

**Nachweis von murinen *Helicobacter*-Spezies in
Kotproben von Mäusen mittels Multiplex-PCR**

von Vanessa Neubert

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Nachweis von murinen *Helicobacter*-Spezies in
Kotproben von Mäusen mittels Multiplex-PCR

von Vanessa Neubert

aus München

München 2024

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Michael Erhard

Angefertigt im Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München

Mentor: Dr. Karin Seidel

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Micheal H. Erhard

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sebastian-Uwe Ulrich

Tag der Promotion: 10. Februar 2024

Für Pia

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT	4
1.	<i>Helicobacter</i> spp.	4
1.1.	<i>Helicobacter hepaticus</i>	4
1.2.	<i>Helicobacter bilis</i>	8
1.3.	<i>Helicobacter muridarum</i>	9
1.4.	<i>Helicobacter rodentium</i>	10
1.5.	<i>Helicobacter typhlonius</i>	12
2.	Nachweismethoden für <i>Helicobacter</i> spp.	14
2.1.	Kultur	14
2.2.	Histologie	14
2.3.	Elektronenmikroskopie	15
2.4.	Serologie.....	15
2.5.	Polymerasekettenreaktion	17
III.	MATERIAL UND METHODEN	21
1.	Unterbringung der Sentineltiere	21
2.	Kotprobenentnahme	21
3.	Bakterienstämme	22
3.1.	Herkunft der Bakterienstämme	22
3.2.	Kultivierung der Bakterienstämme	22
4.	Extraktion von DNA	23
4.1.	Extraktion von bakterieller DNA	24
4.2.	Extraktion von DNA aus Kotproben.....	25
4.3.	Bestimmung der DNA-Eigenschaften.....	25
5.	Primer Konzeption	25
6.	Durchführung der PCR.....	26
6.1.	Single-PCR.....	26
6.2.	Multiplex-PCR	27
7.	DNA Spiking.....	28

8.	Validationsprozess	28
9.	Testen der Methode in Versuchstiereinrichtungen.....	30
10.	Statistische Auswertung	30
IV.	PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE	31
1.	Veröffentlichung Neubert <i>et al.</i> 2022	31
V.	ERWEITERTE DISKUSSION.....	41
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	52
VII.	SUMMARY.....	53
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	54
IX.	ANHANG	68
1.	Abbildungsverzeichnis	68
2.	Abbildungsverzeichnis Veröffentlichung Neubert <i>et al.</i>	68
3.	Tabellenverzeichnis.....	69
4.	Tabellenverzeichnis Veröffentlichung Neubert <i>et al.</i>	69
5.	Repräsentative Durchläufe der Validationsparameter.....	70
X.	DANKSAGUNG	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bezeichnung
AB	Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Kit
AS	Analytik Jena innuPREP Stool DNA Kit
B	Bead Beating-Technik
BB	Biotechrabbit GenUP™ Bacteria gDNA Kit
BHI	brain heart infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
CagA	cytotoxicity-associated immunodominant antigen
cagPAI	cag pathogenicity island
CAR	cilia-associated respiratory
CDT	cytolethal distending toxin
CFU	colony forming units
CLB	cell lysis buffer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
EAP	exhaust air particle
EHS	Enterohepatische- <i>Helicobacter</i> -Spezies
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GC %	Guanin-Cytosin-Gehalt
H	<i>Helicobacter</i>
Hb	<i>Helicobacter bilis</i>

Hh	<i>Helicobacter hepaticus</i>
Hm	<i>Helicobacter muridarum</i>
Hr	<i>Helicobacter rodentium</i>
HRM	high resolution melting
Ht	<i>Helicobacter typhlonius</i>
IBD	inflammatory bowel disease
IgG	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin-10
IVC	individually ventilated cages
kDa	Kilo-Dalton
L	Lysozym
LLOD	lower limit of detection
Min	multiple intestinal neoplasia
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
PF	Vorfilter
QB	Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit
QS	Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit
RNA	Ribonukleinsäure
RPI	Entfernung von PCR Inhibitoren
SB	Strattec RTP® Bacteria DNA Mini Kit
SCID	Severe combined immunodeficient mice
spp.	Spezies
SS	Strattec PSP® Spin Stool DNA Kit
T	Temperatur

T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VacA	Vakuolisierendes Cytotoxin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZM	ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit
ZQ	Zymo Research Quick-DNA Miniprep Plus Kit
3R	R eplacement, R eduction, R efinement

I. EINLEITUNG

Die australischen Wissenschaftler, Robin Warren und Barry Marshall, erhielten 2005 den Nobelpreis der Medizin für die bahnbrechende Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori* und dessen Bedeutung für die Gastroenterologie. Durch seine Arbeit als Pathologe stieß Warren in Magenbiopsien mit chronisch veränderten Magenschleimhäuten immer wieder auf das Bakterium, aber nur mit der Hilfe des Mikrobiologen Marshall konnte dieses auch angezchtet werden. Nach unzähligen gescheiterten Versuchen konnte *H. pylori* erst kultiviert werden, als eine Agarplatte über die Urlaubszeit im Brutschrank vergessen wurde (PAJARES und GISBERT, 2006). Mit einem waghalsigen Selbstversuch, bei dem Warren die Bakteriensuspension schluckte und daraufhin eine Gastritis entwickelte, konnte der Zusammenhang bewiesen werden (ZYLKA MENHORN, 2005).

Seit der Entdeckung 1984 (MARSHALL und WARREN, 1984) und dem Nobelpreis für Medizin wurde viel Forschung betrieben, um mehr über die klinische Relevanz und die Pathomechanismen zu erfahren, welche ein Überleben von *Helicobacter* im sauren Magenmilieu möglich machen und letztendlich beim Menschen zur Entstehung von Magenkrebs führen können.

H. pylori ist ein gram-negatives Stäbchen, welches mikroaerophil, beweglich und zusätzlich auch noch begeißelt ist (MARSHALL und WARREN, 1984). Nur durch seine ausgesprochen gute Beweglichkeit ist es diesem Bakterium möglich in die protektive Schleimschicht des Magens einzudringen. Zusätzlich besitzt es Chemorezeptoren, welche in der Lage sind den HCl Gradienten zu erkennen und sich aktiv von diesem wegzubewegen. Das Enzym Urease vereinfacht ihm zusätzlich das Überleben im Magen, in dem es Ammoniak freisetzt und damit die saure Umgebung neutralisieren kann (CAMILO et al., 2017).

Eine bestimmte Gengruppe, die Pathogenitätsinsel *cagPAI*, welche bei manchen *H. pylori* nachgewiesen wurde, geht mit einer noch höheren Virulenz einher. *CagA* ist ein Virulenzfaktor, welcher mit einem erhöhten Grad an Entzündung und proinflammatorischer Zytokinexpression assoziiert wird. Wobei Träger des Virulenzfaktors *VacA* eine ausgeprägtere Störung der transepithelialen Barriere und Zellvakuolisierung auslösen können (CAMILO et al., 2017).

Die hohe Virulenz von *H. pylori* und die breitschichtige Interaktion mit dem menschlichen Organismus, können nicht nur der Auslöser für chronische Gastritis sein, sondern ist auch der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Adenocarcinoms im Magen (VOGIATZI et al., 2007). *H. pylori* wurde dadurch schon 1994 als Karzinogen der ersten Klasse von der WHO gelistet (CANCER, 1994).

Seit der Entdeckung von *H. pylori* hat der Genus *Helicobacter* eine stetige Zunahme erfahren. Mittlerweile wurden über 50 verschiedene *Helicobacter*-Spezies in verschiedenen Tierarten, wie unseren Haus- und Nutztieren, Nagern, aber auch Vögeln und Delphinen, und natürlich dem Menschen nachgewiesen (LPSN, 2023). Diese werden dabei in gastrische und nicht-gastrische bzw. enterohepatische Arten unterschieden. Beim Versuchstier Maus wurden bis jetzt elf verschiedene *Helicobacter*-Spezies definiert, wobei es sich um enterohepatische Arten handelt, welche vor allem in den Organen Leber, Gallenblase, Pankreas und auch dem Darm vorkommen.

EHS gehören bei Mäusen nicht nur zur physiologischen bakteriellen Flora, sondern können eine klinische Symptomatik auslösen, wie zum Beispiel eine verminderte Reproduktionsrate, Rektalprolapse, IBD und Typhlocolitis (WHARY und FOX, 2006; SHARP et al., 2008; MILLER et al., 2014). Viele Infektion bleiben inapparent und subklinisch, dennoch können Versuchsergebnisse verfälscht werden, nicht mehr reproduzierbar bleiben und damit eine höhere Tierzahl benötigt werden (LEMKE et al., 2009; GE et al., 2011). Auch steht ein zoonotisches Potential in der Diskussion (PANDEY et al., 2010; SEGURA-LOPEZ et al., 2015), was eine genaue Überwachung unabdinglich macht.

2014 wurden Empfehlungen zur Überwachung des Hygienestatus in Versuchstierhaltungen von der FELASA veröffentlicht (MÄHLER et al., 2014). Die FELASA wurde 1978 als Vereinigung der europäischen versuchstierkundlichen Gesellschaften gegründet (PRINS, 2022). Diese Vereinigung veröffentlicht Empfehlungen auf dem Gebiet der Versuchstierkunde wie zum Beispiel dem Health Monitoring. Auch hier lässt sich die wachsende Bedeutung der *Helicobacter*-Spezies klar erkennen: Wobei im Jahr 1996 noch keine Überwachung der Besiedelung mit EHS stattgefunden hat (REHBINDER et al., 1996), wurde ab 2002 eine jährliche Überwachung der EHS auf Gattungsebene empfohlen (NICKLAS et al., 2002). In der Empfehlung von 2014

wird eine Überprüfung der Versuchstiereinrichtung alle 3 Monate auf Speziesebene von *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. typhlonius* als unerlässlich gesehen (MÄHLER et al., 2014).

Jede Versuchstiereinrichtung sollte über ein adäquates Health Monitoring verfügen, in dem die mikrobiologische Überwachung der spezifischen Pathogene, die Auswahl der Sentineltiere, die Testmethoden und die zeitlichen Abstände der Überprüfung definiert sind. Nur durch eine genaue Überwachung der Versuchstiere lassen sich die 3R Ziele einer nachhaltigen Versuchstierkunde umsetzen. Diese Prinzipien wurden 1959 von Russell und Burch definiert: einerseits sollen Tierversuche vermieden werden (Replacement) und andererseits die Zahl der Tiere (Reduction) und ihr Leiden (Refinement) auf das geringste Maß beschränkt werden (RUSSELL und BURCH, 1959).

Um *Helicobacter*-Spezies nachzuweisen eignen sich verschiedene Techniken, wie zum Beispiel die mikrobielle Kultur und das Elektronenmikroskop, aber auch eine histologische Untersuchung aus Biopsien. Als sensitivste Methode hat sich die PCR erwiesen, wobei eine Multiplex-PCR die schnellste und kostengünstigste Methode darstellt, da hierbei mehrere Spezies zeitgleich getestet werden können.

Das Ziel dieser Arbeit ist, eine verlässliche und einfache Methode, in Form einer Multiplex-PCR zu etablieren und validieren, um den *Helicobacter*-Infektionsstatus von Versuchstiereinrichtungen verlässlich wieder zu spiegeln und damit im Sinne der 3R zu handeln.

II. ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT

1. *Helicobacter* spp.

Die elf bei Mäusen beschriebenen *Helicobacter*-Spezies (LPSN, 2023) unterscheiden sich in ihren chemischen Eigenschaften, der klinischen Relevanz und der Prävalenz. *Helicobacter hepaticus* ist der EHS mit der höchsten Prävalenz in Europa, gefolgt von *Helicobacter bilis* mit der zweit höchsten Prävalenz (PRITCHETT-CORNING et al., 2009). Aber auch bei *Helicobacter typhlonius*, *Helicobacter muridarum* und *Helicobacter rodentium* wurde eine signifikant zu berücksichtigende Prävalenz festgestellt (GOTO et al., 2000; BOHR et al., 2006; JOHANSSON et al., 2006; TAYLOR et al., 2007; LOFGREN et al., 2012), welche sich je nach Untersuchungsland und Institut geringgradig voneinander unterscheiden: Taylor *et al.* konnten in einer Studie eine Prävalenz von 59 % für Hh, 26 % für Ht und 6 % für Hr ermitteln. Die Studie von Lofgren *et al.* zeigt eine Prävalenz von 26 % für Hh, 16 % für Hb und Ht, und 12 % für Hr. Daher wurden diese fünf EHS für die Etablierung der Multiplex-PCR ausgewählt. Im Folgenden wird genauer auf die jeweiligen EHS eingegangen.

1.1. *Helicobacter hepaticus*

H. hepaticus ist ein ca. 0,2 - 0,3 µm x 1,5 - 5 µm großes Bakterium mit einem gebogenen bis spiralförmigen Äußeren (Abbildung 1). Es besitzt bipolare Geißeln und eine glatte Oberfläche. Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop und biochemische Eigenschaften wurde von Fox *et al.* 1994 veröffentlicht, denen es möglich war *H. hepaticus* in der Leber, dem Caecum und dem Kolon von Mäusen nachzuweisen (FOX et al., 1994). Die chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 dargestellt.

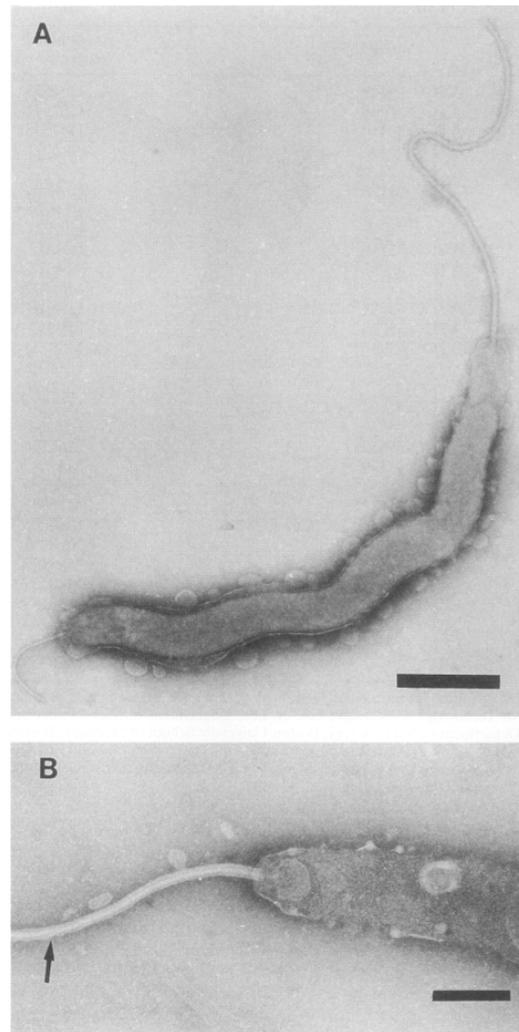


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. hepaticus* (FOX et al., 1994)

Fox *et al.* war es möglich *H. hepaticus* aus der Leber von jungen Mäusen zu isolieren, welche an einer akuten fokalen nekrotischen Hepatitis litten, die sich im Verlauf zu einer chronischen aktiven Hepatitis weiterentwickelte (FOX et al., 1994). Diese Beobachtungen können mit keimfreien Mäusen, welche oral mit *H. hepaticus* infiziert wurden, reproduziert werden (FOX et al., 1994). Klinisch zeigte sich die Hepatitis durch Nekrose, Hepatozytenmegalie mit Zellhyperplasie und Cholangitis (FOX et al., 1994).

Die gleichen Leberläsionen konnten auch von Ward *et al.* nachgewiesen werden. Dabei entwickelten A/JCr Mäuse im höheren Alter, nach Auftreten dieser Läsionen häufig Lebertumore (WARD et al., 1994b; WARD et al., 1994a). Somit steht *H. hepaticus* im Verdacht ein Cofaktor für die Leberkarzinogenese zu sein

(HAILEY et al., 1998). In einer Studie von 2004 (ROGERS et al., 2004) konnte nachgewiesen werden, dass das Geschlecht und die bakterielle Expositionszeit einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Je länger die Expositionszeit mit *H. hepaticus* bei männlichen Mäusen anhielt, desto ausgeprägter waren die präneoplastischen Läsionen.

Neben der Leber kann *H. hepaticus* aber auch den Darm infizieren. Dabei wurde beobachtet, dass es zur Entstehung von IBD bei natürlich infizierten immundefizitären SCID-Mäusen kommen kann (WARD et al., 1996; CAHILL et al., 1997; LI et al., 1998). Diese Tiere zeigten eine Hyperplasie der Mucosa, Entzündung des Caecums, Colitis, Typhlitis und Rektalvorfälle (WARD et al., 1996). Auch hier konnte eine Verbindung zwischen der ausgeprägten Colitis und der Entstehung von Darmkrebs hergestellt werden (FOX et al., 2011). Interessanterweise zeigen die weiblichen Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für die Entzündungsreaktionen im Darm (LIVINGSTON et al., 2004).

Tbl. 1: Chemische Eigenschaften von EHS (LEE et al., 1992; FOX et al., 1994; FOX et al., 1995; SHEN et al., 1997; FRANKLIN et al., 2001)

-	-	-	-
sch	beweglich	beweglich (korkenzieherartige Fortbewegung)	beweglich
unter rophilen und nen Bedingungen 7 Tagen	bei 37 und 42°C unter mikroaerophilen Bedingungen nach 3 bis 7 Tagen	bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen nach 2 bis 3 Tagen	bei 37 oder 42°C unter mikroaerophilen Bedingungen
	++	+	-
	+	+	+
	+	+	+
on	Reduktion	Reduktion	Reduktion
it gegen thin und nsäure,	Resistent gegen Cephalothin und Nalidixinsäure,	Resistent gegen Cephalothin und Nalidixinsäure	Resistent gegen Cephalothin, Nalidixinsäure
illich gegen dazol	empfindlich gegen Metronidazol		empfindlich gegen Nalidixinsäure

1.2. *Helicobacter bilis*

1995 wurde von Fox *et al.* das Bakterium *H. bilis* beschrieben (FOX *et al.*, 1995). Die Wissenschaftler konnten *H. bilis* aus der Leber, der Galle und dem Magendarmtrakt von Mäusen isolieren. Bei diesem Keim handelt es sich um ein ca. 0,5 μm x 4 - 5 μm großes Bakterium mit einem spindel- bis leicht spiralförmigen Aussehen (Abbildung 2). Es besitzt drei bis 14 bipolare Geißeln, wodurch es eine große morphologische Ähnlichkeit zu „*F. rappini*“, *H. muridarum* und *H. felis* aufweist. Die chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengefasst.



Abb.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. bilis* (FOX *et al.*, 1995)

Auch für *H. bilis* ist eine klinische Signifikanz bekannt. Es kann genauso wie *H. hepaticus* eine multifokale chronische Hepatitis auslösen. Die Infektion ist vor allem bei alten Tieren nachgewiesen worden (FOX *et al.*, 1995).

In einem Infektionsversuch mit SCID-Mäusen konnte durch *H. bilis* eine schwerwiegende Diarrhoe, proliferative Typhlitis und Colitis ausgelöst werden (FRANKLIN *et al.*, 1998; SHOMER *et al.*, 1998). Somit können mit *H. bilis* infizierte SCID-Mäuse als gutes Tiermodell zur weiteren Erforschung der

bakteriell-ausgelösten IBD dienen (SHOMER et al., 1997).

Eine *H. bilis* Infektion beim Menschen gilt als Zoonose und steht in der Diskussion Erkrankungen der Gallenblase auszulösen. Schon in einer Studie von 1998 (FOX et al., 1998) wurde gezeigt, dass zwischen einer *H. bilis* Infektion und einer Cholezystitis ein Zusammenhang bestehen kann. Auch hier wurde untersucht, ob die bakterielle Infektion mit einer begünstigten Karzinogenese einhergeht (MURATA et al., 2004). Segura-Lopez *et al.* konnten beweisen, dass eine *H. bilis* Infektion eine signifikante Assoziation mit extrahepatischen Gallengangskarzinomen hat (SEGURA-LOPEZ et al., 2015).

1.3. *Helicobacter muridarum*

Lee *et al.* haben das erste Mal 1992 *H. muridarum* beschrieben (LEE et al., 1992). Es ist mit 0,5 - 0,6 μm x 3,5 - 5 μm in etwa genauso groß wie *H. bilis*. Durch sein spiralförmiges Aussehen und die 10 - 14 bipolaren Geißeln ist die morphologische Ähnlichkeit zu „*F. rappini*“ und *H. bilis* groß (Abbildung 3). Zusätzliche chemische Eigenschaften sind in Tabelle 1 zu finden.

