

**Etablierung und Prä-Validierung einer Methode zum Nachweis  
von *Helicobacter hepaticus* in Tupferproben aus experimentellen  
Maushaltungen - eine *in vitro* Studie**

von Ann-Katrin Sutterer, geb. Maier

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

**Etablierung und Prä-Validierung einer Methode zum Nachweis  
von *Helicobacter hepaticus* in Tupferproben aus experimentellen  
Maushaltungen - eine *in vitro* Studie**

von Ann-Katrin Sutterer, geb. Maier  
aus Rotthalmünster  
München 2025



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. Dr. Michael Erhard

Angefertigt im Institut für Medizinische 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. Dr. Michael H. Erhard

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 08. Februar 2025



Für Stephan



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>7</b>
1.	<i>Helicobacter</i> spp. ....	7
1.1	<i>Helicobacter bilis</i> .....	8
1.2	<i>Helicobacter hepaticus</i> .....	9
1.3	<i>Helicobacter muridarum</i> .....	11
1.4	<i>Helicobacter rodentium</i> .....	12
1.5	<i>Helicobacter typhlonius</i> .....	13
2.	Probenentnahmemethoden zur Untersuchung auf <i>H. hepaticus</i> .....	14
2.1	Blutproben.....	14
2.2	Kotproben.....	15
2.3	Gewebeproben.....	15
2.4	Umweltproben (Environmental Samples).....	15
2.4.1	EAD.....	16
2.4.2	Aus der Käfigumgebung gewonnene Proben.....	16
3.	Nachweismethoden für murine <i>Helicobacter</i> -Arten .....	17
3.1	indirekte Methoden .....	17
3.2	direkte Methoden.....	18
3.2.1	Kulturelle Untersuchung .....	18
3.2.2	Histologische Untersuchung .....	18
3.2.3	Untersuchung mittels PCR.....	18
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
1.	Bakterienstämme .....	20
2.	DNA-Extraktionskits.....	21
3.	Materialien zur Gewinnung von Umweltproben.....	22
4.	Extraktionsprotokoll.....	23
4.1	Initiales Protokoll .....	23
4.2	Verbessertes Protokoll.....	24
5.	Aufbau der PCR und Durchführung.....	25

---

6.	Visualisierung der PCR Produkte .....	26
7.	Validierung.....	26
7.1	Niedrigstes Nachweislimit (LLOD) .....	27
7.2	Sensitivität.....	27
7.3	Spezifität.....	27
7.4	Genauigkeit .....	28
7.5	Präzision .....	28
7.6	Reproduzierbarkeit .....	29
7.7	Robustheit.....	29
<b>IV.</b>	<b>PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE .....</b>	<b>30</b>
1.	Veröffentlichung Sutterer <i>et al.</i> 2024.....	30
<b>V.</b>	<b>ERWEITERTE DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>46</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>47</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>48</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>60</b>
1.	Abbildungsverzeichnis .....	60
2.	Abbildungsverzeichnis Veröffentlichung Sutterer <i>et al.</i> .....	60
3.	Tabellenverzeichnis.....	61
4.	Tabellenverzeichnis Veröffentlichung Sutterer <i>et al.</i> .....	61
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>62</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
AJ	Analytik Jena
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaar
CASO	Casein-Soja
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EAD	exhaust air dust
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBD	inflammatory bowel disease
IVC	individually ventilated cages
LLOD	lower limit of detection
M	Molare Masse
NFW	nuclease-free water
OD	Optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Pasteurella</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

RNA	Ribonukleinsäure
RPM	revolutions per minute
SBS	soiled bedding sentinel
SPF	specific pathogen free
spp.	Spezies
V.	Vena
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZR	Zymo Research

## I. EINLEITUNG

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts wurde durch den deutschen Arzt Dr. Walter Krienitz erstmals vom Vorhandensein spiralförmiger Bakterien im Mageninhalt eines Patienten mit Magenkarzinom berichtet (KRIENITZ, 1906). Dies erschien jedoch aufgrund des extrem niedrigen pH-Wertes und demzufolge unwirtlichen Umgebung im Magen als eher unglaubwürdig.

Im Jahr 1984 wurden aus histologischen Präparaten der Magenschleimhaut des Antrum von Patienten, die zur Gastroskopie vorstellig waren, erstmals spiralförmige Bakterien nachgewiesen (MARSHALL und WARREN, 1984). Diese Entdeckung revolutionierte das Verständnis von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren, die bis dato hauptsächlich auf Stress und eine Ernährung mit scharfen Lebensmitteln zurückgeführt wurden.

Die Autoren beschrieben, dass diese Bakterien nach kultureller Isolierung bei elf von 100 Patienten nachgewiesen werden konnten, die unter aktiver chronischer Gastritis sowie Duodenal- oder Magenzulzera litten. Aufgrund dessen, dass die isolierten Bakterien gram-negatives Färbeverhalten aufwiesen, begeißelt waren und sich mikroaerophil zeigten, ordneten MARSHALL und WARREN diese dem Genus *Campylobacter* zu und bezeichneten sie ab diesem Zeitpunkt als *Campylobacter pylori*. Nach biochemischen und genetischen Untersuchungen wurden die Bakterien einem neuen Genus zugeordnet. 1989 wurde das Bakterium als erster Vertreter von *Helicobacter* in *Helicobacter pylori* umbenannt (GOODWIN *et al.*, 1989). Abbildung 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori*, in der der spiralförmig gewundene Keim mit seinen bis zu fünf unipolaren Geißeln klar zu erkennen ist.



**Abb. 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori* (SUERBAUM *et al.*, 2016).

Es stellte sich heraus, dass das Enzym Urease, welches das Bakterium besitzt, das wichtigste Werkzeug für das Überleben im Magenmilieu darstellt. Urease kann den im Magen enthaltenen Harnstoff -das Endprodukt des Proteinstoffwechsels- in Ammoniak und Kohlendioxid spalten und somit die Magensäure in der unmittelbaren Umgebung des Bakteriums neutralisieren (TESTERMAN und MORRIS, 2014; CAMILO *et al.*, 2017).

Seine jeweils zwei bis sechs ungefähr 3  $\mu\text{m}$  langen unipolaren Flagellen verleihen *H. pylori* eine hohe Beweglichkeit. Neben der Chemotaxis, welche unter anderem durch den pH-Wert angetrieben wird, sowie der Geißeln kann das Bakterium aktiv in den hochviskösen Magenschleim eindringen, sich orientieren und mittels mehrerer Adhäsine in den weniger sauren Gebieten in der Nähe der Epithelzellen des Magens anheften (KUSTERS *et al.*, 2006; SALAMA *et al.*, 2013; SUERBAUM *et al.*, 2016). Zusätzlich bildet *H. pylori* einen Biofilm als Überlebensstrategie, der als zusätzliche Schutzschicht gegen die aggressive Magensäure sowie des Immunsystem des Wirts dient. Diese Biofilme bestehen aus einer komplexen Matrix, die hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA besteht. Die Biofilmbildung ermöglicht es dem Bakterium, in einem selbst hergestellten geschützten Umfeld zu leben (CARRON *et al.*, 2006).

Im Zuge der umfangreichen Forschungsarbeiten konnte bewiesen werden, dass *H. pylori* wesentlicher Mitverursacher von Magengeschwüren ist und nachweislich an der Entstehung maligner Erkrankungen des Magens beteiligt ist (SUERBAUM *et al.*, 2016). Aus diesem Grund wurde *H. pylori* deshalb 1994 von der International

Agency for Research on Cancer (IARC; unter Schirmherrschaft der Weltgesundheitsorganisation WHO) als erstes Bakterium offiziell als karzinogen eingestuft (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1994).

Seit der Entdeckung des Genus *Helicobacter* konnten immer mehr *Helicobacter*-Arten von Mensch und Tier isoliert werden. Nach Stand 2020 sind 54 verschiedene Arten bekannt (PARTE *et al.*, 2020). Tabelle 1 zeigt einige Beispiele mit Angabe natürlich infizierter Wirte und dem Organ der Primärbesiedelung (modifiziert aus WHARY und FOX, 2004; STERZENBACH, 2006; SUERBAUM *et al.*, 2016).

**Tab. 1:** Beispiele für *Helicobacter*-Arten und der empfänglichen Wirte sowie dem Ort der Primärbesiedelung.

<b><i>Helicobacter</i>-Art</b>	<b>Empfängliche(r) Wirte(e)</b>	<b>Primärbesiedelung</b>
<i>H. bilis</i>	Mensch, Nager, Hund, Katze	Magen
<i>H. bovis</i>	Rind	Magen
<i>H. canis</i>	Mensch, Katze, Hund	Darm
<i>H. cinaedi</i>	Mensch	Darm
<i>H. felis</i>	Mensch, Katze, Hund	Magen
<i>H. fennelliae</i>	Mensch	Darm
<i>H. heilmannii</i>	Mensch, Katze, Hund	Magen
<i>H. hepaticus</i>	Maus	Darm (sekundär: Leber, Gallengänge)
<i>H. muridarum</i>	Maus	Darm
<i>H. pullorum</i>	Mensch, Huhn	Darm
<i>H. pylori</i>	Mensch, Primaten, Katze, Hund	Magen
<i>H. rodentium</i>	Nager	Darm
<i>H. suis</i>	Schwein	Magen
<i>H. typhlonius</i>	Nager	Darm

Die verschiedenen *Helicobacter*-Arten werden anhand ihres Besiedlungsortes in zwei Hauptgruppen eingeteilt: gastrische sowie enterohepatische Arten. Gastrische *Helicobacter*-Arten besiedeln den Magen und sind vorwiegend für ihre Rolle bei der Entstehung von Gastritis, Magengeschwüren und Magenkrebs bekannt (LEE *et al.*, 1988; FOX *et al.*, 1997b; GHIL *et al.*, 2009). Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist der beim Menschen vorkommende *H. pylori*. Enterohepatische

*Helicobacter*-Arten infizieren vorwiegend den Darm, die Leber sowie die Gallengänge. Experimentelle Infektionen von immundefizienten Mäusen mit diesem Bakterium können verschiedene gastrointestinale und hepatische Erkrankungen hervorrufen und werden deshalb u. A. als Modell für die Erforschung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen wie Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn verwendet (STERZENBACH, 2006). Weitere Beispiele für enterohepatische *Helicobacter*-Arten, die bei der Maus vorkommen, sind *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* und *H. typhlonius*.

Um die wissenschaftliche Integrität und Validität von Forschungsergebnissen in Versuchstiereinrichtungen zu erhalten, ist es von immenser Bedeutung, Infektionen mit Krankheitserregern schnell und zuverlässig erkennen zu können. Da viele Infektionen inapparent und somit symptomlos bleiben können, ist es wichtig, durch ein routinemäßiges Gesundheitsmonitoring („Health Monitoring“) den aktuellen Gesundheitsstatus der Versuchstiere zu erfassen. Hierdurch kann sichergestellt werden, dass Versuchsergebnisse nicht durch mögliche Infektionen verfälscht werden oder sogar wiederholt werden müssen. Somit kann die Anzahl der verwendeten Versuchstiere auf dem geringstmöglichen Niveau bleiben. Durch die Integration des Health Monitorings können die sogenannten 3R-Richtlinien effektiv umgesetzt werden (BURCH und RUSSELL, 1992). Diese gelten als Grundsatz der experimentellen wissenschaftlichen Arbeit und haben zum Ziel, Tierversuche bestmöglich zu vermeiden (Replacement), sowie deren Anzahl (Reduction) und ihr Leiden (Refinement) auf ein unerlässliches Maß zu beschränken. Mit der Europäischen Richtlinie 2010/63/EU wurde das 3R-Prinzip 2010 erstmalig gesetzlich anerkannt und 2013 im Zuge des neuen Tierschutzgesetzes sowie der Tierschutz-Versuchstierverordnung in deutsches Recht umgesetzt (TierSchG sowie TierSchVersV). Dies bedeutet, dass jeder Wissenschaftler, der einen Tierversuch durchführen möchte, bei der Antragsstellung der zuständigen Behörde darlegen muss, dass keine alternativen Methoden für den Tierversuch existieren, die geringstmögliche Anzahl von Versuchstieren verwendet wird sowie deren Belastungen auf das absolute Minimum beschränkt wird.

Die steigende Bedeutung des Vorkommens von *Helicobacter*-Arten in experimentellen Tiereinrichtungen spiegelt sich auch in den Empfehlungen zur Hygieneüberwachung der FELASA, einer Vereinigung europäischer

versuchstierkundlicher Organisationen, wider. Während in den Empfehlungen von 1994 (KRAFT *et al.*, 1994) sowie 1996 (REHBINDER *et al.*, 1996) keinerlei Testempfehlungen für *Helicobacter* ausgesprochen wurden, änderte sich dies im Jahr 2002, als eine jährliche Testung auf *Helicobacter* spp. bei Maus, Ratte sowie Hamster empfohlen wurde (NICKLAS *et al.*, 2002). Zu diesem Zeitpunkt wurde bereits vermutet, dass einige *Helicobacter*-Arten wie *H. hepaticus*, *H. bilis* sowie *H. typhlonius* das Potential besitzen, Erkrankungen beim Versuchstier hervorzurufen und somit Auswirkungen auf Tierversuche zu haben (FOX und LEE, 1997a; FRANKLIN *et al.*, 1999; NICKLAS *et al.*, 2002). In den aktuell geltenden Empfehlungen der FELASA aus dem Jahr 2014 (MÄHLER *et al.*, 2014) wird die Untersuchung auf *Helicobacter* spp. bei Mäusen, Ratten und Hamstern quartalsweise empfohlen. Im Falle eines positiven Testergebnisses empfiehlt die Arbeitsgruppe die anschließende Testung auf die Spezies *H. hepaticus*, *H. bilis* und *H. typhlonius* bei der Maus sowie auf *H. bilis* bei der Ratte.

Die nach wie vor gängige Methode, um Pathogene im Rahmen des regelmäßigen Health Monitorings zu erfassen, ist die Sentinel-Testmethode (SHEK *et al.*, 2015). Sentinels sind sogenannte Anzeigertiere, die als SPF-Tiere mit bekanntem Hygienestatus in Tierbeständen eingesetzt werden, um festzustellen, ob bestimmte Krankheitserreger vorhanden sind. Sie werden bewusst so gehalten, dass sie einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt sind und sich Pathogene deshalb mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit auf sie übertragen. Verschiedene Arten des Einsatzes von Sentineltieren sind u. A. Kontaktsentinels, die im selben Käfig mit den zu untersuchenden Tieren gehalten werden oder Einstreusentinels („Soiled bedding sentinels“, SBS), die in separaten Käfigen mit gebrauchter Einstreu aus den zu untersuchenden Käfigen gehalten werden. Nach einer bestimmten Verweilzeit werden die Sentineltiere anschließend pathologisch, mikrobiologisch, serologisch und molekulargenetisch untersucht (SHEK *et al.*, 2015; BUCHHEISTER und BLEICH, 2021).

Da für diese Methode zusätzliche Tiere nötig sind, wird seit geraumer Zeit die Etablierung alternativer Health Monitoring-Methoden erprobt. Dies zielt im Sinne der 3R Prinzipien darauf ab, den Einsatz von Sentineltieren zu vermeiden, indem Umweltproben zur Untersuchung eingesetzt werden. Diese stammen aus der unmittelbaren Umgebung des Versuchstieres, wie z. B. Abluftproben (MILLER *et al.*, 2016a; NIIMI *et al.*, 2018; MILLER und BRIELMEIER, 2018; MAHABIR *et*

*al.*, 2019; BUCHHEISTER *et al.*, 2020) oder Umweltprobenmaterial, das aus dem Käfig selbst gewonnen wird (DUBELKO *et al.*, 2018; HANSON *et al.*, 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Testmethode für die einfache und zuverlässige Detektion von *Helicobacter hepaticus* durch die Probennahme aus Umweltmaterial zu etablieren. *H. hepaticus* kommt mit 12,37 % Prävalenz bei Mäusen in Labortierhaltungen vor (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2009) und kann bei immundefizienten Tieren schwere Infektionen wie z. B. nekrotische Hepatitis (FOX *et al.*, 1994), Dickdarmentzündungen (FOX *et al.*, 2011) oder sogar Lebertumore (WHARY *et al.*, 2000a) auslösen.

## II. ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT

### 1. *Helicobacter* spp.

Von den 54 bisher bekannten *Helicobacter* Arten wurden 11 bei Mäusen nachgewiesen (PARTE *et al.*, 2020):

- *H. apodemus*
- *H. bilis*
- *H. cholecystus*
- *H. ganmani*
- *H. hepaticus*
- *H. mastomyrinus*
- *H. muridarum*
- *H. pullorum*
- *H. rappini*
- *H. rodentium*
- *H. typhlonius*

Nachfolgend soll sich aufgrund der klinischen Relevanz und ihrer Bedeutung in Mausmodellen auf fünf murine *Helicobacter*-Arten beschränkt werden: *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. typhlonius* sowie *H. rodentium*. Diese fünf verschiedenen enterohepatischen Arten unterscheiden sich maßgeblich in ihrer charakteristischen Morphologie und ihren biochemischen Eigenschaften, als auch in ihrer Prävalenz. *H. hepaticus* weist hierbei jeweils die höchste Prävalenz auf; hier sind je nach Studie Werte zwischen 12,37 % (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2009) und 26 % (LOFGREN *et al.*, 2012) genannt. An nachfolgender Stelle nennt LOFGREN *et al.* *H. bilis* und *H. typhlonius* mit einer Prävalenz von jeweils 16 %, gefolgt von *H. rodentium* mit 12 %. Für *H. muridarum* liegt laut RILEY *et al.* (1996) lediglich eine Prävalenz von 1 % vor, jedoch hat dieses Bakterium hinsichtlich der IBD-Forschung in Mausmodellen einen hohen Stellenwert (JIANG *et al.*, 2002) und wurde deshalb dieser Auflistung beigelegt. Weitere *Helicobacter*-Arten haben derzeit -noch- keinen signifikanten Stellenwert hinsichtlich der Relevanz von Erkrankungen bei Labortieren, so dass sich auf die oben genannten

fünf murinen *Helicobacter*-Arten beschränkt wurde.

