

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinische Abteilung für Interne Medizin Kleintiere  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Iwan Burgener Dipl.ECVIM-CA Dipl.ACVIM PhD)

Pathohistologischer Nachweis von *Helicobacter spp.* bei Katzen mit gastrischem Lymphom

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Nina Zwickler

Wien, im Juni, 2023

1. Begutachterin: Priv.-Doz. Dr.med.vet. Birgitt Wolfesberger  
Klinische Abteilung für Interne Medizin Kleintiere  
Department für Kleintiere und Pferde  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Betreuerinnen: Ass. Prof. Dr. Andrea Fuchs-Baumgartinger  
Institut für Pathologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Priv.-Doz. Dr.med.vet. Birgitt Wolfesberger  
Klinische Abteilung für Interne Medizin Kleintiere  
Department für Kleintiere und Pferde  
Veterinärmedizinische Universität Wien

2. Begutachter: Dr. med. vet. Christof Bertram, PhD, DACVP  
Institut für Pathologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung und Fragestellung .....	1
2. Literaturübersicht .....	2
2.1. Das Lymphom der Katze .....	2
2.2. Ätiologie des felineen Lymphoms .....	2
2.3. Das gastrointestinale Lymphom .....	3
2.4. Klinik des gastrointestinales Lymphoms .....	4
2.5. Diagnostik des gastrointestinales Lymphoms .....	5
2.6. Therapie und Prognose des gastrointestinales Lymphoms .....	7
2.7. <i>Helicobacter spp.</i> .....	9
2.8. <i>Helicobacter</i> in der Humanmedizin .....	9
2.9. <i>Helicobacter</i> in der Veterinärmedizin .....	11
3. Material und Methode .....	14
3.1. Patientendaten und Probenauswahl .....	14
3.2. Entparaffinieren .....	14
3.3. Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	15
3.4. Giemsa Färbung .....	15
3.5. Eindecken und Fertigstellen der Proben .....	16
3.6. Mikroskopieren .....	16
4. Ergebnisse .....	17
4.1. Allgemeine Patientendaten .....	17
4.2. Probenanalyse .....	19
4.3. Vorkommen der Spiralbakterien .....	21

4.4. Vergleich der Färbemethoden .....	21
5. Diskussion .....	24
6. Zusammenfassung.....	28
7. Summary .....	29
8. Abkürzungsverzeichnis .....	30
9. Abbildungsverzeichnis .....	31
10. Literaturverzeichnis .....	32

## 1. Einleitung und Fragestellung

Das feline Lymphom ist der häufigste maligne Tumor der Katze, mit einer geschätzten Inzidenz von 200 Fällen pro 100 000 Katzen. Die Inzidenz hat in den letzten Jahrzehnten weiter zugenommen, wobei vor allem eine Zunahme am Typ des alimentären Lymphoms zu bemerken ist. Klinisch und sonographisch sind alimentäre Lymphome manchmal schwer von nicht-neoplastischen Krankheiten, wie der Inflammatory Bowel Disease (IBD), zu unterscheiden und brauchen aufwendige diagnostische Aufarbeitung, inklusive gastrointestinalen Biopsien und histopathologischer Beurteilung durch Veterinärpathologen.

In der Humanmedizin sind die cancerogenen Auswirkungen spezieller Erreger seit Jahrzehnten bekannt und gut erforscht. Eines der ersten hierbei entdeckten Pathogenen ist das Spiralbakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), welches seit 1994 von der International Agency for Research on Cancer als cancerogen der Klasse I eingestuft wird. *H. pylori* steht beim Menschen in Korrelation mit Gastritis, Magengeschwüren und mit einer speziellen Art des Lymphoms. Dieses mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) Lymphom kann im frühen Stadium durch eine Eradikation von *H. pylori* in eine komplette Regression gehen.

Auch der Magen-Darm-Trakt von Katzen ist mit *Helicobacter spp.* besiedelt. Die Pathogenität des Erregers ist jedoch bei dieser Spezies umstritten. Obwohl sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin *Helicobacter spp.* Grundlage diverser Forschungen ist, gibt es immer noch keinen eindeutigen Goldstandard zur Diagnosestellung.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit von *Helicobacter spp.* im Magen von Katzen mit diagnostiziertem Magenlymphom zu bestimmen und dabei zwei Färbevarianten als Nachweismethode zu vergleichen. Hierfür wurden histopathologische Schnitte von Magenbiopsien mit der Giemsa-Färbemethode und der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt und mikroskopisch auf Spiralbakterien untersucht. Die Vor- und Nachteile der jeweiligen Färbemethoden wurden notiert und diskutiert. Weitere Daten der Patienten, welche in der Studie erhoben wurden, waren das Geschlecht, Alter, Rasse und Phänotyp sowie Subtyp des jeweiligen Lymphoms. Die ermittelten Daten wurden anschließend graphisch dargestellt und die Ergebnisse der Färbemethoden mit anderen Nachweismethoden verglichen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Das Lymphom der Katze**

30 % aller Neoplasien der Katze sind hämatopoetischen Ursprungs. Davon sind 90 % maligne Lymphome. Damit zählen Lymphome zu den häufigsten Tumoren der Katze. Ursprünglich aus Lymphozyten hervorgehend kann sich das Lymphom in jedem Organ manifestieren. Es gibt mehrere Möglichkeiten feline Lymphome einzuteilen. Nach anatomischer Lokalisation werden fünf Gruppen unterschieden:

- Gastrointestinales Lymphom
- Multizentrisches Lymphom
- Extranodales Lymphom
- Lymphatische Leukämie
- Mediastinales Lymphom

Am öftesten werden derzeit gastrointestinale- und extranodale Lymphome diagnostiziert (Kessler 2022).

