



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Helicobacter spp. i digestionskanalen hos svenska katter

en metodologisk och klinisk studie

Sofia Sjödin

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:41*

Helicobacter spp. i digestionskanalen hos
svenska katter
en metodologisk och klinisk studie

Sofia Sjödin

Handledare: Mona Fredriksson¹
Biträdande handledare: Gunilla Trowald-Wigh och Elisabet Ekman¹
Examinator: Jakob Ryd Ottoson¹

¹Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: *Helicobacter* spp., katt, hepatit, cholangit, cholangiohepatit, paraffininbäddade vävnadsprov, biopsi, PCR

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:41

INNEHÅLL

Sammanfattning.....	1
Abstract.....	2
Inledning	3
Allmänt om <i>Helicobacter</i> spp.	3
<i>Helicobacter</i> spp. hos människa.....	3
<i>Helicobacter</i> spp. hos katt.....	4
Magsäck	4
Lever.....	5
Inflammatoriska leversjukdomar hos katt	5
Analys av paraffinbäddade vävnadsprover.....	6
Formalinfixering och paraffinbäddning.....	6
Avparaffinering.....	7
DNA-extraktion	7
Syfte med studien	7
Material och metod	8
Material.....	8
Metod.....	8
Avparaffinering.....	8
Extraktion av DNA	8
Mätning av extraherat DNA	9
Polymerase Chain Reaction (PCR).....	9
Gelelektrofores	11
Resultat	11
Utvärdering av metoden - magsäckar.....	11
Mätning av extraherat DNA	11
PCR och gelelektrofores	13
Organ från katter med leversjukdom.....	13
Organ från kontrolldjur	14
Diskussion.....	15
Framtida studier.....	17
Litteraturlista.....	19

SAMMANFATTNING

Helicobacter spp. är böjda till stavformade, gramnegativa bakterier som kan orsaka magsår, gastrit och magsäckscancer hos människa. Även hos katt har kopplingar till gastrit observerats, dock har infektion inte orsakat kliniska symptom. Samband mellan infektion med *Helicobacter* spp. och leversjukdom har påvisats hos människa, däremot har inget samband påvisats hos katt.

I denna studie analyserades vävnadsprover som fixerats i formalin och paraffininbäddats för arkivering. Att analysera DNA från paraffininbäddade vävnadsprover med hjälp av PCR försvåras genom att DNA-kvaliteten påverkas negativt och PCR inhiberas av ämnen från fixeringen. Syftet med denna studie var att vidareutveckla en metod för analys av paraffininbäddade vävnadsprover, samt att undersöka om *Helicobacter* spp. kan påvisas hos katter med leversjukdom och hos friska kontrolldjur.

I studien analyserades organmaterial från 26 katter med leversjukdomar, varav 26 vävnadsprover från lever, 5 från magsäck, 2 från duodenum, 5 från pankreas samt ett prov från en gallblåsa. Som kontrollprov användes vävnadsprover från 7 katter utan tecken på leversjukdom. Dessa organ analyserades både som färska och paraffininbäddade för utvärdering av metoden. Paraffin avlägsnades genom tvätt med xylol och etanol, följt av DNA-extraktion med DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland). Mängden extraherat DNA mättes med spektrofotometri, varefter DNA analyserades med PCR och gelelektrofores med avseende på förekomst av ett fragment av 16S rRNA-genen som återfinns hos *Helicobacter* spp.

Helicobacter spp. påvisades i 3 av 5 paraffininbäddade vävnadsprover från magsäck hos katter med leversjukdom. Bakterien kunde inte påvisas i övriga organ. Högre prevalens sågs hos de paraffininbäddade kontrollproverna då 6 av 7 magsäcksprover var positiva. De paraffininbäddade kontrollproverna gav dessutom färre positiva resultat än de färska proverna, där positivt resultat erhöles hos samtliga duodenum- och magsäcksprover, 2 pankreasprover och ett leverprov. Detta indikerar att arkiveringen påverkar mängd och kvalitet på DNA negativt. Trots att DNA framgångsrikt kunde extraheras från samtliga analyserade prover behöver den använda metoden utvecklas ytterligare för att paraffininbäddade vävnadsprover ska kunna analyseras med samma tillförlitlighet som färska vävnadsprover. Förslagsvis skulle detta kunna göras genom förlängd lysering av proverna, inkubering i 98°C före lysering alternativt tillsats av fenol-kloroform efter lysering vilket i tidigare studier setts ge positiva resultat.

ABSTRACT

Helicobacter spp. are gram-negative bacteria that have been shown to cause gastritis, gastric ulcers and cancer in the human stomach. Cats may develop gastritis due to infection, although no clinical symptoms have been observed. Infection has been associated with liver disease in humans. However, this relationship has not been proven in cats.

This study was performed on tissue samples fixed in formalin and paraffin-embedded for archival purposes. Analysis of DNA from paraffin-embedded samples can be performed with PCR. However, fixation with formalin can negatively affect the amount and quality of the DNA, while PCR reactions may be inhibited from formalin residue. The aim of this study was to adjust a method for extracting and analyzing DNA from formalin fixed and paraffin-embedded tissues and to investigate whether cats with shown liver disease harbor *Helicobacter* spp. to the same extent as control animals.

This study was performed on tissue samples from 26 cats diagnosed with hepatitis, cholangiohepatitis or cholangitis. A total of 26 liver, 5 stomach, 2 duodenum, 5 pancreas and one gallbladder samples were analyzed. Seven cats without signs of liver disease were used as control animals. Control samples were analyzed both fresh and paraffin-embedded to further evaluate the method. Paraffin was removed by washing with xylene and ethanol followed by DNA-extraction using DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The amount of extracted DNA was measured by spectrophotometry, after which DNA specific for a fragment of the 16S rRNA gene found in all *Helicobacter* spp. was analyzed by PCR and gelelectrophoresis.

Helicobacter spp. was found in 3 out of 5 stomachs of cats with liver disease. The bacteria could not be found in any of the other organs. Prevalence was higher in paraffin-embedded samples from control cats, of which 6 out of 7 were found positive. Paraffin-embedded control samples were positive to a lesser extent than the fresh samples, as all fresh samples from stomach and duodenum, 2 pancreas and one liver were found positive. This indicates that fixation with formalin and paraffin-embedding can decrease the quality of DNA and inhibit PCR reactions. Although DNA could successfully be extracted from all tissue samples, the method used in this study needs further modification for analysis of formalin fixed and paraffin-embedded as well as fresh samples to be equally reliable. This could be achieved by prolonged lysis of samples, incubation in 98°C before lysis or by adding phenol-chloroform after lysis. These are methods previously shown to have positive effects on quality and amount of extracted DNA.

INLEDNING

Allmänt om *Helicobacter* spp.

Genus *Helicobacter* innefattar idag 32 olika arter, vilka återfunnits hos människa och ett flertal andra däggdjur samt hos fåglar (Euzéby, 2009). Bakterien har påvisats i magsäck, tunntarm, grovtarm, pankreas, lever och gallgångar (Harbour & Sutton, 2007, Nilsson et al, 2006). *Helicobacter* spp. är gramnegativa, böjda till spiralformade, mikroaerofila stavar, vars form och storlek varierar beroende på art (Greene, 2006). Ett flertal arter inom *Helicobacter* spp. utmärker sig genom sin förmåga att bilda enzymet ureas som bryter ner urea till ammoniak och vätekarbonat (Gonciarz et al, 2006). Denna reaktion leder till höjt pH vilket ger bakterien dess unika förmåga att överleva i magsäckens sura miljö. *Helicobacter* spp. har påvisats i faeces samt hittats i vattenkällor, vilket tyder på att smitta kan ske fekalt-oralt (Ghil et al, 2009). Man har även diskuterat oral smitta via saliv då *Helicobacter* spp. hittats i saliven hos katter. De arter som fanns i munhålan speglade dock inte arterna i magsäcken vid en jämförande studie (Shojaee Tabrizi et al, 2010).

Helicobacter spp. hos människa

Förekomst och betydelse av *Helicobacter* spp. hos människa har varit föremål för omfattande efterforskning sedan *Helicobacter pylori* visades orsaka gastrit och magsår (Marshall et al, 1985). Senare har även samband mellan infektion med *H. pylori* och magsäckscancer i form av adenocarcinom och lymfom påvisats (Baele et al, 2009, Jergens et al, 2009, Van den Bulck et al, 2005). Människor infekterade med *H. pylori* har bedömts löpa 10-20 % risk att utveckla magsår och 1-2 % risk att utveckla magsäckscancer (Jergens et al, 2009). *H. pylori* kan kolonisera magsäcken utan att ge kliniska symptom, och har bedömts finnas hos 70-90 % av befolkningen i U-länder och hos 25-50 % av befolkningen i I-länder. Övriga *Helicobacter* spp. som identifierats i magsäcken hos människa inkluderar *H. suis*, *H. salomonis*, *H. felis* och *H. bizzozeronii* (Baele et al, 2009).