In Tabelle 2 sind einige biochemische Eigenschaften, ihr Ansprechen auf Antibiotika sowie Daten zur Morphologie der fünf oben genannten murinen *Helicobacter*-Arten dargestellt.

**Tab. 2:** Eigenschaften fünf verschiedener relevanter muriner *Helicobacter*-Arten (modifiziert aus JACOBSEN, 2004); k. A. = keine Angabe.

	<i>H. bilis</i>	<i>H. hepaticus</i>	<i>H. muridarum</i>	<i>H. rodentium</i>	<i>H. typhlonius</i>
Oxidase	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	-	-
H <sub>2</sub> S-Produktion	+	+	-	k. A.	-
Nitrat-Reduktion	+	+	-	+	k. A.
Metronidazol-Sensibilität	+	+	k. A.	k. A.	k. A.
Geißeln	3–14, bipolar	1, bipolar	10–14, bipolar	1, bipolar	1, bipolar
Periplasmatische Fasern	+	-	+	-	-
Größe (µm), ø × Länge	0,5 × 4–5	0,2–0,3 × 1,5–5	0,5–0,6 × 3,5–5	0,3 × 1,5–5	0,3 × 2–3

### 1.1. *Helicobacter bilis*

*H. bilis* wurde 1995 aus Leber, Galle sowie dem Darmtrakt von 19 – 27 Monate alten Inzuchtmäusen isoliert (FOX *et al.*, 1995). Es handelt sich um ein fusiformes, 0,5 × 4–5 µm großes gramnegatives Bakterium, das mit drei bis 14 bipolaren Geißeln bestückt ist (siehe Abb. 2). Es kann ebenfalls wie *H. hepaticus* unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C kultiviert werden und weist auch aufgrund der biochemischen Eigenschaften eine hohe Ähnlichkeit zu *H. hepaticus* auf.

*H. bilis* ist als opportunistischer Erreger bekannt, der bei verschiedenen Tieren und auch dem Menschen Infektionen verursachen kann. Studien haben gezeigt, dass *H. bilis* bei Mäusen sowohl Hepatitis, Kolitis als auch maligne Prozesse auslösen kann, was auf seine potentielle Rolle bei ähnlichen menschlichen Erkrankungen hinweist (FOX *et al.*, 1995). Aktuelle Forschungen konzentrieren sich auf die Rolle von *H. bilis* bei chronischen Lebererkrankungen und Gallengangskrebs beim Menschen (MURPHY *et al.*, 2024). Es gibt Hinweise darauf, dass das Bakterium eine entzündliche Reaktion im Gallengangsystem induziert, was zu langfristigen Schäden und möglichen malignen Transformationen führen kann (MATSUMOTO *et al.*, 2000; WHARY *et al.*, 2000b; SHEN *et al.*, 2001).

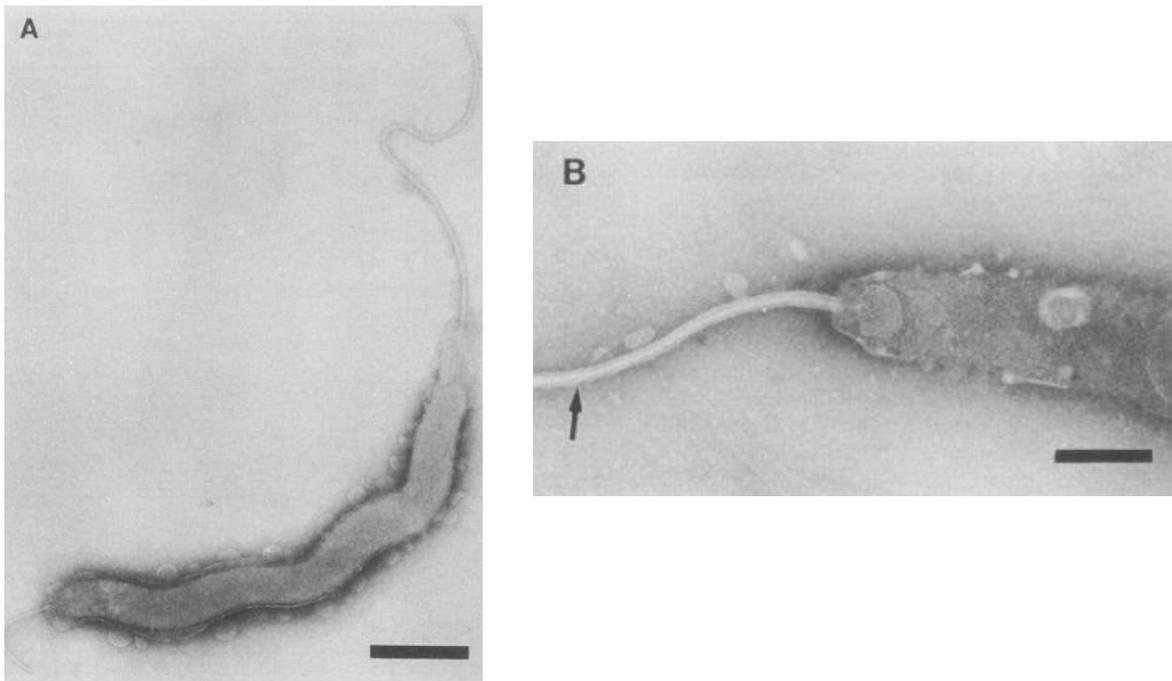


**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. bilis* (FOX *et al.*, 1995).

### 1.2. *Helicobacter hepaticus*

*H. hepaticus* ist ein gram-negatives, gekrümmtes bis spiralförmiges Bakterium, welches zu den enterohepatischen *Helicobacter*-Arten zählt. Es besitzt an jedem der zwei Pole jeweils ein subterminales Flagellum (s. Abb. 3A und 3B), welches ihm helikale Bewegungen ermöglicht. Es misst in der Länge 1,5 bis 5  $\mu\text{m}$  und hat einen Durchmesser von 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$ . Wie auch andere *Helicobacter*-Arten kann *H. hepaticus* unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C kultiviert werden. Es besitzt eine starke Urease-Aktivität und ist Oxidase- und Katalase-positiv (FOX *et al.*, 1994).

Entdeckt wurde es per Zufall im Jahre 1992, als während einer Karzinogenese-Studie an einem Institut in Maryland, USA, unerwartet viele Fälle von chronisch aktiver Hepatitis in mehreren Inzuchtstämmen von jungen Mäusen auftraten. Innerhalb kürzester Zeit stieg die Prävalenz einer histologisch charakteristischen Form der Hepatitis bei männlichen 1-jährigen Mäusen auf nahezu 100 % an. In älteren A/JCr Mäusen herrschte zudem eine hohe Inzidenz an Leberadenomen und -karzinomen, obwohl diese Mäuse üblicherweise selten davon betroffen sind (WARD *et al.*, 1994a, FOX *et al.*, 1994).



**Abb. 3A und 3B:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. hepaticus* (FOX *et al.*, 1994).

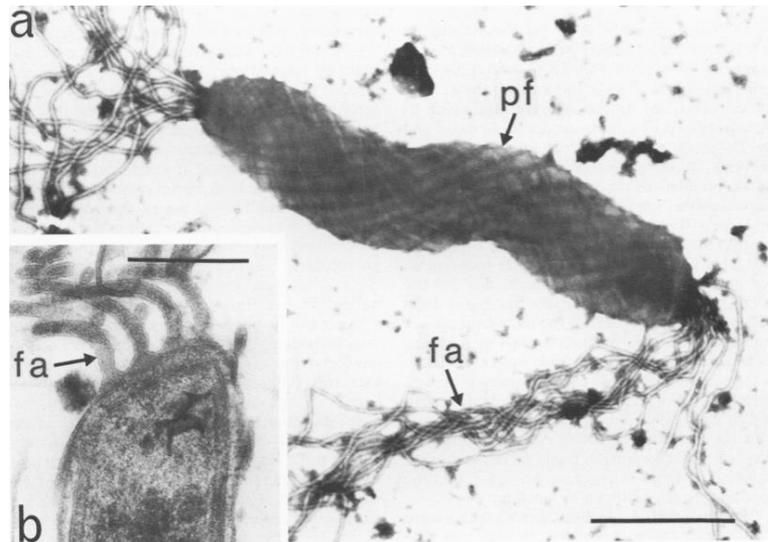
Anfangs wurde vermutet, dass dem gehäuften Auftreten der Erkrankungen eine versehentliche Chemikalienexposition der Tiere in den Versuchsgebäuden zugrunde lag. Diese Theorie konnte jedoch bald widerlegt werden, als auch bei Mäusen in den separat gelegenen Zuchtgebäuden Lebererkrankungen festgestellt wurden. Eine zusätzlich durchgeführte chemische Analyse von Futter, Einstreu, Wasser sowie weiteren potentiellen Quellen toxischer Substanzen verlief negativ (RICE, 1995). Elektronenmikroskopisch konnten in Zellproben mittels Steiner's Spezialfärbung helikale Strukturen zwischen den Hepatozyten und in den Gallengängen festgestellt und kultiviert werden, welche aufgrund einer Gensequenzanalyse der Gattung der *Helicobacter* zugeordnet wurden. In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass *H. hepaticus* zusätzlich auch die Schleimhaut von Zäkum und Dickdarm befallen kann (FOX *et al.*, 1994, WARD *et al.*, 1994b) und daraus geschlussfolgert, dass aufgrund der Autokoprophagie der Mäuse die natürliche Übertragung der Organismen auf oral-fäkaler Route erfolgen muss. Manche Mausstämme (A/JCr, C3H/HeNCr, SJL/NCr, BALB/cAnNCr, Prkdcscid/NCr) scheinen besonders empfänglich für *H. hepaticus*-assoziierte Hepatitis zu sein, wohingegen andere Stämme (C57BL/6NCr, B6C3F1) resistent dagegen sind (WARD *et al.*, 1994a). In neueren Studien wurde bewiesen, dass eine Infektion von bestimmten Knockout-Mäusen mit *H. hepaticus* zu einem

Fortschreiten der Darmerkrankungen von Entzündung über Dysplasie bis hin zum Karzinom führt. Da das Zoonosepotential von *H. hepaticus* nach wie vor nicht hinreichend geklärt ist, wird daher vermutet, dass die Infektion auch einen hohen Risikofaktor für die Entstehung von Darmkrebs beim Menschen darstellt (GE *et al.*, 2019). Ebenfalls wurde bereits 2009 festgestellt, dass *H. hepaticus* eine tragende Rolle in der Progression verschiedener Lebererkrankungen beim Menschen darstellt (HAMADA *et al.*, 2009) und zudem an der Pathogenese der humanen Leberzirrhose beteiligt zu sein scheint (MURAKAMI *et al.*, 2011).

Da *H. hepaticus* nicht nur mit einer Prävalenz von 12,37 % (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2009) bis 26 % (LOFGREN *et al.*, 2012) in Versuchsaumhaltungen nachgewiesen werden kann, sondern auch in der Bedeutung von Tiermodellen hinsichtlich der Entstehung von chronischen Lebererkrankungen und Krebsgeschehen eine große Rolle spielt, wurde dieser Keim für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt.

### 1.3. *Helicobacter muridarum*

Bereits 1983 konnte durch PHILLIPS und LEE (PHILLIPS und LEE, 1983) *H. muridarum* als erste murine *Helicobacter*-Spezies aus der Darmschleimhaut von Wistar-Ratten und BALB/c-Mäusen isoliert werden, die Klassifizierung erfolgte jedoch erst fast ein Jahrzehnt später (LEE *et al.*, 1992). *H. muridarum* ist ca. 0,5-0,6 × 3,5-5 µm groß, besitzt 10-14 bipolare Geißelbüschel (siehe Abb. 4) und kolonisiert primär Ileum und Zäkum, kann aber auch die Magenschleimhaut von älteren Nagern befallen (FOX *et al.*, 1994). Das Bakterium dient für Versuche im Tiermodell unter anderem für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Dadurch können die zugrunde liegenden Immunantworten und die genetischen Faktoren, die die Anfälligkeit für solche Erkrankungen beeinflussen, näher erforscht werden.

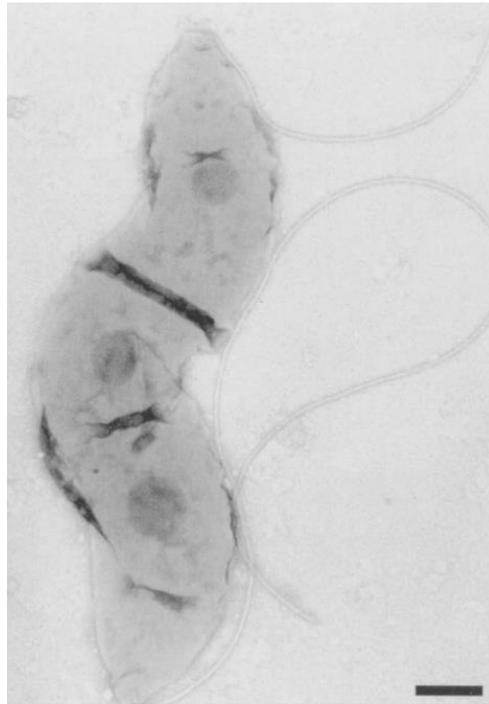


**Abb. 4:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. muridarum* mit den sichtbaren periplasmatischen Fasern (pf) sowie den bipolaren Geißel-Büscheln (fa), (PHILLIPS und LEE, 1983).

#### 1.4. *Helicobacter rodentium*

*H. rodentium* konnte erstmalig 1997 im Zuge eines routinemäßigen Health Monitorings aus dem Darmtrakt von Mäusen isoliert werden und wurde aufgrund biochemischer und phänotypischer Eigenschaften als erste Urease-negative murine *Helicobacter*-Spezies klassifiziert (SHEN *et al.*, 1997). Das Bakterium ist ca.  $0,3 \times 1,5-5 \mu\text{m}$  groß, besitzt jeweils eine bipolare Geißel ohne periplasmatische Fasern (siehe Abb. 5) und wurde ebenfalls aus Zäkum und Kolon von Versuchsmäusen nachgewiesen (SHEN *et al.*, 1997).

Eine alleinige Infektion mit *H. rodentium* führt nicht zu histologischen Veränderungen in Leber und Zäkum und auch zu keinem Anstieg von Zytokinen im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollgruppen und scheint deshalb als Monoinfektion keine pathologische Relevanz zu besitzen. Bei einer zusätzlichen Infektion mit *H. hepaticus* wurde ein geringeres Körpergewicht der Versuchstiere ebenso wie flüssiger Zäkuminhalt festgestellt (MYLES *et al.*, 2004).



**Abb. 5:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. rodentium* (SHEN *et al.*, 1997).

### 1.5. *Helicobacter typhlonius*

Im Jahr 1999 wurde eine weitere *Helicobacter*-Spezies aus Darmproben genetisch veränderter Mäuse mit IBD-ähnlichen Symptomen isoliert (FOX *et al.*, 1999). Es misst  $0,3 \times 2-3 \mu\text{m}$  und besitzt jeweils eine bipolare Geißel, die keine periplasmatischen Fasern beinhaltet (siehe Abb. 6).

*H. typhlonius* wurde von FRANKLIN *et al.* aus dem Kot von BALB/c Mäusen isoliert und charakterisiert (FRANKLIN *et al.*, 1999). Nach der Entdeckung von *H. rodentium* im Jahr 1997 ist dieses Bakterium die zweite Urease-negative *Helicobacter*-Spezies (siehe Tab. 2). Eine experimentelle Infektion mit diesem Bakterium führt bei Versuchsmäusen zu einer proliferativen Typhlokolitis mit Entzündungen im Zäkum und Kolon (FRANKLIN *et al.*, 2001).



**Abb. 6:** Negativaufnahme von *H. typhlonius* mit jeweils einer bipolaren Geißel (FOX *et al.*, 1999).

## **2. Probenentnahmemethoden zur Untersuchung auf *H. hepaticus***

Im Folgenden werden Methoden zur Probenentnahme zum Nachweis von *H. hepaticus* beschrieben. Hierfür sind Proben direkt vom Tier möglich (Blut-, Kot- sowie Gewebeproben) als auch Proben aus der Umwelt des Versuchstieres (EAD sowie aus der Käfigumgebung gewonnene Proben).

### **2.1. Blutproben**

Im Durchschnitt beträgt das Gesamtblutvolumen der Maus ungefähr 6 – 8 % ihres Körpergewichtes. Je nachdem, welche Blutmengen benötigt werden, kann aus verschiedenen Lokalisationen gewählt werden. Für kleinere Blutmengen (0,02 – 0,04 ml) eignet sich die Punktion der Schwanzvene. Für größere Blutmengen (bis zu 300 µl bei größeren Mäusen mit ca. 50g Körpergewicht) kann am wachen Tier die *V. facialis* am Unterkiefer verwendet werden. Am narkotisierten Tier kann in Ausnahmefällen der retrobulbäre Venenplexus oder der Venenwinkel gewählt werden (DÜLSNER *et al.*, 2017).

Bei einer terminalen Blutentnahme (0,7 – 1,0 ml), die zwingend in Narkose durchgeführt werden muss, überlebt die Maus die Prozedur nicht. Diese wird durchgeführt, wenn große Blutmengen benötigt werden oder andere Methoden

nicht praktikabel sind. Als mögliche Lokalisationen kommen das Herz oder die *V. cava* und Aorta in Frage (DÜLSNER *et al.*, 2017).

Wird nur eine kurze Anästhesie benötigt, erfolgt diese in der Regel mittels einer Isofluran-Inhalationsnarkose im Verdampfer. Sollte eine längere Betäubung vonnöten sein, kann eine Ketamin/Xylazin-Injektion verwendet werden (FLECKNELL, 2009; PARASURAMAN *et al.*, 2010) oder eine vollantagonisierbare Anästhesie durch Kombination aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (FLEISCHMANN *et al.*, 2016) durchgeführt werden.