### **2.2. Ätiologie des feline Lymphoms**

Die Gründe für die Entstehung des feline Lymphoms werden vielfältig diskutiert und sind teilweise noch nicht vollständig geklärt. Es gibt allerdings einige Risikofaktoren, die nachweislich begünstigend auf die Tumorgenese wirken. Zwischen 1960 und 1980 waren schätzungsweise zwei Drittel der Lymphom Fälle mit dem feline Leukämie-Virus (FeLV) assoziiert. Die typische anatomische Lokalisation für FeLV assoziierte Lymphome ist die mediastinale Form, mit einem Durchschnittsalter von drei bis fünf Jahren. Seit der Impfung gegen FeLV in den späten 1980er Jahren sind die Fälle der feline Lymphome mit positivem FeLV stark gesunken. Trotz des Rückgangs an FeLV-Infektionen ist jedoch der Gesamtteil der Lymphom Erkrankungen bei Katzen gestiegen. Auffällig hierbei ist die Zunahme an gastrointestinalen- und extranodalen Lymphomen, sowie der Anstieg des Durchschnittsalters auf elf bis zwölf Jahre. Des Weiteren wird von einer genetischen Komponente, sowie einer Prädisposition für orientalische Katzenrassen ausgegangen. Eine Immunsuppression scheint ebenfalls eine Begünstigung für Lymphome darzustellen. Sowohl bei einer Infektion mit dem

felines Immundefizienz-Virus (FIV), als auch nach Organ-Transplantationen und medikamentöser Immunsuppression zeigt sich ein Anstieg der Wahrscheinlichkeit am Lymphom zu erkranken (Vail et al. 2020).

Eine chronische Entzündung mit bakterieller Beteiligung wird als Entstehungsfaktor ebenfalls diskutiert. Die langfristige Stimulation des Immunsystems durch ein Antigen könnte dazu führen, dass sich Tumore entwickeln. Das interessanteste Bakterium, das hierbei eine Rolle spielen könnte, ist *Helicobacter spp.* (Paulin et al. 2018). Bei Menschen ist das Spiralbakterium gut erforscht und wird in engen Zusammenhang mit Gastritis und dem MALT-Lymphom gebracht (Floch et al. 2017, Pereira und Medeiros 2014).

### **2.3. Das gastrointestinale Lymphom**

Das gastrointestinale Lymphom, oft auch alimentäres Lymphom genannt, ist mit 50 % bis 75 % die häufigste anatomische Form des felines Lymphoms und betrifft den Magen, Dünndarm, Dickdarm sowie abdominale Lymphknoten und eventuell die Leber (Paulin et al. 2018). Durchschnittlich sind betroffene Katzen zwölf Jahre alt und FeLV-negativ. Die Unterscheidung der einzelnen Subtypen ist wichtig, da Therapie und Prognose davon abhängen. Die anatomische Lokalisation steht in engem Zusammenhang zum Phänotyp der Lymphozyten. B-Zell Lymphome entwickeln sich meist in Magen und Dickdarm, wohingegen T-Zell Lymphome großteils im Dünndarm entstehen (Pohlman et al. 2009). Eine genauere histologische Einteilung der betroffenen Schichten kann in mukosale und transmurale Infiltration erfolgen. Mukosale Lymphome infiltrieren Epithelium und Propria mit minimaler Ausdehnung in die Submukosa. Transmurale Formen infiltrieren weitreichend bis in Submukosa und Muscularis. Feline intestinale Lymphome vom T-Zell Typ infiltrieren hauptsächlich im diffusen MALT des Dünndarms, wobei sie meist mukosale Läsionen verursachen. Gastrische und intestinale B-Zell Lymphome treten prädominant als transmurale Läsionen auf und können häufig als diffuse großzellige B-Zell Lymphome (DLBCL) klassifiziert werden. Zytologisch vorherrschend bei diesem Typ ist eine zentroblastische Kernmorphologie mit multiplen Nucleoli (Moore et al. 2012).

Die Staging Methode für die meisten malignen Tumore bei Haus- und Nutztieren ist die Beurteilung nach dem Tumor selbst, den betroffenen Lymphknoten, sowie der Metastasierung

(TNM) (Owen 1980). Das TNM-System kann jedoch nicht auf das Lymphom übertragen werden, weshalb ein alternatives Staging empfohlen wird. Dieses wird über klinische, radiologische und hämatologische Diagnostik bestimmt und in fünf Stadien eingeteilt:

- Stadium I: ein Knoten oder ein lymphatisches Gewebe in einem betroffenen Organ
  - Inkludiert primäre intrathorakale Lymphome
- Stadium II: zwei oder mehrere betroffene regionale Lymphknoten
  - Ein resezierbarer gastrointestinaler Tumor mit oder ohne mesenterialer Lymphknotenbeteiligung
- Stadium III: generalisierte Lymphknotenbeteiligung
  - Extensive primäre unresezierbare intraabdominale Erkrankung
- Stadium IV: Beteiligung der Leber oder der Milz
- Stadium V: Beteiligung vom Knochenmark oder vom zentralnervalen System

Weiters kann jedes Stadium in die Subkategorien a (ohne systemische Symptome) und b (mit systemischen Symptomen) eingeordnet werden (Gualtieri und Monzeglio 1999).

#### **2.4. Klinik des gastrointestinalen Lymphoms**

Klinisch ähneln die Symptome des gastrointestinalen Lymphoms vielen primären und sekundären Krankheiten des Magen-Darm-Trakts. Low grade alimentäre Lymphome (LGAL) machen sich durch Gewichtsverlust, Erbrechen, Durchfall, Lethargie und Anorexie bemerkbar. Der Appetit kann auch normal sein, gelegentlich tritt auch eine Polyphagie auf. Im Großteil der Fälle sind die Symptome chronisch. Bei der klinischen Untersuchung sind oft abnormale abdominale Palpationsbefunde auffällig. Diffus-verdickte Darmschlingen oder lokale abdominale Massen können fühlbar sein (Lingard et al. 2009).

Intermediär- und high grade Lymphome (I/HGAL) äußern sich durch ähnliche klinische Symptome wie LGAL, sind aber meist akuter und schwerer. Anorexie, Gewichtsverlust, Lethargie und Erbrechen sind die Hauptsymptome. In den meisten der betroffenen Patienten sind zusätzlich abdominale Massen fühlbar, wobei die mesenterialen Lymphknoten und fokale Bereiche im Magen-Darm-Trakt besonders häufig vorkommen. Zusätzlich können Invaginationen, Darmverschlüsse und Magen-Darmperforationen auftreten (Barrs und Beatty 2012, Krick et al. 2008).