Även förekomst av *Helicobacter* spp. i levern har undersökts i ett flertal studier. Arter som hittills påvisats i lever och galla är bland andra *H. pylori*, *H. bilis* och *H. hepaticus* (Hamada et al, 2009). *Helicobacter* spp. har påvisats hos patienter med ett flertal leversjukdomar, däribland primär skleroserande cholangit, hepatocellulärt carcinom och cirrhos (Pirouz et al, 2008). Det finns ännu inga bevis för att infektion med *Helicobacter* spp. orsakar leversjukdom, dock har patienter med gallsten och gallblåseinflammation (Hamada et al, 2009) samt kronisk hepatit och cirrhos (Pirouz et al, 2008) en högre prevalens av *Helicobacter* spp. jämfört med kontroller. Samband mellan infektion med *Helicobacter* spp. och gallstensbildning har visats på inokulerade möss, vilket kan indikera att en liknande patogenes är möjlig på människa (Hamada et al, 2009). På möss har även olika grader av hepatit efter oral inokulering med *H. pylori* observerats (Huang et al, 2009).

Nilsson et al påvisade 2006 *Helicobacter* spp. i pankreas och duodenum hos patienter med pankreatit och pankreascancer. I friska kontrollprover kunde *Helicobacter* spp. inte påvisas i pankreasvävnad. Även leverprover från samtliga patienter var negativa för växt av bakterien. Detta indikerar att *Helicobacter* spp. kan ha samband med sjukdom i pankreas.

***Helicobacter* spp. hos katt**

Magsäck

Olika studier har visat en prevalens av *Helicobacter* spp. hos katter på 67,5-90 % (Neiger et al, 1997, Shojaee Tabrizi et al, 2010, Takemura et al, 2009, Van den Bulck et al, 2005, Yamasaki et al, 1998). Uppnådda resultat varierar med bland annat analysmetod, katternas kliniska status samt geografiskt område. De generellt höga talen visar att bakterien utgör del av kattens normalflora och att symptomfria infektioner är vanliga. I en studie av Takemura et al (2009) utgjorde ”*Candidatus Helicobacter heilmannii*”¹ 85 % av de *Helicobacter* spp. som koloniserar magsäcken, medan *Helicobacter felis* utgjorde 10 %. *H. felis* har även i andra studier varit vanligt förekommande i magsäcken (Lecoindre et al, 2000, Shojaee Tabrizi et al, 2010, Van den Bulck et al, 2005). Katter härbärgerar ofta flera arter samtidigt vilket visats av bland annat Van den Bulck et al (2005). Enligt denna studie utgjorde blandinfektioner 62,8 % av alla infektioner med *Helicobacter* spp. Övriga *Helicobacter* spp. som påvisats i magsäcken hos katter inkluderar *H. pylori* (Lecoindre et al, 2000), *H. pametensis* (Neiger et al, 1997), *H. bizzozeroni* och *H. salomonis* (Van den Bulck et al, 2005), *H. canis* (Ghil et al, 2009) och *H. baculiformis* (Baele et al, 2008). Flera studier har visat att cardia, fundus och pylorus koloniserar i samma grad. (Simpson et al, 2001, Takemura et al, 2009). Vid silverfärgning av histologiska snitt har *Helicobacter* spp. påvisats på magslemhinnans yta, i kryptor samt intracellulärt i magsäckens parietalceller (Scanziani et al, 2001).

Flera arter inom genus *Helicobacter* kan orsaka histologiska förändringar i magsäcken hos katt, dock har man inte kunnat visa att infektion ger upphov till kliniska symptom. Fox et al visade 1995 att katter som inokulerades med *H. pylori* utvecklade persistent gastrit utan kliniska symptom på sjukdom. En studie utförd av Scanziani et al (2001) visade att katter från samma koloni, naturligt infekterade med *H. pylori*, hade mild till måttlig inflammation i magslemhinnan samt fibros i fundus och framförallt pylorus. Även kraftig hyperplasi av lymfoida folliklar i pylorus observerades vilket anses vara en möjlig bidragande faktor till magsäckslymfom (Takemura et al, 2009). I samma studie konstaterades att katter fria från *Helicobacter* spp. hade signifikant lägre grad av inflammatoriska förändringar. Även en studie av Simpson et al. (2001) visade att katter som naturligt infekterats med *H. pylori* hade högre grad av inflammation och fler lymfoida folliklar än icke infekterade katter. En högre grad av atrofi, fibros och epiteldysplasi, framförallt i pylorus kunde också observeras. Samtliga katter i denna studie var kliniskt fria från gastrointestinala symptom.

Infektion med *H. felis* har visats ge histologiska förändringar i magsäcken. I en studie av Simpson et al (2000) inokulerades fem katter med *H. felis* och undersöktes därefter genom biopsier vid ett flertal tillfällen. Histologiskt påvisades en mild gastrit både hos infekterade och icke infekterade katter. Gastriten var mer utbredd hos de katter som infekterats med *H. felis*. De infekterade katterna hade även ett ökat antal lymfoida folliklar samt atrofi och fibros i magslemhinnan i signifikant högre grad än kontrollkatterna. Alla fem katter förblev dock symptomfria under hela studien.

¹ Denna bakterie har inte klassificerats taxonomiskt då den ännu inte kunnat odlas, därav det provisoriska namnet ”*Candidatus Helicobacter heilmannii*” (O’Rourke et al, 2004).

Huruvida ”*Candidatus H. heilmannii*” kan orsaka gastrit hos katt är mer oklart. I en studie gjord av Neiger et al (1997) undersöktes magsäcksbiopsier från 58 kliniskt friska katter, varav 78 % var infekterade med ”*Candidatus H. heilmannii*”. Däremot kunde inget samband mellan inflammatoriska förändringar och infektionsstatus påvisas. Liknande resultat påvisades av Takemura et al (2009) som jämförde magsäcksbiopsier från katter med och utan gastrointestinala symptom. Inget signifikant samband sågs mellan inflammatoriska förändringar och infektion med ”*Candidatus H. heilmannii*”. Däremot hade katter positiva för *Helicobacter* spp. en signifikant högre grad av lymfoida folliklar och epitelproliferation, vilket som tidigare nämnts anses kunna bidra till utveckling av lymfom i magsäcken.

Lever

Få studier har hittills gjord för att påvisa *Helicobacter* spp. i lever hos katt. *Helicobacter pylori* påvisades av Boomkens et al (2004) i gallprover från katter med lymfocytär cholangiohepatit. I denna studie kunde inte något statistiskt signifikant samband mellan infektion och sjukdom fastställas. Av de kliniskt friska kontrollerna var 58 % positiva för *Helicobacter* spp. vid analys med polymerase chain reaction (PCR), jämfört med 26 % av katterna med lymfocytär cholangit.

Fler arter inom genus *Helicobacter* hittades av Greiter-Wilke et al (2006) i paraffinbäddade organprover från lever, gallgångar och gallblåsa. I studien undersöktes 49 katter varav 32 diagnostiserats med cholangiohepatit, 13 med icke inflammatorisk leversjukdom samt 4 friska kontroller. Med hjälp av PCR påvisades *Helicobacter* spp. hos två katter med cholangiohepatit samt hos en katt med icke inflammatorisk leversjukdom. Med artspezifisk analys detekterades *H. pylori*, *H. nemistrinae*, *H. bilis* och *H. fenelliae/H. cinaedii* hos de positiva proverna. Studien kunde inte visa samband mellan infektion med *Helicobacter* spp. och leversjukdom. Dock visar resultaten att de arter som kan finnas i levern hos katter inte speglar arterna i magsäcken.

Inflammatoriska leversjukdomar hos katt

Inflammation i lever och gallgångar är vanligt förekommande hos katter. Typiskt för katt är en samtidig inflammation i pankreas och tarm, ett tillstånd som benämns triadit. Detta beror troligen på att gallblåsans och pankreas utförsgångar mynnar nära varandra i duodenum hos katt (Caney & Gruffydd-Jones, 2005). I en retrospektiv studie av katter med cholangiohepatit hade >80 % samtidig inflammatorisk tarmsjukdom (IBD) och ca 50 % hade pankreatit (Nelson & Couto, 2003).