## 2.2. Kotproben

Auch durch die DNA-Extraktion aus Kotproben und anschließender PCR lässt sich *H. hepaticus* nachweisen, wie unter anderem NEUBERT *et al.* 2022 gezeigt haben. In dieser Studie wurden sowohl weibliche als auch männliche BALB/cOlaHsd und C57Bl/6JolaHsd-Mäuse in einem Alter von vier Wochen bis sechs Monaten in die Versuche mit einbezogen. Die Tiere wurden für die Kotprobenentnahme auf einem Gitter abgesetzt und auf den aktiven Kotabsatz gewartet. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass das Bakterium selbst in niedriger Konzentration ( $2 \times 10^2$  Bakterien) zuverlässig nachgewiesen werden konnte und die Methode eine Sensitivität und Spezifität von 100 % zeigte.

## 2.3. Gewebeproben

Um Gewebeproben aus Leber, Galle oder Darm zur Detektion von *H. hepaticus* gewinnen zu können, muss das Tier zuvor zwingend euthanasiert werden. Unmittelbar darauf erfolgt eine Nekropsie, bei der die notwendigen Gewebeproben entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet werden (WARD *et al.*, 1994b; WHARY *et al.*, 1998). Aus diesem Paraffinblock können dünne Schnittpräparate (ca. 3  $\mu\text{m}$ ) angefertigt und mit unterschiedlichen Farbstoffen (z. B. Hämatoxylin und Eosin oder Silberfärbung) histochemisch angefärbt werden. Im Anschluss erfolgt die histologische Untersuchung unter dem Mikroskop.

## 2.4. Umweltproben (Environmental Samples)

Alle der oben genannten Methoden setzen voraus, dass die Tiere zumindest gehandhabt werden müssen und teilweise sogar eine Euthanasie vonnöten ist, um Proben gewinnen zu können. Bei invasiven Methoden wie der Blutentnahme (BUTT *et al.*, 2023) ist das Handling und die Blutentnahme selbst als Stress für die

Versuchsmäuse einzustufen (WHITTAKER und BARKER, 2020).

Um die Tiere nicht einem unnötigen Stress durch teils schmerzhafte Manipulationen (z. B. bei der Blutprobengewinnung) auszusetzen und sie in ihrem gewohnten Umfeld belassen zu können, ist die Umweltprobennahme ein geeignetes Mittel zur Gewinnung von Probenmaterial. Diese bezieht sich im Rahmen des regulären Health Monitorings auf die systematische Sammlung und Analyse von Proben, die nicht vom Tier selbst stammen, sondern aus der Umgebung, in der die Tiere gehalten werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Proben allesamt nicht-invasiv gewonnen werden können und zudem keine Notwendigkeit mehr besteht, zusätzliche Sentineltiere zu halten.

#### **2.4.1. EAD**

Die Probenahme aus Abluftstaub wird seit einigen Jahren als zuverlässige und leicht durchzuführende Methode für verschiedene Pathogene angeführt. Üblicherweise werden für diese Art der Probenahme kleine Gazestücke auf den Vorfilter der Lüftungseinheit gepinnt und diese nach einer bestimmten Abluftstaub-Akkumulationszeit auf die gewünschten Keime untersucht (MILLER *et al.*, 2016a; ZORN *et al.*, 2017; MILLER und BRIELMEIER, 2018; KÖRNER *et al.*, 2019).

Im Zuge dieser Studien konnte herausgefunden werden, dass sich diese Methode u. A. für den Nachweis von [*P.*] *pneumotropica* (MILLER *et al.*, 2016a), dem murinen Astrovirus, der Milbe *Myocoptes musculus* (KÖRNER *et al.*, 2019), dem murinen Norovirus (ZORN *et al.*, 2017) sowie *Aspicularis tetraptera*, *Pasteurellaceae*, *Tritrichomonas* und weiteren Keimen (MILLER und BRIELMEIER, 2018) eignet.

Für *H. hepaticus* konnte dieser Nachweis bereits 2016 durch MILLER *et al.* erbracht werden (MILLER *et al.*, 2016b). Dieser zeigte durch die oben genannte Methode, dass eine Besiedelung der Gaze mit *H. hepaticus* bereits eine Woche nach Einsetzen der *H. hepaticus*-positiven Tiere in das Rack nachweisbar war.

#### **2.4.2. Aus der Käfigumgebung gewonnene Proben**

Eine weitere Möglichkeit der Testung von Umweltproben ist die Beprobung der Käfigumgebung durch z. B. Abstrichtupfer oder Medien, die direkt in den Käfig gegeben werden.

Dies konnte auf Gattungsebene für *Helicobacter* spp. durch HANSON *et al.* 2021

nachgewiesen werden. In dieser Studie wurden Tupfer und Filtermedien nach dem Zufallsprinzip ohne besondere Positionierung in die Einstreu gegeben und nach 90 Tagen Verweildauer zusammen mit weiteren Tupfern, die am Studienende aktiv durch die Einstreu geführt wurden, untersucht. Es zeigte sich eine Detektionsrate von 100 % für *Helicobacter* spp.

Ebenfalls auf Gattungsebene konnte in einer Studie der Nachweis über *Helicobacter* spp. aus Filtermaterial erbracht werden, das auf der Innenseite des Käfigfilterdeckels angebracht war (DUBELKO *et al.*, 2018).

### **3. Nachweismethoden für murine *Helicobacter*-Arten**

Für den Nachweis von murinen *Helicobacter*-Arten gibt es verschiedene Methoden, die in Forschung und Diagnostik verwendet werden. Die Wahl der Methode hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der erforderlichen Sensitivität, der Verfügbarkeit von Geräten und auch der Art der zu untersuchenden Probe. In vielen Fällen wird eine Kombination aus verschiedenen Nachweismethoden verwendet. Diese können in direkte und indirekte Methoden eingeteilt werden.

#### **3.1. Indirekte Methoden**

Zum Nachweis von Serumantikörpern muriner *Helicobacter*-Arten wird den Mäusen Blut entnommen und mittels ELISA die humorale Immunantwort untersucht.

Die Verwendung eines *H. hepaticus*-Bakterienlysats als Antigen erwies sich zwar als einfach, wurde jedoch hinsichtlich Sensitivität und Spezifität als unzureichend eingestuft (WARD *et al.*, 1994a; WARD *et al.*, 1994b; FOX *et al.*, 1996). Auch in weiterführenden Versuchen, in denen verschiedene Antigene zur Durchführung eines ELISA getestet wurden, konnten keine vollumfänglich zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden (LIVINGSTON, *et al.*, 1999; WHARY *et al.*, 2000c). Zudem wurde festgestellt, dass sowohl Alter als auch Herkunft der Versuchsmäuse einen bedeutenden Effekt auf eine Serokonversion zu haben scheinen (WARD *et al.*, 1994b; FENG *et al.*, 2005) und die Infektion in einem frühen Stadium nicht zuverlässig mittels ELISA nachgewiesen werden kann (HODZIC *et al.*, 2001).

Aufgrund dessen hat sich die serologische Methode nicht etabliert.

### **3.2. Direkte Methoden**

#### **3.2.1. Kulturelle Untersuchung**

Eine Möglichkeit des direkten Nachweises besteht in der kulturellen Anzucht des jeweiligen Keimes. Es werden in der Regel Proben aus Zäkum oder Kolon entnommen, mit PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) homogenisiert und durch eine Membran gefiltert, um mögliche Kommensale größtmöglich zu eliminieren (MÄHLER *et al.*, 1998; WHARY und FOX, 2004). Dieses Filtrat wird sodann auf Blutagarplatten aufgebracht, die zugesetzte Antibiotika (Trimethoprim, Vancomycin, Polymyxin) enthalten, um das Wachstum anderer im Filtrat vorhandener Darmbakterien zu verhindern (RUSSELL *et al.*, 1995). Die Agarplatten werden daraufhin bei 37 °C unter mikroaerophilen Bedingungen (ca. 5 % O<sub>2</sub>) für drei bis sieben Tage inkubiert (WHARY und FOX, 2004). Da murine *Helicobacter*-Arten allerdings keine Kolonien auf den Nährböden bilden, sondern „schwärmen“, ist diese Nachweismethode nur von spezialisierten Laboren durchführbar.

#### **3.2.2. Histologische Untersuchung**

Diese umfasst eine Beurteilung auf entzündliche Veränderungen von Gewebeproben aus Leber, Dickdarm oder Gallenblasenpräparaten. Hierfür werden die Präparate wahlweise mit Hämatoxylin-Eosin (Leber, Dickdarm) oder auch mittels Warthin-Starry oder modifizierter Steiner-Versilberung (Leber, Dickdarm, Gallenblase) angefärbt und anschließend unter dem Mikroskop beurteilt (GARVEY *et al.*, 1985; PATEL, 1993; WHARY und FOX, 2004). Ein großer Nachteil dieser Methode besteht darin, dass ein hoher Arbeitsaufwand erfolgen muss, um die Präparate anzufertigen und mittels Silberfärbung auch andere Organismen des Darmtraktes, die für die Untersuchung nicht von Belang sind, mit angefärbt werden. Eine Differenzierung der verschiedenen murinen *Helicobacter* bis auf Speziesebene ist nicht möglich (JACOBSEN, 2004).

#### **3.2.3. Untersuchung mittels PCR**

Der Erregernachweis mittels PCR ist heute das Mittel der Wahl, um eine Infektion mit murinen *Helicobacter* spp. nachzuweisen. Hierbei kann man zwischen einer gattungsspezifischen und speziesspezifischen PCR unterscheiden. Bei der gattungsspezifischen PCR kann lediglich die Infektion mit *Helicobacter* spp. nachgewiesen werden und keine weitere Differenzierung erfolgen. Hierfür nutzt die

PCR einen Abschnitt des Gens für die bakterielle, ribosomale 16s RNA, der bei allen bisher bekannten murinen *Helicobacter*-Arten identisch ist (DEWHIRST *et al.*, 2000). Bei Verwendung darauf bindender Primer kann somit zuverlässig der Nachweis für eine *Helicobacter*-Infektion erbracht werden.

Soll stattdessen gezielt eine Aussage über die Infektion mit bestimmten *Helicobacter*-Spezies getroffen werden, wird eine speziesspezifische PCR eingesetzt. Auch hier wird das Gen für die bakterielle 16s RNA genutzt, auf dem sich Abschnitte befinden, die charakteristisch für einzelne murine *Helicobacter* sind. *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. rodentium* und *H. typhlonius* können durch ihre individuellen Abschnitte im 16s RNA-Gen gezielt identifiziert werden (SHAMES *et al.*, 1995; FOX *et al.*, 1995; SHEN *et al.*, 1997; FRANKLIN *et al.*, 1999). Ebenfalls für einen speziesspezifischen Nachweis besteht bei *H. hepaticus* die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der Urease-Untereinheiten UreA und UreB zu verwenden (SHEN *et al.*, 1998), wodurch auch eine quantitative Bestimmung mittels realtime-PCR möglich wird. Hierfür werden Primer verwendet, die spezifisch an das UreaseB-Gen von *H. hepaticus* binden. (STERZENBACH, 2006).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden über die hauseigene Sammlung des Institutes für Mikrobiologie der Technischen Universität München bezogen. Diese wurden ursprünglich jeweils aus folgenden Bakterienstämmen angezüchtet: *H. hepaticus* (ATCC 51448), *H. bilis* (Collection de l'Institut Pasteur, CIP 104752T), *H. muridarum* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, DSM 22221), *H. rodentium* (ATCC 700285), *H. typhlonius* (CIP 107729T), *H. pylori* J99, *H. pylori* SS1, *H. pylori* PMSS1, *H. mastomyrinus* (DSM 22886), *H. felis* (ATCC 49179), *Campylobacter coli* (ATCC 33559), *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560), *Arcobacter butzleri* (DSM 8739), *Wolinella succinogenes* (DSM 1740), *Citrobacter rodentium* (ATCC 51459), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Clostridium difficile* (DSM 1296), *Streptococcus salivarius* (DSM 20560), *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016).

Die Anzucht der murinen *Helicobacter* spp. sowie *H. felis* erfolgte auf Columbia 5 % Schafblutagarplatten, die mit jeweils 3 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) überschichtet wurden. Die Platten wurden unmittelbar danach in einen Anaerobentopf (Anaerobentopf AJ9023, OMNI Life Science, Bremen) überführt und unter mikroaerophilen Bedingungen (6 % O<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) zwei bis drei Tage bei 37 °C inkubiert. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Arcobacter butzleri* und *Streptococcus salivarius* wurden ebenso kultiviert.

Für die Anzucht von *Staphylococcus aureus* (Inkubation bei 37 °C für 24 bis 36 Stunden) wurde ebenfalls Columbia 5 % Schafblutagar verwendet, allerdings unter aeroben Bedingungen. Die Kultivierung der *H. pylori*-Stämme erfolgte auf WC-DENT-Selektivagar (Wilkins Chalgren-Agar mit Antibiotikamischung, bestehend aus Vancomycin 5 mg, Trimethoprim Lactat 2,5 mg, Cefsulodin 2,5 mg und Amphotericin B 2,5 mg). Diese Bakterien benötigen mikroaerophile Bedingungen (6 % O<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) bei 37 °C und 2 – 3 Tage für ihr Wachstum. Sowohl *Citrobacter rodentium* als auch *Escherichia coli* wurden auf CASO-Agarplatten (Casein-Soja-Platten, jeweils aus Pankreas- bzw. Papainhydrolysat) bei 37 °C unter aeroben Bedingungen kultiviert. *Wolinella succinogenes* wurde

anaerob in einem Anaerobiergefäß (H<sub>2</sub> 10 %, CO<sub>2</sub> 10 %, N<sub>2</sub> 80 %) bei 37 °C auf einem pH-neutralen *Wolinella*-Medium angezüchtet. *Clostridium difficile* konnte sowohl auf Chopped-Meat-Medium als auch Fastidious-Anaerobe-Agarplatten unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert werden. *Lactobacillus reuteri* wurde zu den gleichen Bedingungen auf MRS-Agarplatten angezüchtet.

## 2. DNA-Extraktionskits

Um eine maximale Ausbeute an *H. hepaticus* DNA zu erreichen, wurden sechs verschiedene im Handel erhältliche DNA-Extraktionskits hinsichtlich Handhabung und DNA-Ertrag miteinander verglichen. Zum Stand der durchgeführten Studie war lediglich ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit offiziell für die Analyse von Umweltproben deklariert (Qiagen DNeasy PowerWater Kit). Das Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Kit sowie das ZymoResearch Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit wurden beide für die Extraktion von bakterieller DNA entwickelt; das ZymoResearch Kit extrahiert zusätzlich auch DNA aus Pilzen. Das Norgen Blood DNA Isolation Kit ist für die Extraktion von DNA aus Blut bestimmt. Das Biotechrabbit GenUP gDNA sowie das Lucigen MasterPure Complete DNA and RNA Kit sind beide für die Extraktion von DNA aus Gewebeproben entwickelt worden.

Die Extraktion der DNA wird in allen verwendeten Kits durch eine chemische Zelllyse in Verbindung mit Temperatur (alle außer ZymoResearch), Enzymen (Analytik Jena, Biotechrabbit, Lucigen) oder mechanischem Aufschluss (Zymo Research, Qiagen) erreicht.

Um die Ergebnisse der Untersuchung der DNA-Extraktionskits miteinander vergleichen zu können, wurde für jede Beprobung der unterschiedlichen Kits die gleiche Bakterienkonzentration von  $2 \times 10^8$  *H. hepaticus* pro Milliliter gewählt.

In Tabelle 3 sind die verwendeten DNA-Extraktionskits mit samt ihrer Eigenschaften aufgelistet.

**Tab. 3:** Eigenschaften der sechs verschiedenen DNA-Extraktionskits.

<b>Extraktionskit</b>	<b>Zielmaterial</b>	<b>Art der Zellyse</b>	<b>Zeit bis Fertigstellung</b>
Zymo Research Quick-DNA Fungal / Bacterial Kit	Bakterien, Pilze	mechanisch, Lyse-Puffer	1,5 – 2 Stunden
Qiagen DNeasy Power Water Kit	Umweltproben	mechanisch, Lyse-Puffer, Temperatur	2 Stunden
Norgen Blood DNA Isolation Kit	Blut	Lyse-Puffer, Temperatur	2,5 Stunden
Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Kit	Bakterien	Lyse-Puffer, Temperatur, Lysozym, Proteinase	1 Stunde
Biotechrabbit GenUP gDNA Kit	Gewebeproben	Lyse-Puffer, Temperatur, Proteinase	1,5 – 2 Stunden
Lucigen MasterPure Complete DNA/RNA Kit	Gewebeproben	Lyse-Puffer, Temperatur, Proteinase	2,5 Stunden

### 3. Materialien zur Gewinnung von Umweltproben

Es wurden fünf verschiedene Probenmaterialien darauf getestet, wie gut sie sich für die Gewinnung von Umweltproben und der darauffolgenden DNA-Extraktion eignen. Da MILLER *et al.* (2016b) bereits zeigen konnten, dass sich Gaze als Medium für Umweltproben hervorragend eignet, wurde diese als Referenzmaterial festgelegt. Zusätzlich dazu wurden einfache Wattetupfer, Millipore® Filterpapier, Vorfilter aus den Belüftungsgeräten sowie Cellulose-Nistmaterial (sog. 'Nestlet') getestet.

Als Material für Gaze wurden handelsübliche 8-lagige Kompressen (ES Kompressen, Fa. Hartmann) verwendet, die jeweils auf eine Größe von  $1,5 \times 1,5$ cm zugeschnitten wurden; als Tupfer dienten sterile Applikatoren der Fa. Boettger.

Filterpapier wurde von der Fa. Merck Millipore mit einem Durchmesser von 13mm und dem Filtertyp 0,45  $\mu$ m geliefert. Der Vorfilter aus den Belüftungsgeräten stammt von der Fa. Tecniplast und wurde ebenfalls auf  $1,5 \times 1,5$ cm zugeschnitten; als Nestlet wurden jeweils 50 mg Arbocel Roll von der Fa. Rettenmaier & Söhne verwendet.

