TCA AAG ATC GGG TGA AT rv: CCA TTA AGG GGT GCT TGA AA	<i>lpsA</i> -gen 405 bp
<i>H. felis</i>	fw: GCK GAW TTG ATC CAA GAA GG rv: CTT CGT GRA TTT TAA RRC CAA T	deel van <i>ureAB</i> - gencluster 1228 bp
<i>H. bizzozeronii</i>	fw: GCK GAW TTG ATG CAA GAA GG rv: CTT CGT GRA TTT TAA RRC CAA T	deel van <i>ureAB</i> - gencluster 1230 bp
<i>H. salomonis</i>	fw: GCK GAW TTG ATG CAA GAA GG rv: CTT CGT GRA TTT TAA RRC CAA T	deel van <i>ureAB</i> - gencluster 1224 bp

en met 10^0 kopieën/ μ l, meegenomen om het aantal kopieën in de onbekende stalen te bepalen. De genfragmenten die gebruikt werden voor het maken van de standaardreeks alsook de primers voor amplificatie van deze genfragmenten worden weergegeven in Tabel 3. Het totale reactiemengsel werd vervolgens in de realtime thermocycler (CFX96™ Real-Time cyler, Bio-Rad) geplaatst. Tenslotte werden de bekomen data verwerkt met behulp van de Bio-Rad CFX Manager (versie 1.1.308.1111) software en weergegeven in een curve als fluorescentie (RFU) ten opzichte van het aantal cycli om zo het kiemaantal in de speekselstalen, fecesstalen en maagbiopten te bepalen. Ter bevestiging werden de positieve qPCR-amplicons ook onderworpen aan “sanger sequencing”.

RESULTATEN

Detectie van *Helicobacter* spp. in het speeksel, de feces en de maag van honden en katten

In totaal werd er bij 70 dieren, waarvan 46 van de 106 honden (43%) (7 proefhonden, 28 gezelschapshonden en 11 gastroscopiehonden) en 24 van de 58 katten (41%), DNA van één of meerdere *Helicobacter*-species aangetroffen in het speeksel en/of de feces en/of het maagbiopt. In 29% van de speekselstalen, 37% van de fecesstalen en 41% van de maagbiopten konden één of meerdere *Helicobacter*-species gevonden worden. *H. salomonis*, gevolgd door *H. felis* en *H. ailurogastricus* waren zowel bij de honden als bij de katten de drie meest gedetecteerde *Helicobacter*-species. Daarnaast werd bij de honden ook nog *H. bizzozeronii* gedetecteerd en bij de katten *H. heilmannii*. Deze laatstgenoemde *Helicobacter*-species kon slechts één keer bij de hond aangetoond worden, en dit enkel in het speeksel. In totaal werd bij 8% (9/106) van de honden en 10% (6/58) van de katten DNA van meer dan één *Helicobacter*-species gevonden.

Wanneer gekeken werd naar honden en/of katten die samenleefden in één huishouden, kon geen hoger procent positieve dieren vastgesteld worden dan bij honden of katten die als enig huisdier gehouden werden (data niet getoond). In 6 van de 30 huishoudens met meerdere honden/katten kon bij twee dieren dezelfde *Helicobacter*-species gedetecteerd worden.

Correlatie tussen de aanwezigheid van *Helicobacter*-species in de maag en in de feces en het speeksel

Uit de analyse van de DNA-stalen bleek er niet steeds een verband te zijn tussen de aanwezigheid van een *Helicobacter*-species in de maag en de detectie ervan in het speeksel en/of de feces van honden. De gedetecteerde aantallen *Helicobacter*-kiemen in speeksel (gemiddeld 3 kiemen/ μ l) en feces (gemiddeld 6 kiemen/mg) waren bovendien vaak zeer laag, zeker in vergelijking met de gedetecteerde aantallen in de maagbiopten (gemiddeld $5,60 \times 10^5$ kiemen/mg). Bij slechts 2 van de 11 honden werd dezelfde *Helicobacter*-species (*H. salomonis*) gevonden in zowel het speekselstaal, maagbiopt als het fecesstaal. Vier keer, en dit bij drie verschillende honden, werd dezelfde *Helicobacter*-species aangetoond in het speeksel en maagbiopt, maar niet in de feces: twee keer *H. salomonis*, één keer *H. ailurogastricus* en één keer *H. felis*. Bij één van deze laatste honden kon dezelfde *Helicobacter*-species (*H. salomonis*) in feces en maagbiopt gedetecteerd worden, maar dit species werd niet in het speeksel gevonden.