Det råder viss tveksamhet om hur inflammatoriska leversjukdomar hos katt ska klassificeras utifrån den histologiska bilden. Vanligtvis brukar de två vanligaste sjukdomarna benämnas som exsudativ cholangit/cholangiohepatit respektive lymfocytär cholangit (Caney & Gruffydd-Jones, 2005).

Exsudativ cholangiohepatit ses ofta som en akut insättande sjukdom hos äldre katter med tydliga symptom såsom feber, inappetens, icterus och eventuellt buksmärter. Vid histologi ses som viktigaste fynd en stor mängd neutrofiler i gallgångarna. Vid odling av levermaterial ses vanligen bakterier som återfinns i

tarmens normala flora, däribland *Escherichia coli*. Blandinfektioner är vanligt förekommande. Av denna anledning brukar sjukdomen vanligtvis behandlas med antibiotika (Caney & Gruffydd-Jones, 2005).

Lymfocytär cholangit ses framförallt hos yngre katter, och då som en mer kronisk sjukdom än den exsudativa formen. Icterus och ascites är vanliga symptom, dock har drabbade katter ofta opåverkat allmäntillstånd och bibehållen aptit. Vid histologi ses inflammation bestående av framförallt lymfocyter men även andra leukocyter. Gallgångarnas lumen brukar vara fria från inflammatoriska celler (Caney & Gruffydd-Jones, 2005). Lymfocytär cholangit anses inte vara av bakteriellt ursprung då man inte hittar växt av bakterier vid odling på galla (Boomkens et al, 2004). Behandling består därför framförallt av kortikosteroider (Caney & Gruffydd-Jones, 2005).

Analys av paraffinbäddade vävnadsprover

Formalinfixering och paraffinbäddning

Fixering i formalin och paraffinbäddning är ett vanligt förekommande sätt att förvara vävnadsprover och används vid många patologiska laboratorier i samband med obduktioner och biopsier (Miething et al, 2006). Detta arkiveringssätt gör att vävnadsprover kan förvaras i rumstemperatur under mycket lång tid (Coura et al, 2005). På senare tid har man utforskat möjligheterna att analysera DNA från dylika prover. Detta kan bland annat göras med PCR, vilket är en mycket känslig metod som kan påvisa små mängder DNA. Med hjälp av PCR kan exempelvis specifika infektiösa ämnen eller gener som styr en viss sjukdom undersökas. En väl fungerande metod för DNA-analys av formalinfixerade och paraffinbäddade prover skulle ge helt nya möjligheter att studera de enorma mängder material som finns arkiverat både i Sverige och utomlands och möjliggöra retrospektiva studier i mycket stor utsträckning (Farrugia et al, 2009).

DNA-analys av formalinfixerade och paraffinbäddade prover försvåras av en rad olika faktorer. Exempelvis kan fixering i formalin orsaka korsbindningar mellan DNA-molekyler och vävnadsproteiner. Detta leder till DNA-fragmentering vilket minskar möjligheten att påvisa längre DNA-fragment med hjälp av PCR (Dedhia et al, 2007). Risk finns även att DNA:t degraderas helt och därmed inte kan påvisas med PCR. Lehmann & Kreipe (2001) har bedömt den genomsnittliga fragmentlängden som 300-400 baspar. I en studie av Dedhia et al (2007) påvisade man fragment på upp till 250 baspar med hjälp av PCR, men fick enbart negativa resultat på längre fragment. DNA-fragment på 362 baspar påvisades av Santos et al (2008) som använde en mer utförlig avparaffineringsprocess innehållande tvätt med etanol i flera koncentrationer. Utöver fragmentering av DNA kan formalinrester också orsaka inhibering av den mycket känsliga PCR-reaktionen (Farrugia et al, 2009). Den negativa effekten av formalin har visats vara relaterad till under hur lång tid fixeringen har skett. Miething et al (2006) utförde PCR-analys av prover som fixerats i formalin under tider som varierade från 1 dygn till 336 dygn. Fragment på 150-170 baspar kunde påvisas i prover som fixerats i upp till 28 dagar. Fixering i över 56 dagar gav negativa resultat för vissa vävnader, däribland lever, och 84 dagars fixering gav genomgående negativa resultat. Tiden som prover fixeras i formalin varierar i olika studier mellan 24 timmar (Coura et al, 2005) och 34 dygn (Farrugia et al, 2009).

En rad olika metoder har använts för att extrahera DNA från formalinfixerade och paraffininbäddade vävnadsprover. På grund av den stora variationen mellan dessa metoder är resultaten svåra att jämföra. Även utvärderingen av resultaten varierar då olika författare använt primers avsedda för varierande längder av DNA-fragment. Det bör också nämnas att formalinfixerade och paraffininbäddade prover löper större risk att kontamineras på grund av de många steg som krävs för att avlägsna paraffin och formalinrester.

Avparaffinering

Vid analys av paraffininbäddade prover renas vävnaden vanligen först från paraffin. Detta sker vanligen med hjälp av lösningsmedlet xylen (dimetylbensen) följt av tvätt med etanol i varierande utsträckning. Tvätten syftar till att rehydrera proverna och avlägsna xylenrester som annars kan inhibera efterföljande cellysning med proteinas K (Coura et al, 2005). I regel sker tvätt i 2-3 koncentrationer av etanol, inledningsvis används en hög koncentration (vanligen 99-100 %) som sedan sänks för varje tvätt. Eventuellt följs detta av en avslutande tvätt i destillerat vatten (Carturan et al, 2008, Coura et al, 2005, Farrugia et al, 2009, Gilbert et al, 2007, Santos et al, 2008). I vissa studier har tvätt med etanol följts av rehydrering med Tris/EDTA (Coura et al, 2005, Farrugia et al, 2009).

DNA-extraktion

Extraktion av DNA från de avparaffinerade vävnadsproverna kan numera utföras med ett av flera tillgängliga extraktionskit. Extraktionen inleds med lysering av proverna, vanligen med hjälp av proteinas K. I en studie av Gilbert et al (2007) fann man att den totala extraherade DNA-mängden ökade vid lysering i 48 timmar jämfört med 24 timmar. Detta förklaras med att värmebehandling kan bryta korsbindningarna mellan DNA och vävnadsprotein som orsakas av fixering i formalin. Samma studie jämförde olika metoder som tidigare använts vid DNA-extraktion, med avseende på erhållen DNA-mängd och DNA-kvalitet. Förutom vid längre lyseringstid kunde en ökad mängd DNA erhållas då proverna värmdes i buffert till 98°C före tillsats av proteinas K, samt då proverna efter DNA-extraktion inkuberades med *Taq*-polymeras. Däremot påvisades ingen skillnad i mängd extraherat DNA beroende på huruvida proverna avparaffinerades eller inte. Farrugia et al (2009) erhöll även ökad mängd extraherat DNA då phenol-chloroform tillsattes efter lysering. Mängden extraherat DNA varierade mellan olika vävnader, exempelvis kunde större mängd DNA utvinnas från lever- än hjärtvävnad.

Syfte med studien

Denna studie utfördes utifrån följande frågeställningar:

- Kan man med den i studien använda metoden analysera DNA från formalinfixerade och paraffininbäddade prover med tillförlitliga resultat?
- Kan *Helicobacter* spp. påvisas hos katter med leversjukdom samt hos friska kontrollkatter?

MATERIAL OCH METOD

Material

Inledningsvis prövades metoden genom fem slumpmässigt utvalda magsäckar från katter som obducerats av varierande anledningar. Dessa var sedan tidigare inbäddade i paraffin och snittades på samma sätt som övriga prover.

I studien analyserades organmaterial från 26 katter med diagnoserna cholangiohepatit, cholangit eller hepatit. Företrädevis användes prover från lever, men även material från magsäck, duodenum och pankreas användes då dessa organ fanns tillgängliga. Totalt analyserades vävnadsprover från 26 leverar, 5 magsäckar, 2 duodenum, 5 pankreas samt 1 gallblåsa. Av totalt 39 organprover var 38 tagna i samband med obduktion medan det kvarvarande leverprovet togs vid biopsi. Samtliga prover hade tidigare fixerats i buffrad formalin och paraffininbäddats för arkivering vid Avdelningen för patologi, farmakologi och toxikologi, BVF, SLU. Tiden för formalinfixeringen varierade mellan några dygn och flera veckor. Från varje paraffininbäddat organ snittades till försöket $2 \times 20 \mu\text{m}$ tjocka skivor, undantagsvis även $3 \times 20 \mu\text{m}$ då erhållen DNA-mängd var otillräcklig för analys.