Eine Übersicht über die verschiedenen verwendeten Umweltprobenmaterialien ist in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tab. 4:** Eigenschaften der fünf verschiedenen Umweltprobenmaterialien.

Probenmaterial	Name des Probenmaterials	Hersteller	verwendete Größe
Gaze	ES Kompressen, steril	Hartmann, Heidenheim, Deutschland	1,5 x 1,5cm
Tupfer	Sterile Applikatoren	Boettger, Bodenmais, Deutschland	Tupferkopf 5,5mm Ø
Filterpapier	Millipore® Express Plus	Merck Millipore, Cork, Irland	13mm Ø Filtertyp 0,45µm
Vorfilter	Tecniplast Easyflow Prefilter	Tecniplast, Buggugiate, Italien	1,5 x 1,5cm
Nestlet	Arbocel Roll	Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland	50mg

#### 4. Extraktionsprotokoll

Um die Testergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde jedem Probenmaterial eine definierte Menge an *H. hepaticus*-DNA zugegeben (sog. 'spiking').

Anfangs wurde ein initiales DNA-Extraktionsprotokoll verwendet, das je nach Fortschritt der Untersuchungen und deren Ergebnisse weiter verfeinert wurde, so dass schlussendlich exakt feststand, welche Mengen, welche Probengefäße und welche Schritte notwendig waren, um zuverlässige und aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

##### 4.1 Initiales Protokoll

Zuerst wurde ein einfaches Extraktionsprotokoll verwendet, das als grober Rahmen diente, um die DNA-Extraktion aus den jeweiligen Probenmaterialien untersuchen

zu können.

Die Bakterien wurden nach der Anzucht aufbereitet und mit BHI gewaschen, um totes und somit nicht brauchbares Material zu entfernen. Anschließend wurde die Konzentration von *H. hepaticus* in einem Photometer (Eppendorf BioPhotometer 6131) gemessen und auf OD<sub>600</sub> 1 eingestellt, was einer Konzentration von ungefähr  $2 \times 10^8$  Bakterien pro Milliliter entspricht. Falls notwendig, z. B. für die Bestimmung der geringstmöglichen Nachweisgrenze im Rahmen des erfolgten In-house-Validationsprozesses, wurden Verdünnungsreihen in BHI in der jeweils benötigten Konzentration angelegt.

Um festzustellen, welches Probengefäß sich am besten eignen würde, wurden die Probenmaterialien sowohl in 1,5ml Eppendorf-Tubes (Eppendorf Microtubes) als auch in 15ml Cellstar Tubes (Cellstar sterile tube) verbracht und dort mit jeweils 10 µl der jeweils benötigten Konzentration *H. hepaticus* Bakteriensuspension gespiked.

Anschließend wurde den Eppendorf Tubes 1ml, den Cellstar Tubes 3ml PBS hinzugefügt und per Hand geschüttelt. Danach wurden die Probenmaterialien mithilfe eines Soft-Loops (sterile soft loop) aus dem jeweiligen Gefäß entfernt und anschließend für zehn Minuten bei 8500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in Nuklease-freiem-Wasser (NFW, Promega) resuspendiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde das jeweilige Protokoll des DNA-Extraktionskits verwendet.

#### **4.2 Verbessertes Protokoll**

Zusätzlich zu den Tests, welches Probengefäß sich am besten eignen würde, wurde untersucht, ob sich eine zusätzliche Vorbehandlung des Probenmaterials nach dem Spiking als hilfreich hinsichtlich verbesserter Ergebnisse zeigen würde. Nach persönlicher Empfehlung des Bayerischen Landeskriminalamtes für „schwierige Proben“ (persönliche Mitteilung, 01.10.2019) wurde dem Probenmaterial direkt nach dem Spiking 0,1 % Tween-20 (Merck KGaA) und 1 M Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich) zugegeben und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Eppendorf Tubes befanden sich dafür bei 900 rpm auf einem Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf), die Cellstar Tubes bei 40 rpm auf einem Mixing Rotor (Variospeed, Renner GmbH). Danach wurde mit dem initialen Protokoll (4.1) fortgefahren.

## 5. Aufbau der PCR und Durchführung

Für eine optimale Zusammensetzung der Reaktionslösung, die die besten Amplifikationsergebnisse erzielte, wurde folgende Mischung verwendet:

- 10 µl GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, USA). Enthält Taq-Polymerase (thermostabiles Enzym, das die DNA-Synthese während der PCR katalysiert), dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate als Bausteine für die Synthese der neuen DNA-Stränge), Pufferlösung (für optimale Bedingungen der Taq-Polymerase), Magnesiumchlorid (Kofaktor für eine optimale Enzymaktivität), Färbemittel (für spätere Visualisierung der PCR-Produkte auf dem Agarosegel)
- 1 µl des jeweiligen Primers
- 9 µl der Probe

Dies ergab ein Gesamtvolumen von 20 µl.

Die eigentliche PCR fand in einem BioRad C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, USA) mit folgenden Parametern statt:

1. Initialer Denaturierungsprozess bei 95 °C für fünf Minuten
2. Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden
3. Primeranlagerung bei 55 °C für 30 Sekunden (*H. hepaticus*) bzw. 58 °C für 30 Sekunden (*H. spp*)
4. Elongation bei 72 °C für eine Minute
5. Letzte Elongation bei 72 °C für fünf Minuten

Die Schritte 2 bis 4 wurden in insgesamt 39 Zyklen wiederholt.

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Primer-Sets verwendet, die beide von Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen wurden. Für die Detektion von *Helicobacter* spp. wurde ein Primersatz von BÜCHLER (2010) verwendet, als Primer für die Detektion von *H. hepaticus* diente ein Primersatz von NEUBERT *et al.*, 2022 (Tabelle 5):

**Tab. 5:** Übersicht über die verwendeten Primer.

Bakterienspezies	Primersequenz (5' zu 3')	Amplikonlänge	Ziel-Gen
<i>Helicobacter</i> spp.	f: GCCTATGTCCTATCAGCTTGTTGG r: CAAAAGGAGTTTACAATCCTAAAACCTTC	210 bp	16s RNA
<i>H. hepaticus</i>	f: GAGCCTCAAAGGTTTATAGC r: CTATTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC	657 bp	p52

## 6. Visualisierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden durch eine Gelelektrophorese visualisiert. Hierfür wurde ein 1,2-prozentiges Gel gegossen, welches aus 100ml BHI und 1,2g Agarose-Gel (Sigma Agarose Gel, Sigma-Aldrich, USA) bestand und mit dem Färbemittel Roti®-Safe (Roti® GelStain, Roth, D) versetzt wurde. Hier handelt es sich um einen unter ultraviolettem Licht fluoreszierenden Farbstoff, der die Nukleinsäuren im Agarosegel anfärbt. Als Alternative zu Ethidiumbromid, welches stark mutagen wirkt, wird dieser Farbstoff mittlerweile als Standard genutzt. Hierbei wird eine Vorwärtsfärbung verwendet, in der das Färbemittel direkt zur Gelmatrix hinzugefügt wird, bevor das Gel gegossen wird. Um eine deutliche Trennung der jeweiligen Banden zu erreichen, wurde eine Spannung von 90 V für 50 Minuten angelegt.

Visualisiert wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht durch den Bio-Rad GelDoc® XR + Imager, Bio-Rad, USA). In jedem Experiment wurde eine 100 bp DNA-Leiter benutzt (BenchTop 100bp DNA ladder, Promega, USA). Diese dient als molekularer Größenstandard, um die Banden der PCR-Produkte mit denen der Leiter zu vergleichen und so ihre Größe abschätzen zu können. Die erwartete Größe der PCR-Produkte lag bei 657 bp für *H. hepaticus* sowie 210 bp für *H. spp.*

## 7. Validierung

Um die erprobte Methodik zu analysieren, wurde ein interner Validierungsprozess durchgeführt, der auf den Empfehlungen von RABENAU *et al.* (2007), NEWMAN und MARITZ (2017) sowie NEUBERT *et al.* (2022) basiert. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob die Methode zuverlässige und wiederholbare Ergebnisse lieferte und deshalb als Grundlage für spätere externe

Validationsprozesse dienen. Es wurden die folgenden Parameter untersucht: Niedrigstes Nachweislimit, Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Präzision, Reproduzierbarkeit und Robustheit.

### **7.1 Niedrigstes Nachweislimit (LLOD)**

Um die niedrigste Konzentration an *H. hepaticus*-DNA, die gerade noch detektiert werden kann, zu ermitteln, wurde die sogenannte LLOD bestimmt. Diese ist ein wichtiges Maß für die Empfindlichkeit des analytischen Verfahrens. Hierfür wurden Serienverdünnungen mit bekannter Konzentration in der erwarteten LLOD angefertigt und das Probenmaterial damit gespiked. Jede Konzentrationsstufe wurde in Triplets ausgeführt und jeder Lauf dreimal wiederholt.

### **7.2 Sensitivität**

Die Sensitivität ist die Fähigkeit eines Tests, die Anwesenheit des fraglichen Keimes zuverlässig selbst bei sehr geringen Bakterienkonzentrationen nachweisen zu können. Dieser Parameter wurde im internen Validierungsprozess durch zehn positiv (=mehr als 1 log<sub>10</sub> über LLOD) und zehn niedrig positiv (=bis zu 1 log<sub>10</sub> über LLOD) gespikten Proben untersucht. Diese wurde in drei verschiedenen, voneinander unabhängigen Durchgängen wiederholt.

### **7.3 Spezifität**

Eine hohe Spezifität ist wichtig, um sicherstellen zu können, dass der Test möglichst ausschließlich das gesuchte Bakterium erkennt und keine falsch-positiven Ergebnisse liefert. Dies könnte z. B. durch Kreuzreaktionen mit verwandten Organismen der Fall sein, in dem der Test nicht zwischen dem gesuchten Bakterium und der kreuzreaktiven Verbindung unterscheiden kann. Auch könnten durch nicht-spezifische Bindungen z. B. mit Bestandteilen der Testkomponenten oder durch Kontaminationen falsche Resultate entstehen und das Ergebnis verfälschen.

Um die Spezifität des Tests bestimmen zu können, wurden 20 verwandte, potentiell kreuzreagierende oder ubiquitär vorkommende Bakterienarten oder -stämme ausgewählt.

Gram-negative Bakterien:

- *Helicobacter hepaticus*

- *H. bilis*
- *H. muridarum*
- *H. rodentium*
- *H. typhlonius*
- *H. pylori* J99
- *H. pylori* SS1
- *H. pylori* PMSS1
- *H. mastomyrinus*
- *H. felis*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Arcobacter butzleri*
- *Wolinella succinogenes*
- *Citrobacter rodentium*
- *Escherichia coli*

Gram-positive Bakterien:

- *Staphylococcus aureus*
- [*Clostridium*] *difficile*
- *Streptococcus salivarius*
- *Lactobacillus reuteri*

Die Proben wurden mit einer hohen Konzentration an jeweiliger Bakteriensuspension gespiked ( $2 \times 10^5$  Bakterien pro Milliliter) und dreimal in unabhängigen Durchläufen wiederholt.

#### **7.4 Genauigkeit**

Die Genauigkeit eines Tests beschreibt die Nähe der gemessenen Werte zu einem bekannten Referenzwert. In diesem Fall wurden sieben positiv-, sieben niedrig positiv- und sieben negativ-gespikete Proben von Gaze und Tupfer untersucht und miteinander verglichen. Der Test wurde in drei separaten Durchläufen wiederholt.

#### **7.5 Präzision**

Bei der Präzision wird überprüft, ob der Test gleichbleibende Ergebnisse liefert, wenn mehrere Aliquote derselben Probe mehrmals gemessen werden. Hierbei wird

zwischen Intra-Präzision und Inter-Präzision unterschieden. Bei der Intra-Präzision wurde dieselbe Probe (einmal positiv- und einmal schwach positiv-gespiked) dreimal innerhalb eines Durchgangs getestet, wohingegen bei der Inter-Präzision ebenfalls eine Probe (einmal positiv- und einmal schwach positiv-gespiked) dreimal innerhalb eines Durchgangs und an drei verschiedenen Tagen getestet wird.

### **7.6 Reproduzierbarkeit**

Dieser Validierungsparameter gibt die Fähigkeit eines Tests an, konsistente Ergebnisse zu liefern, selbst wenn dieser unter anderen Bedingungen durchgeführt wird. Hierfür führten das Protokoll zwei verschiedene Personen an drei unterschiedlichen Tagen durch, es wurden drei verschiedene PCR-Cycler benutzt und die Testung in zwei unabhängigen Laboren vorgenommen. Es wurde jeweils eine positiv- und eine niedrig positiv-gespikte Probe verwendet, die in drei voneinander unabhängigen Durchläufen getestet wurde.

### **7.7 Robustheit**

Um feststellen zu können, wie lange sich *H. hepaticus* nachweisen lässt, wenn sich die Temperaturen ändern, wurden jeweils drei positiv-, schwach positiv- und negativ gespikte Proben bei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur sowie -20 °C und -80 °C) für eine bestimmte Zeitspanne aufbewahrt. Die Proben, die auf Raumtemperatur gelagert waren, wurden an Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 10 auf *H. hepaticus*-DNA untersucht. Die eingefrorenen Proben wurden nach Tag 10 mit dem bekannten Protokoll untersucht.

## IV. PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE

### 1. Veröffentlichung Sutterer *et al.* 2024

Ann-Katrin Sutterer<sup>1</sup>, Michael H. Erhard<sup>2</sup>, Behnam Kalali<sup>1</sup>, Karin Seidel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München

<sup>2</sup>Veterinärwissenschaftliches Department, Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Establishment and pre-validation of a method for the detection of *Helicobacter hepaticus* in swab samples from experimental mouse facilities: an *in vitro* study**

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, Ausgabe 137

DOI: 10.2376/1439-0299-2024-3

Eingereicht am: 27.03.2024

Angenommen am: 27.06.2024

Veröffentlicht am: 23.07.2024



DOI 10.2376/1439-0299-2024-3

<sup>1</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Technical University of Munich (TUM), Germany<sup>2</sup>Department of Veterinary Sciences, Chair of Animal Welfare, Animal Behaviour, Animal Hygiene and Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich (LMU), Germany

Peer-reviewed | Eingegangen: 27.03.2024 | Angenommen: 27.06.2024 | Veröffentlicht: 23.07.2024

## Establishment and pre-validation of a method for the detection of *Helicobacter hepaticus* in swab samples from experimental mouse facilities: an in vitro study

Ann-Katrin Sutterer<sup>1</sup>, Michael H. Erhard<sup>2</sup>, Behnam Kalali<sup>1</sup>, Karin Seidel<sup>1</sup>

Korrespondenzadresse: Ann-katrin.sutterer@outlook.de

**Summary** Efficient and reliable detection of pathogens such as *Helicobacter (H.) hepaticus* is highly relevant for the hygiene management of experimental animal facilities. Common practice in health monitoring is the analysis of samples obtained from so-called indicator animals (sentinels) in the facility at regular intervals. The use of these animals can be avoided by an alternative sampling method in which the sample is taken from the environment of the laboratory animals and therefore they do not need to be handled.

In this study, five sample materials (gauze, swabs, Millipore filterpaper, prefilter from air handling unit, nestlet) and six different DNA extraction kits were compared to detect *H. hepaticus* in environmental samples by PCR. The method providing the best and most consistent results was selected, and a protocol was established to obtain reliable PCR results with the lowest possible amount of *H. hepaticus* DNA. In spiking experiments, in which a known amount of bacteria was added to the sample material, the swab material in combination with the Analytik Jena DNA extraction kit proved to be most suitable one for obtaining *H. hepaticus*-DNA from environmental samples. To validate the method, an in-house validation process including sensitivity, specificity, accuracy, precision, reproducibility and robustness of the method was performed. Based on these results, environmental sampling using this protocol can provide a basis for subsequent field studies and thus constitute a potential alternative to the need for sentinel animals in hygiene monitoring. It therefore represents a promising tool for the detection of *H. hepaticus* as part of routine health monitoring in experimental animal facilities.

**Keywords** environmental sample, 3R, health monitoring, alternative method, PCR

### *Etablierung und Prä-Validierung einer Methode zum Nachweis von Helicobacter hepaticus in Tupferproben aus experimentellen Maushaltungen: Eine In-vitro-Studie*

**Zusammenfassung** Ein effizienter und zuverlässiger Nachweis von Krankheitserregern wie *Helicobacter (H.) hepaticus* ist von großer Bedeutung für das Hygienemanagement von Versuchstierhaltungen. Übliche Praxis der Gesundheitsüberwachung ist die Analyse von Proben, die von sogenannten Anzeigertieren (Sentinels) in Versuchstiereinrichtungen in regelmäßigen Abständen gewonnen werden. Der Einsatz dieser Tiere kann durch eine alternative Probenahme vermieden werden, bei der die Proben aus der Umgebung der Versuchstiere entnommen werden und diese daher nicht gehandhabt werden müssen.

In der vorliegenden Studie wurden fünf Probenmaterialien (Gaze, Tupfer, Millipore-Filterpapier, Vorfilter aus der Lüftungsanlage, Nestlet) und sechs verschiedene DNA-Extraktionskits zum PCR-Nachweis von *H. hepaticus* aus Umweltproben verglichen. Die Methode, die die besten und konstantesten Ergebnisse lieferte, wurde ausgewählt und ein Protokoll erstellt, um zuverlässige PCR-Ergebnisse mit der geringstmöglichen Menge an *H. hepaticus*-DNA zu erhalten. In Spiking-Experimenten, bei denen dem Probenmaterial eine bekannte Menge an Bakterien zugesetzt wurde, erwies sich das Material Tupfer in Kombination mit dem DNA-Extraktionskit von Analytik Jena als am besten geeignet, um *H. hepaticus*-DNA aus Umweltproben zu gewinnen. Zur Validierung der Methode wurde ein interner Validierungsprozess durchgeführt, der Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Präzision, Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methode beinhaltet. Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Umweltprobennahme mit diesem Protokoll als Grundlage für nachfolgende Feldstudien dienen und somit eine potenzielle Alternative zum Einsatz von Sentineltieren bei der Hygieneüberwachung bilden. Sie stellt somit ein vielversprechendes Werkzeug für die Detektion von *H. hepaticus* bei der routinemäßigen Gesundheitsüberwachung in Versuchstiereinrichtungen dar.