In einer retrospektiven Studie mit ausschließlich gastrischen Lymphomen war das häufigste klinische Symptom der betroffenen Katzen mit 94 % Erbrechen. Verminderter Appetit, Gewichtsverlust und Lethargie waren ebenfalls häufig. 50 % der Patienten waren in einem guten Ernährungszustand, nur ein Drittel der Probanden hatte eine palpierbare abdominale Masse. Nur 13 % zeigten abdominale Schmerzen bei der Palpation (Gustafson et al. 2014).

## **2.5. Diagnostik des gastrointestinalen Lymphoms**

Die Aufarbeitung eines Patienten mit gastrointestinalen Symptomen sollte ein vollständiges rotes und weißes Blutbild, Blutchemie, Schilddrüsentests und eine Urinanalyse inkludieren. FeLV- und FIV-Infektionen sollten in jeder chronisch kranken Katze ausgeschlossen werden. Eine Pankreatitis sollte ebenfalls abgeklärt werden, da die Symptome sehr ähnlich ausfallen können. Auffälligkeiten im Blutbild können eine Anämie und eine Neutrophilie sein. In der Blutchemie können eine Hypoalbuminämie und/ oder eine Panhypoproteinämie auftreten. Ein abdominaler Ultraschall ist unumgänglich um den gastrointestinalen Trakt, mesenteriale Lymphknoten, Leber- und Milzparenchym zu überprüfen. Bei Tumorverdacht sind ebenfalls Thorax-Röntgenaufnahmen aus drei Ebenen angezeigt (Gieger 2011).

Im abdominalen Ultraschall ist eine genaue Beurteilung der Wandschichten, der Wanddicke, der Darmmotilität und des Inhalts des Lumens möglich. Die Darmwand von Katzen besteht aus vier Schichten, der Mukosa, der Submukosa, der Muscularis, und der Serosa. In der Sonographie zeigt sich ein fünf-schichtiges Muster aus alternierenden hypo- und hyperechogenen Ebenen. Um physiologische Unterschiede in der Anatomie des Gastrointestinal-Trakts nicht mit pathologischen Veränderungen zu verwechseln, muss die Wanddicke von gesunden Katzen bekannt sein. Diese ändert sich zwischen den einzelnen Darmabschnitten. Der Magenfundus hat eine durchschnittliche Dicke von 2 mm, der Pylorus 2,1 mm, das Duodenum 2,2 mm, das Jejunum 2,3 mm, das Ileum 2,8 mm und das Colon 1,5 mm (Goggin et al. 2000). Der im Ultraschall messbare Durchmesser der abdominalen Lymphknoten von Katzen ist im Durchschnitt unter 5 mm. Es gibt anatomische Varianzen bei einzelnen Katzen. Nicht jede Katze hat jeden Lymphknoten ausgebildet und die Anzahl der Lymphknoten in einem anatomischen Gebiet ist variabel. Pathologisch abnorme Lymphknoten sind hingegen einfacher darzustellen, da sie normalerweise vergrößert und abgerundet sind, und eine verminderte Echogenität aufweisen. Im weiteren Fortschreiten einer

Erkrankung werden die Lymphknoten unregelmäßiger in Form und Oberfläche, weisen eine heterogene Struktur auf und sind schlechter von der Umgebung abzugrenzen (Schreurs et al. 2008).

Alimentäre Lymphome stellen sich in der abdominalen Sonographie häufig als solitäre oder multiple, hypoechogene Massen dar. Die transmurale Verdickung geht mit einer Unterbrechung der normalen Wandschichtung einher. Lymphome können allerdings auch diffus infiltrieren und eine Verdickung der Muscularis auslösen. In diesem Fall sind sie kaum von anderen entzündlichen Erkrankungen wie der IBD zu unterscheiden, bei der ebenfalls eine Zunahme an Wanddicke der Muscularis vorliegt (Gaschen 2011).

Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose Lymphom ist es notwendig eine Probe zu entnehmen. Bei vergrößerten Lymphknoten oder palpierbaren Massen kann eine Feinnadelaspiration mit nachfolgender zytologischer Untersuchung erfolgen. Diese einfache und schnelle Methode kann jedoch aufgrund von Entzündungsreaktionen oder zu geringem Probenmaterial nicht immer aussagekräftig sein. Bei diffusen Verdickungen oder unsicheren Ergebnissen muss eine Gewebebiopsie zur histopathologischen Untersuchung entnommen werden. Die histopathologische Untersuchung ist der Goldstandard in der Lymphomdiagnose, sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin. Proben können auf chirurgischem Weg während einer Laparotomie, oder endoskopisch entnommen werden. Der Vorteil an der chirurgischen Probenentnahme ist, dass man alle Schichten eines Darmteils, und zusätzlich Biopsien von suspekt erscheinenden Lymphknoten, Milz oder Leber entnehmen kann. Die endoskopische Variante ist weniger invasiv und von geringerer Narkosedauer gekennzeichnet und wird daher vor allem bei instabilen und sehr kranken Katzen empfohlen. Des Weiteren ist endoskopisch eine Darstellung der Mukosa gegeben, womit gute Probenareale leichter erkennbar sind. Lymphome in tieferen Darmschichten können jedoch übersehen werden und falsch negative Ergebnisse zeigen. Differentialdiagnostisch ist vor allem die IBD vom Lymphom auszuschließen. Bei der IBD ist eine Infiltration der Mukosa mit variierenden Mengen an Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen- und neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zu sehen. Beim Lymphom infiltrieren neoplastische Lymphozyten die Mukosa, unregelmäßig verteilt zwischen den intestinalen Villi, mit einer häufigen Progression in die Submukosa und einer transmuralen Infiltration. Typischerweise findet im Gegensatz zur IBD

beim Lymphom keine Entzündungsreaktion und kein mukosales Ödem statt (Gieger 2011). Die Immunhistochemie kann ebenfalls als Unterstützung zur Differenzierung von IBD und Lymphom dienen, indem sie monomorphe Populationen von T- und B-Zellen identifiziert. Die verschiedenen Lymphomsubtypen werden heute nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der Veterinärmedizin nach der WHO-Klassifikation eingeteilt (Valli et al. 2016). Zusätzlich kann eine PCR für Antigen Rezeptor Rearrangements (PARR) durchgeführt werden, um die Klonalität von T- und B-Zellen zu bestimmen (Kiupel et al. 2011).