Som kontroll användes vävnadsprover från lever, magsäck, duodenum och pankreas från 7 katter obducerade vid Avdelningen för patologi, farmakologi och toxikologi, BVF, SLU, under hösten 2009. Dessa katter hade inte uppvisat gastrointestinala symptom och hade inga makroskopiska förändringar i något av de aktuella organen. Två prover togs från varje organ varav ett omedelbart frystes till -20°C medan det andra inbäddades i paraffin och snittades i likhet med tidigare prover. Dessa analyserades sedan parallellt för ytterligare utvärdering av metoden.

Metod

Avparaffinering

Avparaffinering av proverna skedde i enlighet med den metod som tidigare beskrivits av Pirouz et al. (2008), dock med viss modifiering. Till varje rör med $2 \times 20 \mu\text{m}$ provmaterial tillsattes $1000 \mu\text{l}$ xylol (dimetylbensen) för att lösa upp paraffinet. Proven blandades i vortex, skakades i rumstemperatur i 30 minuter och centrifugerades slutligen i 5 minuter i 13000 rpm. Detta upprepades en gång varpå proverna rehydrerades genom tvätt med etanol i sjunkande koncentration. Tvätten skedde genom tillsats av $1000 \mu\text{l}$ 99 % etanol, vortex samt centrifugering i 5 minuter. Detta upprepades en gång, varpå tvätt skedde på samma sätt med 80 %, 60 %, 40 % etanol samt destillerat vatten. Efter tvättningen torkades proverna i öppna rör i 37°C .

Extraktion av DNA

DNA extraherades med hjälp av DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland) enligt instruktioner från tillverkaren. I korthet gick metoden ut på att proverna lyserades över natt efter tillsats av ATL-buffert och proteinas K, vilket ger lysning av vävnadens celler och frigör befintligt DNA. Efter lysningen tillsattes AL-buffert och 99 % etanol varefter provet pipetterades över till ett medföljande 2 ml-rör med ett filter speciellt anpassat för att binda DNA. Proverna

centrifugerades i 8000 rpm i 1 minut för att separera DNA från övrigt material. Vätskan som passerat genom filtret avlägsnades varefter AW1-buffert tillsattes och proverna centrifugerades i 8000 rpm i 1 minut. Därefter tillsattes AW2-buffert följt av centrifugering i 14000 rpm i 3 minuter. Genom dessa steg med AW1- och AW2-buffert tvättas filtren rena från övrigt material medan DNA fäster vid filtret. Slutligen placerades filterrören i 1,5 ml-rör avsedda att samla upp renat DNA. DNA:t eluerades med AE-buffert avsedd att lossa det renade DNA:t (templet) från filtret. Proverna centrifugerades i 8000 rpm i 1 minut varefter vätskan innehållande eluerat DNA sparades i -20°C. Elueringen upprepades en gång i nya rör för att få ut största möjliga mängd DNA. Eluering utfördes med 2x50 µl AE-buffert för paraffinerade prover, medan färska prover eluerades med 100 µl och 200 µl AE-buffert i första respektive andra elueringen. Detta för att högre DNA-mängd förväntas från färska prover.

Mätning av extraherat DNA

Erhållen mängd extraherat DNA mättes med spektrofotometri, en metod där man mäter absorbansen av UV-ljus i provet vilket är relaterat till koncentrationen av DNA.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR utfördes för att påvisa eventuell förekomst av DNA från *Helicobacter* spp. i proverna. PCR är en kemisk reaktion genom vilken det genfragment man letar efter kan kopieras (amplifieras) upp i stor mängd. Detta sker med hjälp av specifika så kallade primers, korta oligonukleotidsekvenser som är komplementära till ändarna på det fragment man söker efter. Då dessa primers fäster till genfragmentet sker DNA-syntes med hjälp av ett värmestabil polymeras. För DNA-syntes krävs även oligonukleotider (dNTP) som fungerar som byggstenar för DNA-strängarna. Reaktionen möjliggörs genom en serie temperaturväxlingar som aktiverar programmets olika steg (se utförligare förklaring av respektive steg nedan).

I denna studie användes primerparet H276f och H676r (sekvens 5'-CTA TGA CGG GTA TCC GGC-3' respektive 5'-ATT CCA CCT ACC TCT CCC A-3') enligt Riley et al (1996). Dessa är specifika för ett 374 baspar långt fragment av 16S rRNA-genen som återfinns hos genus *Helicobacter*, men kan inte skilja på specifika arter.

Till PCR:en blandades en mastermix innehållande samtliga beståndsdelar som krävs för DNA-syntes. Mastermixen blandades enligt följande protokoll (där mängden multiplicerades med antal prover):

- 2,5 µl GeneAmp10X PCR Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 2,5 µl MgCl₂ (25mM) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 1µl dNTP-mix (10 mM) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 0,4 µl forward primer (10pmol/µl) (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Tyskland)

- 0,4 µl reverse primer (10 pmol/µl) (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Tyskland)
- 0,1 µl AmpliTaq® Gold DNA polymerase (5U/µl) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 16,1 µl H₂O

Till mastermixen tillsattes 2,5 µl templat vilket i varje separat rör gav en total mängd av 25 µl. Då DNA-koncentrationen bedömdes som alltför låg tillsattes istället 3 µl templat för att kompensera detta. Mängden mastermix minskades då för en bibehållen total mängd av 25 µl. För vissa prover som gav negativt resultat vid första PCR:en modifierades metoden genom ökad mängd templat eller genom spädning av proverna.

Från varje prov användes första eller andra elueringen beroende på DNA-koncentration. Företrädesvis användes koncentrationer på 50-200 ng/µl. Som positiv och negativ kontroll användes *H. bilis* respektive H₂O.

PCR-reaktionerna utfördes i en termocykler (GeneAmp® PCR System 2720 RTD, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR-programmet såg ut som följande, där punkt 2-4 upprepades 40 gånger:

- 94°C i 10 minuter
 - *Polymeraset aktiveras.*
- 94°C i 30 sekunder
 - *Bindningarna mellan DNA-strängarna bryts vilket ger denaturerat (enkelsträngat) DNA.*
- 55°C i 30 sekunder
 - *Primers binder selektivt till rätt segment på DNA:t varpå polymeras binder till primer och DNA-segment. DNA-syntesen startar.*
- 72°C i 30 sekunder
 - *DNA-syntes med hjälp av DNA-polymeras och dNTP.*
- 72°C i 5 minuter
 - *Ger en slutlig extension av eventuella kvarvarande strängar av denaturerat DNA.*
- 4°C ∞
 - *Nedkylning av provet möjliggör påföljande förvaring tills gelelektrofores genomförs.*

Gelelektrofores

Gelelektrofores utfördes för att kunna detektera det genus specifika fragmentet från 16S rRNA-genen efter genomgången PCR. Metoden går ut på att proverna vandrar genom en agarosgel med hjälp av elektrisk spänning. Detta sker genom att DNA-molekylerna på grund av sin negativa laddning färdas mot polen med positiv laddning. DNA-fragment kommer att vandra olika långt beroende på dess storlek, och med hjälp av infärgning av provet kan man därmed avläsa hur långt fragmenten vandrat under den aktuella tiden. I de prover som är positiva för *Helicobacter* spp. har det eftersökta genfragmentet amplifierats med hjälp av PCR, och kommer att ge upphov till ett band som kan avläsas med hjälp av en UV-kamera.

I denna studie användes en 1,5 % agarosgel (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) infärgad med etidiumbromid för att eventuella band skulle kunna avläsas med UV-ljus. Till brunnar i gelen pipetterades 10 µl av varje prov blandat med 1 µl laddningsbuffert. Nämnade buffert tjänar till att tynga ner provet som på så sätt kvarhålls i brunnen, samt ge en infärgning som gör det möjligt att se hur långt provet vandrat i gelen. I varje gel användes även en 50 baspars DNA-stege (GeneRuler™ MBI Fermentas, Carlsbad, CA, USA) innehållande DNA-fragment av definierade storlekar. Med hjälp av denna är det möjligt att avgöra storleken på DNA-fragmenten i de band som erhålls från analyserade prover.