**Schlüsselwörter** Umweltprobe, 3R, Gesundheitsüberwachung, alternative Methode, PCR

## Introduction

*Helicobacter (H.) hepaticus* is a spiral-shaped gram-negative bacterium that belongs to the group of enterohepatic *Helicobacter* species. In mice, it primarily colonises the crypt epithelium of colon and caecum, but can also spread to the liver parenchyma and bile ducts (Fox et al. 1994, Sterzenbach 2006). *H. hepaticus* was discovered by chance in 1992 in mouse control groups used in a carcinogenesis study at the US National Cancer Institute; the mice in these groups showed an unusually high rate of hepatocellular tumours and chronic active hepatitis (Fox et al. 1994). Experiments clearly established that *H. hepaticus* was excreted and absorbed via the faecal-oral route (Livingston et al. 1998, Whary et al. 2000b). The researchers assumed that mice, as autocoprophages, orally ingest the pathogen, excrete it via the faeces and thus become infected. In these infection experiments indicator animals (so called 'sentinels') were kept on soiled bedding from *H. hepaticus*-positive animals for a certain period (so-called 'soiled-bedding-sentinels', SBS). Sixty-six percent of the experimental mice were *H. hepaticus* positive according to faecal PCR tests after two weeks of exposure, and all mice were positive four weeks after beginning of the study (Livingston et al. 1998). Whary et al. (2000a) also found all mice to be positive for *H. hepaticus* with PCR testing of faeces and caecal scrapings after four weeks. In addition, the presence of *H. hepaticus* antigens was demonstrated by a positive serology outcome in this study. These results indicate that soiled bedding serves as a vector for the faecal-oral transmission of *H. hepaticus*.

Considering the rapid infection rates and high prevalence (12,37%) of *H. hepaticus* in experimental mouse facilities (Pritchett-Corning et al. 2009), identifying *H. hepaticus*-infected animals quickly and reliably is important to prevent invalidation of research data obtained from infected mice. Infections during ongoing experiments would necessitate the inclusion of immunological responses in the research results which may alter the outcome of the conducted tests. It is also important for animal welfare reasons to prevent unnecessary repetition of experiments and hence the use of more laboratory animals. In addition, infection of receptive hosts – mostly immunodeficient mice – with *H. hepaticus* can cause various diseases such as necrotic hepatitis (Fox et al. 1994), typhlitis and hepatic carcinoma (Whary et al. 2000a) or colitis (Fox et al. 2011). Furthermore, there is still no certainty as to whether *H. hepaticus* has zoonotic potential (Falsafi and Mahboubi 2013), and therefore an efficient identification and elimination of infected animals is important to prevent transmission of *H. hepaticus* to other experimental animals and to humans. Considering these issues, the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), which regularly publishes recommendations for the health monitoring of experimental animals, added annual testing for *Helicobacter* spp. to the FELASA test panel for mice in 2002 (Nicklas et al. 2002) and in addition recommended quarterly testing in 2014 (Mähler et al. 2014).

Although non-invasive diagnostic methods such as testing of faecal samples collected from the cages are available, a common method to identify these *Helicobacter* species is SBS testing. While this method is currently standard in experimental mouse facilities, it has some significant drawbacks. A major disadvantage is the considerable number of animals required for this procedure. Shipment, husbandry and testing of SBS animals leads to high costs. In addition, the '3R' principle (reduction, refinement, replacement; Burch and Russell 1992) should always be followed in experiments. This ethical guideline is applied in biomedical research and in the field of animal testing within researchers are strongly encouraged to replace all animal-involving experiments with animal-free alternatives whenever possible. Another disadvantage is that not all infectious diseases can be transmitted to SBS. Compton et al. (2004) were able to prove that diseases which are not transferred via the faecal-oral route, such as Sendai virus, do not manifest in SBS. Miller et al. (2016a) came to the same conclusion for the transmission of *Pasteurella [P.] pneumotropica*.

For the reasons described above, intensive research has been conducted into alternative sampling methods obtained at the level of the individually ventilated cage (IVC) racks, which do not require prior pathogen transfer to sentinel animals and could therefore potentially have a positive effect on the diagnostic sensitivity of the test. IVC is a housing system to maintain laboratory animals in a controlled environment. Each cage is equipped with its own ventilation system, which enables better control of environmental factors such as temperature, humidity and air quality. Variations can impact animal health as well as research outcomes and must be avoided by permanent monitoring. Possible sampling locations are the air handling unit (AHU), its exhaust hose or the cage itself as described by Dubelko et al. (2018) for filter paper from IVC cage lids and by Hanson et al. (2021) for media placed in soiled bedding. Another option of such environmental sampling is testing dust from the cage exhaust air system (exhaust air dust sampling, EAD sampling). This is performed directly by testing dust from the prefilter or indirectly by testing gauze pieces pinned onto the prefilter of the air handling unit.

The suitability of EAD for pathogen sampling has been established in various studies: Miller et al. (2016a) succeeded in detecting *[P.] pneumotropica* by EAD testing. Zorn et al. (2017) detected murine norovirus using this method, and Körner et al. (2019) demonstrated that murine astrovirus and the mite *Myocoptes (M.) musculus* can be detected by EAD testing. In 2016, *H. hepaticus* was detected for the first time using the EAD method of Miller et al. (2016b). To avoid blowing dust from the AHU into the room and contaminating the environment, the air circulation must be turned off for the period of sampling and cages are disconnected from fresh air supply for this time. This type of sampling can therefore be easily combined with routine cleaning procedure of the cages, as EAD sampling requires a certain waiting time anyway, as the potentially infectious dust must accumulate in the materials before it can be examined. Miller et al. (2016a) state a suitable waiting time of one week for gauze and two weeks for prefilters. Körner et al. (2019)

also postulate a one-week waiting period for gauze. Moreover, the precision of EAD sampling depends on variable factors, such as the position of the air filter and uniformity of the airflow. Therefore, alternatives to EAD sampling may be useful for more efficient and safer environmental sampling. Because Miller et al. (2016b) had already demonstrated that the detection of *H. hepaticus* from environmental samples works in principle, the aim of the present methodical study was to develop another environmental sample method that is suitable for the reliable, fast and uncomplicated detection of *H. hepaticus*.

## Materials and methods

### Bacteria

*Helicobacter hepaticus* strain ATCC 51448 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and was cultivated on Columbia 5% sheep blood agar (BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D) with the addition of 3 ml brain heart infusion (BHI) broth for approximately two to three days at 37 °C. Agar plates were placed in an anaerobic jar (Anaerobentopf AJ9023, OMNI Life Science, Bremen, D) and cultured under microaerophilic conditions (6% O<sub>2</sub>) by Anoxomat Mark II, Mart Microbiology B.V., Lichtenvoorde, NL.

### DNA extraction kits

Six DNA extraction kits from different manufacturers were chosen for the analysis. Two kits were designed for the extraction of bacterial DNA (Zymo Research, Freiburg, D; Analytik Jena, Jena, D), two kits for DNA extraction from tissue samples (Biotechrabbit, Berlin, D; Lucigen, Middleton, WI, USA), one kit for DNA extraction from blood samples (Norgen Biotek, Thorold, ON, CA) and one kit for extraction of DNA from environmental samples (Qiagen, Hilden, D). All six kits included a chemical lysis buffer for cell lysis and indi-

vidual additional cell lysis treatment. Table 1 shows the characteristics of each kit.

### Sample materials

Prompted by the successful use of gauze to extract *H. hepaticus* DNA described by Miller et al. (2016b), the question arose whether there are other environmental samples that may be faster and easier to obtain and extract, enabling improvements in future animal health testing programs. Thus, extraction of *H. hepaticus* DNA was tested from five different sample materials (gauze as reference material, swabs, Millipore filter paper, prefilter from AHU, nestlet) to which a known amount of bacteria had previously been added (so called 'spiking'). Data of the sample materials used can be found in Table 2.

### Initial spiking protocol

An initial protocol was designed to allow easy transfer of DNA from all sample materials to the respective extraction kit. This protocol served as a basic framework and was gradually adapted and improved for the intended purposes. For spiking, the concentration of *H. hepaticus* in a bacterial suspension was measured using a spectrometer (Eppendorf BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg, D), adjusted to OD<sub>600</sub> 1 ( $\approx 2 \times 10^8$  bacteria per millilitre) and diluted to the required degree. Sample material was placed in a tube (1.5-ml Eppendorf microtubes, Sigma-Aldrich, Darmstadt, D; 15-ml Cellstar sterile tube, Greiner bio-one, Kremsmünster, AT) and spiked with 10 µl of a 10<sup>8</sup> per millilitre *H. hepaticus* bacterial suspension. Phosphate-buffered saline (PBS) was added (Eppendorf: 1 ml; Cellstar: 3 ml), and the tube was shaken by hand for one minute. The sample material was then removed from the tube with the pointed end of a soft loop (10-µl sterile soft loops, VWR, Radnor, PA, USA). The tube was centrifuged for ten minutes at 8500 rpm and the supernatant discarded. The cell pellet was resuspended in nuclease-free water (NFW, Promega,

**TABLE 1:** Characteristics of the six chosen DNA extraction kits.

Extraction kit	Target material <sup>1</sup>	Lysis procedure <sup>2</sup>	DNA isolation principle <sup>3</sup>	Completion time
Zymo Research Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit	Bac, F	BB, CLB	SCC	1.5–2.0 hours
Qiagen DNeasy PowerWater Kit	E	BB, CLB, T	SCC	2.0 hours
Norgen Blood DNA Isolation Kit	B	CLB, T	SCC	2.5 hours
Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Kit	Bac	L, CLB, P, T	SCC	1.0 hour
Biotechrabbit GenUP gDNA Kit	T	CLB, P, T	SCC	1.5–2.0 hours
Lucigen MasterPure Complete DNA and RNA Kit	T	P, CLB, T	SP	2.5 hours

<sup>1</sup> B: blood, Bac: bacteria, E: environmental samples, F: fungi, T: tissue

<sup>2</sup> BB: bead beating, CLB: cell lysis buffer, L: lysozyme, P: proteinase, T: temperature

<sup>3</sup> SCC: spin column chromatography, SP: salt precipitation

**TABLE 2:** Sample materials used.

Sample material	Name of sample material	Manufacturer	Size used
Gauze	ES Kompressen, steril	Hartmann, Heidenheim, Germany	1.5 × 1.5 cm
Swabs	Sterile applicators	Boettger, Bodenmais, Germany	Size head 5.5 mm Ø
Filter paper	Millipore Express Plus	Merck Millipore, Cork, Ireland	13 mm Ø Filter type 0.45 µm
Prefilter	Tecniplast Easyflow Prefilter	Tecniplast, Buggugiate, Italy	1.5 × 1.5 cm
Nestlet	Arbocel Roll	Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Germany	50 mg

Madison, WI, USA). From this point on, the protocol of the respective manufacturer was used.

### Improvement of DNA elution from sample material and cell lysis

Different methods were tested to improve the elution of DNA from sample material and the cell lysis. First, 1.5-ml Eppendorf tubes containing 1 ml PBS and 15-ml Cellstar tubes containing 3 ml PBS were compared to determine which condition yielded better results. Second, the effect of adding a pretreatment step after spiking of sample material was analysed. This pretreatment step consisted of adding 0.1% Tween-20 (Merck KGaA, Darmstadt, D) and 1 M dithiothreitol (DTT, Plus One DTT, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) to PBS, followed by one hour incubation at room temperature (RT). Eppendorf tubes were incubated on a thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg, D) and shaken at 900 rpm. Cellstar tubes were incubated on a mixing rotor (Variospeed, Renner GmbH, Dannstadt, D) at 40 rpm.

### Primers

Two primer sets were used in the experiments. One was a *Helicobacter* spp. primer pair from Büchler (2010) that detects all *Helicobacter* species (forward 5' GCCTATGTCCTATCAGCTTGTTGG 3', reverse 5' CAAAAGGAGTTTACAATCCTAAAACCTTC 3') and the other a *H. hepaticus*-specific primer set from Neubert et al. (2022) (forward 5' GAGCCTCAAAGGTTTATAGC 3', reverse 5' CTATTTTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC 3'). Both primer pairs were purchased from Eurofins Genomics (Ebersberg, D).

### PCR assay

The PCR assay was conducted according to Neubert et al. (2022) with minor modifications. The optimal amplification was achieved by a mixture of 10 µl of GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl primer (concentration 10 µM) and 9 µl template in a total volume of 20 µl. Thermocycling parameters were an initial denaturation process of 95 °C for five minutes, followed by 39 cycles of: denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds (*H. hepaticus*) or 58 °C for 30 seconds (*Helicobacter* spp.) and elongation at 72 °C for one minute. A final elongation step at 72 °C for five minutes was applied. PCR was performed using a Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCR products were detected by gel electrophoresis using a 1.2% gel (Sigma agarose gel, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), stained with Roti-Safe (Roti GelStain, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D) and visualised under UV light (Bio-Rad GelDoc XR+, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). DNA markers (BenchTop 100bp DNA ladder, Promega, Madison, WI, USA) were used in each experiment to determine the size of the PCR products. The expected size of the PCR product was 657 base pairs (bp) for *H. hepaticus* and 210 bp for *Helicobacter* spp.

### Validation

To validate the established method, an in-house validation process based on the recommendations of Newman and Maritz (2017), Rabenau et al. (2007) was

performed according to Neubert et al. (2022). Validation parameters included the lower limit of detection (LLOD), sensitivity, specificity, accuracy, precision, reproducibility and robustness. To determine the lowest detectable concentration of *H. hepaticus* DNA, serial dilutions of samples with a known concentration in the analytic range of the expected LLOD were tested. Each concentration had three replicates, and each run was repeated three times. After the LLOD had been determined, sensitivity was analysed by evaluating ten positive-spiked samples (more than 1 log<sub>10</sub> above LLOD) and ten low positive-spiked samples (up to 1 log<sub>10</sub> above LLOD) in three different runs. To ensure that the assay detected only the intended bacteria and did not cross-react with related organisms (= specificity), sample materials were spiked with a set of 20 different gram-positive and gram-negative bacteria species or strains in a high concentration (2 × 10<sup>6</sup> bacteria per millilitre), based on frozen stock bacteria used by Neubert et al. (2022). The specificity set included different strains of *Helicobacter*, phylogenetically closely related species or ubiquitously existing bacteria. Specificity tests were repeated three times.

Gram-negative bacteria:

- *Helicobacter hepaticus*
- *H. bilis*
- *H. muridarum*
- *H. rodentium*
- *H. typhlonius*
- *H. pylori* (J99/SS1/PMSS1)
- *H. mastomyrinus*
- *H. felis*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Arcobacter butzleri*
- *Wolinella succinogenes*
- *Citrobacter rodentium*
- *Escherichia coli*

Gram-positive bacteria:

- *Staphylococcus aureus*
- *Clostridium difficile*
- *Streptococcus salivarius*
- *Lactobacillus reuteri*

Accuracy testing involved a comparison of the newly established method with a reference method. Seven positive-, low positive- and negative-spiked samples each were tested in three different runs. Precision tests were conducted to determine how well a given measurement can be reproduced when a test is applied repeatedly to multiple aliquots of a single homogenous sample (Newman and Maritz 2017). These tests consist of intra-precision and inter-precision ratings. For intra-precision the same spiked sample (one positive and one low positive) was tested three times within a run, and for inter-precision one positive- and one low positive-spiked sample was tested three times within a run on three different days. Based on Neubert et al. (2022), two parameters were added to the validation process of Newman and Maritz (2017) and Rabenau et al. (2007): reproducibility and robustness. Reproducibility was added to

**TABLE 3:** Comparison of DNA extraction kits.

Kit	Score	Results and comments
Zymo Research Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit	++	$\beta$ -Mercaptoethanol is required (mutagenic and corrosive substance of concern), bashing beads and horizontal vortex needed, clear PCR product bands
Qiagen DNeasy PowerWater Kit	-	Bashing beads and horizontal vortex needed, time-consuming protocol, very expensive, faint PCR product bands
Norgen Blood DNA Isolation Kit	-	Time-consuming protocol, foaming, Eppendorf tubes burst because of foaming, inconsistent results
Analytik Jena innuPREP Bacteria DNA Kit	+++	Easy to perform, no additional equipment required, clear and consistent results
Biotechrabbit GenUP gDNA Kit	+	Easy to perform, inconsistent results
Lucigen MasterPure Complete DNA and RNA Kit	-	Complicated, time-consuming protocol, residual ethanol, foaming, inconsistent results

verify that the same results are achieved when the framework conditions are changed. The newly established DNA extraction method was performed by two different people on three different days, and the PCR protocol ran in three different cyclers in two different laboratories. For each test one positive- and one low positive-spiked sample was used, and each sample was tested three times within a run. To verify whether the same results can be obtained when the external conditions are changed, the robustness was tested by storing positive- and low positive-spiked samples at RT for zero, three, seven and ten days. In addition, one set of these samples was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , the other at  $-80^{\circ}\text{C}$  for ten days each. Afterwards, the DNA was extracted according to the established protocol and the results were compared.

## Results

### Comparison of DNA extraction kits

Six DNA extraction kits were compared under the same conditions: gauze as sample material in 1.5-ml Eppendorf tubes, spiked with  $10\ \mu\text{l}$  of a  $10^8$  bacteria per millilitre suspension and *H. hepaticus* primer set. The results are shown in Table 3. Because Analytik Jena and Zymo Research yielded the best results, we confirmed their suitability on all sample materials by using both kits (see Fig. 1). The Analytik Jena kit consistently yielded the strongest and clearest bands for all sample materials and hence this kit was used for all following tests.

### Comparison of sample materials

To identify the most suitable sample material, gauze was used as reference as successful extraction of *H. hepaticus* DNA from gauze samples has been demonstrated (Miller et al. 2016b). Other sample materials (swab, Millipore filter paper, prefilter, nestlet) were tested using the Analytik Jena DNA extraction kit with initial spiking protocol. The most consistent results were obtained using swabs as sample material in addition to gauze as reference. Spiking and DNA extraction from swab samples was easy to perform, so based on these results, swab samples were used for further analysis.