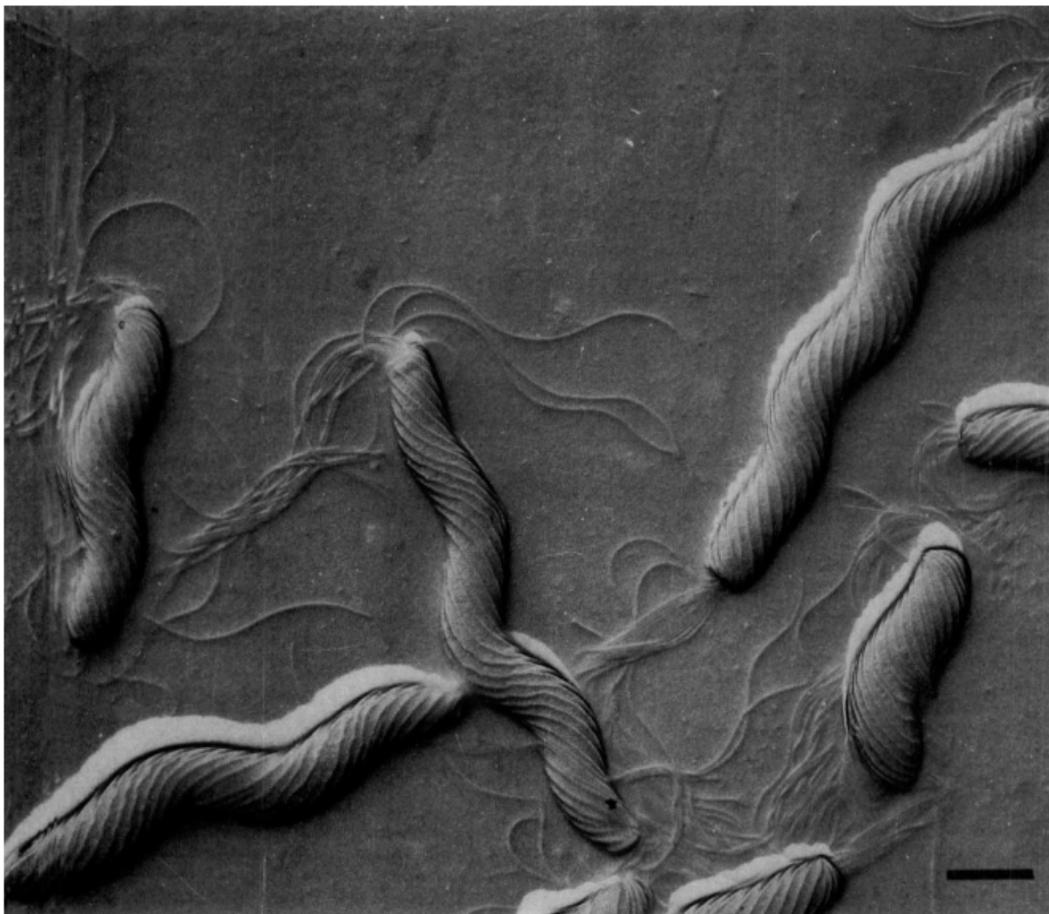


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. muridarum* (LEE et al.,

1992)

H. muridarum siedelt im Darm, hauptsächlich im Ileum, kann aber auch den Magen besiedeln und dort eine atopische Gastritis auslöst (LEE et al., 1993; FOX, 1997). In einem Infektionsversuch wurden konventionelle Mäuse oral mit 0,1 ml einer *H. felis* Suspension infiziert. Diese waren nachweislich frei von *Helicobacter* spp. im Magen, trugen aber *H. muridarum* im Darm. Ab ca. zwei Wochen nach der Infektion konnte bei 82 % der Tiere eine Co-Kolonisation von *H. felis* und *H. muridarum* im Magen nachgewiesen werden, wobei diese mit ausgeprägteren histopathologischen Veränderungen einherging. Zusätzlich konnte ein zeitlicher Zusammenhang hergestellt werden: Je länger die Expositionszeit, desto häufiger wurde *H. muridarum* im Magen nachgewiesen. *H. felis* scheint das Milieu im Magen so zu verändern, dass sich *H. muridarum* dort ansiedeln kann (LEE et al., 1993).

Mit *H. muridarum* infizierte SCID-Mäuse können eine IBD entwickeln (JIANG et al., 2002). Interessant an dieser Studie ist, dass immundefiziente Mäuse, denen T-Zellen transferiert wurden, sogar schneller eine IBD entwickelten, als unbehandelte SCID-Mäuse. Somit scheint das Immunsystem und die Aktivierung der T-Zellen durch das Pathogen ausschlaggebend für den Krankheitsverlauf der IBD zu sein.

1.4. *Helicobacter rodentium*

H. rodentium ist Urease-negativ (SHEN et al., 1997). Seine Morphologie zeigt Ähnlichkeit zu den anderen murinen *Helicobacter*-Spezies. Bei *H. rodentium* handelt es sich um ein schlank gebogenes bis spiralförmiges Stäbchen mit bipolaren Geißeln und einer Größe von 0,3 µm x 1,5 - 5 µm (Abbildung 4). Es wurde im Caecum und Kolon von Versuchsmäusen nachgewiesen. Weitere chemische Eigenschaften finden sich in Tabelle 1.

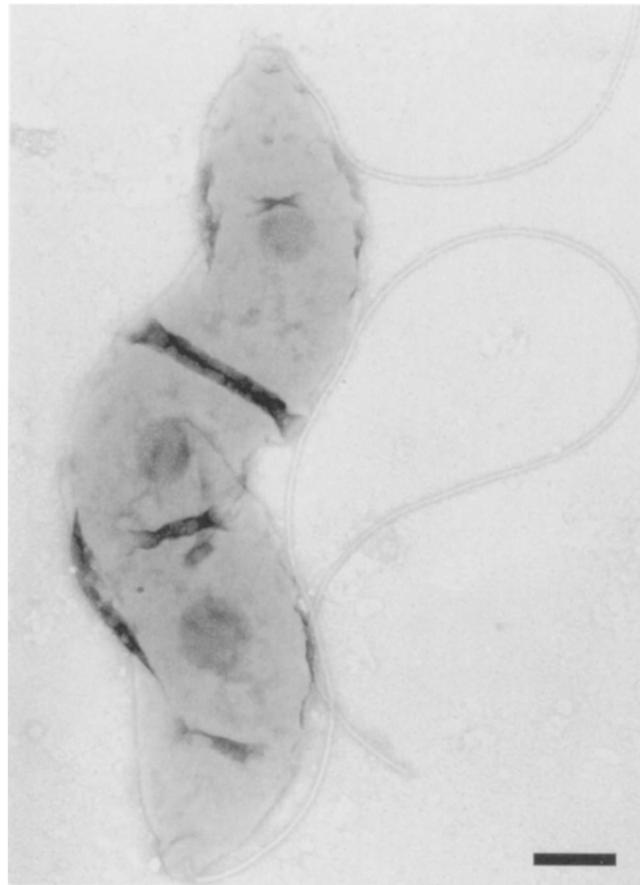


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. rodentium* (SHEN et al., 1997)

Eine Monoinfektion mit *H. rodentium* scheint keine Pathologien hervorzurufen (MYLES et al., 2004), aber bei Koinfektionen von *H. rodentium* mit anderen EHS werden schwerwiegende Entzündungen im Darm ausgelöst.

Eine Co-Infektion mit *H. bilis* führte zur akuten Diarrhoe und proliferativer Typhlocolitis bei SCID-Mäusen (SHOMER et al., 1998). Zusätzlich gibt es durch die Co-Infektion von *H. rodentium* mit *H. bilis* einen signifikanten Anstieg von Zytokinen, wie IL-10, und damit eine stärkere Aktivierung des Immunsystems (MYLES et al., 2004).

Bei Infektionsversuchen mit *H. hepaticus* konnte bewiesen werden, dass *H. rodentium* alleinig keine Hepatitis oder Enteritis auslösen kann. Aber in Kombination mit *H. hepaticus* zeigte sich eine klinische Manifestation mit zu flüssigen Blinddarminhalt und einem geringen Körpergewicht der Tiere (MYLES et al., 2004).

Des Weiteren konnte derselbe Zusammenhang zwischen *H. rodentium* und *H. typhlonius* hergestellt werden. Dabei zeigten infizierte IL10^{-/-} Mäuse bei einer Co-Infektion hochgradige Entzündungsreaktion im Caecum, Colon und Rektum als Symptome der IBD (CHICHILOWSKI et al., 2008).

1.5. *Helicobacter typhlonius*

Offiziell beschrieben wurde *H. typhlonius* das erste Mal 2001 (FRANKLIN et al., 2001), aber schon 1999 wurde in zwei unabhängigen Laboren gleichzeitig die ersten Hinweise auf diesen neuen *Helicobacter* entdeckt (FOX et al., 1999; FRANKLIN et al., 1999), da *H. typhlonius* aus entzündlich veränderten Caecum und Colon von natürlich infizierten IL-10^{-/-} Mäusen isoliert wurde (FOX et al., 1999). Das spiralförmige Stäbchen hat eine Größe von 0,3 µm x 2 -3 µm mit bipolaren Geißeln (Abbildung 5). Den höchsten Verwandtschaftsgrad besitzt es zu *H. hepaticus* mit 97,44 % (FRANKLIN et al., 2001). Wobei der größte Unterschied darin besteht, dass *H. typhlonius*, wie *H. rodentium*, Urease-negativ ist. Sonstige chemische Eigenschaften sind in Tabelle 1 erläutert.

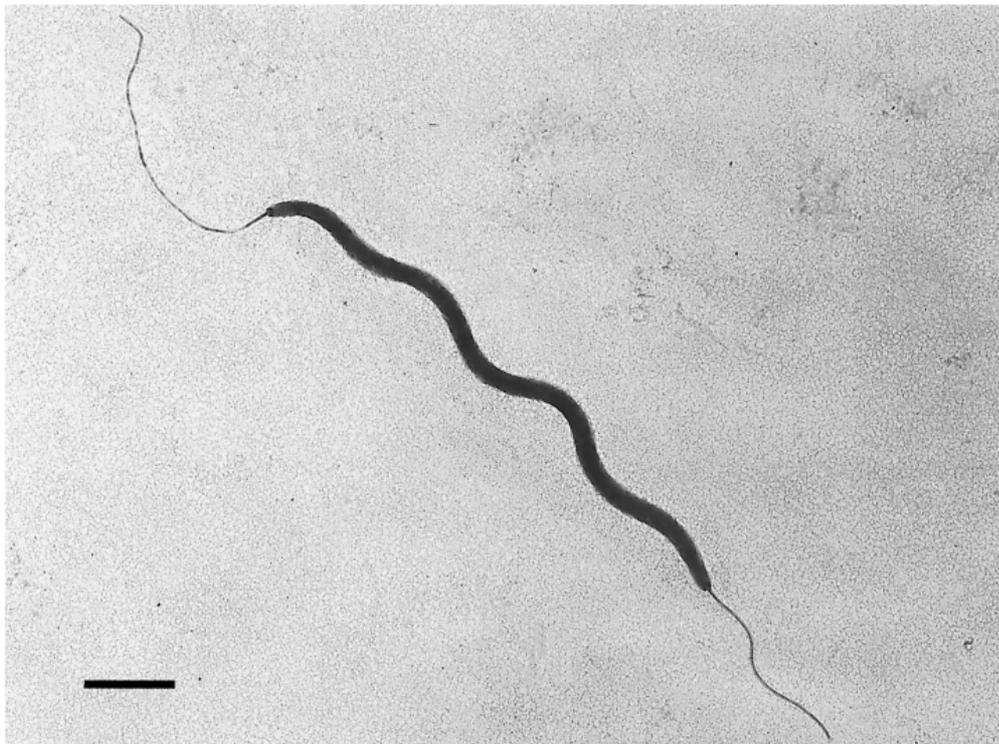


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. typhlonius* (FRANKLIN et al., 2001)

H. typhlonius kann eine klinische Problematik bei Versuchsmäusen auslösen. Bei einer experimentellen Infektion von SCID-Mäusen löste *H. typhlonius* eine proliferative Typhlocolitis aus. Diese äußerte sich in Hyperplasie der Mukosa und entzündliche Veränderungen im Caecum, aber auch im Colon. Im Vergleich zu *H. hepaticus* und *H. bilis*, ruft *H. typhlonius* ähnliche Läsionen wie *H. hepaticus* hervor. *H. bilis* Infektionen verlaufen milder. Lebererkrankungen, ausgelöst durch *H. typhlonius*, konnten in dieser Studie nicht beobachtet werden (FRANKLIN et al., 1999).

In der bereits erwähnten Studie von Chichlokwski *et al.* zeigte sich die gleichen klinischen Symptome (CHICHLOWSKI et al., 2008). Wobei auch hier eine Monoinfektion mit *H. typhlonius* hochgradigere Läsionen erkennen lässt, als bei einer Monoinfektionen mit *H. rodentium*.

Auch *H. typhlonius* hat einen Einfluss auf die Karzinogenese. Dabei wurde 2015 in einer Infektionsstudie gezeigt, dass eine Besiedelung in immunkompetenten Mäusen einen Anstieg von Darmkrebskrankungen auslösen kann (DINGEMANSE et al., 2015).

2. Nachweismethoden für *Helicobacter* spp.

Um Infektionen bei Mäusen mit murinen *Helicobacter* spp. zu diagnostizieren gibt es verschiedene Möglichkeiten. Einerseits lassen sich die Bakterien in Kulturen anzüchten. Des Weiteren können durch histologische Untersuchungen und mittels Elektronenmikroskopie *Helicobacter*-Infektionen nachgewiesen werden. Ebenso ist ein Nachweis mittels Serologie sowie Polymerase-Kettenreaktion möglich.

2.1. Kultur

Zum Erstellen einer Kultur werden Proben aus dem Caecum, Colon oder Leber der betroffenen Tiere unter aseptischen Bedingungen entnommen und in einer mikroaerophilen Atmosphäre angezüchtet (SHAMES et al., 1995). Es handelt sich somit um eine invasive Methode, bei der die Versuchsmäuse euthanasiert werden müssen.

Die Anzucht von *Helicobacter* spp. ist anspruchsvoll. Murine *Helicobacter* spp. wachsen nur unter mikroaerophilen Bedingungen mit einer Sauerstoffsättigung von 3 - 7 % bei 37 °C auf Blutagarplatten. Die Wachstumsdauer beträgt dabei im Schnitt 5 - 7 Tage, wobei eine Charakterisierung meist erst nach 1 - 3 Wochen möglich sein kann, wenn eine ausreichenden Anzahl an Bakterien kultiviert wurde (ZENNER, 1999). Problematisch ist dabei, dass vor allem ein hoher Anteil der bakteriellen Flora des Darmes leichter und schneller zur kultivieren ist, wodurch es zu einer Kontamination und Überwucherung der Kultur kommen kann (RILEY et al., 1996). Versuche durch eine Filtration der Probe (JACOBSEN, 2004), oder durch Anwendung eines Selektiv-Agars mit Trimethoprim, Vancomycin und Polymyxin (SHAMES et al., 1995), trugen nur zur minimalen Verbesserung des kulturellen Nachweises bei.

2.2. Histologie

Zum Nachweis von *Helicobacter* spp. mittels histologischer Verfahren müssen histologische Schnitte aus Leber - bzw. Darmpräparaten erstellt werden. Diese können mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung gefärbt werden (WARD et al., 1994b). Aber auch eine modifizierte Versilberung nach Steiner (GARVEY et al., 1985), mit der die spiralförmigen Bakterien sichtbar gemacht werden können, kann zum *Helicobacter* Nachweis genutzt werden.

Aus Sicht des Tierschutzes und der Einhaltung der 3R ist der größte Nachteil der Histologie, dass auch hier jedes Tier für den Nachweis euthanasiert werden muss (ZENNER, 1999). Ein zusätzlicher Nachteil ist der große Arbeits- und Zeitaufwand zum Erstellen der Präparate. Des Weiteren kann nur fachkundiges Personal die histologischen Präparate interpretieren (MÄHLER et al., 1998).

Diese Methode besitzt eine niedrige Spezifität, da eine Differenzierung der verschiedenen *Helicobacter* Spezies nicht möglich ist. Zusätzlich kann eine Unterscheidung zu anderen spiralförmigen Bakterien, welche den Magen-Darmtrakt besiedeln wie zum Beispiel *Campylobacter* spp., nicht getroffen werden (MÄHLER et al., 1998). Auch weist die Methode eine geringe Sensitivität auf, da ein Nachweis erst ab einer bestimmten Anzahl von Bakterien möglich ist (MÄHLER et al., 1998).

2.3. Elektronenmikroskopie

Um *Helicobacter* spp. elektronenmikroskopisch zu untersuchen, werden entweder Gewebeproben oder Bakterienkulturen benötigt. Dabei können die murinen *Helicobacter* spp. auf Grund der unterschiedlichen Morphologie gut voneinander differenziert werden (MÄHLER et al., 1998).

Leider handelt es sich hierbei auch wieder um eine invasive Methode, wobei Versuchstiere euthanasiert werden müssen. Zusätzlich ist die Elektronenmikroskopie zeitaufwendig und eine kostenintensive Nachweismethode (MÄHLER et al., 1998).

2.4. Serologie

Zum serologischen Nachweis von murinen *Helicobacter* spp. wird Serum von Versuchsmäusen durch eine Blutentnahme gewonnen (FENG et al., 2002; BUTT et al., 2023). Somit stellt es eine weniger invasive Methode dar, da Tiere hierfür nicht euthanasiert werden müssen. Dennoch werden serologische Verfahren zum Nachweis von murinen *Helicobacter* spp. noch nicht routinemäßig genutzt, was vielfältige Gründe hat.

In der Literatur kann immer noch keine verlässliche Aussage darüber getroffen werden, wann genau es zur Serokonversion bei Versuchsmäusen kommt. In einer Studie von Fox et al. konnte eine Infektion mit *H. hepaticus* erst 16 Wochen nach Inokulation durch eine positive Reaktion im ELISA bestätigt werden (FOX et al.,

1996). Wobei der höchste Titer erst in Woche 58 nach der Infektion nachweisbar war (FOX et al., 1996). Im Gegensatz dazu haben Livingston *et al.* eine Studie veröffentlicht bei der es zu einem positiven ELISA Ergebnis zwei Wochen nach Infektion kam (LIVINGSTON et al., 1997). Die gleiche Beobachtung machten Butt *et al.*: In einem Infektionsversuch konnten Antikörper gegen *H. hepaticus* und *H. bilis* zwei Wochen nach der DNA Detektion aus dem Kot nachgewiesen werden (BUTT et al., 2023).

Auch scheint das Alter des jeweiligen Versuchstiers einen Einfluss auf den Nachweis der IgG Antikörper zu haben. Seren von immunkompetenten Tieren, welche in einem Alter von 29 Tagen euthanasiert wurden, zeigten keine positiven Banden für *H. hepaticus*-Proteine im Western Blot. Wohingegen Tiere, welche erst am Tag 262 euthanasiert wurden, stark positive Banden aufwiesen. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Tiere natürlich oder experimentell mit *H. hepaticus* infiziert waren (WARD et al., 1994b).

Zusätzlich scheint der genetische Hintergrund des einzelnen Versuchstieres einen Einfluss auf die Serokonversion zu haben. Es ist möglich, dass immunkompetente Versuchsmäuse erst sehr spät im Infektionsgeschehen einen niedrigen Titer zeigen. Oder, dass es immuninkompetenten Mäuse nicht möglich ist überhaupt eine nachweisbare Antikörperantwort zu erzeugen (FENG et al., 2005).

Die verwendeten Antigene zur Durchführung des ELISAs unterscheiden sich in ihrer Sensitivität. Einerseits wird ein einfaches Lysat des Bakteriums als Antigen verwendet, das sich als wenig sensitiv erwies (WARD et al., 1994b; FOX et al., 1996). In einer Studie von Whary *et al.* konnte zwar eine höhere Sensitivität mit einem Bakterienlysat von *H. hepaticus* oder auch von *H. rodentium* erzielt werden, die Spezifität lag jedoch nur bei 34 - 44 %, da es zu falsch positiven Ergebnissen auf Grund von Kreuzreaktionen zwischen *H. hepaticus*, *H. rodentium* und *H. bilis* kam (WHARY et al., 2000). Andererseits werden rekombinante Proteine verwendet. Als *H. bilis* spezifisches Antigen wurde das 167-kDA Protein P167 entdeckt (FENG et al., 2002). Für den Nachweis von *H. hepaticus* wurde das 18-kDA Protein MAP18 identifiziert (LIVINGSTON et al., 1999). Dadurch erhöht sich zwar die Spezifität auf 98 % des ELISAs für *H. hepaticus*, aber die Sensitivität bleibt trotzdem noch gering bei 66 % (LIVINGSTON et al., 1999).

Durch die geringe Spezifität, die geringe Sensitivität und die späte Serokonversion wird der ELISA nicht als Routine-Nachweismethode für *Helicobacter*-Infektionen genutzt.

2.5. Polymerasekettenreaktion

Die sensitivste Nachweismethode zum Nachweis von murinen *Helicobacter*-Spezies ist bis heute die Polymerasekettenreaktion. Dabei handelt es sich um eine nicht invasive Methode, da die PCR anhand von Kotproben durchgeführt werden kann und somit in einer Linie mit den 3R steht.

Zum *Helicobacter* spp.-Nachweis können gattungsspezifische PCRs genutzt werden, welche auf die hochkonservierte ribosomale 16s RNA zurückgreifen und einen, für alle bis *dato* bekannten *Helicobacter*-Spezies, identischen Genabschnitt nutzt, um diese nachzuweisen (BECKWITH et al., 1997; MÄHLER et al., 1998). Eine Speziesdifferenzierung ist dabei nicht möglich.

Um die Spezifität der Methode zu erhöhen, können nested-PCR's verwendet werden. Bei einer nested-PCR werden zwei Primerpaare in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen genutzt. In einer ersten Reaktion wird der erste Primer genutzt und in ca. 15 - 30 Zyklen amplifiziert. In der zweiten Reaktion greift der zweite Primer dann auf eine Sequenz innerhalb des aus der ersten Reaktion entstandenen Amplikons zu (SEVERINI, 1993).

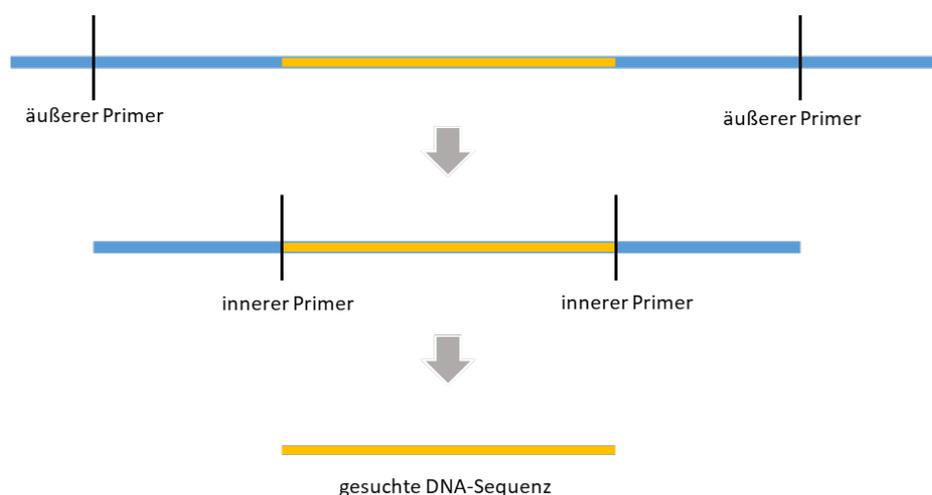


Abb. 6: Schematische Darstellung Nested PCR

Diese Methode machten sich Nilsson *et al.* und Pellicano *et al.* zu Nutze, um *Helicobacter*-Infektionen bei Krebspatienten nachzuweisen (PELLICANO *et al.*, 2004; NILSSON *et al.*, 2006). Auch die Sensitivität lässt sich mit einer nested-PCR erhöhen. Qin *et al.* entwickelten eine nested-PCR, welche spezifisch für mindestens 34 *Helicobacter*-Stämme ist und diese mit einer Sensitivität von bis zu 102 CFU/ml aus Kotproben nachweisen kann (QIN *et al.*, 2016).