## **2.6. Therapie und Prognose des gastrointestinalen Lymphoms**

Die effektivste Therapie für feline Lymphome ist die Chemotherapie. Es sind verschiedene Kombinationschemotherapieprotokolle beschrieben. Ein gängiges Standard-Protokoll, auch COP-Protokoll genannt, basiert auf einer Kombination aus Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison (Kristal et al. 2001, Vail et al. 1998).

Bei Katzen mit obstruierenden abdominalen Massen ist eine chirurgische Entfernung dieser notwendig. In einigen Fällen kann eine vollständige Resektion unmöglich sein, und Patientenbesitzer müssen in diesen Fällen über die erhöhte Komplikationsrate einer Dehiszenz der Anastomose-Stelle aufgeklärt werden. Postoperativ wird zusätzlich eine Chemotherapie empfohlen. Die Auswahl der Chemotherapie ist abhängig von Lymphomtyp, eventuellen weiteren Krankheiten des Patienten und der Compliance und den finanziellen Mitteln des Besitzers (Gieger 2011).

Für die weniger aggressive Variante des gastrointestinalen Lymphoms, des LGAL, wird eine orale Therapie mit Chlorambucil und Prednison empfohlen. Dosierungen von Prednison reichen von 5-10 mg alle 12-24 Stunden, Chlorambucil wird mit 2 mg jeden zweiten oder dritten Tag angegeben. 92 % der Katzen sprechen mit zweieinhalb Jahren auf die Therapie an (Kiselow et al. 2008). Patienten, welche durch die Therapie in komplette Remission gehen, haben eine längere Überlebenszeit als Patienten mit partieller Remission (Lingard et al. 2009).

In der Studie von Gustafson et al. wurden Therapie und Prognose für rein gastrische Lymphome untersucht. Die untersuchten Magentumore waren high-/ und intermediate-grade Lymphome. Zur Behandlung wurden Kombinationen mit unterschiedlichen Chemotherapeutika verwendet. Das so genannte CHOP-Protokoll besteht aus einer Mischung

aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon. Als Zusatz zu diesem Protokoll ist noch die L-Asparaginase möglich. Ein modifiziertes Protokoll des Animal Medical Centers besteht aus Vincristin, Cyclophosphamid und Doxorubicin. Die erwähnten Chemotherapeutika werden intravenös appliziert, die Steroide werden meist oral verabreicht. Eine rein orale Therapie besteht aus der Kombination aus Chlorambucil und Prednison. Diese Variante wird bei high-grade Lymphomen nicht empfohlen, kann aber auf explizitem Besitzerwunsch durchgeführt werden. Die Katzen einer Studie haben im Durchschnitt aus den oben genannten verschiedenen Behandlungsprotokollen zu 75 % auf die Therapie angesprochen und hatten eine durchschnittliche Lebensdauer von 171 Tagen. Die einzige Katze der Studie, welche die orale Therapie bekommen hat, hatte eine Überlebensdauer von 103 Tagen (Gustafson et al. 2014).

In einer weiteren Studie von Williams et al. wurde eine neue Therapiemöglichkeit versucht. Acht Katzen mit diagnostiziertem abdominalem high-grade Lymphom bekamen eine Chemotherapie mit Kombinationen aus Prednisolon, L-Asparaginase, Vincristin, Doxorubicin und Cyclophosphamid. Studienteilnehmer, welche in vollständige Remission gingen, wurden daraufhin mit abdominaler Bestrahlung behandelt. Die Patienten bekamen eine Totaldosis von 15 Gray, aufgeteilt über zehn Tage, mit einem Wochenende Pause. Je Einheit wurden 1,5 Gray verabreicht. Die Remissions-Dauer der Katzen war 72-1332 Tage. Die gastrointestinalen Nebenwirkungen der Behandlungen waren mild. Die Konklusion der Autoren ist, dass diese Therapiemethode eine vielversprechende Alternative zur langwierigen reinen Chemotherapie sein könnte. Aufgrund der geringen Probandenzahl sind jedoch weitere Studien notwendig (Williams et al. 2010).

Katzen mit aggressiveren Lymphomtypen sind zum Zeitpunkt der Diagnose oft schwer krank. Daher müssen weitere Behandlungen, wie Infusionstherapie, intravenöse Antibiose und Transfusionen bis hin zur intensivmedizinischen Versorgung durchgeführt werden. Ein weiterer wichtiger Therapiepunkt ist die Ernährung. Das Futter sollte leicht verdaulich und schmackhaft sein, bei anorektischen Katzen wird eine Magensonde empfohlen. Appetit-Stimulantien wie Mirtazapin können der Fressunlust entgegenwirken (Gieger 2011). Supplementation von Cobalamin ist anzuraten, da ein Großteil der Katzen mit

gastrointestinalem Lymphom eine Hypocobalaminämie aufweisen. Dies steht in Korrelation mit einer kürzeren Remissionsdauer (Kiselow et al. 2008).

Im Vergleich mit der Hauptdifferentialdiagnose des alimentären Lymphoms, haben Katzen mit IBD eine längere Lebenserwartung als Katzen mit Lymphom. Hierbei muss jedoch miteinbezogen werden, dass sich Besitzer aufgrund der schlechten Prognose bei Lymphomdiagnosen schneller zur Euthanasie entscheiden könnten (Kiupel et al. 2011).