DISCUSSIE

In deze studie werd nagegaan in hoeverre *Helicobacter*-DNA kan gevonden worden in speeksel en feces van honden en katten om op die manier een beter inzicht te verwerven in mogelijke transmissiewegen tussen dieren onderling en tussen dieren en de mens.

Een groot deel van de honden en katten bleek draager te zijn van één of meerdere *Helicobacter*-species. Dit bevestigt dat deze kiemen frequent voorkomen bij deze dieren en dat het hier vaak menginfecties met verschillende species betreft (Van den Bulck et al., 2005).

Bij de 22 honden waarvan een maagbiopt beschikbaar was, werden de *Helicobacter* spp. die aangetoond werden in de maag niet altijd teruggevonden in hun secreta/excreta (speeksel/feces). Een van de mogelijke verklaringen hiervoor is een intermitterende excretie van deze helicobacters, waardoor deze micro-organismen bij een eenmalige staalname kunnen gemist worden. Dit werd bevestigd door de resultaten van een opvolgstudie bij katten, waarbij er van vier katten gedurende één week dagelijks speeksel- en fecesstalen verzameld werden en waarbij er inderdaad een intermitterende excretie kon aangetoond worden (niet-gepubliceerde data). Ook bij de mens werd een intermitterende excretie van *H. pylori* DNA in de feces beschreven (Watanabe et al., 1998). Het is ook mogelijk dat het DNA van de gastrale helicobacters reeds sterk gedegradeerd was in de feces, zoals eerder beschreven (Monteiro et al., 2001). Dit kan interfereren met de detectie ervan door middel van qPCR. Een derde mogelijke verklaring is de ongelijke distributie van helicobacters in het speeksel, de feces en de maag in combinatie met de kleine hoeveelheden staal die gebruikt worden voor DNA-extractie. Als het staal net genomen werd op de plaats waar er zich geen helicobacters bevonden, kan dit leiden tot een valsnegatief resultaat. De onregelmatige verspreiding van diergerelateerde *Helicobacter*-species in de maag werd reeds aangetoond, zowel bij mens als dier (Debongnie et al., 1995; Hilzenrat et al., 1995; Takemura et al., 2009).

Niet alle *Helicobacter*-species blijken even frequent voor te komen bij de hond en kat. Zo is het opvallend dat *H. heilmannii* in deze studie slechts één keer gedetecteerd werd bij de hond, en dit enkel in het speeksel en niet in de maag. Deze *Helicobacter*-species zou dus eerder katten dan honden prefereren als reservoir. In eerder PCR-gebaseerd onderzoek van maagbiopten werd beschreven dat *H. salomonis* slechts zelden voorkomt bij honden en katten en dat *H. bizzozeronii* de meest voorkomende *Helicobacter*-species is bij de hond, terwijl dit voor de kat *H. felis* en *H. heilmannii* zijn (Van den Bulck et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009). In de huidige studie bleek *H. salomonis*, gevolgd door *H. felis* en *H. ailurogastricus* de meest voorkomende *Helicobacter*-species te zijn bij zowel de hond als de kat. *H. bizzozeronii* bleek in deze studie slechts de vierde meest voorkomende species te zijn bij de hond. Er moet echter rekening mee gehouden worden dat in deze studie de prevalentiecijfers gebaseerd zijn op de totale detectie in speeksel, maag en feces. Indien enkel de maagbiopten van de honden uit deze studie in rekening worden gebracht, blijken honden het vaakst geïnfecteerd met *H.*

salomonis, gevolgd door *H. ailurogastricus*, *H. bizzozeronii* en *H. felis*.