Gleichzeitig besteht die Möglichkeit durch charakteristische Gensequenzen der jeweiligen Bakterien eine speziesspezifische PCR durchzuführen. Dabei können zum Beispiel *H. hepaticus* (BATTLES *et al.*, 1995; SHAMES *et al.*, 1995), *H. bilis* (FOX *et al.*, 1995; HODZIC *et al.*, 2001), *H. rodentium* (SHEN *et al.*, 1997) und *H. typhlonius* (FRANKLIN *et al.*, 2001) eigenständig mit individuellen, definierten Abschnitten im 16s RNA-Gen nachgewiesen werden. Aber auch andere Gensequenzen können genutzt werden um speziesspezifische PCRs durchzuführen. Zur Identifikation von *H. hepaticus* kann die gut konservierte Nukleotidsequenz der Urease *ureAB* genutzt werden (SHEN *et al.*, 1998; DRAZENOVICH *et al.*, 2002). Durch das *cdt*-Gen lassen sich *H. hepaticus* und *H. bilis* in der Leber oder in Kotproben von Mäusen nachweisen (YOUNG *et al.*, 2000; KOSTIA *et al.*, 2003). Speziesspezifische PCR können genutzt werden, um bestimmte *Helicobacter*-Infektionen in Maushaltungen nachzuweisen. Der Arbeitsaufwand zum Nachweis von mehreren *Helicobacter* auf Speziesebene ist aber zeitaufwendig und kostenintensiv, da jedes Mal ein eigener Durchlauf am Cycler durchgeführt werden muss.

Um diesen Nachteilen entgegenzuwirken haben schon Riley *et al.* die PCR-Methode mit der Restriktionsenzym-Analyse ergänzt (RILEY *et al.*, 1996). In dieser Studie wurde zuerst eine gattungsspezifische PCR durchgeführt. Die generierten Primer detektieren dabei das 16s RNA-Gen und ergaben ein Amplikonprodukt von 374 bp, welches dann im Anschluss mit den Restriktionsenzymen MboI, MaeI, und HhaI verdaut wurde. Dadurch entstehen spezifische Fragmente mit unterschiedlichen Längen. Somit können die Bakterien *H. hepaticus*, *H. muridarum* und *H. bilis* voneinander unterschieden werden. Leider kann mit dieser Methode *H. bilis* nicht von „*Flexispira rappini*“ unterschieden werden. Bei „*F. rappini*“ handelt es sich um gram negative, spiralförmige, bewegliche Bakterien, welche sich morphologisch und phylogenetisch kaum von *Helicobacter* spp. abgrenzen lassen (DEWHIRST *et al.*,

2000). Bis jetzt besitzt diese Bakteriengruppe keine genau definierte Taxonomie (YOUSSEF et al., 2021).

Wu *et al.* nutzten eine andere Erweiterung der PCR um den Speziesnachweis zu vereinfachen (WU et al., 2017). Dabei wird eine nested-PCR mit der HRM-Analyse ergänzt. Die Analyse basiert auf den Schmelzpunkten der Amplikons, welche sich durch die Länge, der Komplementarität und den Aufbau unterscheiden. Den Amplikons wird ein Fluoreszenzfarbstoff beigefügt und in einem realtime-Cycler erhitzt. Dadurch entstehen charakteristische Schmelzkurven für *H. hepaticus* ($82,95 \pm 0,09$ °C), *H. bilis* ($80,51 \pm 0,09$ °C), *H. muridarum* ($82,11 \pm 0,18$ °C), *H. rodentium* ($78,7 \pm 0,12$ °C), *H. typhlonius* ($81,6 \pm 0,1$ °C) (WU et al., 2017).

Zum quantitativen Nachweis von murinen *Heliobacter*-Spezies kann eine realtime PCR durchgeführt werden. Denn über die Routinemethode der Koloniezählung (CFU-Methode) kann keine Aussage über die Anzahl der murinen *Helicobacter* getroffen werden, da die Bakterien keine Kolonien auf Agarplatten formen, sondern „schwärmen“ (GE et al., 2001). Dabei ist die auf Fluoreszenz basierende Methode 10 - 100-fach sensibler verglichen mit einer normalen Gelelektrophorese (DRAZENOVICH et al., 2002). Zusätzlich werden Kosten durch den Verzicht auf Gele eingespart (DRAZENOVICH et al., 2002). Die Anschaffung des teuren realtime-Cyclers ist allerdings hierbei nicht mit bewertet worden.

Der simultane Nachweis von EHS war erst möglich als Feng *et al.* eine Multiplex-PCR entwickelten, welche in einem einzigen PCR-Durchlauf gleichzeitig *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* und *H. typhlonius* nachweisen kann. Dafür wurden neue Primer entwickelt, wobei die Primer für *H. rodentium* und *H. typhlonius* auf Sequenzen der 16s RNA basieren. Die restlichen Primerpaare nutzen andere spezifische Gensequenzen (P17 für *H. bilis*, P25 für *H. hepaticus* und P20 für *H. muridarum*). Durch diese Nachweismethode können Maushaltungen effektiv, schnell und kostengünstig auf *Helicobacter*-Infektionen untersucht werden (FENG et al., 2005).

Neben den vielen positiven Aspekten der PCR, wie hohe Sensitivität und Spezifität mit Speziesdifferenzierung, Zeit - und Kostenersparnis, gibt es auch bei dieser Methode gewisse Beeinträchtigungen. Dazu zählen die PCR-Inhibitoren,

wodurch es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Dabei handelt es sich zum Beispiel um komplexe Polysaccharide, wie Zellulose und Hemizellulose, aber auch Proteine und Gallensalze. Alles chemische Verbindungen, welche sich vor allem in Mäusekot wiederfinden (MONTEIRO et al., 1997; FERRAND et al., 2014). Ein weiteres Problem, das vor allem bei einer Multiplex-PCR auftreten kann, ist die Formation von Primer Dimern oder auch Primerakkumulationen. Dabei können die Primer entweder aneinander oder an sich selber binden und somit eine Haarschleifenformation bilden. Zum Vermeiden dieser Formationen müssen die Primer mit höchster Sorgfalt designt und geprüft werden. Zusätzlich kann die Verwendung von Hot-Start-Polymerasen, welche erst bei 95 °C aktiviert werden, die Primer Dimer Bildung verhindern (ZANGENBERG et al., 1999).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Unterbringung der Sentineltiere

Die Versuchstiereinrichtung des Institutes für Mikrobiologie der Technischen Universität Münchens hält als Sentineltiere „Soiled Bedding Sentinels“. Dabei wird jedem Rack ein bestimmter Sentinel-Käfig zugeteilt, in welchem zwei weibliche BALB/cOlaHsd Mäuse gehalten werden. Einmal pro Woche wird von jedem Käfig aus dem zugeteilten Rack ca. 25 ml schmutzige Einstreu entnommen und die Sentineltiere diesem ausgesetzt (SMITH et al., 2007). Nach zwölf Wochen Exposition wird jeweils ein Sentineltier in einem diagnostischen Labor auf Basis der vierteljährlichen Hygieneuntersuchung laut den FELASA Empfehlungen untersucht (MÄHLER et al., 2014). Dazu wird das Sentineltier euthanasiert und eine vollständige Autopsie durchgeführt, zusätzlich wird das Tier histopathologisch und mikrobiologisch auf ausgewählte Pathogene getestet (MÄHLER et al., 2014).

Die Mäuse werden unter spezifisch pathogen freien Bedingungen in IVC-Käfigen gehalten, wodurch die Belüftungsverhältnisse in einem Rack konstant gehalten werden können. Verwendet werden einerseits Käfige der Firma Tecniplast (Blue Line Sealsafe Next Typ I/II und Green Line Sealsafe Plus) und andererseits Käfige der Firma Thoren Caging Systems (Maxi-Miser mit auswechselbarem Filter). Nur so kann die Umgebung auf eine relative Luftfeuchte von 45 - 47 %, einer Temperatur von 20 - 24 °C und einer Luftwechselrate von 3 - 13-fach pro Stunde standardisiert werden. Ein Hell:Dunkel Zyklus von 12:12 wird für die Tiere eingehalten. Als Enrichment wird den Versuchstieren Einstreu, Häuschen und Nestlets zur Verfügung gestellt. Eine autoklavierte Teklad global Nagerdiät mit 18 % Proteinanteil (Envigo, UK) und angesäuertes Wasser wird den Mäusen *ad libitum* angeboten.

2. Kotprobenentnahme

Um ein sicheres Handling der Versuchstiere zu gewährleisten, wird mit einer Laminar Flow System Umsetzstation (Typ BH02A faster, Tecniplast) gearbeitet, unter welcher verschmutzte Käfige gewechselt und auch Proben entnommen werden können. Die Kotproben wurden von BALB/cOlaHsd und C57Bl/6JolaHsd

Mäusen gesammelt, wobei weibliche sowie männliche Mäuse, in einem Alter zwischen vier Wochen bis sechs Monaten, in die Versuche mit einbezogen wurden. Zur Kotprobenentnahme wurden die Mäuse sanft auf einem Gitter abgesetzt und auf den aktiven Kotabsatz gewartet. Die Kotpellets wurden in einem 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf Safe-Lock Tubes) für die weitere Verarbeitung gesammelt und aufbewahrt.

Das Handling und das Sammeln der Kotproben der Tiere des Versuchstierbestandes des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene wurde im Rahmen eines Tierversuchantrages von der Regierung von Oberbayern genehmigt (ROB-55.2-2532.Vet_02-16-98). Die weiteren Proben stammten von Tieren des Bestandes der jeweiligen Versuchseinrichtungen und wurden im Rahmen der Hygieneüberwachung beim Umsetzen der Tiere entnommen.

3. Bakterienstämme

3.1. Herkunft der Bakterienstämme

Die Bakterienstämme *H. hepaticus* (DSM 22909), *H. muridarum* (DSM 22221), *H. mastomyrinus* (DSM 22886), *Acrobacter butzleri* (DSM 8739), *Wolinella succinogenes* (DSM 1740), *Enterococcus faecalis* (DSM 20478), *Clostridioides difficile* (DSM 1296), *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016) und *Streptococcus salivari* (DSM 20560) wurden über das DSMZ bezogen.

H. bilis (CIP 104752T) und auch *H. typhlonius* (CIP 107729T) stammen aus der Collection de l'Institut Pasteur. Aus der amerikanischen Zellkultur Sammlung stammt *H. rodentium* (ATCC 700285).

Die Stämme *H. pylori* SS1, *H. pylori* PMSS1, *H. pylori* J99, *Citrobacter rodentium* (ATCC 51459), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560) und *Campylobacter coli* (ATCC 33559) wurden durch die hauseigene Sammlung des Institutes für Mikrobiologie der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

3.2. Kultivierung der Bakterienstämme

Die murinen *Helicobacter* spp. wurden auf Columbia 5 % Schafblutagar, welcher

mit einer zusätzlichen flüssigen Schicht von 2,5 ml BHI überschichtet ist, kultiviert. Die Agarplatten wurden unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Anaerobiergefäß inkubiert. Durch den AnoxomatTM Mark II wurden die Bedingungen von 6 % O₂ geschaffen und bei 37 °C für 2 - 4 Tage bebrütet.

H. pylori-Stämme wurden auf dem Selektivagar WC-DENT kultiviert. Dieser wird aus Wilkins-Chalgren-Agar mit Hefeextrakt in destillierten Wasser hergestellt. Zusätzlich wird 10 % fetales Kälberserum und das DENT-Supplement, bestehend aus Vancomycin 5 mg, Trimethoprim Lactat 2,5 mg, Cefsulodin 2,5 mg, Amphotericin B 2,5 mg, hinzugefügt (RAD, 2009). Diese Stämme benötigen mikroaerobe Umweltbedingungen von 10 % CO₂, 5 % O₂ bei 37 °C für zwei Tage.

Die restlichen Bakterienstämme wurden nach den Empfehlungen für Nährböden und den jeweiligen Wachstumsbedingungen des Leibniz-Institutes (LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH, 2019) kultiviert. *Acrobacter butzleri*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivari*, *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* wurden mit Columbia 5 % Schafblutagar bei 37 °C unter mikroaerophilen Bedingungen angezüchtet. *Staphylococcus aureus* benötigt den gleichen Agar und aerobe Verhältnisse. Auch *Citrobacter rodentium* und *Escherichia coli* benötigen aerobe Bedingungen bei 37 °C. Sie wachsen am besten auf einem Casein-Soja-Pepton-Agar. Für die folgenden Bakterien sind spezielle Agarplatten nötig: *Wolinella succinogenes* wächst anaerob bei 37 °C auf einem nährstoffreichen Wollinella-Agar. *Clostridioides difficile* benötigt anaerobe Verhältnisse bei 37 °C und einen Fastidious Anaerobe Agar. Auf dem MRS-Agar wächst *Lactobacillus reuteri* aerob bei 37 °C.

4. Extraktion von DNA

Es wurden mehrere DNA Extraktions-Kits verglichen, um die bestmögliche Qualität der DNA für den Nachweis von *Helicobacter* spp. zu erlangen. Für die Extraktion von bakterieller DNA wurden fünf kommerziell erwerbbar Extraktions-Kits beurteilt. Für die Extraktion und den Nachweis der DNA aus Mäusekotproben wurden vier verschiedene Kits überprüft. Eine Zusammenfassung der jeweiligen Eigenschaften der Kits ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Tbl. 2: Eigenschaften der kommerziell erwerblichen DNA Extraktions-Kits

(B: bead beating, CLB: Zell Lyse Puffer, L: Lysozyme, PF: Präfilter, RPI: Entfernung von PCR-Inhibitoren, T: Temperatur)

EXTRAKTIONSKITS	EIGENSCHAFTEN DES KITS			
	Material	Abkürzung	Empfohlene Start-Dosis	Lyse-Prozess
QIAGEN DNEASY BLOOD & TISSUE KIT	Bakterien	QB	$\leq 5 \times 10^6$	CLB, T
ANALYTIK JENA INNUPREP BACTERIA DNA KIT	Bakterien	AB	$\leq 1 \times 10^9$	CLB, T
STRATEC RTP® BACTERIA DNA MINI KIT	Bakterien	SB	$\leq 1 \times 10^9$	CLB, T
BIOTECHRABBIT GENUP™ BACTERIA GDNA KIT	Bakterien	BB	$\leq 1 \times 10$	CLB, L, T
ZYMO RESEARCH QUICK-DNA MINIPREP PLUS KIT	Bakterien	ZQ	$\leq 5 \times 10^6$	CLB, T
QIAGEN QIAAMP FAST DNA STOOL MINI KIT	Kot	QS	180-220 mg	CLB, RPI, T
ANALYTIK JENA INNUPREP STOOL DNA KIT	Kot	AS	200-400 mg	CLB, PF, T
STRATEC PSP® SPIN STOOL DNA KIT	Kot	SS	≤ 200 mg	B, CLB, RPI, T
ZYMOBIOMICS DNA MINIPREP KIT	Kot	ZM	≤ 200 mg	B, CLB, RPI, T

4.1. Extraktion von bakterieller DNA

Die Extraktion der bakterieller DNA wurde in vier der fünf Kits (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Ki, Stratec RTP® Bacteria DNA Mini Kit und dem Zymo Research Quick-DNA Miniprep Plus Kit) durch chemischen Zellaufschluss in Verbindung mit Lysozym erreicht. Das Biotechrabbit GenUP™ Bacteria gDNA Kit nutzt zusätzlich eine Erwärmung der Proben auf 70 °C zur Zelllyse. Da die empfohlene bakterielle Anzahl zur Extraktion sich zwischen den Kits unterscheidet, wurde für jede Probe die gleiche bakterielle Konzentration von 2×10^6 *H. hepaticus*/ml eingestellt.

4.2. Extraktion von DNA aus Kotproben

Zur Extraktion der DNA aus Kotproben wurde auf zusätzliche Techniken zurückgegriffen. Das Stratec PSP® Spin Stool DNA Kit und ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit machen sich die Technik des „bead beating“ zu Nutze, wobei die DNA mechanisch aufgeschlossen wird.

PCR-Inhibitoren werden mit dem Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit und auch dem SS vor der Extraktion entfernt. Das Analytik Jena innuPREP Stool DNA Kit nutzt Vorfilter.

Bei allen Kits wurden zur Extraktion der DNA 50 mg Mäusekot von *Helicobacter* spp. freien Mäusen mit 500 µl 2×10^6 *H. hepaticus*/ml gespiked.

Für die DNA-Extraktion wurden die Herstellerangaben jedes Extraktions-Kit genauestens befolgt und mit 100 µl des jeweiligen Elutionspuffer gelöst.

4.3. Bestimmung der DNA-Eigenschaften

Um die DNA-Konzentration (µl/ml) und auch die DNA-Qualität, welche durch die Absorptionsraten 260nm/280nm und 260nm/230nm beschrieben wird, zu bestimmen, wurde das Spektrophotometer NanoDrop™ 1000 verwendet.

Die Absorptionsraten messen die Reinheit der DNA-Proben. Bei einer Absorptionsrate 260nm/280nm spricht ein Wert von 1,8 für eine Probe mit reiner DNA. Reine RNA-Proben haben einen Wert von 2,0. Bei Verunreinigungen können sich diese Werte verändern. Bei einer Kontamination mit Proteinen, Phenolen oder Ethanolen fällt der Wert, da diese Stoffgruppen am stärksten bei 280nm absorbieren. Absorptionsraten von 260nm/230nm dienen als zweiter Parameter zur Beurteilung der DNA-Qualität. Werte von 2,0 - 2,2 sind hier erstrebenswert. Hier fällt der Wert durch Kontaminationen, welche bei 230nm absorbieren, z.B. EDTA, Phenole und Kohlenhydrate (THERMOSCIENTIFIC, 2019).

Die DNA-Ausbeute wurde errechnet, in dem die DNA-Konzentration mit dem totalen Probenvolumen (ml) multipliziert wurde.

5. Primer Konzeption

Zur Entwicklung einer Multiplex-PCR, welche gleichzeitig *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* und *H. typhlonius* nachweisen kann, wurden neue

Primerpaare entworfen oder vorhandene modifiziert. Dabei wurden die Primer von bereits bestehenden Veröffentlichungen (FENG et al., 2005) verbessert, indem die Primer gekürzt wurden, damit die Länge durchschnittlich 24 bp beträgt. Zusätzlich wurden die Schmelztemperaturen der verschiedenen Primer aneinander angenähert und die Amplikonlänge verändert, damit die Amplikons leichter voneinander zu unterscheiden sind (siehe Tabelle 3). Jedoch wurde die Position im Genom des jeweiligen *Helicobacter* spp. beibehalten: *H. hepaticus* mit Gen P25, *H. muridarum* mit Lipoproteinen P30Hm13, *H. bilis* mit P17 Gen, und *H. typhlonius* als auch *H. rodentium* mit dem 16sRNA Gen.

Die Primer wurden mit Hilfe der Bioinformatik Software Geneious v8.1.9 konzipiert und die jeweilige Sequenz mit den Gensequenzen der GenBank Nukleotid Bibliothek durch eine BLAST-Suche verglichen.

6. Durchführung der PCR

6.1. Single-PCR

Zur Durchführung der Single-PCR wird eine 20 µl Reaktionslösung benötigt, welche folgende Bestandteile enthält: 10 µl GoTaq® G2 Green Master Mix, 8 µl Nuklease freies Wasser, 1 µl des 10 µM konzentrierten speziesspezifischen Primerpaar (siehe Tabelle 3), 1 µl der Probe, wobei es sich entweder um aufgereinigte DNA aus einer bakteriologischen Kultur oder einer Kotprobe handelte.

Die Reaktion läuft dabei in einem BioRad C1000 Touch Thermal Cycler ab, mit einer Initialisierung von 95 °C für fünf Minuten und einer anschließenden Denaturierung von 95 °C für 30 Sekunden. Zur Primerhybridisierung wird eine Temperatur von 55 °C für 30 Sekunden gewählt. Während der Elongation liegt die Temperatur bei 72 °C für eine Minute. Diese Schritte werden in 35 Zyklen wiederholt. Am Schluss erfolgt eine finale Elongation bei 72 °C für fünf Minuten.

Das PCR-Produkt wird im nächsten Schritt durch die Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Dazu wird es auf ein 1,5 % Agarosegel, welche mit dem Farbstoff Roti®-GelStain versetzt ist, aufgetragen und durch den Gel Doc™ XR+ Imager sichtbar gemacht.

6.2. Multiplex-PCR

Für die Durchführung der Multiplex-PCR wird eine größere Menge an Reaktionslösung benötigt. Die 50 µl Lösung besteht aus: 25 µl GoTaq® G2 Green Master Mix, 22 µl Nuklease freies Wasser, 2 µl der Primermischung, 1 µl der Probe. Die Primermischung selbst unterscheidet sich für genomische DNA und DNA aus Kotproben. Für genomische DNA kann eine equimolare Primerkonzentration gewählt werden, aber für DNA aus Kotproben benötigt jedes Primerpaar eine unterschiedliche genau definierte Konzentration (siehe Tabelle 3).

Die Reaktion im BioRad C1000 Touch Thermal Cycler läuft mit ein paar Änderungen ab. Die Initialisierung wird bei 94 °C für fünf Minuten und die Denaturierung bei 94 °C für eine Minute. Bei der Primerhybridisierung liegt die Temperatur bei 53 °C für eine Minute. Die Elongation läuft bei 72 °C für eine Minute wiederholt in 40 Zyklen. Die finale Elongation erfolgt bei 72 °C für fünf Minuten.

Zur Darstellung durch die Elektrophorese wird für die Multiplex-PCR ein 2,5 % Agarosegel benötigt.