### **2.7. *Helicobacter* spp.**

*Helicobacter* spp. zählen zusammen mit den *Wolinella* spp. zur Familie der *Helicobacteraceae*, zur Klasse der *Epsilonproteobacteria* und zur Abteilung der *Proteobacteria*. *Helicobacter* sind gram-negativ, microaerophil und nicht-sporenbildend mit einer Breite von 0.3-0.6 µm und einer Länge von 1-5 µm. Der Form nach sind sie spiralförmige-, gebogene- oder fusiforme Stäbchen. Die optimale Umgebungstemperatur befindet sich zwischen 37 °C und 42 °C (On et al. 2017). Viele Arten besitzen Flagellen, oft mit einer bipolaren Ausprägung. Die Fortbewegung der Spiralbakterien mittels ihrer Geißeln ist entweder schnell mit Korkenzieher-Bewegungen, oder langsamer in Wellen-Bewegungen. In allen Arten findet man eine Oxidase, in einem Großteil der Arten ebenfalls eine Katalase. Des Weiteren produzieren viele Spezies Urease, sowie alkalische Phosphatase (Bergey et al. 2005). Mit Stand 2016 sind über 35 verschiedene *Helicobacter* Spezies bei Menschen und diversen Tierarten, unter anderem Hunde und Katzen, bekannt (Mladenova-Hristova et al. 2017).

### **2.8. *Helicobacter* in der Humanmedizin**

Der Gastrointestinaltrakt von Menschen ist dicht besiedelt mit Trillionen von Mikroorganismen. Im menschlichen Verdauungssystem, angefangen im Mund, bis hin zum Anus, befinden sich Bakterien, Viren, Pilze und Archaeen. Diese Besiedelung wird in der Gesamtheit auch als Darmflora bezeichnet. In einem balancierten Zustand ist die Darmflora essenziell für die Produktion von Vitaminen, der Metabolisierung von Nahrungsbestandteilen und der Abwehr von pathogenen Erregern (Bonde et al. 2021). Um schädigende Mikroorganismen effektiv eliminieren zu können ist ein enges Zusammenspiel der Darmflora mit der natürlichen Immunabwehr des Wirts notwendig (Sepich-Poore et al. 2021). Bei einer

Störung der physiologischen Balance des Mikrobioms kommt es zu einem pathologischen Zustand namens Dysbiose. Die Dysbiose steht z.B. in Zusammenhang mit Krankheiten wie der IBD, Lebererkrankungen und Adipositas. In allen erwähnten Krankheitsbildern sind Veränderungen einer physiologischen Darmflora erkennbar. Es ist allerdings noch nicht ausreichend geklärt, ob die Dysbiose auslösender Faktor, oder Folge der jeweiligen Erkrankung ist (Mayenaaz Sidhu und David van der Poorten 2017). Das Vorkommen von bestimmten Mikroorganismen wird außerdem mit gastrointestinalen, malignen Tumoren in Verbindung gebracht (Bonde et al. 2021). Eines dieser Mikroorganismen ist ein Bakterium aus der Familie der *Helicobacteriaceae*. Die Art *H. pylori* wurde 1994 von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als cancerogen der Klasse I klassifiziert (IARC Working Group 1994). Geschätzte 50 % der Weltbevölkerung sind mit *H. pylori* infiziert, wobei die Prävalenz in Entwicklungsländern deutlich höher ist als in Industrieländern (IARC Working Group 2012).

*H. pylori* löst bei Menschen eine Entzündung der Magenschleimhaut aus. Das Bakterium ist einer der Hauptgründe für Gastritis, Magengeschwüre und maligne Magentumore (IARC Working Group 1994, Mladenova-Hristova et al. 2017). Durch den chronisch-entzündlichen Immunstimulus wird eine Hyperplasie des lymphatischen Gewebes ausgelöst. Dieses mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe, auch MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) genannt, kann unter Beteiligung verschiedener Faktoren, wie genetischer Prädisposition und Umweltbedingungen, im Zuge der Proliferation einen malignen Klon von Lymphozyten erzeugen. Der so entstandene Tumor, das MALT-Lymphom scheint einer Marginalzonen B-Zelle zu entstammen (Pereira und Medeiros 2014). Das Besondere dieses Tumors ist das gute Ansprechen auf eine Antibiotika-Therapie. 60-90 % der Patienten mit lokalen MALT Lymphomen gingen durch eine Therapie gegen *H. pylori* in Remission (Montalban und Norman 2006). Die in den USA empfohlene erste Therapievariante beinhaltet Clarithromycin in Kombination mit Amoxicillin oder Metronidazol, und einen Protonen Pumpen Hemmer. Eine zweite Therapievariante ist Bismuth, Metronidazol in Kombination mit Tetrazyklin, und ein Protonenpumpen-Inhibitor oder ein H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist (Chey und Wong 2007).

Obwohl *H. pylori* als wichtiger pathogener Erreger schon lange bekannt ist, gibt es immer noch keinen eindeutigen Goldstandard bei der Diagnostik. Es gibt viele unterschiedliche

Methoden, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Die Serologie, der Urea Breath Test, die Kotproben-PCR sowie eine Kultur des Kotes sind nicht-invasive Methoden. Die invasive Diagnostik beinhaltet PCR, Histopathologie, Kultur und den Rapid Urease Test durch Magenbiopsien (Patel et al. 2014). Die beste Lösung für eine sichere Diagnostik scheint eine Kombination aus PCR und Histologie von Magenbiopsien zu sein (Patel et al. 2014, Pokhrel et al. 2019).

## **2.9. *Helicobacter* in der Veterinärmedizin**

Gleich wie beim Menschen spielt eine ausgeglichene Darmflora eine wichtige Rolle für die Gesundheit des feline Wirts. Die physiologische Darmflora moduliert das Immunsystem, schützt vor intestinalen Pathogenen und produziert Vitamine und Nährstoffe (Suchodolski 2022). Die vorherrschenden Mikroorganismen im Magen-Darmtrakt von gesunden Katzen sind *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* und *Actinobacteria* (Ritchie et al. 2008). Studien zeigen, dass eine Dysbiose bei Katzen sowohl zu gastrointestinalen Krankheiten (Janeczko et al. 2008), als auch zu extraintestinalen Krankheiten, wie der Chronic Kidney Disease (Summers et al. 2019), feline Diabetes mellitus und Adipositas prädisponiert (Kieler et al. 2019). Anders als bei Menschen gibt es jedoch widersprüchliche Studien zur Relevanz von *Helicobacter spp.* als Auslöser für Gastritis und Magen-Darmgeschwüren bei Katzen. Katzen scheinen eher als natürliches Reservoir für *Helicobacter spp.* zu dienen, wie mehrere Studien durch eine hohe Prävalenz (45-100 %) von *Helicobacter spp.* bei gesunden Katzen zeigen (Elyasi et al. 2020, Lecoindre et al. 2000, Norris et al. 1999, Teixeira et al. 2022). Die häufigsten *Helicobacter* Arten, die in Katzenmägen gefunden werden, sind *Helicobacter heilmannii* (*H. heilmannii*), *Helicobacter felis* und *Helicobacter bizzozeronii* (Lecoindre et al. 2000, Teixeira et al. 2022). Von den genannten Spezies ist *H. heilmannii* die vorherrschende Art bei Hauskatzen und wird mit keiner- bis sehr milder Gastritis in Verbindung gebracht (Kubota-Aizawa et al. 2017, Neiger et al. 1997, Norris et al. 1999). Das Vorkommen vom humanpathogenen *H. pylori* bei Streuner- und Hauskatzen ist je nach Studie unterschiedlich, mit Varianzen von 0-60 % (Elyasi et al. 2020, Kubota-Aizawa et al. 2017, Sasani et al. 2014).