Het is belangrijk om te benadrukken dat in deze studie enkel *Helicobacter*-DNA werd aangetoond. De aanwezigheid van DNA geeft geen uitsluitel wat betreft de leefbaarheid van de aanwezige kiemen. Bovendien waren de gedetecteerde aantallen in speeksel en feces vaak zeer laag. Het is niet bekend hoeveel kiemen nodig zijn om de mens te infecteren. Bij rhesusapen werd aangetoond dat een infectiedosis van minstens 10^4 *H. pylori*-kiemen nodig is (Solnick et al., 2001). Dezelfde minimale infectiedosis werd ook vastgesteld bij muizen die geïnoculeerd werden met *H. suis* (Blaecher et al., 2016). Bijkomende studies zijn noodzakelijk om na te gaan of de gedetecteerde *Helicobacter*-kiemen in speeksel en feces wel leefbaar zijn. Om de leefbaarheid aan te tonen kan bijvoorbeeld een EMA- (ethidium monoazide) of PMA- (propidium monoazide) behandeling uitgevoerd worden, voorafgaand aan de qPCR. Dit laat toe om enkel levende kiemen te kwantificeren. Deze techniek werd reeds succesvol toegepast om leefbare *H. suis*-bacteriën in varkensvlees op te sporen (De Cooman et al., 2013).

Als besluit kan gesteld worden dat zowel in speeksel als feces van honden en katten frequent lage hoeveelheden DNA van gastrale *Helicobacter*-species kunnen worden aangetroffen. Verder onderzoek is nodig om de betekenis hiervan voor de volksgezondheid na te gaan.

REFERENTIES

- Amorim I., Freitas D.P., Magalhães A., Faria F., Lopes C., Faustino A.M., Smet A., Haesebrouck F., Reis C.A., Gärtner F. (2014). A comparison of *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* spp. Binding to canine gastric mucosa with defined gastric glycophenotype. *Helicobacter* 19, 249-259.
- Amorim I., Smet A., Alves O., Teixeira S., Saraiva A.L., Tulescu M., Reis C., Haesebrouck F., Gärtner F. (2015). Presence and significance of *Helicobacter* spp. in the gastric mucosa of Portuguese dogs. *Gut Pathogens* 7,12.
- Baele M., Pasmans F., Flahou B., Chiers K., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2009). Non-*Helicobacter pylori* helicobacters detected in the stomach of humans comprise several naturally occurring *Helicobacter* species in animals. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 55, 306-313.
- Bento-Miranda M., Figueiredo C. (2014). *Helicobacter heilmannii* sensu lato: An overview of the infection in humans. *World Journal of Gastroenterology* 20, 17779-17787.
- Blaecher C., Bauwens E., Tay A., Peters F., Dobbs S., Dobbs J., Charlett A., Ducatelle R., Haesebrouck F., Smet A. (2016). A novel isolation protocol and probe-based RT-PCR for diagnosis of gastric infections with the zoonotic pathogen *Helicobacter suis*. *Helicobacter*. 2016;00:e12369. doi:10.1111/hel.12369.
- Bosschem I., Flahou B., Bakker J., Heuvelman E., Langer-