Tbl. 3: Primer zur Detektion der murinen *Helicobacter*-Spezies

*modifizierte Primer

SPEZIES	SEQUENZ (5' TO 3')	AMPLIKON-LÄNGE	MULTIPLEX-PCR PRIMER KONZENTRATION
<i>H. hepaticus</i> (Hh)			
forward	GAGCCTCAAAGGTTTATAGC *	657 bp	100 µmol
reverse	CTATTTTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC		
<i>H. bilis</i> (Hb)			
forward	ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAACTTCAG	435 bp	70 µmol
reverse	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT		
<i>H. muridarum</i> (Hm)			
forward	CACAAAATTCATTGGTGCG *	293 bp	40 µmol
reverse	GTAGAGGACCTCTAGTTTTTGC *		
<i>H. rodentium</i> (Hr)			
forward	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT	192 bp	35 µmol
reverse	TAGCCAGTTTGGCATTCC		
<i>H. typhlonius</i> (Ht)			
forward	GGGACTCTTAAATATGCTCC *	119 bp	25 µmol
reverse	CATCGTGTTGAATGCGTC *		

7. DNA Spiking

Das DNA Spiking wird wie in der Veröffentlichung von Ferrand *et al.* mit gewissen Modifikationen durchgeführt (FERRAND *et al.*, 2014). Dabei wird Mäusekot mit einem Gewicht von 50 mg mit 500 µl bakterieller Suspension versetzt, welche die hier beschriebenen fünf *Helicobacter*-Stämme zu gleichen Teilen enthält. Zur Aufbereitung der Bakterien werden die jeweiligen Stämme mit BHI gewaschen, um freie DNA von toten Bakterien zu entfernen. Im Anschluss wird die optische Dichte und damit auch die Konzentration mit dem Eppendorf BioPhotometer 6131 gemessen und auf OD₆₀₀ 1 eingestellt, was somit einer Konzentration von 2 x 10⁸ Bakterien/ml entspricht. Zehnfache Verdünnungen der Bakteriensuspension wurden angefertigt (von 2 x 10⁸ bis 2 x 10⁴ Bakterien/ml) und den Kotproben hinzugefügt. Die gespikten Proben werden bei 13,000 x g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA aus dem entstandene Pellet mit Hilfe des AS-Kit extrahiert.

8. Validationsprozess

Der Validationsprozess wurde basierend auf den Empfehlungen für hausinterne entwickelte Tests durchgeführt (RABENAU *et al.*, 2007; NEWMAN und MARITZ, 2017). Folgende Parameter wurden in dieser Studie analysiert: Untere

Nachweisgrenze (LLOD), Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Präzision, Reproduzierbarkeit und Robustheitsbewertung.

Um die untere Nachweisgrenze der etablierten Methode genau zu bestimmen, wurden gespikete Mäusekotproben verwendet. Dazu wurden Verdünnungen mit einer bekannten Konzentration angefertigt. Die fünf EHS wurden dabei in jeweils gleicher Menge hinzugefügt. Dabei wurde jede Verdünnung dreimal repliziert und dies in drei eigenständigen Durchläufen.

Die Validierung der Sensitivität erfolgte mit zehn positiven (= mehr als 1 log₁₀ über dem LLOD) und zehn niedrig positiven (= bis zu 1 log₁₀ über dem LLOD) gespikten Kotproben, welche in drei unabhängigen Durchläufen getestet wurden.

Die Spezifität der etablierten Multiplex-PCR wurde mit 20 negativ gespikten Kotproben untersucht. Dafür wurden 50 mg einer Mäusekotproben mit verschiedenen Bakterienspezies versetzt, jeweils in einer Konzentration von 2 x 10⁵ Bakterien/ml. Unter Anderem wurden zehn *Helicobacter*-Stämme verwendet: *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, *H. typhlonius*, *H. mastomyrinus*, *H. felis*, *H. pylori J99*, *H. pylori SSI*, *H. pylori PMSSI*. Außerdem wurden sechs gram negative Bakterien (*C. jejuni*, *C. coli*, *A. butzleri*, *W. succinogenes*, *C. rodentium*, *E. coli*) und fünf gram positive Bakterien (*S. aureus*, *L. reuteri*, *E. faecalis*, *C. difficile*, *S. salivarius*) untersucht.

Um die Genauigkeit der Methode zu validieren, wurde diese mit einer Referenzmethode verglichen. Jeweils sieben positive, niedrig positive und negative gespikete Mäusekotproben wurden mit der Multiplex-PCR analysiert und diese dann mit jeweils einer positiven, niedrig positiven und negativen gespikten Probe der korrespondierenden *Helicobacter* Single-PCR verglichen. Jede Probe wurde in drei separaten PCR-Durchläufen getestet.

Als nächster Schritt wurde die Präzision der Methode ermittelt. Dabei wird zwischen Intra-Präzision und Inter-Präzision unterschieden. Zur Validierung der Intra-Präzision wird eine gespikete Kotproben dreimal in einem Durchlauf getestet. Im Gegensatz dazu wird bei der Inter-Präzision eine gespikete Kotprobe dreimal in einem Durchlauf und zusätzlich an drei verschiedenen Tagen getestet.

Die Reproduzierbarkeit des Testsystems wird überprüft in dem eine positive und eine negative gespikete Kotprobe mindestens in drei unabhängigen Durchläufen

von drei verschiedenen Personen durchgeführt wird. Zusätzlich werde die Proben an zwei verschiedenen Cyclern und in zwei unabhängigen Laboren getestet.

Für die Robustheitsbewertung, also wie stabil murine *Helicobacter* in Kotproben von Mäusen sind, wurden gespikte Kotproben verwendet, entweder jeweils drei Proben mit 100 µl Stabilisator oder drei Proben ohne Stabilisator. Diese wurden bei Raumtemperatur entweder am Tag des Spikens (entspricht Tag Null) weiterverarbeitet oder für drei, sieben und zehn Tage aufbewahrt. Die DNA aller Proben wurde mit AS extrahiert und die etablierte Multiplex-PCR durchgeführt. Als Kontrolle wurde jeweils eine ungespikte Kotprobe unter den gleichen Bedingungen aufbewahrt und getestet (BECKWITH et al., 1997).

9. Testen der Methode in Versuchstiereinrichtungen

Um einen Überblick über die Prävalenz der verschiedenen *Helicobacter*-Spezies in Versuchstiereinrichtungen in Bayern zu kriegen, wurden acht verschiedene Einrichtungen untersucht. Die Mäusekotproben unterscheiden sich in der Anzahl, welche von den Einrichtungen im Rahmen des jeweiligen Hygienemonitorings zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wurden vier bis 39 Kotproben gesammelt, insgesamt wurden 162 Proben untersucht. Sie stammten von den Sentineltieren aus verschiedenen Barrieren. Alle Versuchstiereinrichtungen arbeiten mit „soiled bedding“ Sentineltieren und deren jeweiliger *Helicobacter*-Status variiert zwischen positiv oder negativ. Alle Proben wurden direkt am Tag der Probennahme weiterverarbeitet in dem die DNA mit dem AS-Kit extrahiert und die etablierte Multiplex-PCR durchgeführt wurde.

10. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 8 verwendet. Die nicht parametrischen Daten wurden mit dem 1way ANOVA Bonferroni-Test ausgewertet. Ab einer Abweichung von $p * < 0.05$ galt dieses als statistisch signifikant.

IV. PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE

1. Veröffentlichung Neubert *et al.* 2022

Vanessa Neubert¹, Ahmed Sadek¹, Teresa Burell¹, Anna Ralser¹, Michael Erhard², Markus Gerhard^{1,3}, Karin Seidel¹, Behnam Kalali¹

¹Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität, München

²Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Ludwig-Maximilians-Universität, München

³Deutsches Zentrum für Infektionsforschung, München

Validation and improvement of a multiplex PCR method to detect murine *Helicobacter* species in feces samples of mice

Helicobacter 2022, Volume 27, Issue 3: e12888

DOI: 10.1111/hel.12888

Angenommen am 15.03.2022

Veröffentlicht am 01.04.2022

Impact Factor: 4,4 (2022)

Received: 1 September 2021 | Revised: 28 February 2022 | Accepted: 15 March 2022

DOI: 10.1111/hel.12888

ORIGINAL ARTICLE

Helicobacter WILEY

Validation and improvement of a multiplex PCR method to detect murine *Helicobacter* species in feces samples of mice

Vanessa Neubert¹ | Ahmed Sadek¹ | Teresa Burell¹ | Anna Ralser¹ | Michael Erhard² | Markus Gerhard^{1,3} | Karin Seidel¹ | Behnam Kalali¹

¹Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Technical University of Munich, Munich, Germany

²Department of Veterinary Sciences, Chair of Animal Welfare, Ethology, Animal Hygiene and Animal Housing, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

³German Center for Infection Research, Partner Site Munich, Munich, Germany

Correspondence

Karin Seidel, Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Technical University of Munich, Munich, Germany.
Email: karin.seidel@tum.de

Funding information

German Center for Infection Research

Abstract

Background: Murine *Helicobacter* species have gained increasing awareness in mouse facilities over the last years. Infections with *Helicobacter* species may have an impact effect on the health of mice and might pose a zoonotic risk to researchers. To minimize the interference with experiments and hence contribute to the 3Rs, a reliable method of monitoring *Helicobacter* infections in animal facilities needs to be available. The aim of this study was to improve and validate the detection of the most common murine *Helicobacter* species.

Material and Methods: A multiplex PCR assay was developed for identification of *Helicobacter hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, and *H. typhlonius* that could simultaneously detect these five strains in fecal samples. To ensure the quality of the results, the method was validated based on recommendations for in-house developed tests.

Results: The method established was highly sensitive and specific. All five strains were detectable with a detection limit of 10² bacteria. Eight different mouse facilities were tested with the validated assay, and the following prevalence were found: *H. rodentium* 57%, *H. hepaticus* 46%, *H. typhlonius* 17%, *H. bilis* 12%, and *H. muridarum* 0%.

Conclusion: The multiplex PCR is a reliable, economic, and time-saving diagnostic tool for routine health monitoring. Further prevalence studies are needed to confirm the high prevalence and hence importance of *H. rodentium*, as until now this agent is not yet listed in FELASA recommendations.

KEYWORDS

multiplex PCR, non *H. pylori* *Helicobacter*, validity

1 | INTRODUCTION

Since Robin Warren and Barry Marshall discovered *Helicobacter (H.) pylori* in 1984,¹ the genus *Helicobacter* has rapidly expanded, now including more than 40 species.² They can be divided into two groups: gastric *Helicobacter* species, that colonize the stomach, and enterohepatic *Helicobacter* species, that can be found in the intestine and in the hepatobiliary system. *Helicobacter* spp. are not only found in humans, but in the entire animal kingdom, which is particularly important in laboratory rodents.

Enterohepatic *Helicobacter* species (EHS) are the predominant *Helicobacter* species in mice and are globally endemic in mouse facilities,³ with *H. hepaticus* (Hh)⁴ being the most dominant species, followed by *H. bilis* (Hb).⁵ Other studies⁶⁻¹⁰ have also found a significant prevalence of *H. typhlonius* (Ht),^{11,12} *H. muridarum* (Hm),¹³ and *H. rodentium* (Hr).¹⁴

In laboratory rodents, *Helicobacter* spp. are known to be able to cause clinical symptoms. Some EHS are associated with decreased reproductive performance, rectal prolaps, inflammatory bowel disease, and typhlocolitis.¹⁵⁻¹⁷ *H. hepaticus* and *H. bilis* can additionally

cause hepatitis and hepatocarcinoma in mice.¹⁵ In humans, infection with *H. bilis* might provoke biliary tract carcinoma.¹⁸⁻²⁰

Additionally, colonization with EHS can also influence experimental infections. An experimental co-infection with *H. pylori* and *H. bilis* can attenuate *H. pylori*-induced gastritis. Hence mice, which have been previously exposed to *Helicobacter* antigens, can have a reduced gastric pathology, when *Helicobacter* primed native T_{REG} cells migrate from the lower bowel to the stomach upon *H. pylori* infection.²¹ The same outcome was seen when C57BL/6 mice were experimental co-infected with *H. pylori* and *H. muridarum*. However, an experimental co-infection of *H. pylori* and *H. hepaticus* can lead to the exact opposite result: A stronger gastric pathology developed compared to *H. pylori* mono-infected mice. This could be due to the fact that *H. hepaticus* stimulates Th17 cells more than T_{REG} cells, which then enhance signals of the Th17 pathway and lead to a more distinct pathology.²²

The high number of rodent facilities with positive tests for *Helicobacter* spp. as well as the possible health impact on mice and hence animal welfare, alongside the discussion of zoonotic potential, has led to an increased awareness of the importance of monitoring *Helicobacter* spp. in mouse facilities, since the microbiological quality of the laboratory animals has to be secured. Only animals which are not infected with any pathogen or potentially zoonotic commensal should be used in experimental studies. However, a lot of *Helicobacter* spp. infections are inapparent. These infections could lead to wrong interpretations of research results, experiments may have to be repeated, or results may be not reproducible anymore, all of which leads to a higher number of animals being used. Therefore, the Federation of European Laboratory Animal Science Associations saw a need to raise monitoring frequencies of murine *Helicobacter* from no surveillance in 1995 to a quarterly surveillance of *H. hepaticus*, *H. bilis*, and *H. typhlonius* in 2014.²³

Techniques to detect EHS include culture, electron microscopy, histologic examination from biopsies, or PCR from feces. Mähler et al described a genus-specific PCR, based on 16S rRNA gene sequences, to be more sensitive compared to other techniques. Most animal facilities test for infections with EHS using such genus-specific PCR as part of their health monitoring. According to FELASA, positive results should be followed up by species-specific PCR for *H. hepaticus*, *H. bilis*, and *H. typhlonius*.²³ To simplify this procedure, Feng et al developed a five-plex PCR to detect *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, and *H. typhlonius* simultaneously. However, this assay, in our hands, showed insufficient sensitivity and specificity, and was not formally validated.

The purpose of this study was to optimize the detection of murine *Helicobacter* species by the establishment and systematic validation of a multiplex PCR. Thus, primers were improved and characterized, so they could reach a higher sensitivity and specificity and a lower LLOD. Also, with the validation, we provide a reliable and easy method for animal facilities to test for *Helicobacter* spp., survey their infection status and act in the sense of the 3R (Refinement, Reduction, Replacement).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals, sample collection, and sentinel monitoring

Mice were housed in Blue Line Sealsafe Next (Typ I/II) and Green Line Sealsafe Plus individually ventilated cage (IVC) systems (Tecniplast, Italy) or in Maxi-Miser filter-top interchangeable IVC caging (Thoren Caging Systems, PA, USA) under specific pathogen-free conditions with bedding material (Abedd, Wien, Austria) and enrichment such as houses (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Germany) or nestlets (J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Germany). Autoclaved Teklad global 18% protein rodent diet (Envigo, UK) and water acidified to a pH of 2.5–3 was available ad libitum. The environment was standardized with 45–47% relative humidity, 20–24°C temperature, 3–13 air exchange per hour, and 12:12 dark:light cycle. A laminar flow system (Typ BH02A faster, Tecniplast) was used to handle animals, collect samples, and change cages.

Fecal samples were collected from BALB/cOlaHsd and C57Bl/6JolaHsd mice of both sexes, aged four weeks to six months. For this, animals were lifted up briefly on to a grid; pellets were collected in a microcentrifuge tube at defecation for further processing.

The animal facility of the Institute for Medical Microbiology of the Technical University, Munich, is monitored using soiled bedding sentinels. Each sentinel cage is appointed to one rack side in every room, and two female BALB/cOlaHsd mice are housed per sentinel cage. Once a week dirty bedding is collected from all cages of one rack side and sentinels are exposed to soiled bedding for at least 12 weeks. A sentinel is then sent to a diagnostic laboratory for quarterly hygienic monitoring according to FELASA recommendations.²³

2.2 | Bacterial strains and cultivation

Helicobacter hepaticus (DSM 22909), *H. muridarum* (DSM 22221), *H. mastomyrinus* (DSM 22886), *Acrobacter butzleri* (DSM 8739), *Wolinella succinogenes* (DSM 1740), *Enterococcus faecalis* (DSM 20478), *Clostridioides difficile* (DSM 1296), *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016), and *Streptococcus salivari* (DSM 20560) were obtained from the German Collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ), kindly provided by German Center for Infection Research (DZIF); *H. bilis* (CIP 104752T) and *H. typhlonius* (CIP 107729T) were obtained from the Collection de l'Institut Pasteur and *H. rodentium* (ATCC 700285) from the American Type Culture Collection. *H. pylori* SS1, *H. pylori* PMSS1, *H. pylori* J99, *Citrobacter rodentium* (ATCC 51459), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560), and *Campylobacter coli* (ATCC 33559) were obtained from strain collection of the Institute for Medical Microbiology of the Technical University, Munich. Murine *Helicobacter* species were cultivated on Columbia 5% sheep blood agar with a liquid phase of 2.5 ml brain heart infusion (BHI). Agar

TABLE 1 A: General attributes of the commercially available DNA extraction methods evaluated; B: yields and qualities of DNA extracted from *H. hepaticus* or fecal spiked with *H. hepaticus*

Extraction kit	A: General attributes			B: DNA quantity and quality			
	Material	Abbreviation	Recommended starting amount	Lysis procedure	Nucleic acid yield (μg) ^a	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit	Bacteria	QB	$\leq 5 \times 10^{6c}$	CLB, T	1.6	1.6	0.8
Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Kit	Bacteria	AB	$\leq 1 \times 10^{6c}$	CLB, T	5.2 ^b	2.1	0.5
Stratec RTP [®] Bacteria DNA Mini Kit	Bacteria	SB	$\leq 1 \times 10^{6c}$	CLB, T	0.8	2.3	0.4
Biotechrabbit GenUP [™] Bacteria gDNA Kit	Bacteria	BB	$\leq 1 \times 10^{6c}$	CLB, L, T	4.6 ^c	2.0	1.1 ^c
Zymo Research Quick-DNA Miniprep Plus Kit	Bacteria	ZQ	$\leq 5 \times 10^{6c}$	CLB, T	0.9	2.0	1.1
Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit	Feces	QS	180–220 mg	CLB, RPI, T	0.03	1.3	0.9
Analytik Jena innuPREP Stool DNA Kit	Feces	AS	200–400 mg	CLB, PF, T	1.2 ^c	2.0 ^c	1.2
Stratec PSP [®] Spin Stool DNA Kit	Feces	SS	≤ 200 mg	BB, CLB, RPI, T	0.2	1.8	0.1
ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	Feces	ZM	≤ 200 mg	BB, CLB, RPI, T	0.3	1.7	0.9

Abbreviations: B, bead beating; CLB, cell lysis buffer; L, lysozyme; PF, prefilter; RPI, removal of PCR inhibitors; T, temperature.

^aDNA yield for bacteria from *H. hepaticus* 2×10^6 bacteria/ml, for feces (50 mg) measured with the Nanodrop photometer (mean of five replicates).

^bData significantly different to other methods. Analyzed using the one-way ANOVA Bonferroni test, *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

^cCell number.

plates were incubated in an anaerobic jar under microaerophilic conditions (6% O₂) using Anoxomat[™] Mark II (Mart Microbiology BV, Lichtenvoorde, Netherlands) at 37°C for 2–4 days. *H. pylori* strains were grown on WC-Dent agar plates (selective agar with Bacitracin, Nalidixicacid, Polymyxin B) in a microaerobic atmosphere (10% CO₂, 5% O₂) at 37°C for 2 days. All other strains were cultivated according to Leibniz-Institute recommendations on media and growth conditions.²⁴

2.3 | DNA isolation and determination of quantity and quality

Five commercially available kits for the extraction of bacterial DNA were tested; for the extraction of DNA from mice fecal samples, four commercially available kits were tested. The attributes of the DNA extraction kits are described in Table 1.

The extraction of bacterial DNA was performed through chemical cell lysis enhanced with lysozyme in four of the five kits: Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (QB) (Qiagen, Hilden, Germany), Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Kit (AB) (Analytik Jena, Jena, Germany), Stratec RTP[®] Bacteria DNA Mini Kit (SB) (Stratec SE, Birkenfeld, Germany), and Zymo Research Quick-DNA Miniprep Plus Kit (ZQ) (Zymo Research, Irvine, CA, USA). The fifth kit, Biotechrabbit GenUP[™] Bacteria gDNA Kit (BB) (biotechrabbit, Hennigsdorf, Germany), additionally uses heat for cell lysis. Since the recommended starting amount differed among the kits, the same bacterial load of 2×10^6 *H. hepaticus*/ml was used for each.

Kits for DNA extraction out of fecal samples use additional techniques such as bead beating (Stratec PSP[®] Spin Stool DNA Kit (SS) and ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZM)); removal of PCR inhibitors (Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QS) as well as SS); or the usage of prefilters (Analytik Jena innuPREP Stool DNA Kit (AS)). DNA was extracted from 50 mg mice feces²⁵ spiked with 500 μl bacterial suspension of *H. hepaticus* (2×10^6 bacteria/ml).

All tested methods were performed as recommended in the manufacturer's manual and eluted with 100 μl of the respective elution buffer.

The DNA concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) and quality (represented by the absorbance ratios 260 nm to 280 nm and 260 nm to 230 nm) were measured with a NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). DNA yield (μg) was calculated as DNA concentration multiplied by the total sample volume (ml).

2.4 | Primer design

For a multiplex PCR targeting, *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, and *H. typhlonius* primer pairs were designed or modified from previously published data,²⁶ by reducing the length of the primer, shorter amplicon lengths, or lower melting temperatures (Table 2).

TABLE 2 Primer sets for detection of murine *Helicobacter* strains

Species and primer	Sequence (5' to 3')	Product length	Multiplex PCR primer concentration
<i>H. hepaticus</i> (Hh)			
Forward	GAGCCTCAAAGGTTTATAGC ^a	657bp	100 µmol
Reverse	CTATTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC ^b		
<i>H. bilis</i> (Hb)			
Forward	ATGGAACAGATAAAGATTTAAAGCAACTTCAG ^b	435 bp	70 µmol
Reverse	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT ^b		
<i>H. muridarum</i> (Hm)			
Forward	CACAAAATTCATTGGTGCG ^a	293 bp	40 µmol
Reverse	GTAGAGGACCTCTAGTTTTTGC ^a		
<i>H. rodentium</i> (Hr)			
Forward	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT ^b	192 bp	35 µmol
Reverse	TAGCCAGTTGGCATTCC ^b		
<i>H. typhlonius</i> (Ht)			
Forward	GGGACTCTAAATATGCTCC ^a	119 bp	25 µmol
Reverse	CATCGTGTGAAATGCGTC ^a		

^aModified Primers.^bRef. [26].