Die Studie von Bridgeford et al. hat die Assoziation zwischen einer Infektion mit *H. heilmannii* bei Katzen und dem feline gastrischen MALT-Lymphom untersucht. 47 Katzen

mit Zeichen von gastrointestinalen Problemen, wie Inappetenz und Erbrechen, wurden beprobt und auf Ansprechen für Silber-Färbungen untersucht. Die darauf positiven Proben wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf *H. heilmannii* getestet. Die Ergebnisse der Studie haben einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *H. heilmannii* und dem Auftreten von Lymphomen gezeigt. Die feline Lymphome entsprachen hierbei den histologischen Kriterien für MALT-Lymphome in der Humanmedizin. Die Autoren schlagen vor, weitere Studien über eine Eradikationstherapie für *Helicobacter spp.* bei feline gastrischen Lymphomen durchzuführen (Bridgeford et al. 2008).

Die verschiedenen Diagnostikmöglichkeiten für *Helicobacter spp.* der Humanmedizin können für die Veterinärmedizin adaptiert werden. Für die direkte, oder invasive Diagnostik ist eine Endoskopie oder eine Operation notwendig, um Magenbiopsien gewinnen zu können. Der Rapid Urease Test zeigt über eine Änderung eines pH Indikators die Urease Aktivität der Bakterien in einer Probe an. Der Test ist schnell und einfach durchführbar. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn die Besiedelung mit Urease-produzierenden *Helicobacter* nicht hoch genug ist, um eine Änderung des Farbschlags auszulösen. Falsch positive Ergebnisse können bei anderen Urease-produzierenden Bakterien auftreten. Die Kultur zeigt sich bei *Helicobacter* als schwierig, und nicht zuverlässig, da alle Arten microaerophil sind, und äußerst spezielle Inkubationsbedingungen benötigen (Lecoindre et al. 2000). Die histopathologische Untersuchung kann mittels verschiedener Färbungen eines Schnittes einer Magenbiopsie erfolgen. Spezialfärbungen wie Silber-, Giemsa- und Toluidinblau-Färbungen erhöhen die Sichtbarkeit der Spiralbakterien bei geringer Besiedelung (Neiger und Simpson 2000). Die modifizierte Giemsa-Färbung hat eine höhere Detektionsrate von Spiralbakterien als die HE-Färbung (Teixeira et al. 2022). Eine weitere Methode der besseren Sichtbarmachung des gesuchten Bakteriums ist die Immunohistochemie, bei der ein *Helicobacter* Antigen angefärbt wird, welches sich dann als gold-braune Spiralstruktur, oder Partikel zeigt. Die Immunohistochemie hat im Vergleich mit der modifizierten Giemsa-Färbung und der Hämatoxylin-Eosin-Färbung die beste Rate bei der Auffindung der Bakterien, mit bis zur doppelten Trefferquote (Teixeira et al. 2022). *Helicobacter* befinden sich in der oberflächlichen Schleimschicht, den Magengruben und Magendrüsen (Norris et al. 1999). Durch die teils sehr fleckenhafte Besiedelung von *Helicobacter* im Magen ist es für die Histopathologie wichtig mehrere Proben aus unterschiedlichen Arealen zu entnehmen. Es

sollten Bereiche der *Cardia*, des *Corpus*, des *Fundus* und des *Antrum pylori* untersucht werden, um die höchste Sicherheit eines besiedelten Bereichs bei der unregelmäßigen Verteilung der Bakterien zu erzielen. Die einzige Möglichkeit gleichzeitig auch die Spezies mit der Diagnostik zu bestimmen ist die PCR. Die benötigte DNA kann aus dem Magensaft oder aus einer Biopsie entnommen werden. Als Primer werden entweder Urease Gene oder das 16S rRNA Gen verwendet (Lecoindre et al. 2000, Neiger und Simpson 2000). Als indirekte, oder nicht invasive Methode hat sich der Urea Breath Test auch bei Katzen etabliert. Dabei wird erst in der Expirationsluft der Feliden ein Basiswert erhoben und danach eine Lösung mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Harnstoff verabreicht. 30 Minuten später wird die Differenz aus  $^{13}\text{CO}_2$  zu  $^{12}\text{CO}_2$  ermittelt, und so die Urease Aktivität der Magenorganismen evaluiert. Dies kann an anästhesierten Katzen durch einen endotrachealen Tubus und ein Endoskop erfolgen, oder am wachen Patienten mittels Atemmaske und oraler Urea-Lösung (Neiger et al. 1997). Da jede Nachweismethode ihre eigenen Vor- und Nachteile hat, sollte für vertrauenswürdige Ergebnisse idealerweise eine Kombination aus den Testmöglichkeiten erfolgen (Teixeira et al. 2022).