### Improved spiking protocol

After selection of the most suitable DNA extraction kit and sample material, the question arose whether 1.5-ml Eppendorf tubes or 15-ml Cellstar tubes were more suitable for the given purposes. Therefore, both



FIG. 1: Comparison of two DNA extraction kits (Analytik Jena, AJ; Zymo Research, ZR) on all sample materials with 100bp DNA ladder. 1: AJ gauze, 2: AJ swab, 3: AJ filter paper, 4: AJ prefilter, 5: AJ nestlet, 6: ZR gauze, 7: ZR swab, 8: ZR filter paper, 9: ZR prefilter, 10: ZR nestlet, 11: positive control, 12: negative control.

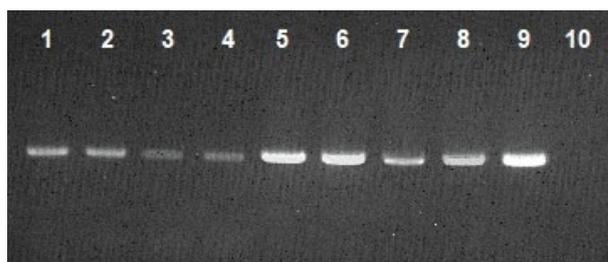


FIG. 2: Comparison of PCR results without and with pretreatment with  $20\ \mu\text{l}$  Dithiothreitol (DTT) and 0.1% Tween-20 in gauze, swab, filter paper and prefilter samples with 100bp DNA ladder. 1–4: Gauze, swab, filter paper, prefilter without pretreatment; 5–8: gauze, swab, filter paper, prefilter pretreated with DTT and Tween-20; 9: positive control; 10: negative control.

types of tubes were used with varying volumes of PBS, different incubation methods and with or without pretreatment of the samples with Tween-20 and DTT before DNA extraction. The PCR results performed in Cellstar tubes yielded consistently clearer and stronger DNA bands. Therefore, Cellstar tubes were considered more suitable for the tests. The addition of DTT and Tween-20 in the pretreatment step improved band intensity (see Fig. 2).

### Validation

Validation results are summarised in Table 4.

All tests to assess the quality of DNA extraction from *H. hepaticus* were conducted with  $10\ \mu\text{l}$  of a  $10^8$  bacteria per millilitre bacterial suspension spike onto gauze and swabs, a pretreatment step (Tween-20 and DTT) as well as extraction in 15-ml Cellstar tubes. To validate the method, the LLOD, defined as the lowest

consistently detectable DNA concentration (Newman and Maritz 2017), was determined. Serial dilutions from known bacterial concentrations were assessed in triplicates three times. All PCRs were performed with *Helicobacter* spp. and *H. hepaticus* primers, but for clarity, *Helicobacter* spp. results are not shown for all assessments. Taking into account the dilutions during DNA extraction, the LLOD of the assay using both primers was  $2 \times 10^0$  bacteria (see Fig. 3).

Sensitivity, which means the ability to detect very low concentrations of the analyte, was assessed as a further measure to validate the method. Ten positive-spiked samples and ten low positive-spiked samples were tested three times on gauze and swab samples. From the tests that were performed, it is evident that sensitivity was 100%.

Specificity refers to the ability of an assay to detect only the intended target and that quantification of the target is not affected by cross-reactivity from related or potentially interfering organisms or substances (Newman and Maritz 2017). To assess specificity, a panel of 20 different gram-negative and gram-positive bacteria species or strains was analysed with the assay. Specificity was 100%, because only *H. hepaticus* was detected using specific primers. *Wolinella succinogenes* was correctly detected with *Helicobacter* spp. primers because this species belongs to the Helicobacteraceae family.

Accuracy refers to the closeness of agreement between a test result and an accepted reference value or comparative method (Newman and Maritz 2017). Seven samples each of positive-, low positive- and negative-spiked samples from gauze and swabs were compared by PCR, and the test was repeated three times. The assay yielded 100% accurate results.

Per definition, precision testing determines if the PCR results can be reproduced by repeatedly testing

multiple aliquots of the same samples (Newman and Maritz 2017). Intra-precision was assessed using one positive- and one low positive-spiked sample obtained from gauze and swabs by testing each sample three times within a run. Inter-precision was tested with one positive- and one low positive-spiked sample, each sample tested three times within a run on three different days. The assay of intra- and inter-precision testing using *H. hepaticus* primers yielded 100% precise results.

Reproducibility refers to inter-run precision (Newman and Maritz 2017) and was tested by using one positive- and one low positive-spiked sample which were tested three times using different cyclers for PCR, performing the tests in two different laboratories and with two different researchers. Reproducibility of results obtained by researcher A and B on different days achieved similar results. Reproducibility was also evaluated by performing the PCR on three different cyclers with both *H. hepaticus* and *Helicobacter* spp. primer sets. PCRs yielded similar results on all three cyclers. The parameter was further assessed by spiking, extraction of DNA and PCR testing in two laboratories. Again, PCRs with both primer sets yielded similar results. Therefore, all tests for reproducibility of the assay demonstrated that the results

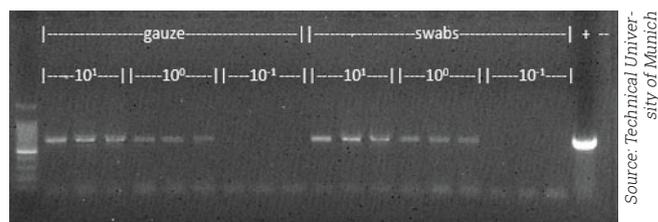


FIG. 3: Lower limit of detection of *H. hepaticus* with 100bp DNA ladder

**TABLE 4:** Overview and results of the in-house validation process with *H. hepaticus* and *Helicobacter* spp. primers.

Parameter	Number of samples used	Result
LLOD	Triplicates Repeated three times	$2 \times 10^0$ bacteria
Sensitivity	10 positive 10 low positive Repeated three times	100%
Specificity	16 gram-negative bacteria 4 gram-positive bacteria	100%
Accuracy	7 positive 7 low positive 7 negative Repeated three times	100%
Intra-Precision	Triplicates 1 positive 1 low positive	100%
Inter-Precision	Triplicates 1 positive 1 low positive On three different days	100%
Reproducibility	One positive One low positive Repeated three times, either with different: 3 cyclers, 2 researchers, 2 laboratories	100%
Robustness	3 positive 3 low positive 3 negative Stored at RT, -20 °C or -80 °C for 0, 3, 7, 10 days	<i>H. hepaticus</i> primers: storage up to 10 days at RT or -20 °C  <i>Helicobacter</i> spp. primers: storage up to 7 days at RT and up to 10 days at -20 °C

were reproducible by different researchers, on different cyclers and in different locations with another laboratory equipment.

Robustness was assessed to evaluate the consistency of results to variations of internal factors of the method, such as sample preparation (Newman and Maritz 2017). For testing this parameter, three positive-, low positive- and negative-spiked samples from gauze and swabs were stored at different temperatures (RT, -20 °C or -80 °C). The RT samples were tested for bacterial DNA after zero, three, seven and ten days; the frozen samples were assessed after ten days. Both primer sets (*H. hepaticus* and *Helicobacter* spp.) were used.

By using the *Helicobacter* spp. primers, bacteria could be detected in samples kept at RT up to day seven but not on day ten. In samples kept at -20 °C, bacteria were detectable after ten days of storage, whereas no bacteria could be detected if samples had been stored at -80 °C for ten days. In contrast, using *H. hepaticus* primers allowed the detection of bacteria in samples stored at RT or at -20 °C for up to ten days (the latest time point assessed). Similar to the observations made using the *Helicobacter* spp. primers, storage of bacteria at -80 °C for ten days resulted in lack of detection.

## Discussion

The results of the present in vitro study indicate that alternative sampling using swab material according to the proposed protocol may be an option to conduct routine health monitoring in experimental animal facilities without the need to use sentinel animals. Studies involving experimental animals are still an integral component of biomedical research, and often true alternatives are lacking. Nonetheless, ethical boards evaluating study proposals with experimental animals strongly recommend the application of the 3R principle to reduce animal numbers and refine the experiments, thereby minimising the need to euthanise animals and replace animal experiments whenever possible. Experimental animals used in scientific studies are typically kept in animal housings with large numbers of cages and limited space. Pathogens must be strictly controlled in such facilities to avoid cross-contaminations and infections that would render the study results unusable and result in unnecessary culling numbers. Because typical infection-control involves tests on sentinel animals, such tests require a higher number of animals. This is not only relevant for ethical reasons but also for economic considerations as animal housing is increasingly expensive.

It is feasible to assume that pathogens may also be detected in the immediate environment of the animal, which would spare the animal and – depending on the sampling method – may avoid disturbance of the animal in the cage. The purpose of the present study was to investigate whether there are potential alternatives to sentinel tests exist and if these in vitro studies can provide a basis for desirable subsequent field studies to pose a true alternative to common sentinel monitoring. A reliable alternative appears to be testing

of the animal's environment, such as air filters or caging material, which can be screened for the presence of defined pathogens.

Several studies have reported environmental sampling procedures for the detection of pathogens in animal facilities. Cacciamali et al. (2021) proposed the implementation of a health surveillance plan based on environmental samples in animal facilities, thereby tackling the reduction and refinement goals of the 3R principle. Mailhiot et al. (2020) performed EAD sampling and PCR analysis in comparison with SBS testing to assess the sensitivity of these methods in detecting pathogens in rodent facilities over the course of one research year. The samples were obtained in rooms with suspected *Helicobacter* spp., *Rodentibacter* spp., and murine norovirus infections in the animals. The results showed that EAD sampling with subsequent PCR analysis was more sensitive in detecting these pathogens than using SBS animals. The authors proposed this alternative method as a superior approach to monitor pathogens in rodent facilities. There were no differences between both methods in the detection sensitivity of the viral pathogen, and hence environmental sampling techniques may be particularly applicable for the detection of bacterial pathogens. In contrast, Zorn et al. (2017) attested a superior sensitivity of EAD testing in detecting murine norovirus as compared with using SBS animals. In addition, Körner et al. (2019) reported the exclusive detection of *Myocoptes musculus* by EAD and not SBS testing. In a similar study, Pettan-Brewer et al. (2020) implemented EAD sampling to replace sentinel animals and found reliable detection of *Helicobacter* species and murine norovirus by using this method in their facility. These findings are in line with the conclusions of Miller et al. (2016b), who proposed a method of sampling EAD for *H. hepaticus*.

Nonetheless, this procedure is highly reliant on parameters that may vary between different housing facilities or even different rooms, such as a constant airflow and the location of the air filter. Therefore, it may not be achievable for every facility to use EAD as sampling material for routine pathogen analysis. Because gauze is commonly used as a sample material pinned on the prefilter of the AHU, we used it as a reference material to compare the suitability of other materials, including swabs, Millipore filter paper, prefilter and nestlets. In addition to testing different sampling materials, we searched for the ideal test kit for a fast and reliable detection of *H. hepaticus*-DNA in environmental samples. We found only one kit that was specifically designed for DNA extraction from environmental samples. This kit was not only very expensive but also did not yield convincing results compared to other general DNA extraction kits. In total, we tested six different DNA extraction kits in terms of the length and difficulty of the required protocol as well as the quality and consistency of results.

In a series of PCR analyses, we were able to identify a test kit (Analytik Jena) that yielded consistent and clear results for *H. hepaticus* DNA that were superior to all other kits tested. Moreover, the sensitivity, specificity, precision, reproducibility and robustness of this test kit was excellent and provided easy fea-

sible and reliable detection of *H. hepaticus* in various environmental sample materials. Importantly, performing the tests in different laboratories, on different cyclers and by different researchers yielded consistent results, which makes the protocol highly applicable in practice because it can easily be conducted in different research facilities and by different people.

We were able to refine the test by adding a pre-treatment component to the DNA extraction protocol, using DTT and Tween-20. We identified swabs as the most suitable sample material next to gauze, which is advantageous because swab samples may be easily obtained from many cages in a row without having to switch off the air supply of the AHU and without distressing the animal. This is of relevance because unnecessary stress for the animal should be avoided, not only for ethical purposes, but also because it can skew the results. In our in vitro study, the highest detection rate was achieved when samples were obtained using swabs, yet other materials in the animal cage might be suitable to obtain sufficient DNA quantities. For example, O'Connell et al. (2021) demonstrated that *Helicobacter* species are efficiently detected in filter paper samples and that environmental sampling from filter paper is more sensitive than using SBS animals.

The present study is limited by the detection of only one pathogen, *H. hepaticus*. Although this is a highly relevant germ in mice housing, other pathogens must be equally detectable using commercially available test kits. The fact that only a single DNA extraction kit for environmental sampling is currently on the market indicates that the protocol presented in the current study could be a true alternative that incurs less cost and effort, as well as yielding better, more consistent results. Our finding that the protocol thoroughly achieved good results when applied in different laboratories and using different equipment suggests that it can be easily performed in any animal housing facility. Furthermore, the testing by different researchers with comparable results suggests that any researcher working in an animal facility will be able to follow the protocol. Accordingly, since the present study was based on in vitro experiments, it would be desirable for the established test method to be evaluated with samples obtained from experimental animals during routine health monitoring and potentially improved in subsequent stages. Even though much lower concentrations of bacterial DNA than we used in our spiking experiments are to be expected in upcoming field studies, the validation of our method shows that even small amounts of *H. hepaticus* DNA can be reliably detected by our extraction protocol and following PCR.

We herein provide further evidence that environmental monitoring of pathogens by swab sampling is a reliable method for the identification of *H. hepaticus*. We propose a novel and robust environmental sampling protocol that may serve as a basis for following field studies to perform a full validation procedure. It can promote the development of alternative testing methods using environmental samples, thereby supporting efforts to decrease animal numbers in biomedical research.

## **Conflict of interest**

The authors hereby declare that they have no proprietary, professional or other personal interests in any product, service and/or company that could have influenced the contents or opinions expressed in this publication.

## **Ethical approval**

The authors hereby declare that they have followed the universally accepted guidelines of good scientific practice while preparing the present paper.

## **Funding**

The authors declare that they did not receive any financial support for this publication.

## **Authors' contribution**

Conception of the project BK, KS; data collection AKS; data analysis and interpretation AKS, BK, KS; drafting of the manuscript AKS; critical revision of the manuscript MHE, BK, KS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## **References**

- Büchler G (2010):** Charakterisierung des Hauptsuszeptibilitätslocus *Cdcs1* für experimentelle, chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- Burch RL, Russell WMS (1992):** The principles of humane experimental technique. Special Edition. Anim Welf, Hertfordshire, UK.
- Cacciamalì A, Romano C, Checco MA, Villa R (2021):** Detection of pathogens from environmental samples for the evaluation of the health status of laboratory animals. *Biomed Sci Engin* 5(s1).
- Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, Clark JM (2004):** Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack. *Comp Med* 54: 382–392.
- Dubelko AR, Zuwannin M, McIntee S, Livingston RS, Foley PL (2018):** PCR testing of filter material from IVC lids for microbial monitoring of mouse colonies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 57(5): 477–482.
- Falsafi T, Mahboubi M (2013):** *Helicobacter hepaticus*, a new pathogenic species of the *Helicobacter* genus: Similarities and differences with *H. pylori*. *Iran J Microbiol* 5: 185–194.
- Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins Jr. MJ, Gorelick PL, Ward JM (1994):** *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* 32: 1238–1245.
- Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE, Horwitz BH (2011):** *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol* 4(1): 22–30.
- Hanson WH, Taylor K, Taylor DK (2021):** PCR testing of media placed in soiled bedding as a method for mouse colony health surveillance. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 60(3): 306–310.

- Körner C, Miller M, Brielmeier M (2019):** Detection of murine astrovirus and *Myocoptes musculus* in individually ventilated caging systems: Investigations to expose suitable detection methods for routine hygienic monitoring. *PLoS One* 14(8): e0221118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221118> (Zugriff 15.11.2023).
- Livingston RS, Riley LK, Besch-Williford CL, Hook Jr. RR, Franklin CL (1998):** Transmission of *Helicobacter hepaticus* infection to sentinel mice by contaminated bedding. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48: 291–293.
- Mähler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M (2014):** FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 48: 178–192.
- Mailhot D, Ostdiek AM, Luchins KR, Bowers CJ, Theriault BR, Langan GP (2020):** Comparing Mouse Health Monitoring Between Soiled-bedding Sentinel and Exhaust Air Dust Surveillance Programs. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 59(1): 58–66.
- Miller M, Ritter B, Zorn J, Brielmeier M (2016a):** Exhaust Air Dust Monitoring is Superior to Soiled Bedding Sentinels for Detection of *Pasteurella pneumotropica* in Individually Ventilated Cage Systems. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55: 775–781.
- Miller M, Ritter B, Zorn J, Brielmeier M (2016b):** Exhaust air particle PCR detects *Helicobacter hepaticus* infections at low prevalence. *J Vet Sci Technol* 7: 4: DOI 10.4172/2157-7579.1000343.
- Neubert V, Sadek A, Burell T, Ralser A, Erhard M, Gerhard M, Seidel K, Kalali B (2022):** Validation and improvement of a multiplex PCR method to detect murine *Helicobacter* species in feces samples of mice. *Helicobacter* 27(3): e12888.
- Newman H, Maritz J (2017):** Basic overview of method validation in the clinical virology. *Rev Med Virol* 27: e1940: DOI 10.1002/rmv.1940.
- Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny A, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B (2002):** Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36: 20–42.
- O’Connell KA, Tigyi GJ, Livingston RS, Johnson DL, Hamilton DJ (2021):** Evaluation of in-cage filter paper as a replacement for sentinel mice in the detection of murine pathogens. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 60(2): 160–167.
- Pettan-Brewer C, Trost RJ, Maggio-Price L, Seamons A, Dowling SC (2020):** Adoption of Exhaust Air Dust Testing in SPF Rodent Facilities. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 59(2): 156–162.
- Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB (2009):** Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 43: 165–173.
- Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A (2007):** Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 40: 93–98.
- Sterzenbach T (2006):** Untersuchungen zur Pathogenität von *Helicobacter hepaticus*: genomische und funktionelle Aspekte. Würzburg, JMU, Diss.
- Whary MT, Cline JH, King AE, Corcoran CA, Xu S, Fox SG (2000a):** Containment of *Helicobacter hepaticus* by use of husbandry practices. *Comp Med* 50: 78–81.
- Whary MT, Cline JH, King AE, Hewes KM, Chojnacky D, Salvarrey A, Fox JG (2000b):** Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium* and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. *Comp Med* 50: 436–443.
- Zorn J, Ritter B, Miller M, Kraus M, Northrup E, Brielmeier M (2017):** Murine norovirus detection in the exhaust air of IVCs is more sensitive than serological analysis of soiled bedding sentinels. *Lab Anim* 51: 301–310.