TABLE 3 Overview of parameters validated for home-brewed qualitative nucleic acid tests and the results obtained with the established method

No. Samples required for testing		Result
Accuracy	7 positive ^a 7 low negative ^b 7 negative	100%
LLOD	serial dilutions with a known concentration in the analytic range of the expected LLOD with 3 replicates	10 ² bacteria
Intra-Precision	1 positive ^a 1 low positive ^b tested 3 times within one run	100%
Inter-Precision	1 positive ^a 1 low positive ^b tested 3 times within one run	100%
Reproducibility	1 positive ^a 1 low positive ^b tested in 3 runs, either with different: 3 operators, 3 cyclers, 2 separate laboratories	100%
Robustness	3 positive ^a stored for 0, 3, 7, 10 days with or without stabilizer 3 negative stored at the same manner	Storage up to 10 days with stabilizer
Sensitivity	10 positive ^a 10 low positive ^b	100%
Specificity	20 negative	100%

Note: Intra-precision = each spiked fecal sample is tested three times within a run; Inter-precision = each spiked fecal sample is tested three times within a run on three different days; LLOD = lower limit of detection.

^aMore than to 1 log₁₀ over LLOD.^bUp to 1 log₁₀ over LLOD.

Primers were designed with the help of the Geneious bioinformatics software package (Geneious v8.1.9, Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand), and primer sequences were compared with

gene sequences available in the GenBank nucleotide library of the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA) by BLAST searching. Genomic locations for *H. hepaticus*

(P25 gene), *H. muridarum* (putative lipoprotein P30Hm13 gene), *H. typhlonius* (16s gene), *H. rodentium* (16s gene), and *H. bilis* (P17 gene) were undertaken from Feng et al.²⁶

2.5 | Single and multiplex PCR assay

For single PCRs, a species-specific primer (Table 2) was used in a 20 μ l reaction containing 10 μ l GoTaq[®] G2 Green Master Mix (Promega, Madison, USA), 8 μ l nuclease-free water, 1 μ l of 10 μ M primer, and 1 μ l template (purified DNA either from bacterial culture or fecal sample). The PCR was amplified in a BioRad C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) under the following conditions: initial denaturation of 95°C for 5 min; denaturing at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, elongation at 72°C for 1 min repeated in 35 cycles; and a final elongation step at 72°C for 5 min. Amplicons were analyzed using electrophoresis with a 1.5% agarose gel and Roti[®]-GelStain (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and visualized with Gel Doc[™] XR+Imager from BioRad.

To perform multiplex PCR, an amplification mixture of 50 μ l was used,²⁶ containing 25 μ l GoTaq[®] G2 Green Master Mix, 22 μ l nuclease-free water, 2 μ l of primer mix, and 1 μ l template. For genomic DNA, equimolar primer concentrations were used, for fecal DNA different concentrations for each primer pair had to be evaluated (Table 2). Changes also were made in amplification conditions: initial denaturation 94°C for 5 min; denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 53°C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min repeated in 40 cycles; followed by a final elongation step at 72°C for 5 min. For electrophoresis, a 2.5% agarose gel was used.

2.6 | Spiking experiments

Spiking experiments were conducted as previously described by Ferrand et al.²⁵ with minor modifications. A fecal pellet (50 mg) was spiked with a 500 μ l bacterial suspension containing the five murine *Helicobacter* strains in equal amounts. Prior to spiking, bacteria were washed with BHI to remove free DNA from dead bacteria. The concentration of the bacterial suspension was measured by optical density using the Eppendorf BioPhotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg, Germany) and adjusted to OD₆₀₀ 1, which represents 2×10^8 bacteria/ml. Tenfold dilutions of the bacterial suspension were made. Spiked fecal samples were centrifuged 5 min at 13,000g. The pellet was used for DNA extraction with AS kit, and the supernatant was discarded.

2.7 | Validation process

Validation of the method was based on recommendations^{27,28} for in-house developed tests. The following parameters of the multiplex PCR were analyzed in the validation study: lower limit of detection (LLOD), sensitivity, specificity, accuracy and precision, reproducibility and robustness (Table 3).

To define the LLOD, fecal samples were spiked with dilutions of a bacterial suspension containing the five murine *Helicobacter* strains in equal amounts with a known concentration. Each concentration was replicated three times and tested in three independent runs.

For testing of sensitivity, ten "positive" (= more than 1 log₁₀ over LLOD) and ten "low positive" (= up to 1 log₁₀ over LLOD) spiked fecal samples were used; this was repeated three times.

Specificity was evaluated with 20 "negative" spiked fecal samples. For this purpose, ten *Helicobacter* strains (*H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, *H. typhlonius*, *H. mastomyrinus*, *H. felis*, *H. pylori* J99, *H. pylori* SS1, and *H. pylori* PMSS1), six additional gram-negative (*C. jejuni*, *C. coli*, *A. butzleri*, *W. succinogenes*, *C. rodentium*, and *E. coli*), and five gram-positive (*S. aureus*, *L. reuteri*, *E. faecalis*, *C. difficile*, and *S. salivarius*) bacteria species were tested. Each species was spiked with a concentration of 2×10^5 bacteria/ml into a 50 mg fecal sample.

To test the accuracy, the established method was compared to a reference method. Seven of each "positive," "low positives" spiked fecal samples and "negative" fecal samples were tested with the multiplex PCR and compared to one "positive," one "low positive" spiked fecal sample, and one "negative" fecal sample from the corresponding *Helicobacter* single PCR; each sample was tested in three separate runs.

Precision was tested on the one hand as intra-assay precision, in which each spiked fecal sample was tested three times within a run and on the other hand as inter-assay precision, in which each spiked fecal sample was tested three times within a run on three different days. In both cases, one positive and one low positive spiked fecal samples were included.

To test reproducibility, the method was performed by three operators, in three different cyclers and in two separate laboratories, in each case with one "positive" and one "low positive" spiked fecal sample being tested in three runs.

To analyze the robustness, the stability of murine *Helicobacter* in fecal samples was tested by using three "positive" spiked fecal sample stored for zero, three, seven, and ten days at room temperature, either with or without 100 μ l stabilizer (DNA/RNA Shield, Zymo Research). DNA was extracted with AS, and multiplex PCR was performed. As a control, unspiked fecal samples were stored and tested in the same manner.²⁹

2.8 | Screening feces samples from animal facilities

Eight animal facilities in Bavaria, Germany, were tested, to gain an overview of the prevalence of *Helicobacter* species in Germany. Samples received from facilities varied between four and 39 fecal pellets; in total, 162 samples were screened. They were collected from soiled bedding sentinel mice within defined hygienic barriers varying between breeding and experimental units from animal facilities that either have a positive or negative *Helicobacter* spp. status. The DNA was isolated on the day of collection with AS stool kit, and the established multiplex PCR was performed.

2.9 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, LA Jolla, CA, USA). Nonparametric data were analyzed using the one-way ANOVA Bonferroni test. Statistical significance of differences was established when $*p < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | DNA extraction method

In order to obtain the highest quality of DNA and achieve the best results in the detection of murine *Helicobacter* species, we compared five commercially available DNA extraction kits (Table 1).

For the extraction of bacterial DNA, *H. hepaticus* was used with a starting amount of 2×10^6 bacteria/ml. Substantial differences in bacterial DNA yield were seen. SB (mean of five replicates: 0.8 μg) and ZQ (0.9 μg) showed the lowest nucleic acid yield, followed by QB (1.6 μg). In contrast BB (4.6 μg) and AB (5.2 μg), a higher DNA yield was obtained. The differences between BB or AB to the other kits were both statistically significant ($***p = 0.0001$). To also compare DNA quality, the absorbance ratios were evaluated. While pure DNA is defined as having a A_{260}/A_{280} ratio between 1.8 and 2.0, a A_{260}/A_{230} ratio higher than 1.5 demonstrates the purity of the nucleic acids.³⁰ The only two kits which presented a A_{260}/A_{280} ratio in the described range were BB (2.0) and ZQ (2.0). The other kits either had a too low ratio (QB: 1.6) or were above the upper limit: AB (2.1) and SB (2.3). None of the kits reached the demanded A_{260}/A_{230} ratio of 1.5, but again, BB (1.1) and ZQ (1.1) achieved the best result. We chose BB for the extraction of bacterial DNA, as the highest DNA yield and a constant acceptable DNA quality was achieved with this kit.

We tested four kits for the extraction of DNA from mice fecal samples (Table 1). The DNA was extracted from 50 mg of fecal spiked with 2×10^6 bacteria/ml of *H. hepaticus*. AS reached the highest DNA yield with 1.2 μg . SS (0.2 μg) and ZM (0.3 μg) had a low yield. Only QS (0.03 μg) showed an even lower DNA yield ($***p = \text{AS}/\text{QS}$: 0.0001; AS/SS : 0.0001; AS/ZM : 0.0001). When looking at A_{260}/A_{280} ratio, QS showed the lowest value (1.3). ZM was slightly out of the required range (1.7). SS (1.8) and AS (2.0) obtained results within the required range. Concerning A_{260}/A_{230} ratio, only AS came close to the expected values (1.2), showed significant differences to SS and reached constant results. Therefore, we chose AS for the extraction of DNA from fecal samples.

3.2 | Single and multiplex PCR with bacterial DNA and spiked fecal sample

To be able to test for five different *Helicobacter* species, a multiplex PCR was designed for *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, and *H. typhlonius*. In order to establish a multiplex PCR, single

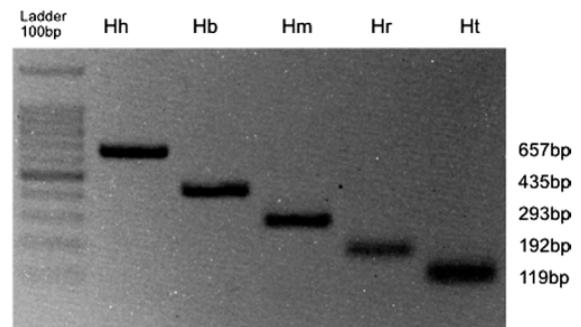


FIGURE 1 Multiplex PCR performed with bacterial DNA of five murine *Helicobacter* strains (5 ng/ μl) for which equimolar primer concentrations were used. Each primer pair is specific for the respective *Helicobacter* species (Hh = *H. hepaticus*, Hb = *H. bilis*, Hm = *H. muridarum*, Hr = *H. rodentium*, and Ht = *H. typhlonius*)

PCRs had to be designed for all five murine *Helicobacters*. According to Feng et al, five primers were adapted for the described genes, so that *H. hepaticus*-, *H. muridarum*-, and *H. typhlonius*-specific PCRs resulted in the following amplicon lengths: Hh = 657 bp; Hm = 293 bp; Ht = 119 bp. Single PCRs for *H. bilis* and *H. rodentium* resulted in the previously described amplicon lengths: Hb = 435 bp; Hr = 192 bp.²⁶ PCRs were performed with bacterial DNA of the five strains in equal concentrations (5 ng/ μl). Likewise, fecal DNA spiked with the corresponding bacteria (15 ng/ μl) were tested in single PCRs. Each primer pair was specific for the respective *Helicobacter* species. The sensitivity of each PCR was tested by 10-fold dilutions. Up to 0.5 ng/ μl of each *Helicobacter* species was detectable in bacterial or spiked fecal DNA. The five primer pairs were combined to conduct a multiplex PCR with bacterial DNA for which equimolar primer concentration were used (Figure 1).

Since it was not possible to receive a fecal sample that was positive for all five *Helicobacter* strains, spiked fecal samples were used as positive controls. Primer concentrations (Table 2) were adopted in multiplex assays to adjust for different length of amplicons in order to achieve clear signals for all products. No differences in sensitivity or specificity were seen compared to single PCRs.

3.3 | In house validation

The method was validated to confirm that the established multiplex PCR fulfils the requirements for its specific use and consistently achieves the intended results. Thus, various parameters for a qualitative in-house PCR assay were surveyed (LLOD, sensitivity, specificity, accuracy, and precision; Table 3). All parameters were tested with fecal samples spiked with the five *Helicobacter* strains. To define the LLOD, 10-fold dilutions were made in the expected range of the LLOD (10^3 , 10^2 , 10^1 bacteria). A constant detection of all *Helicobacter* species was visible down to 10^2 bacteria. Sensitivity was tested with "positive" and "low positive" spiked fecal samples. The established multiplex PCR is 100% sensitive. When testing

for specificity, "negative" samples were tested. A specificity of 100% was reached. Also, accuracy and precision (either inter- or intra-precision) for the targeted *Helicobacter* strains were 100% (Figure 2). Figure 2 shows one representative run of inter-precision, with three "positive" and three "low positive" samples, in which all *Helicobacter* strains were detected with defined bands at expected heights.

In addition to the recommended parameters, we also tested for reproducibility and robustness. All operators, cyclers, and laboratories were able to obtain the same results, so that the method was proven to be 100% reproductive. To be able to give a recommendation on how to test for *Helicobacter* species, we validated the robustness of the method. The stability of murine *Helicobacter* in fecal samples was tested: Samples stored at room temperature only showed positive results for all five *Helicobacter* species on the day of spiking the samples with EHS. At the other time points (day three, seven, and ten) *H. bilis*, but also *H. muridarum* were not detected in the samples. In comparison, stabilized samples showed positive results at each time point.

3.4 | Animal screening

Samples from animal facilities were included in the study to evaluate the feasibility of the method under field conditions. In six out of eight research facilities, *Helicobacter* species were detected (Figure 3). The prevalence of *Helicobacter* spp. was 75%. In total, 162 samples were screened, of which 49 showed a positive result. Infection with only one *Helicobacter* species was detected in 65% of the samples, double or triple infections in 35%. In our study, *H. rodentium* was the most

dominant *Helicobacter* species with a prevalence of 57% in positive samples. This was followed by *H. hepaticus* with a prevalence of 46%. *H. typhlonius* was detectable in 17% of the positive samples; *H. bilis* in 12%. *H. muridarum* was found in none of the samples.

4 | DISCUSSION

The need for reliable health monitoring has become more and more important over the last decades, requiring efficient diagnostic methods. The microbiological quality of research animals must be secured in order to enable high-quality research. By doing so, the number of animals used can be minimized. As infections with *Helicobacter* spp. mostly stay inapparent and subclinical, routine health monitoring is crucial for a reliable detection of *Helicobacter* infections.

For these reasons, a multiplex PCR was designed, established, and validated in this study. The benefits of multiplex PCR include reductions in cost, time, and contamination risk.³¹ This is particularly important when a large number of samples are tested and samples are of limited quantity. When testing for *Helicobacter* spp., the information required by the animal facility is whether there is an infection present or not. As the load of infection is not a relevant information in this context, we deliberately choose to work with a qualitative and not a quantitative test. One difficulty in designing a multiplex PCR lies in optimizing the primers, since multiple primers can cause dimer formation. Primers should have similar melting temperatures, and PCR products need to be of different sizes to distinguish them by gel electrophoresis.³¹

Previously described primer pairs were optimized to fulfil these requirements. For example, primer pairs for *H. muridarum* were newly designed, both forward and reverse, so that the melting temperature could be lowered from 67°C to 59°C in order to match the other primer pairs. The length of the primer itself reduced from 39 to 22 bp in both cases, and the amplicon length shortened from 807 to 293 bp, so it could be easily distinguished from *H. hepaticus*.

Not only the multiplex PCR itself needs to lead to reliable results, prior sample handling is also decisive. Due to ethical reasons, we choose to work with spiked feces samples. One of the main goals of this work was to make it easier for animal facilities to work in the sense of the 3R and reduce the numbers of animals used. The numbers of animals that would have to be used for the establishment of the Multiplex PCR by experimentally infected animals would be extremely high, taking into consideration that all five *Helicobacter* species need to be tested and at least repeated three times for the validation process.

Dry rodent diet consists mainly of cellulose and hemicellulose, which are known to inhibit PCR reaction.²⁵ Mice feces comprise bile salt, proteins, and polysaccharides, which could also play an inhibitory role.²⁵ Different extraction kits for fecal samples were compared and evaluated to find the one with an acceptable DNA yield, a A_{260}/A_{280} ratio between 1.8 and 2.0, a A_{260}/A_{230} ratio higher than 1.5. AS kit was the only kit which had a suitable outcome for all three parameters.

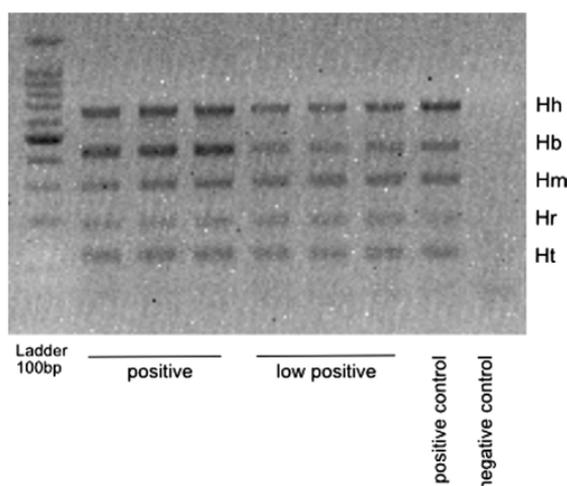


FIGURE 2 Representative run of inter-precision in the validation process with three "positive" (= more than $1 \log_{10}$ over LLOD) and three "low positive" (= up to $1 \log_{10}$ over LLOD) samples, in which all *Helicobacter* strains (Hh = *H. hepaticus*, Hb = *H. bilis*, Hm = *H. muridarum*, Hr = *H. rodentium*, and Ht = *H. typhlonius*) were detected with defined bands at expected heights

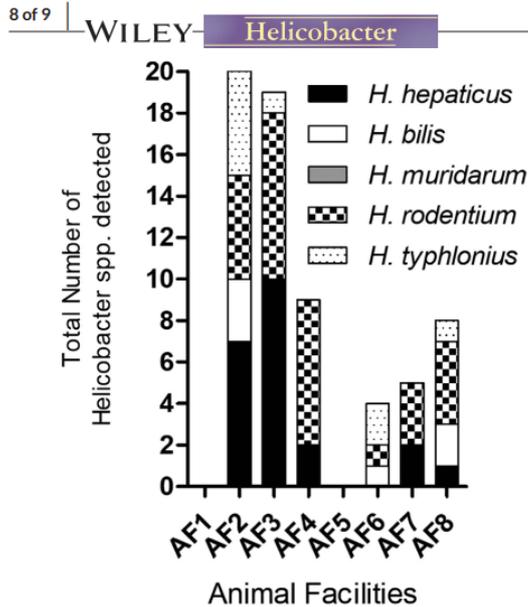


FIGURE 3 Prevalence of *Helicobacter* spp. in naturally infected mice from animal facilities in Germany. In 6 from 8 animal facilities, *Helicobacter* spp. were found in mono- and coinfections with a prevalence from 75%

The validation of the multiplex PCR assured that we established a steady working method. Sensitivity, specificity, accuracy, precision, and reproducibility were 100%. The validation of the additional parameter robustness enabled us to recommend the process of sample taking and storage before further processing. Fresh fecal samples should be stored with a stabilizer to detect constant results several days after sampling. This makes routine sampling easier, since samples can be stored, according to the stabilizers manufacturer's manual, for up to 30 days at room temperature. Working with dried feces should be avoided as it cannot be guaranteed that each *Helicobacter* can be detected properly.

To our knowledge, there is no prevalence study for the occurrence of EHS in laboratory mice in Germany. In order to gain an overview of the distribution of *Helicobacter* species, we tested eight animal facilities. As expected, we found *Helicobacter* spp. in mono- and coinfections in almost every facility (6/8). Interestingly, *H. hepaticus* was not the dominant species, as other prevalence studies stated,^{3,8} but *H. rodentium*. This could be due to changes in the spread of EHS over the last years, or because the prevalence data available do not reflect the distribution in Germany. The fact that *H. rodentium* is not listed in the FELASA recommendations to date,²³ makes a prevalence study, including more animal facilities all over Germany, indispensable.

This study describes the validation and improvement of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, and *H. typhlonius*. The established method is a reliable tool to screen a great number of samples and consequently whole mice populations in compliance with the aims of the 3Rs.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the German Center for Infection Research, partner site Munich, for supporting this research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet (London, England)*. 1984;1(8390):1311-1315.
- LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: Genus *Helicobacter*. 2019; <http://www.bacterio.net/helicobacter.html> Accessed September 2, 2019
- Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim*. 2009;43(2):165-173.
- Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol*. 1994;32(5):1238-1245.
- Fox JG, Yan LL, Dewhirst FE, et al. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol*. 1995;33(2):445-454.
- Taylor NS, Xu S, Nambiar P, Dewhirst FE, Fox JG. Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America. *J Clin Microbiol*. 2007;45(7):2166-2172.
- Bohr UR, Selgrad M, Ochmann C, et al. Prevalence and spread of enterohepatic *Helicobacter* species in mice reared in a specific-pathogen-free animal facility. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):738-742.
- Lofgren JL, Esmail M, Mobley M, et al. Prevalence of murine *Helicobacter* spp. Infection is reduced by restocking research colonies with *Helicobacter*-free mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(4):436-442.
- Goto K, Ohashi H, Takakura A, Itoh T. Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. *Curr Microbiol*. 2000;41(3):161-166.
- Johansson SK, Feinstein RE, Johansson K-E, Lindberg AV. Occurrence of *Helicobacter* species other than *H. hepaticus* in laboratory mice and rats in Sweden. *Comp Med*. 2006;56(2):110-113.
- Fox JG, Gorelick PL, Kullberg MC, Ge Z, Dewhirst FE, Ward JM. A novel urease-negative *Helicobacter* species associated with colitis and typhlitis in IL-10-deficient mice. *Infect Immun*. 1999;67(4):1757-1762.
- Franklin CL, Gorelick PL, Riley LK, et al. *Helicobacter typhlonius* sp. nov., a Novel Murine Urease-Negative *Helicobacter* Species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3920-3926.
- Lee A, Phillips MW, O'Rourke JL, et al. *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int J Syst Bacteriol*. 1992;42(1):27-36.
- Shen Z, Fox JG, Dewhirst FE, et al. *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47(3):627-634.
- Whary MT, Fox JG. Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents. *Lab Animal*. 2006;35(7):25.
- Miller CL, Muthupalani S, Shen Z, Fox JG. Isolation of *Helicobacter* spp. from mice with rectal prolapses. *Comp Med*. 2014;64(3):171-178.
- Sharp JM, Vanderford DA, Chichlowski M, Myles MH, Hale LP. *Helicobacter* infection decreases reproductive performance of IL10-deficient mice. *Comp Med*. 2008;58(5):447-453.