Eine andere Möglichkeit zur Detektion von *Helicobacter spp.* ist eine Magenspülung. In dem Research Report „Detection of *Helicobacter* in gastric washing of cats“ von Paola Pregel et al. wurde getestet, wie effizient eine Magenspülung von Katzen ist, um *Helicobacter spp.* in oberflächlichem Magenschleim nachzuweisen. Elf Katzen, welche für Routine-Eingriffe anästhesiert wurden, wurden in der Studie zehn Milliliter sterile Kochsalzlösung in den Magen injiziert. Gleich darauf wurden die zehn Milliliter durch eine Spritze wieder abgesaugt, und die daraus gewonnene Flüssigkeit zentrifugiert. Der Überschuss wurde abgegossen und die Probe mittels May-Grünwald/Giemsa-Färbung und PCR nach *Helicobacter spp.* durchsucht. 90,9 % der untersuchten Katzen wurden positiv auf *Helicobacter spp.* getestet. Der Erfolg der Studie zeigt eine weitere, nicht invasive Diagnostikmethode, welche das Problem der lückenhaften *Helicobacter*-Besiedelung des Magens löst (Pregel et al. 2008).

### **3. Material und Methode**

#### **3.1. Patientendaten und Probenauswahl**

In dieser Arbeit wurden die Magenbiopsien von 26 Katzen mit histologisch verifiziertem Magenlymphom untersucht. Die Gewebeproben sind eine Sammlung von Patienten, welche von 2004-2021 in der klinischen Abteilung für Interne Medizin Kleintiere vorgestellt wurden. In die Studie aufgenommen wurden alle Katzen, welche eine adäquate Gewebeprobennahme aufwiesen und die pathohistologisch sicher als Magenlymphom diagnostiziert werden konnten. Bei diesen Patienten wurden im Rahmen der Diagnostik mittels Endoskopie oder Operation Magenbiopsien, oder *post mortem* bei der Sektion Gewebeproben zur pathohistologischen Untersuchung entnommen. Patientenangaben, welche in diese Studie einfließen sind das Alter, das Geschlecht, die Rasse, sowie Phänotyp und Subtyp des vorkommenden Magenlymphoms. Als Datenquelle wurde hierfür das Tierspitalinformationssystem (TIS) verwendet.

Die Subtypisierung der Proben wurde nach dem für Haustiere modifizierten Schema der WHO vorgenommen (Valli et al. 2017). Zum Nachweis der T-Lymphozyten wurde ein polyklonaler Kaninchen CD3 Antikörper (Dako, Glostrup, Denmark; Verdünnung 1:1000) und zum Nachweis der B-Lymphozyten ein monoklonaler Kaninchen CD20 Antikörper (Abcam, Cambridge, UK; Verdünnung 1:1000) verwendet.

Für diese Arbeit wurden die in Paraffin eingebetteten Tumorproben je zweimal in 1-2 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Je ein histopathologischer Schnitt einer Probe wurde mittels HE-Färbung angefertigt, während der andere Schnitt mit der Giemsa-Färbemethode hergestellt wurde.

#### **3.2. Entparaffinieren**

Um in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte anfärben zu können, muss zuerst das Paraffin aus dem Schnitt entfernt werden. Hierfür wurde die aktuelle Standard Operating Procedure (SOP) des Instituts für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien verwendet. Die Schnitte wurden zuerst für zehn Minuten in eine Limonenlösung verbracht, danach zweimal je eine Minute in 100%igem Alkohol, einmal eine Minute in 96%igem Alkohol,

einmal eine Minute in 70%igem Alkohol und zweimal für einige Sekunden in entsalztem Wasser gespült.

### **3.3. Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die HE-Färbung wurde ebenfalls nach der aktuellen SOP des Instituts für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt. Nach der Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte ca. zehn Minuten in der Hämatoxylinfarbe nach Ehrlich angefärbt. Danach wurden die Objektträger in Leitungswasser gespült und durch ein- bis dreimaliges eintauchen in HCL-Alkohol differenziert. Anschließend wurden die Schnitte ca. zehn Minuten fließend gewässert und mit *Aqua destillata* gespült. Nach diesem Schritt wurden die Proben ca. dreimal in 0,5-1%iger Eosin-Farblösung eingetaucht, in Leitungswasser gespült und abschließend in aufsteigender Alkoholreihe fixiert.

### **3.4. Giemsa Färbung**

Die entparaffinierten Schnitte wurden zuerst zwei bis drei Stunden in der Giemsa-Gebrauchslösung entsprechend der SOP angefärbt. Die anschließende Differenzierung erfolgte mittels Eisessiglösung und 96%igem Alkohol. Da die Giemsa-Färbemethode am Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien nicht routinemäßig zur Detektion von Bakterien verwendet wird, wurde von der standardmäßigen Differenzierungsdauer etwas abgewichen, um die bestmögliche Erkennbarkeit der Spiralbakterien zu erzielen. Die beste Herangehensweise für die Entfärbung wurde daher vorher mit einer Positiv-Kontrolle erprobt. Dabei ist es wichtig, sich nicht an den Schleimhautzellen zu orientieren, sondern an den gesuchten Spiralbakterien. Bei zu starker Differenzierung sind die gesuchten Bakterien zwar schwerer sichtbar, bei stark angefärbten Präparaten ist die Spiralform jedoch nicht mehr eindeutig erkennbar. Die Schnitte wurden aufgrund dessen stärker differenziert, um die Verwechslungsgefahr mit anderen Stäbchenbakterien zu minimieren. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Proben nur zweimal für je eine Sekunde in die Eisessiglösung eingetaucht wurden. Direkt danach wurden sie in den 96%igen Alkohol verbracht, um die feinere Differenzierung vorzunehmen. Die Schnitte wurden unter ständiger Sichtbeurteilung drei bis fünf Mal im 96%igen Alkohol eingetaucht, bis makroskopisch der gewünschte Farbschlag vorhanden war. Anschließend

wurden die Schnitte zweimal in 100%igem Alkohol gespült und unter dem Mikroskop überprüft. Die Differenzierung wurde wiederholt, wenn der Schnitt noch zu kräftig angefärbt war.

### **3.5. Eindecken und Fertigstellen der Proben**

Im Anschluss an die Färbungen wurden die Proben erneut in eine Limonenlösung verbracht, um sie endgültig zu fixieren. Danach wurde ein Tropfen Klebstoff an den Rand des Objektträgers aufgetragen und der Schnitt mit einem Deckglas versehen. Nach Ausstreichen der Luftblasen wurden die fertigen Schnitte vor Begutachtung unter dem Mikroskop mindestens einen Tag getrocknet.