RESULTAT

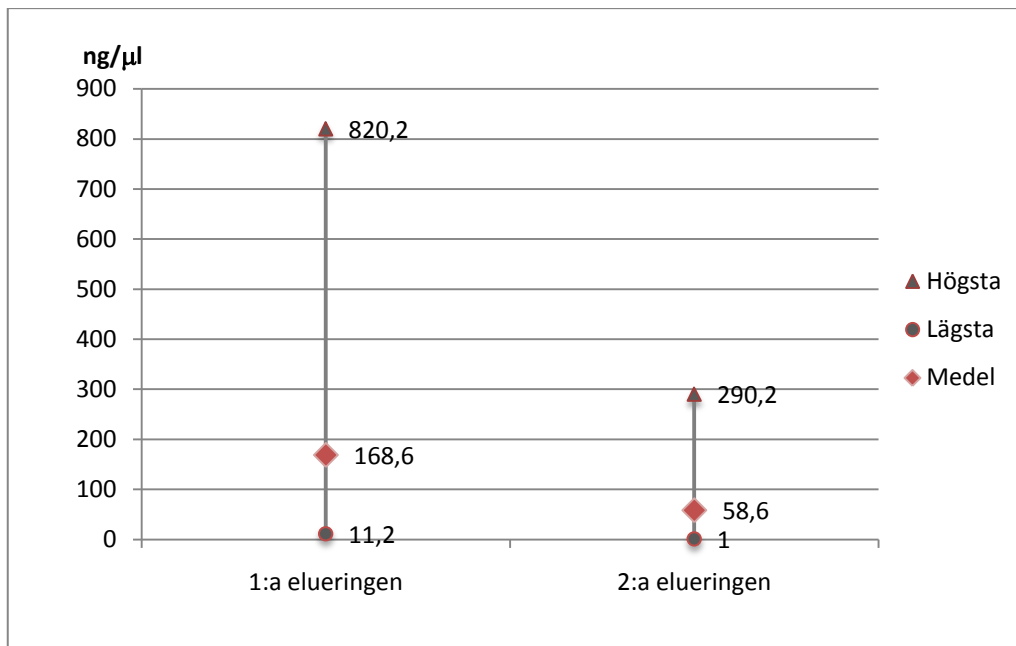
Utvärdering av metoden - magsäckar

Fem paraffininbäddade vävnadsprover från magsäck från katt analyserades för initial utvärdering av den metod som användes i studien. Uppnådd DNA-koncentration för dessa prover varierade mellan 12,6 ng/µl och 109,8 ng/µl. Efter PCR och gelelektrofores påvisades *Helicobacter*-genus specifika band för 3 av 5 vävnadsprover. Metoden tolkades därmed som framgångsrik och användes fortsättningsvis vid analys av övriga prover.

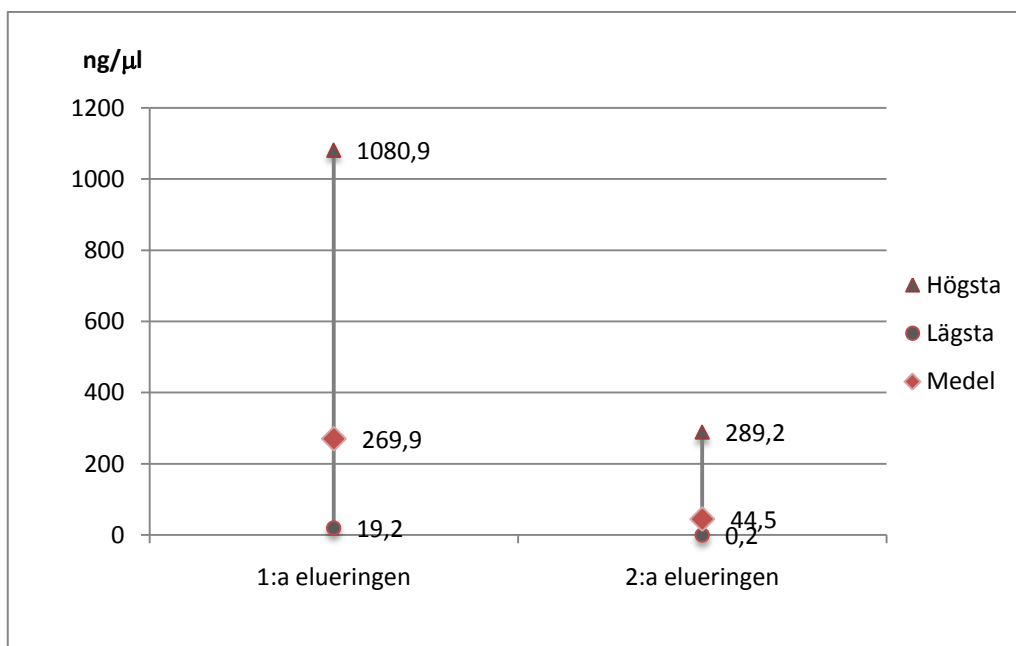
Mätning av extraherat DNA

Totalt mättes DNA-koncentrationen i 95 vävnadsprover varav 67 var avparaffinerade. Av dessa var 39 organprover från katter med leversjukdom och 56 prover från friska kontroldjur. Ett duodenumprov var negativt med avseende på DNA-mätning. Det snittades därför om i 3x20 µm och avparaffinerades på nytt varpå ett positivt DNA-värde uppmättes.

Som tidigare nämnts eluerades de paraffininbäddade proverna med 2 x 50 µl AE-buffert, medan de färskas eluerades med 100 µl och 200 µl AE-buffert vid första respektive andra elueringen. Av denna anledning presenteras DNA-koncentrationerna för färskas och paraffininbäddade prover i två skilda diagram (Figur 1 och Figur 2). Hos samtliga prover sågs som förväntat högre DNA-koncentration i första elueringen jämfört med den andra elueringen.



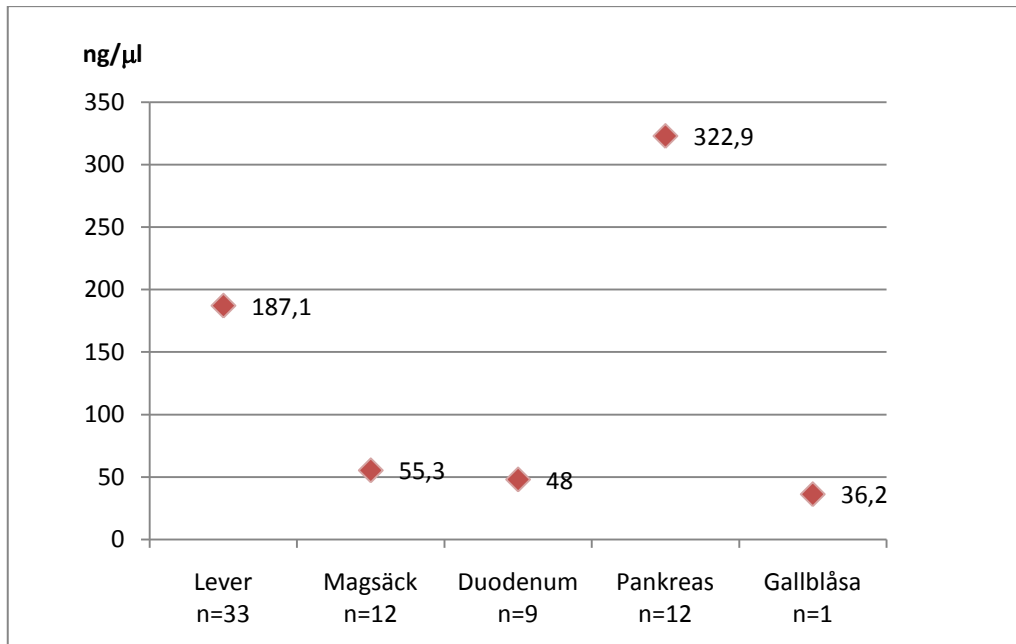
Figur 1. DNA-koncentration för paraffininbäddade vävnadsprover



Figur 2. DNA-koncentration för färska vävnadsprover

Den genomsnittliga DNA-koncentrationen som erhöles från paraffininbäddade vävnadsprover motsvarade den som erhöles från färska vävnadsprover. Dock utvanns större absolut mängd DNA från färska vävnadsprover då dessa eluerades med 2-4 gånger mer buffert. Även mellan olika organ sågs skillnad i DNA-koncentration vilket visas i Figur 3.

Till PCR användes elueringar med en DNA-koncentration som varierade mellan 11,1 ng/μl och 591,4 ng/μl. Positivt resultat på PCR erhöles vid 12,6 ng/μl och 227,3 ng/μl som lägsta respektive högsta DNA-koncentration.