18. Murata H, Tsuji S, Tsujii M, et al. Helicobacter bilis infection in biliary tract cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(Suppl 1):90-94.
19. Pandey M, Mishra RR, Dixit R, Jaiswal R, Shukla M, Nath G. Helicobacter bilis in human gallbladder cancer: results of a case-control study and a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11(2):343-347.
20. Segura-Lopez FK, Aviles-Jimenez F, Guitron-Cantu A, et al. Infection with Helicobacter bilis but not Helicobacter hepaticus was associated with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Helicobacter.* 2015;20(3):223-230.
21. Lemke LB, Ge Z, Whary MT, et al. Concurrent Helicobacter bilis infection in C57BL/6 mice attenuates proinflammatory H. pylori-induced gastric pathology. *Infect Immun.* 2009;77(5):2147-2158.
22. Ge Z, Feng Y, Muthupalani S, et al. Coinfection with Enterohepatic Helicobacter species can ameliorate or promote Helicobacter pylori-induced gastric pathology in C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 2011;79(10):3861-3871.
23. Mähler M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim.* 2014;48(3):178-192.
24. Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. DSMZ: Culture Technology. 2019; <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/culture-technology.html> Accessed June 12, 2019.
25. Ferrand J, Patron K, Legrand-Frossi C, et al. Comparison of seven methods for extraction of bacterial DNA from fecal and cecal samples of mice. *J Microbiol Methods.* 2014;105:180-185.
26. Feng S, Ku K, Hodzic E, Lorenzana E, Freet K, Barthold SW. Differential detection of five mouse-infecting helicobacter species by multiplex PCR. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(4):531-536.
27. Newman H, Maritz J. Basic overview of method validation in the clinical virology laboratory. *Rev Med Virol.* 2017;27(5):e1940.
28. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol.* 2007;40(2):93-98.
29. Beckwith CS, Franklin CL, Hook R, Besch-Williford CL, Riley LK. Fecal PCR assay for diagnosis of Helicobacter infection in laboratory rodents. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1620-1623.
30. ThermoScientific. 260/280 and 260/230 Ratios. 2019; <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf> Accessed August 23, 2019
31. Zangenberg G, Saiki RK, Reynolds R. 6 - Multiplex PCR: Optimization guidelines. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, eds. *PCR Applications.* Academic Press; 1999:73-94.

How to cite this article: Neubert V, Sadek A, Burell T, et al. Validation and improvement of a multiplex PCR method to detect murine *Helicobacter* species in feces samples of mice. *Helicobacter.* 2022;00:e12888. doi:[10.1111/hel.12888](https://doi.org/10.1111/hel.12888)

V. ERWEITERTE DISKUSSION

Über die Jahre hat sich gezeigt, dass *Helicobacter*-Infektionen nicht nur für die Humanmedizin, sondern auch in der Veterinärmedizin von Bedeutung sind. Dabei wurden Mäuse als Tiermodelle für *Helicobacter*-Infektionen etabliert, um die Pathomechanismen der Erkrankungen mit *Helicobacter* spp. besser zu verstehen und somit an der Entwicklung für Diagnose- und Behandlungsmethoden mitwirken zu können. Das Mausmodell einer experimentellen Infektion mit *H. hepaticus* führt bei den Tieren zu chronischen Lebererkrankungen bis hin zu Leberkarzinomen. In einem dieser Modelle konnte ein potenzieller Therapieansatz gezeigt werden: Wenn der oxidative Stress in der Leber reduziert wird, kommt es zu weniger stark ausgeprägten Entzündungsreaktionen und somit zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Lebertumoren (KRISHNAN et al., 2008.).

Diese Grundlagenforschung ist ausschlaggebend, um die Tumorentstehung in verschiedenen Organen, wie zum Beispiel im Darm aber auch der Leber, nachvollziehen zu können. Die zugrundeliegenden Mechanismen, warum es zur Ausprägung von Lebertumoren kommt, sind komplex. Die chronischen Entzündungsprozesse, wobei durch das *cdt* von *H. hepaticus* der prä-inflammatorische NF- κ B Signalweg aktiviert wird, spielen dabei eine Rolle. Somit kommt es zur verstärkten Immunantwort und Zellproliferation mit eventueller DNA-Schädigung, was letzten Endes zur Tumorentwicklung beitragen kann (FALSAFI und MAHBOUBI, 2013).

Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen *H. hepaticus* Infektionen und der Entstehung von Darmkrebs untersuchte, machte eine sehr interessante Entdeckung: mehr als 2/3 der weiblich immundefizitären *Min*-Mäuse entwickelten neben den Darmkrebs auch noch Mammatumore (RAO et al., 2006). Rao et al. konnten beweisen, dass bei immunkompetenten Tieren regulatorische T-Zellen die Immunantwort so modulieren, dass eine gesunde bakterielle Eubiose im Darm erlangt werden kann (RAO et al., 2007). Im Gegensatz führten Darminfektionen bei *Min*-Mäuse dazu, dass es zur einer überschießenden Immunantwort kam. Das vermehrt gebildete inflammatorische TNF- α begünstigt generalisiert die Entwicklung von Tumoren im Körper (RAO et al., 2007). Dieser Umstand

beweist wie wichtig ein gesundes Darmmikrobiom einerseits für den Menschen, aber auch für Mäuse ist.

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen spielt das Mikrobiom und *Helicobacter*-Infektionen eine Rolle. Infektionen mit *H. felis* oder *H. pylori* können durch die hervorgerufene Gastritis letztendlich Entzündungen des Nervengewebes auslösen und somit Risikofaktoren für die Entstehung der Alzheimerschen Krankheit sein (ALBARET et al., 2020). Der gleiche Zusammenhang konnte für *H. suis* Infektionen und der Parkinson Erkrankung hergestellt werden (AUGUSTIN et al., 2019). Mittlerweile konnte sogar bewiesen werden, dass bei Mäusen, welche als Modell für die Parkinson Erkrankung dienen, motorische Einschränkungen leichter entstehen können, wenn eine bakterielle Dysbiose auf Grund einer Besiedelung mit *H. hepaticus* vorliegt (AHN et al., 2023).

Infektionen mit *H. hepaticus* können somit das Darmmikrobiom verändern. Dabei nimmt der Diversitäts-Index ab und somit die biologische Vielfalt der Darmflora. Zusätzlich nimmt die gleichmäßige Verteilung der Bakterien ab und es kommt zu einer bakteriellen Ungleichheit. Bereits 14 Tagen nach der experimentellen Infektion nimmt *H. hepaticus* eine vorherrschende Rolle im Mikrobiom an (KUEHL et al., 2005). Somit sind weitere Untersuchungen des Mikrobioms unerlässlich, um mehr über die durch *Helicobacter* spp. ausgelösten Krankheiten an sich zu verstehen und eventuelle Behandlungsmethoden zu entwickeln.

Um verlässliche Studienergebnisse im Mausmodell zu erzielen und um die Forschung im Bereich der *Helicobacter*-assoziierten Erkrankungen weiter voranzutreiben, ist daher die mikrobiologische Qualität und Standardisierung der Versuchsmäuse unerlässlich. Die meisten Infektionen mit murinen *Helicobacter*-Spezies bleiben subklinisch. Durch die unentdeckten Infektionen kann es zu Kreuzreaktionen in serologische Untersuchungen kommen, Ergebnisse wären somit nicht mehr aussagekräftig und Studien müssten wiederholt werden. Dies führt wiederum zu einem erhöhten Verbrauch an Versuchstieren und lässt sich nicht mit den 3R vereinbaren. Die hygienische Überwachung der Versuchstiereinrichtungen mit einer sicheren und zuverlässigen Testmethode bleibt somit unverzichtbar.

Aufgabe dieser Dissertation war die Etablierung, Verbesserung und Validierung

einer Multiplex-PCR, um das Health Monitoring in den Versuchstiereinrichtungen zu vereinfachen und verlässlich zu gestalten.

Die Vorteile einer Multiplex-PCR liegen klar auf der Hand. Durch die hohe Spezifität der Methode, werden die untersuchten *Helicobacter* spp. gleichzeitig, schnell und gezielt nachgewiesen. Die hohe Sensitivität ermöglicht einen Nachweis der murinen *Helicobacter*-Spezies schon früh im Infektionsgeschehen, auch wenn nur eine geringe Anzahl an Bakterien vorhanden sind. Somit können Infektionen zeitnah erkannt werden und nur so besteht die Möglichkeit zur Intervention. Weitere Gründe für die Nutzung einer Multiplex-PCR gegen über anderen Nachweisverfahren ist unter anderem die Zeitersparnis. Klassische Nachweismethoden können mehrere Tage bis zur definitiven Diagnose in Anspruch nehmen. Die Multiplex-PCR liefert Ergebnisse in wenigen Stunden in einem einzigen Durchlauf. Zusätzlich handelt es sich um eine kostengünstige Methode und das Kontaminationsrisiko der einzelnen Proben sinkt. Es werden durch den zeitgleichen Nachweis Material, Gerätschaften und Personalkosten eingespart (ZANGENBERG et al., 1999).

Trotz aller Vorteile die eine Multiplex-PCR bietet, muss dennoch erwähnt werden, dass bei der Etablierung höchste Sorgfalt eingehalten werden muss. Zu schnell kann es zu unerwünschten Primer Formationen kommen, wie Primer Dimer oder Haarschleifenformationen. Am leichtesten werden diese Fehler vermieden, wenn beim Design der Primer auf bestimmte Kenngrößen geachtet wird. Einerseits sollten die verwendeten Primer über annähernd gleiche Schmelztemperaturen verfügen. Andererseits sollten die PCR-Produkte unterschiedliche Längen aufweisen, damit sie durch die Gelelektrophorese genau voneinander unterschieden werden können (ZANGENBERG et al., 1999).

Die Primer-Paare der von Feng *et al.* entwickelten Multiplex-PCR wurden hinsichtlich dieser Vorgaben verändert.

Tbl 4: Primer nach Feng *et al.* mit Länge, Schmelztemperatur und GC %

	PRIMER	LÄNGE	TM	GC %
<i>H.hepaticus</i>	ATGGGTAAGAAAATAGCAAAAAGATTGCAA	30 bp	63,9 °C	30 %
	CTATTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC	30 bp	65,1 °C	33 %
<i>H.bilis</i>	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT	24 bp	62 °C	42 %
	ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAACTCAG	33 bp	66,4 °C	30 %
<i>H.muridarum</i>	ATGACAAAAAATATTCTTTACAAAACTATTTCATTGGT	39 bp	67,3 °C	23 %
	TTATTTTAGATTCCATTTAACTGCTAAATCATCAATAGT	39 bp	67,3 °C	23 %
<i>H.rodentium</i>	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAACT	28 bp	61,5 °C	29 %
	TAGCCAGTTTGGCATTCC	18 bp	53,8 °C	50 %
<i>H.typhlonius</i>	AGGGACTCTTAAATATGCTCCTAGAGT	27 bp	65,3 °C	41 %
	ATTCATCGTGTGTTGAATGCGTCAA	24 bp	60,3 °C	38 %

Einige der rot gekennzeichneten Primer der Tabelle 4 überschreiten die bevorzugte Primer-Länge von 18 – 24 bp. Zusätzlich variiert die Schmelztemperatur zwischen 53,8 °C und 67,3 °C, wobei hier eine Annäherung der Temperaturen wünschenswert wäre. Auch der GC % innerhalb der Primer ist bei einigen Primern zu niedrig, erstrebenswert sind hier Werte von 45 – 60 % (DIEFFENBACH *et al.*, 1993; SINGH und KUMAR, 2001).

Durch Veränderung der Primer-Sequenzen (siehe Tabelle 5) konnte zum Beispiel eine Kürzung der Primer-Länge des forward und reverse Primers von *H. muridarum* vorgenommen werden. Dadurch passen sich zusätzlich die Schmelztemperaturen und auch der GC % an.

Tbl 5: Primer nach Neubert *et al.* mit Länge, Schmelztemperatur und GC %

	PRIMER	LÄNGE	TM	GC %
<i>H.hepaticus</i>	GAGCCTCAAAAGGTTTATAGC	21 bp	57,5 °C	43 %
	CTATTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC	30 bp	65,1 °C	33 %
<i>H.bilis</i>	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT	24 bp	62 °C	42 %
	ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAACTTCAG	33 bp	66,4 °C	30 %
<i>H.muridarum</i>	CACAAACTATTTCATTGGTGCG	22 bp	58,4 °C	41 %
	GTAGAGGACCTCTAGTTTTTGC	22 bp	60,1 °C	45 %
<i>H.rodentium</i>	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT	28 bp	61,5 °C	29 %
	TAGCCAGTTTGGCATTCC	18 bp	53,8 °C	50 %
<i>H.typhlonius</i>	GGGACTCTTAAATATGCTCC	20 bp	56,4 °C	45 %
	CATCGTGTTTGAATGCGTC	19 bp	55,0 °C	47 %

Darüber hinaus ändert sich die Produktlänge des *H. muridarum* Primers von 807 bp zu 293 bp und lässt sich damit leichter von den anderen PCR-Produkten unterscheiden (siehe Abbildung 7).

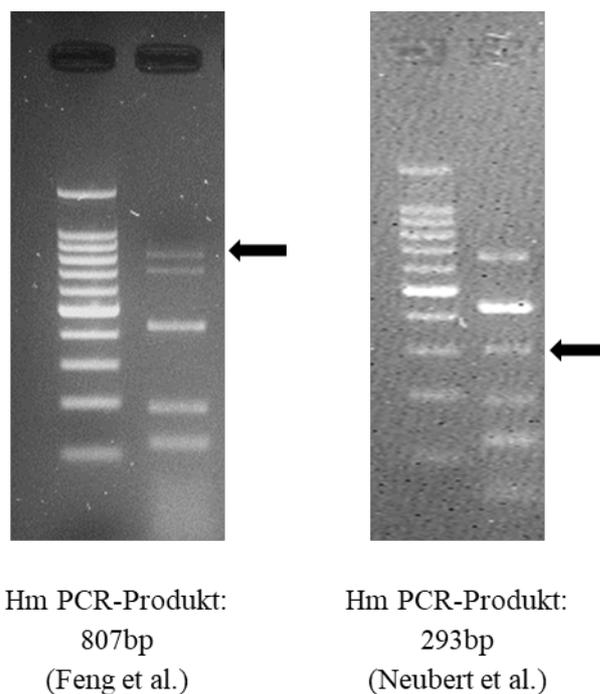


Abb. 7: Vergleich der unterschiedlichen PCR-Produktlängen durch Veränderung des Primerpaares für *H. muridarum*

Aber nicht nur die Multiplex-PCR allein führt zu verlässlichen Ergebnissen, sondern auch die Probenverarbeitung vor Ablauf der eigentlichen Methode muss mit Bedacht gewählt und durchgeführt werden. Es muss DNA höchster Qualität aus den Proben isoliert werden. Dies stellt sich als besonders komplex dar, wenn DNA aus Mäusekotproben gewonnen wird. Dabei sind die möglichen Inhibitoren in der Probe ausschlaggebend. Einerseits spielt die Fütterung der Versuchstiere eine Rolle: durch die getrocknete Nagerdiät gerät viel Zellulose und Hemizellulose in die Ausscheidungsprodukte der Versuchstiere, welche wiederum als Inhibitoren für PCR Reaktionen gelten (FERRAND et al., 2014). Zusätzlich enthält Mäusekot, neben den Polysacchariden, auch Proteine und Gallensalze. Diese gelten als Hemmstoffe (FERRAND et al., 2014), welche sich negativ auf die PCR auswirken können.

Um die bestmögliche DNA-Extraktion zu gewährleisten, wurden in dieser Arbeit kommerziell erhältliche Extraktionskits verglichen. Dabei wurden folgende Parameter in die Beurteilung mit einbezogen: DNA-Konzentration, A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} Absorptionsraten, aber auch die benötigte Dauer der Extraktion, der Preisunterschied und die verschiedenen chemischen Aufschlussverfahren. Für jede Extraktion wurde eine *Helicobacter* spp. negative Kotprobe mit 1×10^6 *H. hepaticus* gespiked. Am besten hat bei diesem Vergleich das kommerzielle Analytik Jena Kit abgeschnitten. Es weist die beste DNA-Qualität und DNA-Quantität auf (siehe Abbildung 8).

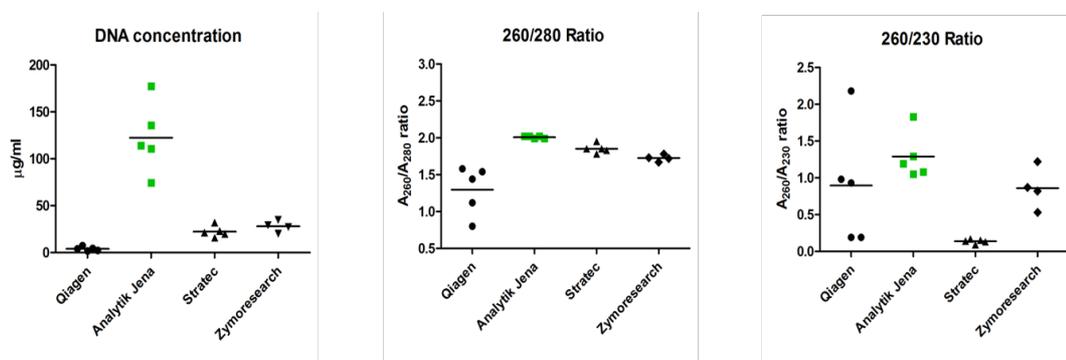


Abb. 8: DNA-Quantität und DNA-Qualität (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} Absorptionsraten) der vier kommerziellen DNA-Extraktionskits aus Kotproben

Zusätzlich überzeugt es durch den niedrigsten Preis. Als negativen Aspekt lässt sich die längste Bearbeitungszeit von ca. drei Stunden aufführen, aber in Anbetracht der überwiegenden positiven Eigenschaften und auch der kurzen Bearbeitungszeit der Multiplex-PCR, kann das in Kauf genommen werden (siehe Tabelle 6).

Tbl. 6: Vergleich der Eigenschaften (Lyse-Verfahren, Kosten, Zeit) der vier kommerziellen DNA-Extraktionskits aus Kotproben

EXTRAKTIONSKIT	STARTMENGE (MG)	LYSE-PROZESS	KOSTEN (€/PROBE)	ZEITAUFWAND
Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit	180-220 mg	T, CLB, RPI	5,55 €	2 h
Analytik Jena innuPREP Stool DNA Kit	180-220 mg	T, CLB, PF	3,55 €	3 h
Stratec PSP® Spin Stool DNA Kit	≤ 200 mg	T, CLB, BB, RPI	5,05 €	2 h
ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	≤ 200 mg	CLB, BB	4,05 €	1 - 1,5 h

Damit gewährleistet ist, dass es sich bei der etablierten Methode um ein zuverlässiges Testsystem handelt, wurde die Multiplex-PCR validiert. Dabei wurde die untere Nachweisgrenze (LLOD), Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode beurteilt. Es konnte hierbei für alle Parameter eine 100 % Übereinstimmung erreicht werden. Repräsentative PCR-Durchläufe der jeweiligen Parameter sind im Anhang 1 - 4 ersichtlich.

Zusätzlich wurde die Multiplex-PCR auf Robustheit untersucht. Nur dadurch ist es möglich eine genaue Empfehlung bezüglich der Probenhandhabung und der Probenaufbewahrung zu treffen. Die Kotproben sollten direkt von den Versuchsmäusen entnommen und mit einem Stabilisator bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Nur so kann gewährleistet werden, dass alle murinen *Helicobacter*-Spezies bis zu 30 Tage, laut Herstellerangaben, nach der Probennahme noch nachgewiesen werden können. In den

Reproduzierbarkeitsversuchen wurde festgestellt, dass Proben, welche bei Raumtemperatur ohne Stabilisator gelagert wurden, schon ab dem dritten Tag einen weitaus geringere Nachweismöglichkeit für *H. bilis* und *H. muridarum* boten (siehe Abbildung 9). Auch Jacobsen *et al.* machten die gleichen Beobachtungen: Die Nachweisgrenze von gelagerten Proben war um ein 10 - faches niedriger, als die Nachweisgrenze von Proben am Tag 0 (JACOBSEN, 2004). Dies lässt sich darauf zurückzuführen, dass mit der zunehmenden Degradierung der DNA durch DNAsen, der Gehalt an *Helicobacter*-spezifischer DNA abnimmt. Außerdem scheinen die verschiedenen *Helicobacter* spp. eine unterschiedliche Stabilität und somit Sensibilität für DNAsen zu haben.

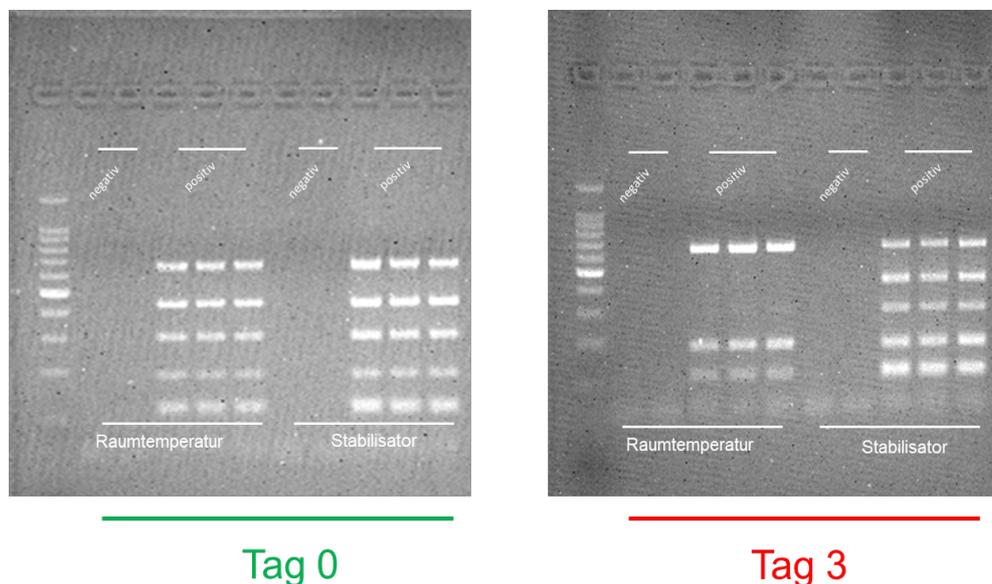


Abb. 9: Robustheitsbewertung im Validierungsprozess: ab Tag 3 kein Nachweis von *H. bilis* und *H. muridarum* bei Lagerung mit Raumtemperatur mehr möglich

Multiplex-PCR mit fünf Primer-Sets, durchgeführt mit "positiven" (= mehr als 1 \log_{10} über dem LLOD) künstlich gespickten Proben und "negativen" Proben.