**Address for correspondence**

Ann-Katrin Sutterer  
Trogerstraße 30  
81675 München  
[Ann-katrin.sutterer@outlook.de](mailto:Ann-katrin.sutterer@outlook.de)

## V. ERWEITERTE DISKUSSION

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf dem Nachweis von *H. hepaticus*. Durch *H. hepaticus* hervorgerufene Erkrankungen bei Versuchsmäusen sind von klinischer und tierexperimenteller Relevanz. Dieser Keim wird laut Literatur am häufigsten der bekannten *Helicobacter*-Arten in Mäusen und Ratten in Tierversuchshaltungen nachgewiesen (WHARY und FOX, 2006; BUCHHEISTER und BLEICH, 2021). Daher richtet sich ein Fokus auf die Entwicklung von effektiven Methoden, um diesen Erreger in Tierversuchseinrichtungen zuverlässig nachweisen und eliminieren zu können (FAHEY und OLEKSZAK, 2015; COMPTON, 2020; KIM *et al.*, 2022).

Die hierfür zur Verfügung stehenden analytischen Methoden unterscheiden sich grundlegend hinsichtlich des eingesetzten Probenmaterials sowie der Untersuchungsmethode. Die in der Literatur beschriebenen Ansätze zur Eliminierung reichen von der Verfütterung einer Medikamenten-supplementierten Diät (GARRETT *et al.*, 2014) über die Rekolonisierung mit *Helicobacter*-freien Tieren (LOFGREN *et al.*, 2012) bis hin zu molekularbiologischen Multiplex-Ansätzen für die gleichzeitige Testung multipler DNA- oder Blutproben (BUTT *et al.*, 2023).

In Bezug auf tierschutzrelevante Aspekte stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, inwiefern Probenmaterial aus der Umgebung der Versuchstiere für die Diagnostik von Infektionskrankheiten eingesetzt werden kann.

Etabliert für die Diagnostik von *H. hepaticus* hat sich der Nachweis mittels PCR. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher, die Eignung von gespikten Umweltproben (Gaze, Tupfer, Filterpapier, Vorfilter aus der Lüftungsanlage, Nestlet) für den PCR-basierten *Helicobacter*-Nachweis zu überprüfen und die hierfür beste Methode zu identifizieren.

Die Hauptergebnisse der methodischen Studie zur zuverlässigen Detektion von *H. hepaticus* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Als Material mit den besten Ergebnissen stellten sich die gespikten Tupfer dar.

2. Das PCR-Extraktionskit mit den zuverlässigsten und konstantesten Ergebnissen war das Analytik Jena-Kit.
3. Eine zusätzliche Behandlung des Probenmaterials vor der DNA-Extraktion mit Tween-20 und DTT resultierte in einer deutlichen Zunahme der Intensität der PCR-Banden.
4. Die Verwendung dieser Methode resultierte in einer 100 %igen Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit.

Die 3R-Prinzipien bilden den Grundstein jedes Tierversuchsvorhabens (BURCH und RUSSELL, 1992). Diese Prinzipien zielen darauf ab, den Schutz von Versuchstieren zu verbessern, indem der Einsatz alternativer Methoden gefördert, die Zahl der verwendeten Tiere minimiert und die Versuchsverfahren angepasst werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können zum Erreichen dieser Ziele beitragen. Durch die frühzeitige Erkennung von Infektionskrankheiten im Bestand kann zum einen eine bestehende Versuchstierkolonie geschützt werden, zum anderen kann darauf hingewirkt werden, dass gesunde Tiere für Versuche eingesetzt und somit zuverlässige Ergebnisse erzielt werden (Reduce).

Bei der Entwicklung und Überprüfung einer Nachweismethode stellt sich in erster Linie die Frage nach der Anwendbarkeit der Methode in der Praxis. Das Probenmaterial muss einfach und schnell zu entnehmen sein, bei gleichzeitig minimalem Stress für das Versuchstier. Eine Stressreduktion ist zum einen für das Wohl des Versuchstieres von Bedeutung, zum anderen muss hierbei aber auch berücksichtigt werden, dass Stress Auswirkungen auf die Ergebnisse eines Versuchs haben kann. In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Stress die Immunfunktion und bestimmte Entzündungsreaktionen verändert, Auswirkungen auf den Stoffwechsel hat und die Anfälligkeit für Erkrankungen erhöht (BAILEY, 2018). Es ist somit auch aus wissenschaftlicher Sicht relevant, das Wohlergehen von Versuchstieren zu steigern und ihre Belastung zu reduzieren, um die Ergebnisse der Versuche nicht zu verzerren. Die Tatsache, dass das Probenmaterial aus der Umgebung des Versuchstieres entnommen wird und dafür kein Handling der Tiere notwendig ist, bedeutet, dass kein Stress für das Tier durch die Probenentnahme entsteht (Refine).

Die Ergebnisse eines diagnostischen Tests müssen sowohl in der wiederholten Testung als auch bei Durchführung durch unterschiedliches Personal zuverlässig und reproduzierbar sein. Zudem werden Versuchseinrichtungen an Universitäten

durch öffentliche Gelder finanziert, so dass auch die Kosten einer Methode eine Rolle spielen. Bei der Wahl der besten Methode für den Nachweis von *H. hepaticus* ist die Größe des Tierhauses und die Verfügbarkeit der für eine Methode erforderlichen Gerätschaften ausschlaggebend. Für eher kleinere Versuchstiereinrichtungen, die die Tests selbst durchführen, ist beispielsweise eine Methode, die komplizierte und teure Gerätschaften erfordert, nicht realistisch einsetzbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass eine DNA-Extraktion mit dem Analytik Jena-Kit aus gespikten Tupferproben zuverlässige und konstante Ergebnisse lieferte. Diese Methode erfüllt somit gleich mehrere Voraussetzungen für eine solide Nachweismethode: der Stress für das Versuchstier ist aufgrund der Probenentnahme aus der Umwelt minimal, die Methode kann durch unterschiedliches Personal mit demselben Ergebnis durchgeführt werden und wiederholte Versuchsansätze liefern dasselbe Ergebnis. Außerdem ist die PCR als Untersuchungsmethode in jedem Versuchstierlabor durchführbar, da sie gut standardisierbar ist und lediglich Geräte erfordert, die nahezu in jeder Einrichtung zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorteil dieses Kits ist der vergleichsweise niedrige Preis und die leichte Anwendbarkeit.

Die Probenentnahme für die DNA-Extraktion bedingt eine große Sorgfalt, um eine möglichst reine DNA-Probe von ausreichender Menge für die Analytik zu gewinnen. Hinzu kommt, dass die PCR-Reaktionen durch verschiedene Parameter in der Käfigumgebung beeinträchtigt werden können. In diesem Zusammenhang sind Polysaccharide wie Zellulose und Hemizellulose sowie Proteine und Gallensalze zu nennen, die durch die Versuchstiere ausgeschieden werden und die PCR-Reaktionen inhibieren können (FERRAND *et al.*, 2014). Eine zuverlässige DNA-Extraktion und -Analyse, wie sie in der vorliegenden Studie beschrieben wird, ist demzufolge unerlässlich für den DNA-basierten Nachweis von *H. hepaticus*.

Grundsätzlich ist eine regelmäßige Überwachung der Hygiene und Gesundheit von Versuchstieren zwingend erforderlich, um Wissenschaft auf höchstem Niveau zu betreiben und gemäß den 3R-Prinzipien zu handeln. Die Verwendung von Sentineltieren hat sich hierfür etabliert und wird in Versuchstiereinrichtungen routinemäßig praktiziert. Der Einsatz dieser Tiere erfolgt üblicherweise durch die Übertragung von verschmutzter Einstreu aus Käfigen einer Kolonie in die

jeweiligen Sentinelkäfige, was *per se* eine potentielle Infektionsquelle für das Käfigsystem und die Racks darstellt. Dieser Aspekt ist allerdings in modernen Versuchstierhaltungen untergeordnet, da IVC-Käfige aus genau diesem Grund eingesetzt werden. Manche Keime werden jedoch nicht oder nur unzureichend durch Kot oder verschmutzte Einstreu übertragen, wie beispielsweise *Filobacterium rodentium* (CUNDIFF *et al.*, 1995) oder auch „Fur mites“ (Pelzmilben) (LINDSTROM *et al.*, 2011), so dass durch Testung der SBS bestehende Infektionen übersehen werden können. Zudem wird dadurch eine beträchtliche Zahl von Tieren allein zur Überwachung der Gesundheit gehalten, da die Untersuchungen in regelmäßigen Abständen wiederholt werden müssen, um Infektionen in einer Kolonie frühzeitig zu erkennen und zu eliminieren (MILLER und BRIELMEIER, 2018).

Das 2009 von der GV-SOLAS empfohlene Bündel von Nachweismethoden (HOMBERGER *et al.*, 2009) zielt darauf ab, die Anzahl der benötigten Sentineltiere zu reduzieren. Durch die Kombination verschiedener Verfahren, wie molekularbiologischer oder immunologischer Techniken, kann die diagnostische Genauigkeit verbessert werden. Die erhobenen Daten aus verschiedenen Methoden ergänzen sich, wodurch verlässliche Ergebnisse mit weniger Tieren erzielt werden können. Dieser Ansatz unterstützt die ethische Verpflichtung zur Minimierung der Anzahl von Tieren in Tierversuchen und fördert gleichzeitig die Effizienz und Präzision der Forschung.

Alternativen der Gesundheitsüberwachung, durch die der Einsatz von Sentineltieren verringert werden kann, sind daher wünschenswert für die Versuchstierhaltung. Die Extraktion von DNA aus Umweltproben scheint eine derartige Alternative zu sein. Zu beachten ist die Art der Probenentnahme und die Qualität der hierdurch gewonnenen DNA, da diese ausschlaggebend für ein positives Analyseergebnis ist. Bei der Verwendung von Gaze, die in den luftführenden Bereichen eines IVC angebracht wird, ist die Zuverlässigkeit des mikrobiellen Nachweises beispielsweise von der Sauberkeit des Abluftkanals und der Rack-Systeme abhängig, so dass ein positiver Nachweis möglicherweise durch eine zurückgebliebene Verschmutzung zustande kommt, nicht durch eine aktive Infektion der Versuchstiere. Dies bedeutet, dass bei positivem Nachweis nicht zwingend darauf zu schließen ist, dass die Tiere akut infiziert sind.

Das hier vorgeschlagene Protokoll könnte sich als valide Methode für den

zuverlässigen und präzisen Nachweis von *H. hepaticus* in Umweltproben einer Versuchstierhaltung erweisen. Diese Ergebnisse müssen in zukünftigen Studien für weitere Pathogene überprüft und *in vivo* evaluiert werden.

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf, die ihre Übertragbarkeit auf die Praxis einschränken könnte. Da die durchgeführten Untersuchungen *in vitro* durchgeführt wurden, ist in nachfolgenden Feldstudien festzustellen, ob die erhobenen Validierungsparameter auch in diesen Versuchen eine ähnlich hohe Erfolgsquote aufweisen können. Zudem ist der Nachweis mikrobieller Spezies mittels konventioneller PCR und einzelnen Primer-Paaren vergleichsweise zeitaufwändig, da jedes Primer-Paar individuelle PCR-Parameter benötigt und somit nicht gleichzeitig eine umfassende Keimanalyse aller Pathogene durchgeführt werden kann, die für eine gegebene Versuchstierkolonie relevant sind. Dennoch ist eine gezielte und valide Überprüfung auf *H. hepaticus* bei Nagern unerlässlich, da diese Infektion in Versuchstierlaboren sehr häufig vorkommt und sogar deren Mikrobiom verändern kann (KUEHL *et al.*, 2005), was wiederum zu nicht kalkulierbaren Veränderungen in Experimenten führen könnte. Viele murine *Helicobacter*-Infektionen bleiben subklinisch und somit unentdeckt. Hierdurch wären Ergebnisse aus experimentellen Studien nicht mehr valide und müssten gegebenenfalls sogar wiederholt werden, was letztendlich den 3R-Prinzipien widerspricht. Deshalb ist es unabdingbar, die mikrobiologische Überwachung des Hygienestatus der Versuchstiere anhand einer verlässlichen Testmethode zu gewährleisten.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die beschriebene Methode einen detaillierten und zuverlässigen Nachweis von *H. hepaticus* ermöglicht. Um sowohl eine valide und genaue Testung auf *H. hepaticus* als auch eine schnelle und umfassende mikrobielle Analyse durchführen zu können, ließe sich die hier beschriebene Methode möglicherweise in einem Multiplex-Ansatz umsetzen, wie sie bei Untersuchungen aus Kotproben bereits beschrieben wurde (NEUBERT *et al.*, 2022). Hierbei ist jedoch größte Sorgfalt geboten, da es bei einer Multiplex-PCR zu unerwünschten Primer-Formationen wie Primer-Dimeren kommen kann und zudem die Schmelztemperaturen der verschiedenen Primer ähnlich sein müssen, um verschiedene PCR-Produkte zuverlässig in einem gemeinsamen Ansatz generieren zu können (ZANGENBERG *et al.*, 1999). Feldstudien in Versuchstierhaltungen sind für eine weitere Validierung der

Methodik notwendig. Es kann ebenso überprüft werden, inwiefern sich das hier verwendete Probenmaterial sowie die DNA-Extraktions- und PCR-Protokolle für die Testung anderer pathogener Keime eignen.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

### **Etablierung und Prä-Validierung einer Methode zum Nachweis von *Helicobacter hepaticus* in Tupferproben aus experimentellen Maushaltungen - eine *in vitro* Studie**

Das Bakterium *Helicobacter hepaticus* ist ein weit verbreiteter Keim in experimentellen Maushaltungen. Dieser und andere Pathogene werden im Rahmen des Health Monitorings in der Regel mittels Sentineltieren nachgewiesen, die für eine bestimmte Zeit auf verschmutzter Einstreu der Versuchstiere gehalten werden.

Das Ziel der vorliegenden *in vitro* Arbeit war es, die Anzahl von benötigten Sentineltieren durch eine alternative Nachweismethode für *H. hepaticus* zu minimieren. Hierfür wurden fünf verschiedene Probenmaterialien (Gaze, Tupfer, Filterpapier, Vorfilter aus der Lüftungsanlage, Nestlet) sowie sechs unterschiedliche DNA-Extraktionskits (Analytik Jena, Zymo Research, Qiagen, Biotechrabbit, Norgen, Lucigen) getestet und ein Protokoll entwickelt, um die DNA-Extraktion einfach und zuverlässig zu gestalten sowie bestmögliche Ergebnisse in der anschließenden PCR zu erzielen.

Es zeigte sich, dass Tupferproben in Kombination mit dem Analytik Jena-Extraktionskit die besten und konstantesten Ergebnisse bei der Detektion von *H. hepaticus* lieferten und im internen Validationsprozess mit einem unteren Detektionslimit von  $2 \times 10^0$  Bakterien und einem Ergebnis von 100 % bei Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, Präzision sowie Reproduzierbarkeit bestmögliche Resultate erzielten.

Der Nachweis von *H. hepaticus* aus Umweltproben trägt in hohem Maße dazu bei, im Sinne der 3R-Richtlinien handeln zu können um Sentineltiere zumindest teilweise durch tierfreie Alternativen zu ersetzen.

In nachfolgenden Feldstudien sollen die erzielten Ergebnisse mit den verwendeten Probenmaterialien und DNA-Extraktionskits sowie mit dem vorgestellten Extraktionsprotokoll validiert werden um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die hervorragenden Werte der Validationsparameter aus dieser methodischen Studie auch *in vivo* erzielt werden können.

## VII. SUMMARY

### **Establishment and pre-validation of a method for the detection of *Helicobacter hepaticus* in swab samples from experimental mouse facilities - an *in vitro* study**

The bacterium *Helicobacter hepaticus* is a widespread pathogen in experimental mouse housing. As part of health monitoring, this and other pathogens are usually detected using sentinel animals, which are kept on soiled bedding of the experimental animals for a certain period of time.

The aim of this *in vitro* study was to minimise the number of sentinel animals required by using an alternative detection method for *H. hepaticus*. For this purpose, five different sample materials (gauze, swab, filter paper, prefilter from the ventilation system, nestlet) and six different DNA extraction kits (Analytik Jena, Zymo Research, Qiagen, Biotechrabbit, Norgen, Lucigen) were tested and a protocol was developed to make DNA extraction simple and reliable and to achieve the best possible results in the subsequent PCR.

It was shown that swab samples in combination with the Analytik Jena extraction kit provided the best and most consistent results in the detection of *H. hepaticus* and achieved the best possible results in the internal validation process with a lower detection limit of  $2 \times 10^0$  bacteria and a result of 100 % for sensitivity, specificity, accuracy, precision and reproducibility.

The detection of *H. hepaticus* from environmental samples significantly contributes to being able to act in accordance with the 3R guidelines in order to at least partially replace sentinel animals with animal-free alternatives.

In following field studies, the results obtained are to be validated with the sample materials and DNA extraction kits used and with the extraction protocol presented in order to be able to make a statement as to whether the excellent values of the validation parameters from this methodological study can also be achieved *in vivo*.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Bailey J. Does the stress of laboratory life and experimentation on animals adversely affect research data? A critical review. *Altern Lab Anim* 2018; 46(5): 291–305.