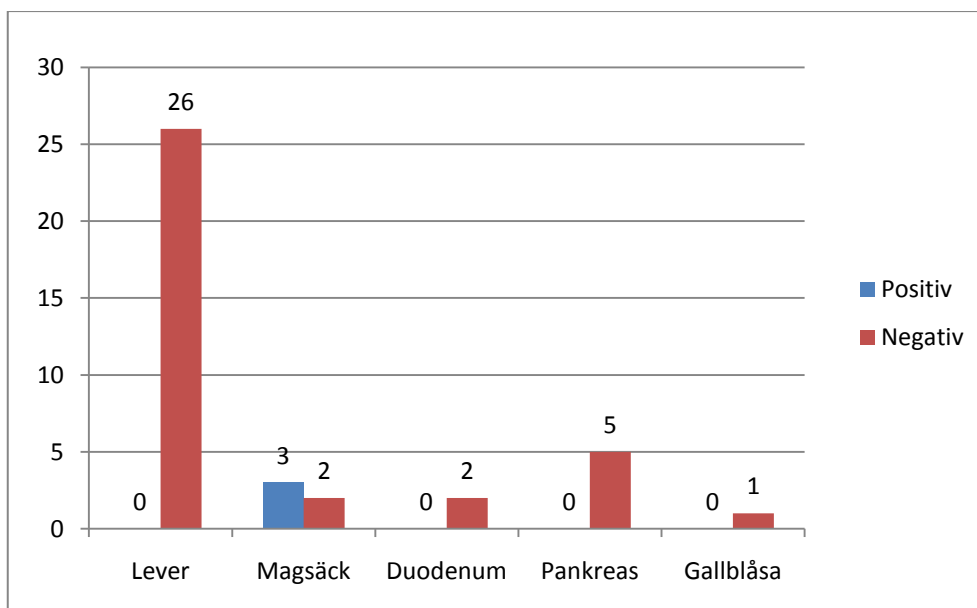


Figur 3. Genomsnittlig DNA-koncentration i paraffininbäddade vävnadsprover från olika organ

PCR och gelelektrofores

Organ från katter med leversjukdom

Resultatet för de paraffininbäddade vävnadsprover som tagits från katter med leversjukdom redovisas i Figur 4. I korthet var endast 3 av 39 prover positiva, vilka utgjordes enbart av magsäckar.

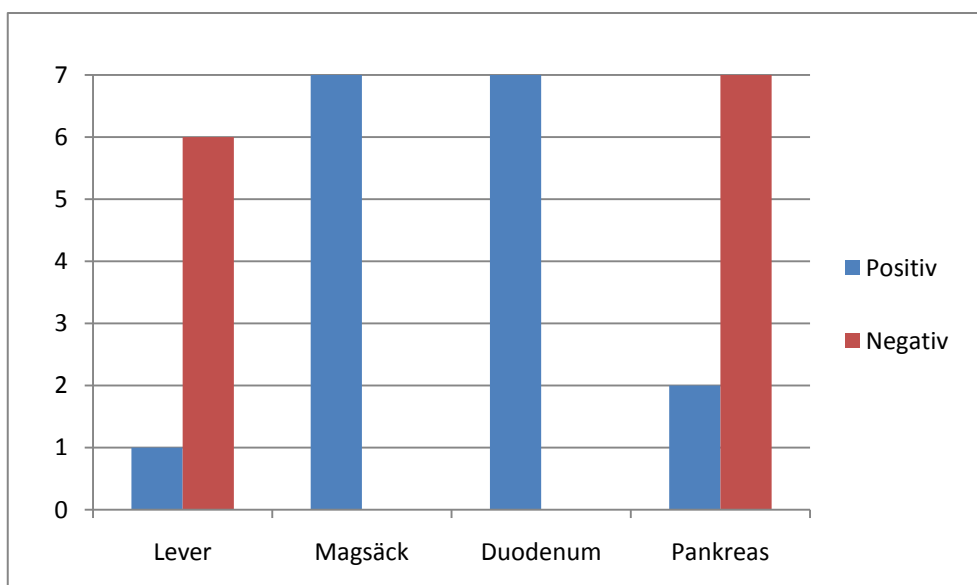


Figur 4. Resultat för vävnadsprover från katter med leversjukdom vid PCR-analys specifik för *Helicobacter* spp.

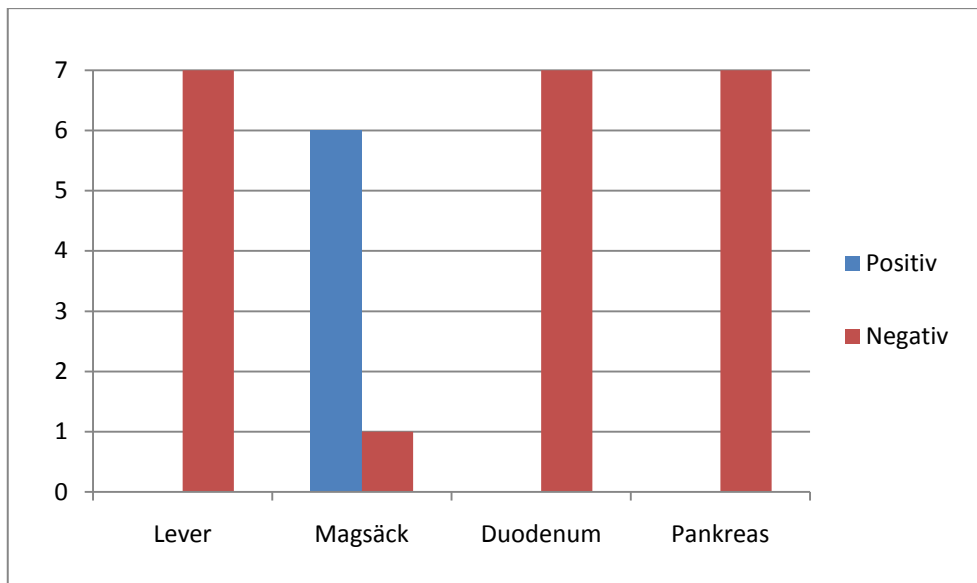
Ett flertal negativa prover analyserades på nytt med ändrade parametrar. Av de prover som redan vid första elueringen hade DNA-koncentration på mindre än 20 ng/μl togs 4 μl alternativt 5 μl templat till en ny PCR-reaktion för att optimera möjligheten till ett positivt resultat. Prover vars DNA-koncentration överskred 100 ng/μl späddes i tre steg, till 1:10, 1:100 och 1:1000. Detta gjordes för att späda ut eventuella icke önskvärda ämnen som riskerar att inhibera PCR-reaktionen, däribland övrigt DNA som inte kommer från *Helicobacter* spp. Ett magsäcksprov gav positivt utslag då mängden templat ökades till 4 μl, detta resultat är inkluderat i Figur 4. Övriga prover förblev negativa trots modifieringen.

Organ från kontroldjur

Resultaten från analys av kontrollkatterna visade en generellt högre förekomst av *Helicobacter* spp. jämfört med katter med leversjukdomar. Tydlig skillnad i resultat sågs mellan färska och paraffinbäddade organ, då *Helicobacter* spp. påvisades i magsäck, duodenum, pancreas och lever i färska vävnadsprover, men enbart i magsäck i paraffinbäddade vävnadsprover (Figur 5 och 6).



Figur 5. Resultat för färska prover från katter utan leversjukdom vid PCR-analys specifik för *Helicobacter* spp.



Figur 6. Resultat för paraffinbäddade prover från katter utan leversjukdom vid PCR-analys specifik för *Helicobacter* spp.

Generellt gav de färska proverna fler positiva utslag än de paraffinbäddade vilket kan ses i Figur 5. Detta trots att proverna togs från samma organ. Försök gjordes att modifiera metoden. Flera paraffinbäddade prover analyserades om med 3 och 4 µl templat till PCR, samt späddes till 1:10, 1:100 och i vissa fall 1:1000. Det första av dessa spädningssteg gav positivt resultat på två magsäckar, vilka är inkluderade i Figur 6. Övriga analyser gav negativt resultat.

DISKUSSION

Som tidigare nämnts har fixering i formalin och paraffinbäddning setts försvåra PCR-analys, både genom fragmentering av DNA samt via ämnen som inhiberar PCR-reaktionen (Dedhia et al, 2007, Farrugia et al, 2009). Studiens resultat stöder denna uppfattning då prover från samma organ gav olika resultat beroende på om analysen skett på färska eller paraffinbäddade vävnadsprover. Av totalt 28 provtagna organ var 11 icke överensstämmande vid jämförelse av färskt och paraffinbäddat vävnadsprov. Detta indikerar att möjligheten att påvisa genfragment med hjälp av PCR försvåras då prover fixerats med formalin och bäddats in i paraffin. Denna studie har inte kunnat klargöra huruvida de negativa resultaten beror på fragmentering av DNA, substanser som inhiberat PCR-reaktionen eller om förklaringen är en kombination av båda dessa faktorer. Ett sätt att undersöka detta närmare vore att använda primers anpassade för ett kortare fragment av DNA specifikt för *Helicobacter* spp. Att påvisa en högre prevalens av bakterien med hjälp av sådana primers skulle tyda på att fragmentering av DNA skett och att det längre genfragmentet av den anledningen inte kunnat påvisas. Alternativt kan man använda sig av en konstant primer i kombination med flera primers komplementära för olika platser på genfragmentet och på så sätt amplifiera fragment av olika längder i samma reaktion. Graden av fragmentering kan även undersökas genom att använda primers för en så kallad housekeeping-gen. En sådan gen är stabil och muterar sällan, varför den kan förväntas finnas hos alla katter och därmed i samtliga analyserade prover (Greiter-Wilke et al, 2006). Om denna inte kan påvisas indikerar det alltså att metoden inte fungerar,

alternativt att DNA:t är alltför fragmenterat för att fragmentet ska kunna påvisas. Risken finns även att DNA degraderats helt till följd av arkiveringen, varpå inga fragment kan påvisas med PCR. Enda möjligheten att undvika detta vore att modifiera själva arkiveringsmetoden, exempelvis förkorta tiden som proverna förvaras i formalin före paraffininbäddning.