Mit dieser verbesserten und validierten Nachweismethode für murine *Helicobacter*-Spezies wurden verschiedene Maushaltungen im Münchner Umland untersucht. Insgesamt wurden acht versuchstierkundliche Einrichtungen beprobt, wobei die Maushaltungen von zertifizierten Laboren positiv oder negativ auf *Helicobacter* spp. getestet wurden. Diese Beobachtung stimmt mit unserem

Testergebnissen über ein: Die gleichen 6/8 Haltungen wurden positiv getestet (Abbildung 10).

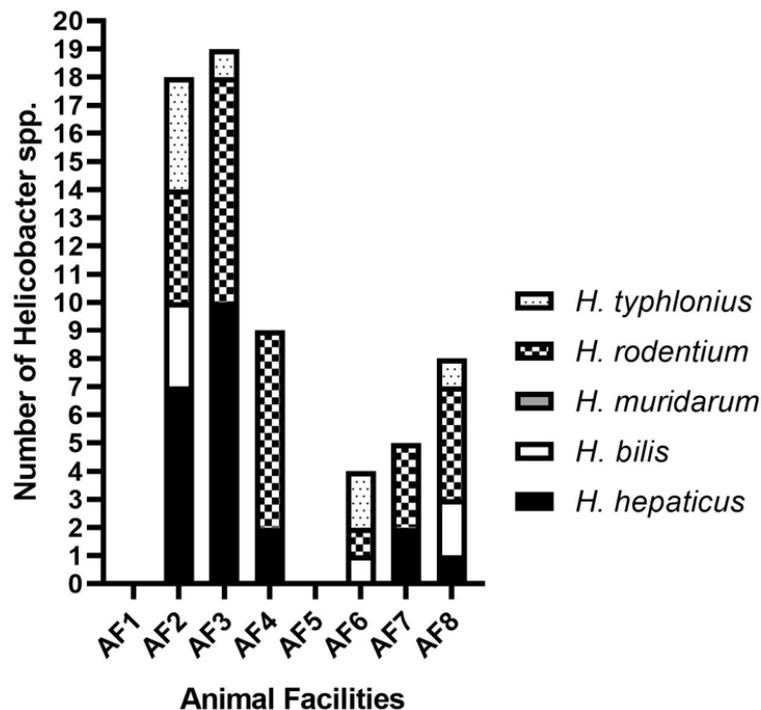


Abb. 10: *Helicobacter* spp. untersuchte Versuchstiereinrichtungen in München mit positiven oder negativen *Helicobacter*-Status: 6/8 positive Haltungen mit einer Prävalenz von 75 %

Insgesamt wurden 162 Mäusekotproben untersucht, von denen 49 ein positives *Helicobacter*-Ergebnis zeigten, entweder in Mono- oder auch in Co-Infektionen. In den positiven Maushaltungen wurden ca 50 % der Proben positiv getestet. Jeder positive Befund wurde sequenziert. Dabei ergab sich eine Prävalenz von: *H. rodentium* mit 57 %, *H. hepaticus* mit 46 %, *H. typhlonius* mit 17 % und *H. bilis* mit 12 %. *H. muridarum* wurde kein einziges Mal nachgewiesen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu anderen *Helicobacter*-Prävalenzstudien. In den Studien von Pritchett-Corning *et al.* und Lofgren *et al.* zeigt sich *H. hepaticus* als dominanter Keim (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2009; LOFGREN *et al.*, 2012). Der Unterschied könnte damit begründet werden, dass sich das Verteilungsmuster der jeweiligen Keime in den letzten Jahren verändert hat. Denkbar wäre auch, dass die Verteilung der murinen *Helicobacter* in den

genannten Studien nicht der in Deutschland entspricht. Die zusätzlich durchgeführte kleinangelegte Prävalenz-Studie sollte die etablierte Multiplex-PCR überprüfen. Durch das interessante Ergebnis mit *H. rodentium* als dominanten Keim, welcher nicht in den FELASA Richtlinien gelistet ist, wäre eine flächendeckende Prävalenzstudie in Deutschland mit einer höheren Anzahl an Proben notwendig, um die wahre Prävalenz der murinen *Helicobacter* beurteilen zu können.

Nur durch die moderne Gesundheitsüberwachung der Versuchstiereinrichtungen kann Wissenschaft auf höchsten Standard betrieben und im Sinne der 3R gehandelt werden. Doch wie zeitgemäß ist noch die Überwachung der Einrichtungen mit Sentineltieren? Durch die Modernisierung und Weiterentwicklung der Haltungsbedingungen wurden offene Käfigsysteme durch IVC-Käfige ersetzt. Dabei entsteht in jedem Käfig eine eigene abgeschlossene hygienische Einheit (COMPTON et al., 2004). Bei „Soiled Bedding“ Sentineltieren werden diese für einen bestimmten Zeitraum mit schmutziger Einstreu exponiert und dann als Stellvertreter für die gesamte Kolonie zur Probengewinnung und -Testung euthanasiert. Dabei wird eine hohe Anzahl an Tieren alleine für das Health Monitoring getötet (MILLER und BRIELMEIER, 2018). Zusätzlich ist diese Methode zeit- und kostenintensiv, und kann eine weitere Infektionsquelle beim Umsetzen der Tiere vom schmutzigen in den sauberen Käfig unter den Laminar Flow Systemen bedeuten (COMPTON et al., 2004). Des Weiteren werden nicht alle pathogenen Keime durch schmutzige Einstreu übertragen. Beispiele hierfür sind das Sendai Virus (DILLEHAY et al., 1990; ARTWOHL et al., 1994), CAR Bazillus (CUNDIFF et al., 1995) und *Myobia musculi/Myocoptes musculus* (LINDSTROM et al., 2011). Durch die fehlende Übertragung ist es möglich, dass Infektionen nicht detektiert werden.

Als tierfreie Alternative wird nun immer öfters auf Proben aus der Umwelt zurückgegriffen, um somit auf die Sentineltiere verzichten zu können. Diese neuartige Methode nutzt die Abluftpartikel (exhaust air particle) aus den IVC's. Dabei wird in den Abluftkanal der IVC ein Gaze-Stück montiert und nach einer bestimmten Zeit aus den gesammelten Partikeln DNA isoliert. Zum Nachweis der gesuchten Pathogene wird im Anschluss eine spezifische PCR durchgeführt. Mehrere Studien konnten somit verschiedene relevante Keime nachweisen. Die Forschungsgruppe um Miller und Brielmeier konnte damit das murine Norovirus

(ZORN et al., 2017), *Pastreurella pneumotropica* (MILLER et al., 2016b) und auch *H. hepaticus* in niedriger Keimzahl (MILLER et al., 2016a) aus den EAP-Filtern nachweisen. Und sogar das Sendai-Virus (COMPTON et al., 2004), als auch der Milben-Nachweis (JENSEN et al., 2013) ist mit dieser Methode möglich. Damit liegen die Vorteile der Methode klar auf der Hand. Das EAP-Filter System ist nicht davon abhängig in wie weit ein Sentinel sich mit einem möglichen Pathogen infiziert. Auch dadurch ist eine Verringerung der Tierzahl laut Miller *et al.* in seiner Einrichtung um ca. 1000 Sentineltiere pro Jahr möglich (MILLER und BRIELMEIER, 2018). Als Nachteil dieser Methode muss angebracht werden, dass es durch mangelnde Hygiene in den Rack-Systemen zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann, wenn zurückgeblieben pathogene Partikel fälschlicherweise nachgewiesen werden und somit eine aktive Infektion imitieren.

Für murine *Helicobacter*-Infektionen konnten Compton *et al.* beweisen, dass der Nachweis durch Sentineltiere aus Kotproben nur unter bestimmten Bedingungen möglich ist. Dabei war für die Infektion durch „Soiled Bedding“ ausschlaggebend, wie häufig und mit wie viel infizierten Kot die Sentineltiere in Kontakt kamen. Zusätzlich konnten sie die Beobachtung machen, dass der Nachweis von *H. muridarum* nicht über Kotproben möglich ist, sondern nur mit EAP-Filtern (COMPTON et al., 2004). Das lässt sich mit unseren Ergebnissen aus der Prävalenzstudie vereinbaren. In keinem einzigen Institut konnte *H. muridarum* aus den Kotproben nachgewiesen werden. Daher wurde in einer weiteren Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene untersucht, ob die etablierte Multiple-PCR sich auch auf EAP-Filtern anwenden lässt (Maier et al., unpublished data).

Leider ist es bis dato keiner Überwachungsmethode möglich eine 100 % Sicherheit zur Detektion von Pathogenen in Versuchstiereinrichtungen zu gewährleisten, daher sollte für jede Einrichtung die Risiko- und Nutzenfaktoren abgewogen werden und im Zuge dessen ein effektives Monitoringsystem erstellt werden. Die in dieser Arbeit etablierte Multiplex-PCR zum Nachweis von murinen *Helicobacter* soll helfen diesem Ziel näher zu kommen und somit für mehr Tierwohl im Sinne der 3R zu sorgen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Nachweis von murinen *Helicobacter*-Spezies in Kotproben von Mäusen mittels Multiplex-PCR

In den letzten Jahren wurde ein immer größeres Augenmerk auf mausspezifische *Helicobacter*-Spezies in Versuchstierhaltungen gelegt, da Infektionen mit murinen *Helicobacter* einen Einfluss auf die Gesundheit der Mäuse haben und ein mögliches zoonotisches Risiko für den Forscher darstellen können. Um die Gefahr von Kreuzreaktionen während Experimenten zu minimieren und somit im Sinne der 3R zu handeln, muss eine verlässliche Nachweismethode zur Überwachung der *Helicobacter* Infektionen in Versuchstierhaltungen vorhanden sein.

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des Nachweises der am weitest verbreiteten murinen *Helicobacter*-Spezies: *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* and *H. typhlonius*, indem eine Multiplex-PCR etabliert wurde, welche die fünf verschiedenen Spezies zeitgleich nachweisen kann. Zur Qualitätssicherung wurde die Nachweismethode, basierend auf Empfehlung für In-House entwickelte Tests, validiert. Die etablierte Methode zeigt eine hohe Sensitivität und Spezifität. Jede untersuchte *Helicobacter* spp. konnte bis zu einem Limit von 10^2 Bakterien nachgewiesen werden. Um den Richtlinien der 3R's zu entsprechen, wurden, um eine Infektion mit *Helicobacter* Spezies nachzuweisen, Kotproben der Mäuse gewonnen. Die Methode erwies sich als ein verlässliches, ökonomisches und zeitersparendes diagnostisches Mittel für die Routine-Gesundheitsüberwachung.

Acht verschiedene Münchner Versuchstierhaltungen wurden mit der etablierten Methode untersucht und eine Prävalenz von *H. rodentium* 57 %, *H. hepaticus* 46 %, *H. typhlonius* 17 %, *H. bilis* 12 %, *H. muridarum* 0 % gefunden. Weitere Studien sind notwendig um die hohe Prävalenz von *H. rodentium* in Münchner Versuchstierhaltungen zu evaluieren, da dieser EHS bis jetzt nicht in den FELASA Empfehlungen für das Hygienemonitoring erwähnt wird.

VII. SUMMARY

Detection of murine *Helicobacter* species in feces samples of mice with a multiplex-PCR method

Murine *Helicobacter* species have become very important in research facilities over the last years due to their increasing prevalence. Natural infections with enterohepatic *Helicobacter* species may interfere with experiments and have a negative effect on the health of either mice or researchers themselves. In order to minimize these adverse effects, a reliable method for health monitoring in animal facilities needs to be available.

The aim of this study was to optimize the detection of the most common murine *Helicobacter* species: *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* and *H. typhlonius*. This was done by designing a novel multiplex-PCR that detects these five strains simultaneously via faeces samples. To ensure the quality of the results the method was validated for tests developed in-house. The method turned out to be highly sensitive and specific. All five strains were detectable up to a limit of 10^2 bacteria.

The established and validated multiplex-PCR is capable of screening a great number of mice non-invasively and thus, is in line with the 3R. Furthermore, for routine health monitoring it is a reliable, economic and time-saving diagnostic tool.

Eight different animal facilities in Munich were tested to get an overview of the prevalence of *Helicobacter* spp in this area. We found that *H. hepaticus* had a prevalence of 46 % in positive samples, *H. rodentium* 57%; *H. typhlonius* 17%, *H. bilis* 12%, *H. muridarum* 0%. Further prevalence studies are needed to evaluate the importance of *H. rodentium*, as until now this agent is not listed in the FELASA recommendations for health monitoring.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Ahn EH, Liu X, Alam AM, Kang SS, Ye K. *Helicobacter hepaticus* augmentation triggers Dopaminergic degeneration and motor disorders in mice with Parkinson's disease. *Molecular Psychiatry* 2023; 28: 1337-50.

Albaret G, Sifré E, Floch P, Laye S, Aubert A, Dubus P, Azzi-Martin L, Giese A, Salles N, Mégraud F. Alzheimer's disease and *helicobacter pylori* infection: inflammation from stomach to brain? *Journal of Alzheimer's Disease* 2020; 73: 801-9.

Artwohl JE, Cera LM, Wright MF, Medina LV, Kim LJ. The efficacy of a dirty bedding sentinel system for detecting Sendai virus infection in mice: a comparison of clinical signs and seroconversion. *Lab Anim Sci* 1994; 44: 73-5.

Augustin AD, Savio A, Nevel A, Ellis RJ, Weller C, Taylor D, Tucker RM, Ibrahim MA, Bjarnason I, Dobbs SM. *Helicobacter suis* is associated with mortality in Parkinson's disease. *Frontiers in Medicine* 2019; 6: 188.

Battles JK, Williamson JC, Pike KM, Gorelick PL, Ward JM, Gonda MA. Diagnostic assay for *Helicobacter hepaticus* based on nucleotide sequence of its 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1344-7.

Beckwith CS, Franklin CL, Hook R, Besch-Williford CL, Riley LK. Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1620-3.

Bohr UR, Selgrad M, Ochmann C, Backert S, König W, Fenske A, Wex T, Malfertheiner P. Prevalence and spread of enterohepatic *Helicobacter* species in mice reared in a specific-pathogen-free animal facility. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 738-42.

Butt J, Schmitz M, Berkus B, Schmidt K, Höfler D. Validation of Multiplex PCR and Serology Detecting *Helicobacter* Species in Mice. *Microorganisms* 2023; 11: 249.

Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, Dangler CA, Powrie F, Schauer DB. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* 1997; 65: 3126-31.

Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2017; 22 Suppl 1 e12405

Cancer IAfRo (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Lyon. 177-241

Chichlowski M, Sharp JM, Vanderford DA, Myles MH, Hale LP. *Helicobacter typhlonius* and *Helicobacter rodentium* differentially affect the severity of colon inflammation and inflammation-associated neoplasia in IL10-deficient mice. *Comp Med* 2008; 58: 534-41.

Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, Clark JM. Efficacy of Three Microbiological Monitoring Methods in a Ventilated Cage Rack. *Comp Med* 2004; 54: 382-92.

Cundiff DD, Riley LK, Franklin CL, Hook Jr RR, Besch-Williford C. Failure of a soiled bedding sentinel system to detect cilia-associated respiratory bacillus infection in rats. *Laboratory animal science (USA)* 1995; 45.2: 219-21.

Dewhirst FE, Fox JG, Mendes EN, Paster BJ, Gates CE, Kirkbride CA, Eaton KA. 'Flexispira rappini' strains represent at least 10 *Helicobacter* taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50 Pt 5: 1781-7.

Dieffenbach C, Lowe T, Dveksler G. General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl* 1993; 3: S30-S7.

- Dillehay D, Lehner N, Huerkamp M. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Sendai virus infections. *Lab Anim Sci* 1990; 40: 367-70.
- Dingemanse C, Belzer C, van Hijum SA, Günthel M, Salvatori D, Dunnen JTd, Kuijper EJ, Devilee P, de Vos WM, van Ommen GB. *Akkermansia muciniphila* and *Helicobacter typhlonius* modulate intestinal tumor development in mice. *Carcinogenesis* 2015: 1388-96.
- Drazenovich NL, Franklin CL, Livingston RS, Besselsen DG. Detection of rodent *Helicobacter* spp. by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays. *Comp Med* 2002; 52: 347-53.
- Falsafi T, Mahboubi M. *Helicobacter hepaticus*, a new pathogenic species of the *Helicobacter* genus: Similarities and differences with *H. pylori*. *Iranian journal of microbiology* 2013; 5: 185.
- Feng S, Hodzic E, Kendall LV, Smith A, Freet K, Barthold SW. Cloning and expression of a *Helicobacter bilis* immunoreactive protein. *Clinical and Vaccine Immunology* 2002; 9: 627-32.
- Feng S, Ku K, Hodzic E, Lorenzana E, Freet K, Barthold SW. Differential detection of five mouse-infecting *helicobacter* species by multiplex PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 531-6.
- Ferrand J, Patron K, Legrand-Frossi C, Fripiat J-P, Merlin C, Alauzet C, Lozniewski A. Comparison of seven methods for extraction of bacterial DNA from fecal and cecal samples of mice. *Journal of microbiological methods* 2014; 105: 180-5.
- Fox J, Yan L, Shames B, Campbell J, Murphy J, Li X. Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* 1996; 64: 3673-81.

Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ, Jr., Gorelick PL, Ward JM. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol 1994; 32: 1238-45.

Fox JG, Yan LL, Dewhirst FE, Paster BJ, Shames B, Murphy JC, Hayward A, Belcher JC, Mendes EN. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. J Clin Microbiol 1995; 33: 445-54.

Fox JG. The expanding genus of *Helicobacter*: pathogenic and zoonotic potential. Semin Gastrointest Dis 1997; 8: 124-41.

Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, Ericson RL, Lau CN, Correa P, Araya JC, Roa I. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. Gastroenterology 1998; 114: 755-63.

Fox JG, Gorelick PL, Kullberg MC, Ge Z, Dewhirst FE, Ward JM. A novel urease-negative *Helicobacter* species associated with colitis and typhlitis in IL-10-deficient mice. Infect Immun 1999; 67: 1757-62.

Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE, Horwitz BH. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. Mucosal immunology 2011; 4: 22-30.

Franklin CL, Riley LK, Livingston RS, Beckwith CS, Besch-Williford CL, Hook Jr RR. Enterohepatic lesions in SCID mice infected with *Helicobacter bilis*. Comp Med 1998; 48: 334-9.

Franklin CL, Riley LK, Livingston RS, Beckwith CS, Hook RR, Besch-Williford CL, Hunziker R, Gorelick PL. Enteric lesions in SCID mice infected with "*Helicobacter typhlonicus*," a novel urease-negative *Helicobacter* species. Comp Med 1999; 49: 496-505.

Franklin CL, Gorelick PL, Riley LK, Dewhirst FE, Livingston RS, Ward JM, Beckwith CS, Fox JG. *Helicobacter typhlonius* sp. nov., a Novel Murine Urease-Negative *Helicobacter* Species. J Clin Microbiol 2001; 39: 3920-6.

Garvey W, Fathi A, Bigelow F. Modified Steiner for the demonstration of spirochetes. Journal of Histotechnology 1985; 8: 15-7.

Ge Z, White DA, Whary MT, Fox JG. Fluorogenic PCR-based quantitative detection of a murine pathogen, *Helicobacter hepaticus*. J Clin Microbiol 2001; 39: 2598-602.

Ge Z, Feng Y, Muthupalani S, Eurell LL, Taylor NS, Whary MT, Fox JG. Coinfection with Enterohepatic *Helicobacter* species can ameliorate or promote *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology in C57BL/6 mice. Infect Immun 2011; 79: 3861-71.

Goto K, Ohashi H, Takakura A, Itoh T. Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. Current microbiology 2000; 41: 161-6.

Hailey JR, Haseman JK, Bucher JR, Radovsky E, Malarkey DE, Miller RT, Nyska A, Maronpot RR. Impact of *Helicobacter hepaticus* infection in B6C3F1 mice from twelve National Toxicology Program two-year carcinogenesis studies. Toxicologic pathology 1998; 26: 602-11.

Hodzic E, McKisic M, Feng S, Barthold SW. Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice. Comp Med 2001; 51: 406-12.

Jacobsen K (2004) Optimierung des Nachweises von murinen *Helicobacter*-Infektionen in Versuchstierhaltungen. LMU, Dissertation

Jensen ES, Allen KP, Henderson KS, Szabo A, Thulin JD. PCR testing of a ventilated caging system to detect murine fur mites. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2013; 52: 28-33.

Jiang HQ, Kushnir N, Thurnheer MC, Bos NA, Cebra JJ. Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells. *Gastroenterology* 2002; 122: 1346-54.

Johansson SK, Feinstein RE, Johansson K-E, Lindberg AV. Occurrence of *Helicobacter* species other than *H. hepaticus* in laboratory mice and rats in Sweden. *Comp Med* 2006; 56: 110-3.

Kostia S, Veijalainen P, Hirvi U, Hänninen M-L. Cytolethal distending toxin B gene (cdtB) homologues in taxa 2, 3 and 8 and in six canine isolates of *Helicobacter* sp. flexispira. *Journal of medical microbiology* 2003; 52: 103-8.

Krishnan N, Doster AR, Duhamel GE, Becker DF. Characterization of a *Helicobacter hepaticus* putA mutant strain in host colonization and oxidative stress. *Infect Immun* 2008; 76: 3037-44.

Kuehl CJ, Wood HD, Marsh TL, Schmidt TM, Young VB. Colonization of the cecal mucosa by *Helicobacter hepaticus* impacts the diversity of the indigenous microbiota. *Infect Immun* 2005; 73: 6952-61.

Lee A, Phillips MW, O'Rourke JL, Paster BJ, Dewhirst FE, Fraser GJ, Fox JG, Sly LI, Romaniuk PJ, Trust TJ, et al. *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 27-36.

Lee A, Chen M, Coltro N, O'Rourke J, Hazell S, Hu P, Li Y. Long term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induce atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter pylori* infection. *Zentralbl Bakteriologie* 1993; 280: 38-50.

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. DSMZ: Culture Technology. 2019: <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/culture-technology.html>. June 12, 2019.

Lemke LB, Ge Z, Whary MT, Feng Y, Rogers AB, Muthupalani S, Fox JG. Concurrent *Helicobacter bilis* Infection in C57BL/6 Mice Attenuates Proinflammatory *H. pylori*-Induced Gastric Pathology. *Infect Immun* 2009; 77: 2147-58.