- mans J.A.M., De Bruybe E., Joosten M., Smet A., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2016). Comparative virulence of *in vitro* cultures primate- and pig-associated *Helicobacter suis* strains in a BALB/c mouse and Mongolian gerbil model. *Helicobacter*, in press.
- Debonnie J.C., Donnay M., Mairesse J. (1995). *Gastrospirillum hominis* ("Helicobacter heilmannii"): a cause of gastritis, sometimes transients, better diagnosed by touch cytology? *The American Journal of Gastroenterology* 90, 411-416.
- De Cooman L., Flahou B., Houf K., Smet A., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F. (2013). Survival of *Helicobacter suis* bacteria in retail pig meat. *International Journal of Food Microbiology* 166, 164-167.
- De Groote D., van Doorn L.-J., Ducatelle R., Verschuuren A., Haesebrouck F., Quint W.G.V., Jalava K., Vandamme P. (1999). 'Candidatus Helicobacter suis', a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1769-1777.
- Gombač M., Švara T., Černe M., Pogačnik M. (2010). Histological changes in stomachs of apparently healthy dogs infected with *Helicobacter*. *Acta Veterinaria* 60, 173-182.
- Haesebrouck F., Pasmans F., Flahou 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. *Clinical Microbiology* 22, 202-223.
- Haesebrouck F., Pasmans F., Flahou B., Smet A., Vandamme P., Ducatelle R. (2011). Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* species in the human gastric mucosa: a proposal to introduce the terms *H. heilmannii* sensu lato and sensu stricto. *Helicobacter* 16, 339-340.
- 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. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 43 (5), 305-315.
- Heilmann K.L., Borchard F. (1991). Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut* 32, 137-140.
- Hilzenrat N., Lamoreux E., Weintrub I., Alpert E., Lichter M., Alpert L. (1995). *Helicobacter heilmannii*-like spiral bacteria in gastric mucosal biopsies. Prevalence and clinical significance. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 119, 1149-1153.
- Joosten M., Blaecher C., Flahou B., Ducatelle R., Haesebrouck F., Smet A. (2013). Diversity in bacterium-host interactions within the species *Helicobacter heilmannii* sensu stricto. *Veterinary Research* 44, 65.
- Joosten M., Lindén S., Rossi M., Chin Yen Tay A., Skoog Z., Padra M., Peters F., Perkins T., Vandamme P., Van Nieuwerburgh F., D'Herde K., Van den Broeck W., Flahou B., Deforce D., Ducatelle R., Marshall B., Haesebrouck F., Smet A. (2015). Divergence between the highly virulent zoonotic pathogen *Helicobacter heilmannii* and its closest relative, the low-virulence "*Helicobacter ailurogastricus*" sp. nov. *Infection and Immunity* 84, 293-306.
- Lanzoni A., Faustinelli I., Cristofori P., Luini M., Simpson K.W., Scanziani E., Recordati C. (2011). Localization of *Helicobacter* spp. in the fundic mucosa of laboratory Beagle dogs: an ultrastructural study. *Veterinary Research* 42, 42.
- Malik R., Love D.N. (1989). The isolation of *Campylobacter jejuni/coli* from pound dogs and canine patients in a veterinary hospital. *Australian Veterinary Practitioner* 19, 16-18.
- McNulty C.A.M., Dent J.C., Curry A., Uff J.S., Ford G.A., Gear M.W., Wilkinson S.P. (1989). *Journal of Clinical Pathology* 42, 585-591.
- Monteiro L., Gras N., Vidal R., Cabrita J., Mégraud F. (2001). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *Journal of Microbiological Methods* 45 (2), 89-94.
- Neiger R., Simpson K.W. (2000). *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 125-133.
- Recordati C., Gualdi V., Tosi S., Facchini R.V., Pengo G., Luini M., Simpson K.W., Scanziani E. (2007). Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. *Veterinary Microbiology* 119, 346-351.
- Smet A., Pasmans F., Flahou B., D'herde K., Vandamme P., Cleenwerck I., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2012). *Helicobacter heilmannii* sp. nov., isolated from feline gastric mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 299-306.
- Solnick J.V., O'Rourke J., Lee A., Paster B.J., Dewhirst F.E., Tompkins L.S. (1993). An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans. *Journal of Infectious Diseases* 168, 379-385.
- Solnick J.V., Hansen L.M., Canfield D.R., Parsonnet J. (2001). Determination of the infectious dose of *Helicobacter pylori* during primary and secondary infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infection and Immunity* 69, 6887-6892.
- Tabrizi A.S., Jamshidi S., Oghalaei A., Salehi T.Z., Eshkaf-taki A.B., Mohammadi M. (2010). Identification of *Helicobacter* spp. in oral secretions vs. gastric mucosa of stray cats. *Veterinary Microbiology* 140, 142-146.
- Takemura L.S., Camargo P.L., Alfieri A.A., Bracarense A.P.F.R.L. (2009). *Helicobacter* spp. in cats: association between infecting species and epithelial proliferation within the gastric lamina propria. *Journal of Comparative Pathology* 141, 127-134.
- Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Driessen A., Debonnie 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. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (5), 2256-2260.
- Watanabe T., Tomita S., Kudo M., Kurokawa M., Orino A., Todo A., Chiba T. (1998). Detection of *Helicobacter pylori* gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in feces. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 33, 1140-1143.
- Whary M.T., Fox J.G. (2004). Natural and experimental *Helicobacter* infections. *Comparative Medicine* 54, 128-158.
- Yilmaz T., Bajin M.D., Günaydin R.Ö., Özer S., Sözen T. (2014). Laryngopharyngeal reflux and *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 20, 8964-8970.