En ytterligare möjlighet att få mer överensstämmande resultat skulle vara att späda proverna i lägre koncentrationer. I denna studie gav två magsäcksprover som var negativa vid första analysen positiva resultat efter spädning 1:10. Denna utspädningseffekt tyder på att det finns inhiberande substanser eller överflödigt DNA som stör PCR-reaktionen. En möjlighet att få mer korrekta resultat vore också att modifiera metoden redan på ett tidigare stadium, alltså korrigerar stegen i avparaffinering och DNA-extraktion. Exempelvis har man visat att tillsats av phenol-kloroform efter lysering av proverna, ökad lyseringstid och inkubation med *Taq*-polymeras ger ökad mängd extraherat DNA (Farrugia et al, 2009, Gilbert et al, 2007).

Tiden som de analyserade proverna förvarats i paraffin varierade mellan 7 år och några dygn. Trots detta sågs inte någon tydlig skillnad på mängden extraherat DNA beroende på lagringstid. Det verkar därför mindre troligt att tiden prover förvarats i paraffin skulle ha betydelse för mängden DNA som kan extraheras, vilket verkar lovande för möjligheten att analysera prover från mycket långt bak i tiden.

I denna studie användes ett protokoll för avparaffinering som var mycket omfattande jämfört med tidigare presenterade studier (Carturan et al, 2008, Coura et al, 2004, Dedhia et al, 2007, Farrugia et al, 2009, Santos et al, 2008). Metoden verkar ha varit framgångsrik då DNA har kunnat extraheras från samtliga prover. Ett organprov fick dock som tidigare nämnts snittas om för att ge positiv mätning. Den lägsta DNA-koncentrationen som gav positivt utslag på PCR var 12,6 ng/μl. Denna koncentration uppnåddes hos samtliga prover i minst en eluering, med undantag för ett lever- och ett duodenumprov. Detta visar att 93 av 95 PCR-analyserade prov i studien uppnådde en DNA-koncentration som hade potential att ge ett positivt resultat, vilket måste tolkas som en framgångsrik avparaffinering och DNA-extraktion. Det är dock viktigt att komma ihåg att DNA-mätning inte skiljer på DNA associerat med *Helicobacter* spp. och övrigt DNA. Mätningen visar inte heller graden av fragmentering hos extraherat DNA då detta inte påverkar den totala mängden. En hög DNA-koncentration behöver alltså inte innebära större chans för positiva resultat. Tvärtom kan höga koncentrationer av icke önskvärdt DNA potentiellt försvåra påvisandet av en mindre mängd *Helicobacter*-associerat DNA.

Vid jämförelse av förekomst av *Helicobacter* spp. i olika organ framgår det i denna studie tydligt att bakterien oftare påvisas i magsäck än i övriga organ. Detta trots att den totala DNA-mängden generellt var högre framförallt i pankreas. Resultaten kan bero på att mängden *Helicobacter* spp. är naturligt högre i magsäcken, varför man vid låga DNA-koncentrationer har större chans att påvisa DNA från denna bakterie. Skillnaden skulle även kunna bero på att olika vävnader varierar i känslighet för formalinfixering och paraffininbäddning (Farrugia et al, 2009). En högre grad av DNA-fragmentering i exempelvis lever skulle då fortfarande ge en total DNA-mängd som är jämförbar med magsäckens, men ge

ökad risk att DNA från *Helicobacter* spp. fragmenterats i hög grad och därför inte kan påvisas. Att vävnader varierar i känslighet för formalinfixering och paraffinbäddning skulle även kunna förklara varför mängden extraherat DNA varierar mellan de olika vävnaderna. En annan möjlig förklaring till detta är att olika organ innehåller varierande mängd DNA, exempelvis kan den stora mängden DNA i pankreas bero på organets höga koncentration av digestionsenzymer.

Inget samband har i denna studie kunnat ses mellan infektion med *Helicobacter* spp. och leversjukdom då bakterien enbart kunnat påvisas i 1 av 40 leverprover. Då den låga prevalensen sågs i såväl färsk som paraffinbäddade vävnadsprover styrker detta misstanken att katter har låg förekomst av *Helicobacter* spp. i levern. Katter med leversjukdom visade sig dock ha lägre förekomst av *Helicobacter* spp. i magsäcken än kontrollkatterna. *Helicobacter* spp. detekterades i endast 60 % av de analyserade magsäckarna från katter med leversjukdom, medan en prevalens på 86 % uppmättes hos de paraffinbäddade kontrollproverna. Ett sådant samband skulle kunna kopplas till eventuell tidigare behandling av katterna i studien, då både behandling med antibiotika och syrahämmande medel kan hämma växten av *Helicobacter* spp. i magsäcken. Huruvida katterna i denna studie behandlats har dock inte undersökts. Skillnaden i resultat mellan färsk och paraffinbäddade kontrollprover visar även att de paraffinbäddade vävnadsproverna riskerar att bli falskt negativa. De prover från katter med leversjukdom som analyserats i studien har fortfarande potential att ge positivt resultat om den använda metoden modifieras ytterligare. Risken kvarstår dock att DNA:t i proverna är alltför fragmenterat för att *Helicobacter* spp. kan påvisas med de primers som här använts. Sådana DNA-skador har i viss mån setts kunna åtgärdas genom inkubation med *Taq*-polymeras efter DNA-extraktion (Gilbert et al, 2007). En annan möjlighet att kompensera fragmenteringen vore att identifiera nya primers som är specifika för en kortare sekvens. Nackdelen med detta är dock att kortare sekvenser löper risken att vara mer ospecifika vilket ökar risken för falskt positiva resultat.

FRAMTIDA STUDIER

Ur klinisk synvinkel måste resultaten för katterna med leversjukdom betraktas som osäkra, då studien visat att paraffinbäddade prover inte säkert kan utvärderas med den metod som använts. För säkrare resultat krävs att metoden modifieras, alternativt att man istället analyserar färsk organprover från katter med leversjukdom. Intressant vore också att närmare undersöka huruvida de katter som undersöktes i studien har stått på medicinsk behandling.

Då man hos människa funnit samband mellan infektion med *Helicobacter* spp. och sjukdomar i pankreas (Nilsson et al, 2006), finns det indikation för att undersöka ett eventuellt liknande samband hos katt. Detta även med tanke på att denna studie visat förekomst av *Helicobacter* spp. i färsk pankreasvävnad. För närmare undersökning av resultaten, framförallt hos de färsk kontrollproverna, vore det av värde att analysera dessa prover med artspezifisk PCR för att definiera vilka arter som påvisats. Detta skulle ge en indikation på vilka arter inom *Helicobacter* spp. som förekommer i pankreas hos katt samt visa på eventuell spridning om samma art påvisas i flera olika organ. En artbestämning av prover

positiva för *Helicobacter* spp. skulle även ge värdefull information om vilka arter som förekommer i magsäck, lever och duodenum hos svenska katter.

Metoden för avparaffinering och DNA-extraktion som utvärderats i studien har visats vara framgångsrik med avseende på erhållen DNA-mängd. Behov finns dock för ytterligare modifiering av metoden för mer tillförlitliga resultat. Framförallt skulle man behöva en mer omfattande jämförelse mellan färska och paraffininbäddade prover från samma organ då detta skulle ge en optimal möjlighet att utvärdera metoden. Som tidigare nämnts har olika studier visat värdet av bland annat ökad lyseringstid och inkubation med *Taq*-polymeras efter DNA-extraktion (Gilbert et al, 2007), varför det vore värdefullt att utvärdera effekten av dessa åtgärder. Då spädning av flera prover visat ge positiva resultat vore det även värdefullt att späda samtliga prover som tidigare gett negativa resultat, samt eventuellt även späda till 1:10 000. Att utveckla en metod för analys av paraffininbäddade vävnadsprover som kan ge resultat motsvarande färska prover skulle visa sig ovärderligt för framtidens forskning, då man genom denna metod skulle ha tillgång till den enorma mängd arkiverade prover som finns i Sverige och världen runt.