Li X, Fox JG, Whary MT, Yan L, Shames B, Zhao Z. SCID/NCr mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus* develop progressive hepatitis, proliferative typhlitis, and colitis. *Infect Immun* 1998; 66: 5477-84.

Lindstrom KE, Carbone LG, Kellar DE, Mayorga MS, Wilkerson JD. Soiled bedding sentinels for the detection of fur mites in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2011; 50: 54-60.

Livingston RS, Riley LK, Steffen EK, Besch-Williford CL, Hook Jr RR, Franklin CL. Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in mice by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1236-8.

Livingston RS, Riley LK, Hook Jr RR, Besch-Williford CL, Franklin CL. Cloning and expression of an immunogenic membrane-associated protein of *Helicobacter hepaticus* for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 1999; 6: 745-50.

Livingston RS, Myles MH, Livingston BA, Criley JM, Franklin CL. Sex influence on chronic intestinal inflammation in *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice. *Comp Med* 2004; 54: 301-8.

Lofgren JL, Esmail M, Mobley M, McCabe A, Taylor NS, Shen Z, Erdman S, Hewes C, Whary MT, Fox JG. Prevalence of murine *Helicobacter* spp. Infection

is reduced by restocking research colonies with *Helicobacter*-free mice. J Am Assoc Lab Anim Sci 2012; 51: 436-42.

LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: Genus *Helicobacter*. 2023: <https://lpsn.dsmz.de/genus/helicobacter>. August 7, 2023.

Mähler M, Bedigian HG, Burgett BL, Bates RJ, Hogan ME, Sundberg JP. Comparison of four diagnostic methods for detection of *Helicobacter* species in laboratory mice. Lab Anim Sci 1998; 48: 85-91.

Mähler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim 2014; 48: 178-92.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 1: 1311-5.

Miller CL, Muthupalani S, Shen Z, Fox JG. Isolation of *Helicobacter* spp. from mice with rectal prolapses. Comp Med 2014; 64: 171-8.

Miller M, Ritter B, Zorn J, Brielmeier M. Exhaust air particle PCR detects *Helicobacter hepaticus* infections at low prevalence. J Vet Sci Technol 2016a; 7.343: 2.

Miller M, Ritter B, Zorn J, Brielmeier M. Exhaust Air Dust Monitoring is Superior to Soiled Bedding Sentinels for the Detection of *Pasteurella pneumotropica* in Individually Ventilated Cage Systems. J Am Assoc Lab Anim Sci 2016b; 55: 775-81.

Miller M, Brielmeier M. Environmental samples make soiled bedding sentinels dispensable for hygienic monitoring of IVC-reared mouse colonies. Lab Anim 2018; 52: 233-9.

- Monteiro L, Bonnemaison D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. J Clin Microbiol 1997; 35: 995-8.
- Murata H, Tsuji S, Tsujii M, Fu HY, Tanimura H, Tsujimoto M, Matsuura N, Kawano S, Hori M. *Helicobacter bilis* infection in biliary tract cancer. Aliment Pharmacol Ther 2004; 20 Suppl 1: 90-4.
- Myles MH, Livingston RS, Franklin CL. Pathogenicity of *Helicobacter rodentium* in A/JCr and SCID mice. Comp Med 2004; 54: 549-57.
- Newman H, Maritz J. Basic overview of method validation in the clinical virology laboratory. Reviews in medical virology 2017; 27: e1940.
- Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny A, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim 2002; 36: 20-42.
- Nilsson HO, Stenram U, Ihse I, Wadstrom T. *Helicobacter* species ribosomal DNA in the pancreas, stomach and duodenum of pancreatic cancer patients. World J Gastroenterol 2006; 12: 3038-43.
- Pajares J, Gisbert J. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. Revista Española de Enfermedades Digestivas 2006; 98: 770.
- Pandey M, Mishra RR, Dixit R, Jaiswal R, Shukla M, Nath G. *Helicobacter bilis* in human gallbladder cancer: results of a case-control study and a meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev 2010; 11: 343-7.
- Pellicano R, Mazzaferro V, Grigioni WF, Cutufia MA, Fagoonee S, Silengo L, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter* species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2004; 10: 598.

Prins J-B. THE HISTORY OF FELASA – 1978-2018. 2022:

[https://felasa.eu/Portals/0/FELASA_History_20180804-](https://felasa.eu/Portals/0/FELASA_History_20180804-220406.pdf?ver=WVSsMJ41-D9_XUQnS1qn3Q%3d%3d)

[220406.pdf?ver=WVSsMJ41-D9_XUQnS1qn3Q%3d%3d](https://felasa.eu/Portals/0/FELASA_History_20180804-220406.pdf?ver=WVSsMJ41-D9_XUQnS1qn3Q%3d%3d). 13.02.2023.

Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 2009; 43: 165-73.

Qin H, Tang G, Yi P, Pan X, Huang H, Chang R, Shi Z, Ashraf MA. Diagnosis of Genus *Helicobacter* through a hemi-nested PCR assay of 16S rRNA. *Saudi Pharm J* 2016; 24: 265-72.

Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *Journal of clinical virology* 2007; 40: 93-8.

Rad L (2009) Die Rolle von Toll-like Rezeptoren bei der Vermittlung der adaptiven Immunität gegenüber *Helicobacter pylori*. Technische Universität München, Dissertation

Rao VP, Poutahidis T, Ge Z, Nambiar PR, Boussahmain C, Wang YY, Horwitz BH, Fox JG, Erdman SE. Innate immune inflammatory response against enteric bacteria *Helicobacter hepaticus* induces mammary adenocarcinoma in mice. *Cancer research* 2006; 66: 7395-400.

Rao VP, Poutahidis T, Fox JG, Erdman SE. Breast cancer: should gastrointestinal bacteria be on our radar screen? *Cancer research* 2007; 67: 847-50.

Rehbinder C, Baneux P, Forbes D, Van Herck H, Nicklas W, Rugaya Z, Winkler G. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig and rabbit experimental units: Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health accepted by the FELASA Board of Management, November 1995. *Lab Anim* 1996; 30: 193-208.

Riley LK, Franklin CL, Hook RR, Jr., Besch-Williford C. Identification of murine *helicobacters* by PCR and restriction enzyme analyses. J Clin Microbiol 1996; 34: 942-6.

Rogers AB, Boutin SR, Whary MT, Sundina N, Ge Z, Cormier K, Fox JG. Progression of chronic hepatitis and preneoplasia in *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice. Toxicologic pathology 2004; 32: 668-77.

Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. Methuen. Page 64

Segura-Lopez FK, Aviles-Jimenez F, Guitron-Cantu A, Valdez-Salazar HA, Leon-Carballo S, Guerrero-Perez L, Fox JG, Torres J. Infection with *Helicobacter bilis* but not *Helicobacter hepaticus* was Associated with Extrahepatic Cholangiocarcinoma. Helicobacter 2015; 20: 223-30.

Severini GM. Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. J Clin Microbiol 1993; 31.5: 1345-9.

Shames B, Fox JG, Dewhirst F, Yan L, Shen Z, Taylor NS. Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. J Clin Microbiol 1995; 33: 2968-72.

Sharp JM, Vanderford DA, Chichlowski M, Myles MH, Hale LP. *Helicobacter* infection decreases reproductive performance of IL10-deficient mice. Comp Med 2008; 58: 447-53.

Shen Z, Fox JG, Dewhirst FE, Paster BJ, Foltz CJ, Yan L, Shames B, Perry L. *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 627-34.

Shen Z, Schauer DB, Mobley HL, Fox JG. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay using the nucleotide sequence of the

Helicobacter hepaticus urease structural genes ureAB. J Clin Microbiol 1998; 36: 2447-53.

Shomer NH, Dangler CA, Schrenzel MD, Fox JG. *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora. Infect Immun 1997; 65: 4858-64.

Shomer NH, Dangler CA, Marini RP, Fox JG. *Helicobacter bilis*/*Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of scid mice. Lab Anim Sci 1998; 48: 455-9.

Singh VK, Kumar A. PCR primer design. Mol. Biol. Today 2001; 2: 27-32.

Smith PC, Nucifora M, Reuter JD, Compton SR. Reliability of soiled bedding transfer for detection of mouse parvovirus and mouse hepatitis virus. Comp Med 2007; 57: 90-6.

Taylor NS, Xu S, Nambiar P, Dewhirst FE, Fox JG. Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America. J Clin Microbiol 2007; 45: 2166-72.

ThermoScientific. 260/280 and 260/230 Ratios. 2019:

<https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>. August 23, 2019.

Vogiatzi P, Cassone M, Luzzi I, Lucchetti C, Otvos Jr L, Giordano A. *Helicobacter pylori* as a class I carcinogen: physiopathology and management strategies. Journal of cellular biochemistry 2007; 102: 264-73.

Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins Jr MJ, Gorelick PL, Nagashima K, Gonda MA, Gilden RV. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a

novel *Helicobacter* species. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 1994a; 86: 1222-7.

Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. Am J Pathol 1994b; 145: 959-68.

Ward JM, Anver MR, Haines DC, Melhorn JM, Gorelick P, Yan L, Fox JG. Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus*. Lab Anim Sci 1996; 46: 15-20.

Whary MT, Cline JH, King AE, Hewes KM, Chojnacky D, Salvarrey A, Fox JG. Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium*, and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. Comp Med 2000; 50: 436-43.

Whary MT, Fox JG. Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents. Lab animal 2006; 35.7: 25-36.

Wu M, Rao D, Zhu Y, Wang J, Yuan W, Zhang Y, Huang R, Guo P. Differentiation of five enterohepatic *Helicobacter* species by nested PCR with high-resolution melting curve analysis. Helicobacter 2017; 22: e12362.

Young VB, Knox KA, Schauer DB. Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. Infect Immun 2000; 68: 184-91.

Youssef A, Afifi A, Abbadi S, Hamed A, Enany M. PCR-based detection of *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* species among humans and animals with potential for zoonotic infections. Polish Journal of Veterinary Sciences 2021; 24: 445-50.

Zangenberg G, Saiki RK, Reynolds R. 6 - Multiplex PCR: Optimization guidelines. In: PCR Applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, eds. San Diego: Academic Press 1999: 73-94.

Zenner L. Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 1999; 22: 41-61.

Zorn J, Ritter B, Miller M, Kraus M, Northrup E, Brielmeier M. Murine norovirus detection in the exhaust air of IVCs is more sensitive than serological analysis of soiled bedding sentinels. Lab Anim 2017; 51: 301-10.

Zylka Menhorn V. Nobelpreis für Medizin: Der Bakterientrunk lieferte der Fachwelt den Beweis. 2005: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/48558/Nobelpreis-fuer-Medizin-Der-Bakterientrunk-lieferte-der-Fachwelt-den-Beweis>. 06.02.2023.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. hepaticus* (FOX et al., 1994)

Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. bilis* (FOX et al., 1995)

Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme *H. muridarum* (LEE et al., 1992)

Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. rodentium* (SHEN et al., 1997)

Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. typhlonius* (FRANKLIN et al., 2001)

Abbildung 6: Schematische Darstellung Nested PCR

Abbildung 7: Vergleich der unterschiedlichen PCR-Produktlängen durch Veränderung des Primerpaares für *H. muridarum*

Abbildung 8: DNA-Qualität (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} Absorptionsraten) und DNA-Quantität der vier kommerziellen DNA-Extraktionskits aus Kotproben

Abbildung 9: Robustheitsbewertung im Validierungsprozess: ab Tag 3 kein Nachweis von *H. bilis* und *H. muridarum* bei Lagerung mit Raumtemperatur mehr möglich

Abbildung 10: *Helicobacter* spp. untersuchte Versuchstiereinrichtungen in München mit positiven oder negativen *Helicobacter*-Status: 6/8 positive Haltungen mit einer Prävalenz von 75 %

2. Abbildungsverzeichnis Veröffentlichung Neubert et al.

Abbildung 1: Multiplex PCR performed with bacterial DNA of five murine *Helicobacter* strains (5 ng/ μ l) for which equimolar primer concentrations were used. Each primer pair is specific for the respective *Helicobacter* species (Hh = *H. hepaticus*, Hb = *H. bilis*, Hm = *H. muridarum*, Hr = *H. rodentium*, and

Ht = *H. typhlonius*)

Abbildung 2: Representative run of inter-precision in the validation process with three “positive” (= more than 1 log₁₀ over LLOD) and three “low positive” (= up to 1 log₁₀ over LLOD) samples, in which all *Helicobacter* strains (Hh = *H. hepaticus*, Hb = *H. bilis*, Hm = *H. muridarum*, Hr = *H. rodentium*, and Ht = *H. typhlonius*) were detected with defined bands at expected heights

Abbildung 3: Prevalence of *Helicobacter* spp. in naturally infected mice from animal facilities in Germany. In 6 from 8 animal facilities, *Helicobacter* spp. were found in mono- and coinfections with a prevalence from 75%

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemische Eigenschaften von EHS (LEE et al., 1992; FOX et al., 1994; FOX et al., 1995; SHEN et al., 1997; FRANKLIN et al., 2001)

Tabelle 2: Eigenschaften der kommerziell erwerblichen DNA Extraktions-Kits

Tabelle 3: Primer zur Detektion der murinen *Helicobacter*-Spezies

Tabelle 4: Primer nach Feng *et al.* mit Länge, Schmelztemperatur und GC %

Tabelle 5: Primer nach Neubert *et al.* mit Länge, Schmelztemperatur und GC %

Tabelle 6: Vergleich der Eigenschaften (Lyse-Verfahren, Kosten, Zeit) der vier kommerziellen DNA-Extraktionskits aus Kotproben

4. Tabellenverzeichnis Veröffentlichung Neubert *et al.*

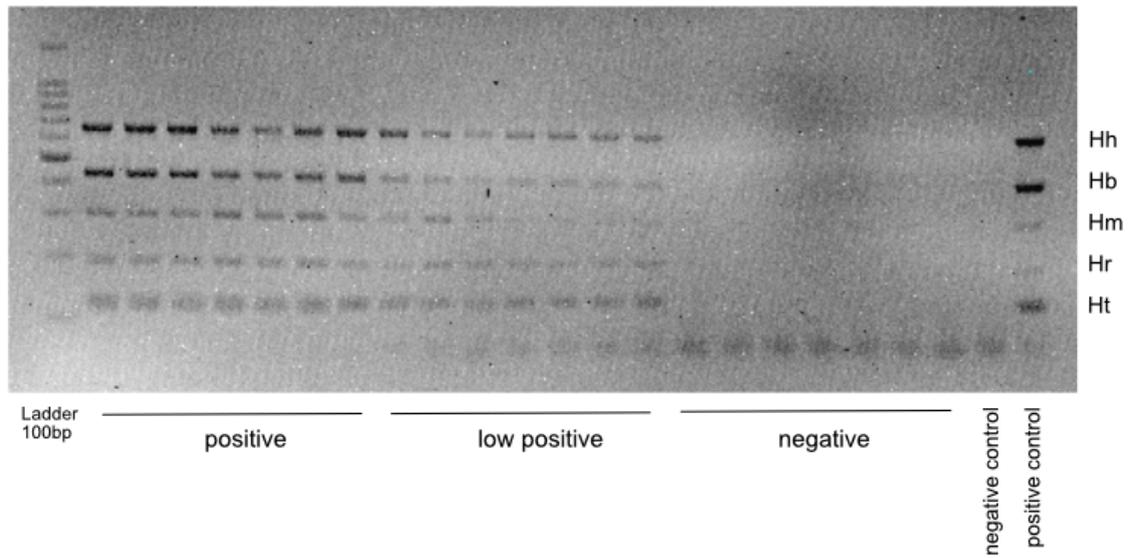
Tabelle 1: A: General attributes of the commercially available DNA extraction methods evaluated; B: yields and qualities of DNA extracted from *H. hepaticus* or fecal spiked with *H. hepaticus*

Tabelle 2: Primer sets for detection of murine *Helicobacter* strains

Tabelle 3: Overview of parameters validated for home-brewed qualitative nucleic acid tests and the results obtained with the established method

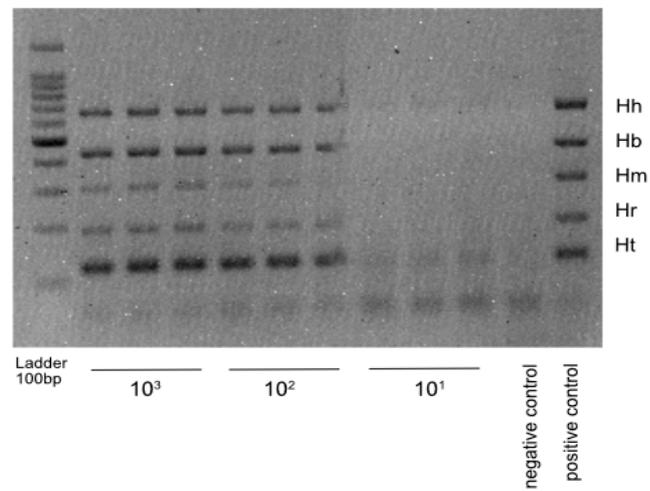
5. Repräsentative Durchläufe der Validationsparameter

Anhang 1: Repräsentative Genauigkeitsbewertung im Validierungsprozess

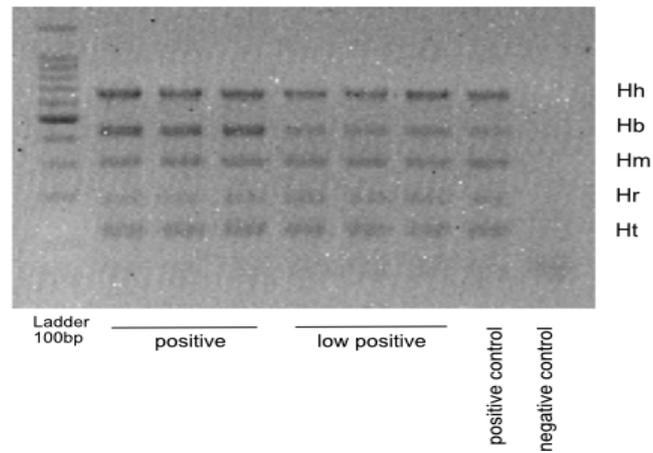


Multiplex-PCR mit fünf Primer-Sets, durchgeführt mit "positiven" (= mehr als 1 \log_{10} über dem LLOD), "schwach positiven" (= bis zu 1 \log_{10} über dem LLOD) künstlich gespikten Proben und "negativen" Proben.

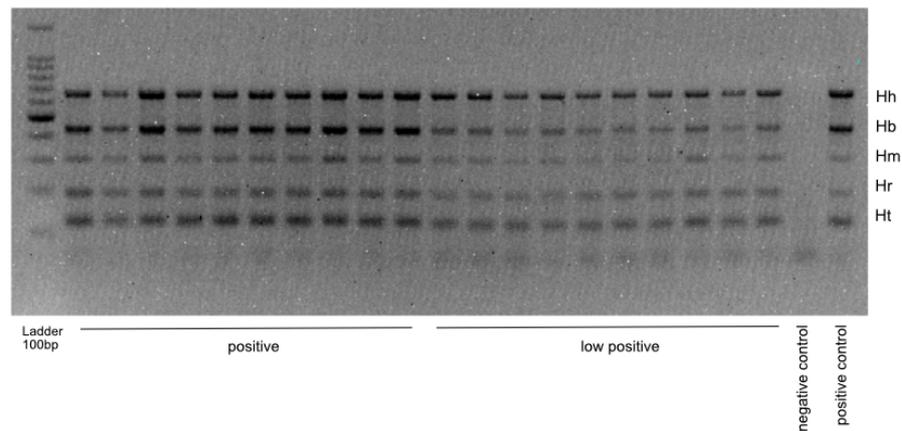
Anhang 2: Repräsentativer Durchlauf der unteren Nachweisgrenze (LLOD) im Validierungsprozess



Multiplex-PCR mit fünf Primer-Sets, durchgeführt mit künstlich gespikten Kotproben mit bekannter Konzentration im erwarteten Bereich des niedrigsten nachweisbaren Limits (LLOD) (10^3 , 10^2 , 10^1).

Anhang 3: Repräsentativer Durchlauf der Reproduzierbarkeit (Operatorwechsel) im Validierungsprozess

Multiplex-PCR mit fünf Primer-Sets, durchgeführt mit "positiven" (= mehr als 1 \log_{10} über dem LLOD), "schwach positiven" (= bis zu 1 \log_{10} über dem LLOD) künstlich gespikten Proben.

Anhang 4: Repräsentativer Durchlauf der Sensitivität im Validierungsprozess

Multiplex-PCR mit fünf Primer-Sets, durchgeführt mit "positiven" (= mehr als 1 \log_{10} über dem LLOD), "schwach positiven" (= bis zu 1 \log_{10} über dem LLOD) künstlich gespikten Proben.

X. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem meiner Mentorin und Betreuerin Dr. med. vet. Karin Seidel, die immer mit Rat und Tat an meiner Seite stand. Nur durch deine Liebe zum *Helicobacter* konnte diese Arbeit erst entstehen und durch deine Betreuung in bester Weise umgesetzt werden.

Auch möchte ich Prof. Dr. Dr. Erhard danken, dass er dieses Thema als Doktorvater an seinem Lehrstuhl übernommen hat und mir so die Gelegenheit gegeben hat, die hygienischen Monitoringmaßnahmen in den Versuchstierhaltungen ein Stück einfacher zu machen und somit das Leben der Versuchstiere ein wenig zu verbessern.

Ganz besonderer Dank gilt Behnam Kalali. Deine unendliche Geduld und deine zielbringenden Vorschläge haben mich immer einen Schritt näher ans Ziel gebracht. Ohne dich und dein technisches Know-How wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Und auch Ahmed Sadek möchte ich in respektvollerweise Danken. Du warst der bester Laborpartner, den man sich hätte vorstellen können. Du hast meinen Horizont erweitert.

Ohne das Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität, München und ganz besonders Prof. Dr. Markus Gerhard wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dank ihm hat das Deutsche Institut für Infektionsforschung die Notwendigkeit gesehen diese Arbeit zu unterstützen. Auch der ganzen Arbeitsgruppe AG Gerhard und den Tierpflegern des Institutes möchte ich danken.

Danke auch meiner Familie: Papa, Mama, Katrin, Marvin und Kimi, dass ihr immer an mich geglaubt habt.