Bayerisches Landeskriminalamt München, Kriminaltechnisches Institut, Dr. Christine Schäfer, persönliche Mitteilung, 01.10.2019

Buchheister S, Roegener F, Zschemisch N, Talbot SR, Christensen H, Bleich A. One for two: A novel and highly sensitive virulence factor-based quantitative polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Rodentibacter pneumotropicus* and *Rodentibacter heyltii* in environmental sample material. *Lab Anim* 2020; 54(3): 239–250.

Buchheister S, Bleich A. Health Monitoring of laboratory rodent colonies – talking about (R)evolution. *Animals (Basel)* 2021; 11(5): 1410.

Büchler G (2010). Charakterisierung des Hauptsuszeptibilitätslokus *Cdcs1* für experimentelle, chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

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.

Burch RL, Russell WMS (1992). The principles of humane experimental technique. Special Edition. UFAW, Wheathampstead, UK.

Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2017; 22 S1 e12405.

Carron MA, Tran VR, Sugawa C, Coticchia JM. Identification of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa. *J Gastrointest Surg* 2006; 10(5): 712–717.

Compton SR. PCR and RT-PCR in the diagnosis of laboratory animal infections and in health monitoring. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2020; 59(5): 458–468.

Cundiff DD, Riley LK, Franklin CL, Hook RR Jr, Besch-Williford C. Failure of a soiled bedding sentinel system to detect cilia-associated respiratory bacillus infection in rats. *Lab Anim Sci* 1995; 45(2): 219–221.

Dewhirst FE, Fox JG, On SL. Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50: 2231–2237.

Dubelko AR, Zuwannin M, McIntee SC, Livingston RS, Foley PL. PCR testing of filter material from IVC lids for microbial monitoring of mouse colonies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2018; 57(5): 477–482.

Dülsner A, Hack R, Krüger C, Pils M, Scherer K, Schmelting B, Schmidt M, Weinert H, Jourdan T. Fachinformation aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte und dem Arbeitskreis 4 in der TVT. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren, Juli 2017.

Fahey JR, Olekszak H. An overview of typical infections of research mice: health monitoring and prevention of infection. *Curr Protoc Mouse Biol* 2015; 5(3): 235–245.

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.

Ferrand J, Patron K, Legrand-Frossi C, Frippiat J, Merlin C, Alauzet C, Lozniewski A. Comparison of seven methods for extraction of bacterial DNA from fecal and cecal samples of mice. *J Microbiol Methods* 2014; Oct:105:180–185.

Flecknell PA (2009): *Laboratory Animal Anaesthesia*. Elsevier Inc., Amsterdam.

Fleischmann T, Jirkof P, Henke J, Arras M, Cesarovic N. Injection anaesthesia with

fentanyl-midazolam-medetomidine in adult female mice: importance of antagonization and perioperative care. *Lab Anim* 2016; 50: 264–274.

Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins Jr MJ, 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: 1238–1245.

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(2): 445–454.

Fox JG, Yan L, Shames B, Campbell J, Murphy JC, Li X. Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* 1996; 64(9): 3673–3681.

Fox JG, Lee A. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Lab Anim Sci* 1997a; 47(3): 222–255.

Fox JG, Dangler CA, Sager W, Borkowski R, Gliatto JM. *Helicobacter mustelae*-associated gastric adenocarcinoma in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Pathol* 1997b; 34: 225–229.

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.

Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE, Horwitz BH. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol* 2011; 4(1): 22–30.

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. *Lab Anim*

Sci 1999; 49(5): 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(11): 3920–3926.

Garrett CM, Muth D, Watson J. Effects of medicated diet to eradicate *Helicobacter* spp. on growth, pathology, and infection status in *Rag1*<sup>-/-</sup> and nude mice. J Am Assoc Lab Anim Sci 2014; 53(3): 238–245.

Garvey W, Fathi A, Bigelow F. Modified Steiner for the demonstration of spirochetes. J Histotechnol 1985; 8: 15–17.

Ge Z, Feng Y, Sheh A, Muthupalani S, Gong G, Chawanthayatham S, Essigmann JM, Fox JG. Mutagenicity of *Helicobacter hepaticus* infection in the lower bowel mucosa of 129/SvEv *Rag2*<sup>-/-</sup>/*Il10*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice is influenced by sex. Int J Cancer 2019; 145(4): 1042–1054.

Ghil H, Yoo J, Jung W, Chung T, Youn H, Hwang C. Survey of *Helicobacter* infection in domestic and feral cats in Korea. J Vet Sci 2009; 10(1): 67–72.

Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. Int J Syst Evol Microbiol 1989; 39(4): 397–405.

Hamada T, Yokota K, Ayada K, Hirai K, Kamada T, Haruma K, Chayama K, Oguma K. Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease. Helicobacter 2009; 14(6): 545–551.

Hanson WH, Taylor K, Taylor DK. PCR testing of media placed in soiled bedding as a method for mouse colony health surveillance. J Am Assoc Lab Anim Sci 2021; 60(3): 306–310.

Hodzic E, McKisic M, Feng S, Barthold SW. Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice. *Comp Med* 2001; 51(5): 406–412.

Homberger FR, Nicklas W, Kränzlin B. Hygiene-Überwachung von Maus- und Rattenbeständen bei verschiedenen Haltungsformen. Fachinformation aus dem Ausschuss für Hygiene GV-SOLAS; 2009.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994; 61: 1–241.

Jacobsen K (2004): Optimierung des Nachweises von murinen *Helicobacter* Infektionen in Versuchstierhaltungen. München, LMU, Tierärztliche Fakultät, Diss.

Jiang HQ, Kushnir N, Thurnheer MC, Bos NA, Cebra JJ. Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not for other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells. *Gastroenterology* 2002; 122: 1346–1354.

Kim H, Bang J, Ho Baek S, Park J. Eliminating murine norovirus, *Helicobacter hepaticus*, and intestinal protozoa by embryo transfer for an entire mouse barrier facility. *Exp Anim* 2022; 71(1): 28–35.

Körner C, Miller M, Brielmeier M. Detection of murine astrovirus and *Myocoptes musculus* in individually ventilated caging systems: Investigations to expose suitable detection methods for routine hygienic monitoring. *PLoS One* 2019; 14(8): e0221118.

Kraft V, Deeny AA, Blanchet HM, Boot R, Hansen AK, Hem A, van Herck H, Kunstyr I, Milite G, Needham JR, Nicklas W, Perrot A, Rehbinder C, Richard Y, de Vroey G. Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies. *Lab Anim* 1994; 28: 1–12.

Krienitz W. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr* 1906; 32(22): 872.

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(10): 6952–6961.

Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 449–490.

Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun* 1988; 56(11): 2843–2850.

Lee A, Phillips MW, O'Rourke JL, Paster BJ, Dewhirst FE, Fraser GJ, Fox JG, Sly LI, Romaniuk PJ, Trust TJ, Kouprach S. *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.

Lindstrom KE, Carbone LG, Kellar DE, Mayorga MS, Wilkerson JD. Soiled bedding sentinels for the detection of fur mites in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50(1): 54–60.

Livingston RS, Riley LK, Hook RR Jr, 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. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(5): 745–750.

Lofgren JLS, 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(4): 436–442.

Mahabir E, Durand S, Henderson KS, Hardy P. Comparison of two prevalent individually ventilated caging systems for detection of murine infectious agents via exhaust air particles. *Lab Anim* 2019; 53(1): 84–88.

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(1): 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(3): 178–192.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* 1984; 1: 1311–1315.

Matsumoto T, Kobayashi Y, Shimizu S, Koike M. *Helicobacter bilis* infection in a colony of Japanese wild-derived mice. *Vet Pathol* 2000; 37(4): 360–369.

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* 2016a; 55(6): 775–781.

Miller M, Ritter B, Zorn J, Brielmeier M. Exhaust air particle PCR detects *Helicobacter hepaticus* infections at low prevalence. *J Vet Sci Technol* 2016b; 7: 4: DOI 10.4172/2157-7579.1000343.

Miller M, Brielmeier M. Environmental samples make soiled bedding sentinels dispensable for hygienic monitoring of IVC-reared mouse colonies. *Lab Anim* 2018; 52(3): 233–239.

Murakami K, Takahashi R, Ono M, Watanabe K, Okimoto T, Kodoma M, Abe D, Kimura M, Fujioka T. Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in patients with liver and gastrointestinal diseases: western blot analysis and ELISA using a highly specific monoclonal antibody for *H. hepaticus* antigen. *J Gastroenterol* 2011; 46(9): 1120–1126.

Murphy G, Freedman ND, Abnet CC, Albanes D, Cross AJ, Huang W, Koshiol J, McGlynn K, Parisi D, Männistö S, Weinstein SJ, Waterboer T, Butt J. *Helicobacter*

*hepaticus* and *Helicobacter bilis* in liver and biliary cancers from ATBC and PLCO. *Helicobacter* 2024; DOI: 10.1111/hel.13053.

Myles MH, Livingston RS, Franklin CL. Pathogenicity of *Helicobacter rodentium* in A/JCr and SCID mice. *Comp Med* 2004; 54(5): 549–557.

Neubert V, Sadek A, Burell T, Ralser A, Erhard M, Gerhard M, Seidel K, Kalali B. Validation and improvement of a multiplex PCR method to detect murine *Helicobacter* species in feces samples of mice. *Helicobacter* 2022; 27(3): e12888.

Newman H, Maritz J. Basic overview of method validation in the clinical virologie. *Rev Med Virol* 2017; 27: e1940: DOI 10.1002/rmv.1940.

Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 2002; 36(1): 20–42.

Niimi K, Maruyama S, Sako N, Miyata K, Yoshimoto T, Bilecki B, Henderson KS, Takahashi E. The Sentinel EAD program can detect more microorganisms than bedding sentinel animals. *Jpn J Vet Res* 2018; 66(2): 125–129.

Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother* 2010; 1(2): 87–93.

Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of procaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020; 70, 5607-5612; DOI 10.1099/ijsem.0.004332.

Patel JR, A variation of the modified Steiner. *Histologic* 1993; 23: 39–40.

Phillips MW, Lee A. Isolation and characterization of a spiral bacterium from the crypts of rodent gastrointestinal tracts. *Appl Environ Microbiol* 1983; 45(2): 675–683.

Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of

infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 2009; 43: 165–173.

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: 93–98.

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. *Lab Anim* 1996; 30(3): 193–208.

Rice JM. *Helicobacter hepaticus*, a recently recognized bacterial pathogen, associated with chronic hepatitis and hepatocellular neoplasia in laboratory mice. *Emerg Infect Dis* 1995; 1(4): 129–131.

Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (2010).

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(4): 942–946.

Russell RJ, Haines DC, Anver MR, Battles JK, Gorelick PL, Blumenauer LL, Gonda MA, Ward JM. Use of antibiotics to prevent hepatitis and typhlitis in male scid mice spontaneously infected with *Helicobacter hepaticus*. *Lab Anim Sci* 1995; 45(4): 373–378.

Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11(6): 385–399.

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(11): 2968–2972.

Shek WR, Smith AL, Pritchett-Corning KR (2015): Microbiological Quality Control for Laboratory Rodents and Lagomorphs. In: Anderson LC, Fox JG, Otto G, Pritchett-Corning KR, Whary MT (Ed.), Laboratory Animal Medicine. Dritte Edition. Elsevier Inc., Amsterdam, 463–510.

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(3): 627–634.

Shen Z, Schauer DB, Mobley HLT, 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(9): 2447–2453.

Shen Z, Feng Y, Zhang Q, Chen L. Detection of *Helicobacter bilis* in human liver samples from patients with primary biliary cirrhosis. Helicobacter 2001; 6(4): 286–291.

Sterzenbach T (2006): Untersuchungen zur Pathogenität von *Helicobacter hepaticus*: genomische und funktionelle Aspekte. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Diss.

Suerbaum S, Burchard G, Kaufmann SHE, Schulz TF (2016): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. World J Gastroenterol 2014; 20(36): 12781–12808.

Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006, das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 20 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 geändert worden ist. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html> (abgerufen 11.07.2024).

Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 01. August 2013, die zuletzt durch Artikel

1 der Verordnung vom 11. August 2021 geändert worden ist. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html> (abgerufen 12.06.2024).

Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins MJ Jr, Gorelick PL, Nagashima K, Gonda MA, Gilden RV, Tully JG, Russell RJ, Benveniste RE, Paster BJ, Dewhirst FE, Donovan JC, Anderson LM, Rice JM. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J Natl Cancer Inst* 1994a; 86(16): 1222–1227.

Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am J Pathol* 1994b; 145(4): 959–968.

Whary MT, Morgan TJ, Dangler CA, Gaudes KJ, Taylor NS, Fox JG. Chronic active hepatitis induced by *Helicobacter hepaticus* in the A/JCr mouse is associated with a Th1 cell-mediated immune response. *Infect Immun* 1998; 66(7): 3142–3148.

Whary MT, Cline JH, King AE, Corcoran CA, Xu S, Fox SG. Containment of *Helicobacter hepaticus* by use of husbandry practices. *Comp Med* 2000a; 50: 78–81.

Whary MT, Feng Y, Ge Z, Dangler CA, Lin K, Fox JG. A *Helicobacter bilis*-associated typhlocolitis model in SCID mice. *Helicobacter* 2000b; 5(4): 295–302.

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* 2000c; 50(4): 436–443.

Whary MT, Fox JG. Natural and experimental *Helicobacter* infections. *Comp Med* 2004; 54(2): 128–158.

Whary MT, Fox JG. Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents. *Lab Anim* 2006; 35(7): 25–36.

Whittaker AL, Barker TH. The impact of common recovery blood sampling

---

methods, in mice (*Mus musculus*), on well-being and sample quality: a systematic review. *Animals* 2020; 10: 989.

Zangenberg G, Saiki RK, Reynolds R (1999): 6 - Multiplex PCR: Optimization guidelines. In: *PCR Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (Ed.), Academic Press, San Diego, California, USA, 73–94.

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(3): 301–310.

## IX. ANHANG

### 1. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori* (SUERBAUM et al., 2016)

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

Abbildung 3A und 3B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. hepaticus* (FOX et al., 1994)

Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. muridarum* mit den sichtbaren periplasmatischen Fasern (pf) sowie den bipolaren Geißel-Büscheln (fa), (PHILLIPS und LEE, 1983)

Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. rodentium* (SHEN et al., 1997)

Abbildung 6: Negativaufnahme von *H. typhlonius* mit jeweils einer bipolaren Geißel (FOX et al., 1999)

### 2. **Abbildungsverzeichnis Veröffentlichung Sutterer et al.**

Abbildung 1: Comparison of two DNA extraction kits (Analytik Jena, AJ; Zymo Research, ZR) on all sample materials with 100bp DNA ladder: 1: AJ gauze, 2: AJ swab, 3: AJ filter paper, 4: AJ prefilter, 5: AJ nestlet, 6: ZR gauze, 7: ZR swab, 8: ZR filter paper, 9: ZR prefilter, 10: ZR nestlet, 11: positive control, 12: negative control

Abbildung 2: Comparison of PCR results without and with pretreatment with 20 µl Dithiothreitol (DTT) and 0,1 % Tween-20 in gauze, swab, filter paper and prefilter samples with 100bp DNA ladder. 1–4: gauze, swab, filter paper, prefilter without pretreatment; 5–8: gauze, swab, filter paper, prefilter pretreated with DTT and Tween-20; 9: positive control, 10: negative control

Abbildung 3: Lower limit of detection of *H. hepaticus* with 100bp DNA ladder

### **3. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Beispiele für *Helicobacter*-Arten und der empfänglichen Wirte sowie dem Ort der Primärbesiedelung

Tabelle 2: Eigenschaften fünf verschiedener relevanter muriner *Helicobacter*-Arten (modifiziert aus JACOBSEN, 2004); k. A. = keine Angabe

Tabelle 3: Eigenschaften der sechs verschiedenen DNA-Extraktionskits

Tabelle 4: Eigenschaften der fünf verschiedenen Umweltprobenmaterialien

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Primer

### **4. Tabellenverzeichnis Veröffentlichung Sutterer *et al.***

Tabelle 1: Characteristics of the six chosen DNA extraction kits

Tabelle 2: Sample materials used

Tabelle 3: Comparison of DNA extraction kits

Tabelle 4: Overview and results of the in-house validation process with *H. hepaticus* and *Helicobacter* spp. primers

## **X. DANKSAGUNG**

Zu allererst gilt mein Dank meiner Mentorin und Betreuerin am Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU, Dr. Karin Seidel. Liebe Karin, ich danke dir für deine Inspirationen und konstruktiven Kritiken, die es ermöglicht haben, diese Arbeit so wundervoll umzusetzen.

Zusätzlich danke ich Prof. Markus Gerhard und allen Angestellten im Institut; hier allen voran Ursula Eschenbach (Danke Eschi, du bist die Beste!) für die Möglichkeit, die Untersuchungen durchführen zu können und mir die notwendige Ausstattung zur Verfügung zu stellen.

Lieber Behnam, ich danke dir für deine unendliche Geduld, deine Muße, mir komplizierte Sachverhalte näherzubringen und dass du mich immer wieder aufgemuntert hast, wenn die Motivation zu schwinden drohte.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Erhard als meinem Doktorvater, der an dieses Projekt geglaubt hat und mir so die Möglichkeit gegeben hat, Tierversuche und Tierschutz ein Stück weit in Einklang zu bringen.

Barbara, meine größte Stütze und Hilfe in all den Jahren – ich sage einfach DANKE, weil alles aufzulisten schlicht und ergreifend den Rahmen dieser Danksagung sprengen würde. Ohne dich wäre ich aufgeschmissen gewesen!

Ich danke meinem Mann und meiner Familie für den Rückhalt, die Motivation, die Unterstützung und dass ihr mir nicht böse wart, wenn ich wegen der Doktorarbeit mal wieder wie so oft keine Zeit für andere Dinge hatte.

Zu guter Letzt: Stephan. Diese Arbeit ist dir gewidmet. Leider konntest du die Fertigstellung nicht mehr miterleben. Ich werde dich nie vergessen.