LITTERATURFÖRTECKNING

Baele M., Decostere A., Vandamme P., Van den Bulck K., Gruntar I., Mehle J., Mast J., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (2008). *Helicobacter baculiformis* sp. Nov., isolated from feline stomach mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 357-364

Baele M, Pasmans F., Flahou B., Chiers K., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (2009). Non-*Helicobacter pylori* helicobacters detected in the stomach of humans comprise several naturally occurring *Helicobacter* species in animals. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 55, 306-313

Boomkens S.Y., Kusters J.G., Hoffmann G., Pot R.G.J., Spee B., Penning L.C., Egberink H.F., van den Ingh T.S.G.A.M. & Rothuizen J. (2004). Detection of *Helicobacter pylori* in bile of cats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 42, 307-311

Caney S.M.A. & Gruffydd-Jones T.J. (2005). Feline Inflammatory Liver Disease. I: (Ettinger S.J. & Feldman E.C.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6 ed. Vol. 2. 1448-1452. St. Louis : Elsevier Saunders

Carturan E., Tester D.J., Brost B.C., Basso C., Thiene G. & Ackerman M.J. (2008). An Evaluation of Different DNA Extraction Protocols and the Feasibility of Mutational Analysis From Archival Paraffin-Embedded Heart Tissue. *American Journal of Clinical Pathology* 129, 391-397

Coura R., Prolla J.C., Meurer L. & Ashton-Prolla P. (2005). An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *Journal of Clinical Pathology* 58, 894-895

Dedhia P., Tarale S., Dhongde G., Khadapkar R. & Das B. (2007). Evaluation of DNA Extraction Methods and Real Time PCR Optimization on Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissues. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 8, 55-59

Euzéby J.P. Hemsida. [online](2009-11-03) Tillgänglig: <http://www.bacterio.cict.fr/> [2009-12-04]

Farrugia A., Keyser C. & Ludes B. (2009). Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Science International* [online]. Tillgänglig: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073809003661> [2009-11-25]

Fox J.G., Batchelder M., Marini R., Yan L., Handt L., Li X., Shames B., Hayward A., Campbell J. & Murphy J.C. (1995). *Helicobacter pylori*-Induced Gastritis in the Domestic Cat. *Infection and Immunity*, jul 1995, 2674-2681

- Ghil H.-M., Yoo J.-H., Jung W.-S., Chung T.-H., Youn H.-Y. & Hwang C.-Y. (2009). Survey of *Helicobacter* infection in domestic and feral cats in Korea. *Journal of Veterinary Science* 10(1), 67-72
- Gilbert M.T.P., Haselkorn T., Bunce M., Sanchez J.J., Lucas S.B., Jewell L.D., Van Marck E. & Worobey M. (2007). The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues – Which Methods Are Useful When? *PLoS ONE* 2(6) e537
- Gonciarz M., Wloch M. & Gonciarz Z. (2006). *Helicobacter pylori* in liver diseases. *Journal of Physiology and Pharmacology* 57(3), 155-161
- Greene C.E. (2006). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3. ed. St. Louis : Elsevier Saunders
- Greiter-Wilke A., Scanziani E., Soldati S., McDonough S.P., McDonough P.L., Center S.A., Rishniw M. & Simpson K.W. (2006). Association of *Helicobacter* with Cholangiohepatitis in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 822-827
- Hamada T., Yokota K., Ayada K., Hirai K., Kamada T., Haruma K., Chayama K. & Oguma K. (2009). Detection of *Helicobacter hepaticus* in Human Bile Samples of Patients with Biliary Disease. *Helicobacter* 14, 545-551
- Harbour S. & Sutton P. (2007). Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122, 191-203
- Huang Y., Tian X.-F., Fan X.-G., Fu C.-Y. & Zhu C. (2009). The pathological effect of *Helicobacter pylori* infection on liver tissues in mice. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 843-849
- Jergens A.E., Pressel M., Crandell J., Morrison J.A., Sorden S.D., Haynes J, Craven M., Baumgart M. & Simpson K.W. (2009). Fluorescence In Situ Hybridization Confirms Clearance of Visible *Helicobacter* spp. Associated with Gastritis in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 16-23
- Lecoindre P., Chevallier M., Peyrol S., Boude M., Ferrero R.L. & Labigne A. (2000). Gastric helicobacters in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2, 19-27
- Lehmann U. & Kreipe H. (2001). Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies. *Methods* 25, 409-418
- Marshall B.J., Armstrong J.A., McGeachie D.B. & Glancy R.J. (1984). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric campylobacter. *The Medical Journal of Australia* 142, 436-439

- Miething F., Hering S., Hanschke B. & Dressler J. (2006). Effect of Fixation to the Degradation of Nuclear and Mitochondrial DNA in Different Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54(3), 371-374
- Neiger R., Dieterich C., Burnens A., Waldvogel A., Corthésy-Theulaz I., Halter F., Lauterburg B. & Schmassmann A. (1997). Detection and Prevalence of *Helicobacter* Infection in Pet Cats. *Journal of Clinical Microbiology* mars 1998, 634-637
- Nelson R.W. & Couto C.G. (2003). *Small Animal Internal Medicine*. 3. ed. St. Louis : Mosby
- Nilsson H-O., Stenram U., Ihse I. & Wadström T. *Helicobacter* species ribosomal DNA in the pancreas, stomach and duodenum of pancreatic cancer patients. *World Journal of Gastroenterology* 21, 3038-3043
- O'Rourke J.L., Solnick J.V., Neilan B.A., Seidel K., Hayter R., Hansen L.M. & Lee A. (2004). Description of “*Candidatus Helicobacter heilmannii*” based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2203-2211
- Pirouz T., Zounubi L., Keivani H., Rakhshani N. & Hormazdi M. (2008). Detection of *Helicobacter pylori* in Paraffin-Embedded Specimens from Patients with Chronic Liver Diseases, Using the Amplification Method. *Digestive diseases and science* 54(7), 1456-1459
- Riley L. K., Franklin C.L., Hook R.R. & Beschwilliford C. (1996). Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 942-946
- Santos M.C.L.G., Saito C.P.B. & Line S.R.P. (2008). Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. *Pathology – Research and Practice* 204, 633-636
- Scanziani E., Simpson K.W., Monestiroli S., Soldati S., Strauss-Ayali D. & Del Piero F. (2001). Histological and immunohistochemical detection of different *Helicobacter* species in the gastric mucosa of cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 3-12
- Shojaee Tabrizi A., Jamshidi Sh., Oghalaei A., Zahraei Salehi T., Bayati Eshkaftaki A. & Mohammadi M. (2010). Identification of *Helicobacter* spp. in oral secretions vs. gastric mucosa of stray cats . *Veterinary Microbiology* 140(1-2):142-146
- Simpson K.W., Strauss-Ayali D., Scanziani E., Straubinger R.K., McDonough P.L., Straubinger A.F., Chang Y.-F., Domeneghini C., Arebi N. & Calam J. (2000). *Helicobacter felis* Infection Is Associated with Lymphoid Follicular Hyperplasia and

Mild Gastritis but Normal Gastric Secretory Function in Cats. *Infection and Immunity*, feb 2000, 779-790

Simpson K.W., Strauss-Ayali D., Straubinger R.K., Scanziani E., McDonough P.L., Straubinger A.F., Chang Y.-F., Esteves M.I., Fox J.G., Domeneghini C., Arebi N. & Calam J. (2001). *Helicobacter pylori* Infection in the Cat: Evaluation of Gastric Colonization, Inflammation and Function. *Helicobacter* 6, 1-14

Takemura L.S., Camargo P.L., Alfieri A.A. & Bracarense A.P.F.R.L. (2009). *Helicobacter* spp. in Cats: Association between Infecting Species and Epithelial Proliferation within the Gastric Lamina Propria. *Journal of Comparative Pathology* 141, 127-134

Van den Bulck K., Decostere A., Baele M., Driessen A., Debongnie J.-C., Burette A., Stolte M., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (2005). Identification of Non-*Helicobacter pylori* Spiral Organisms in Gastric Samples from Humans, Dogs and Cats. *Journal of Clinical Microbiology* maj 2005, 2256-2260

Yamasaki K., Suematsu H. & Takahashi T. (1998). Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212(14), 529-533