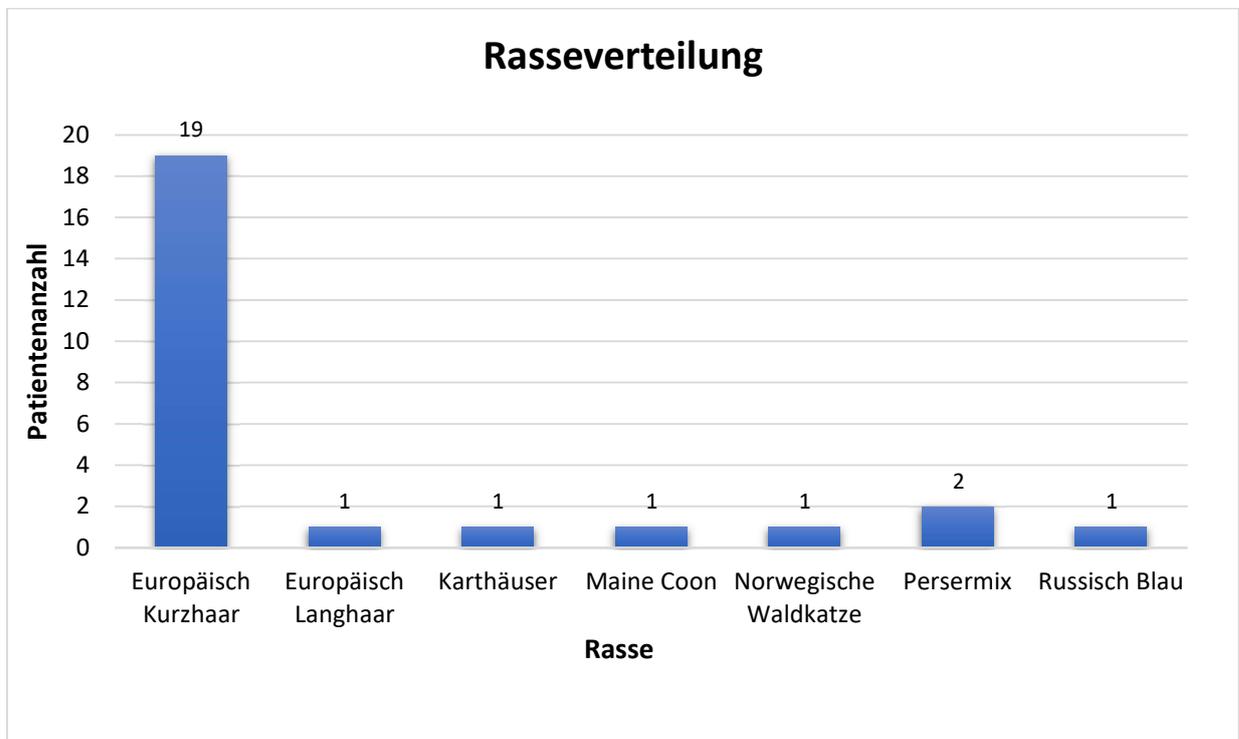
### **3.6. Mikroskopieren**

Die fertigen Präparate wurden unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein von Spiralbakterien untersucht. Es wurden jeweils dieselben Proben erst in der HE-Färbung und darauffolgend vergleichend in der Giemsa-Färbung begutachtet. Jede Probe wurde genormt von links nach rechts vollständig durchgemustert. Die Mägen wurden unter dem Mikroskop zuerst in 100x Vergrößerung begutachtet. Gesucht wurde in dieser Vergrößerung intakte Mukosa und lumenseitige Stellen mit Schleim. Bei 200x Vergrößerung wurde gezielt nach Bakterien gesucht und bei Auffinden dieser mit der 400x Vergrößerung die Spiralstruktur überprüft. Ein einfaches System für die quantitative Beurteilung des Vorhandenseins auf *Helicobacter spp.* wurde erstellt. Vereinzelte Spiralbakterien, ohne Gruppenbildung und nur in einzelnen Schleimhautarealen wurde mit einem Plus (+) notiert. Gruppenbildungen mit je mehr als drei Spiralbakterien, an mindestens drei unterschiedlichen Arealen wurden mit zwei Plus (++) gekennzeichnet. Massenhaft spiralförmige Bakterien, in großen Teilen der Schleimhaut wurden mit drei Plus (+++) versehen. Eine negative Probe ohne die gesuchten Bakterien wurde mit einem Minus (-) vermerkt. Bei starker Zerstörung der Schleimhaut durch Lymphominfiltration wurde gezielt nach Lymphom-freien Stellen gesucht und diese durchgemustert. Dadurch hat sich das Such-Areal dieser Schnitte auf kleine Stellen begrenzt. Anmerkungen zur Qualität der jeweiligen Probe und andere Auffälligkeiten wurden ebenfalls dokumentiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Allgemeine Patientendaten

Von 26 Katzen gehörten 19 der Rasse Europäisch Kurzhaar (73 %) an, und waren damit die am stärksten vertretene Rasse. Die übrigen Rassen waren Persermix, mit zwei Vertretern, sowie jeweils eine Maine Coone, Russisch Blau, Norwegische Waldkatze, Karthäuser und Europäisch Langhaar (*Abb. 1*). Das Alter der untersuchten Katzen ging von fünf bis 15 Jahre, mit einem Durchschnitt von 10,4 Jahren (*Abb. 2*). Alle Katzen, die in die Studie aufgenommen wurden, waren kastriert. Männliche Katzen waren leicht überproportioniert mit 58 % im Vergleich zu den weiblichen Katzen mit 42 % (*Abb. 3*). Die entnommenen gastrischen Tumorproben wurden von VeterinärpathologInnen klassifiziert. Der Immunotyp von 24 der Tumore (92 %) war das B-Zell Lymphom, wovon alle 24 weiters als diffus großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) subtypisiert wurden. Eine einzige Probe wurde als T-Zell Tumor phänotypisiert und als peripheres T-Zell Lymphom (PTCL) subtypisiert. Eine Probe konnte nicht klar immunotypisiert werden und wurde als non B-/non T-Zell Lymphom klassifiziert (*Abb. 4*).



*Abb. 1: Rasseverteilung der Patienten*

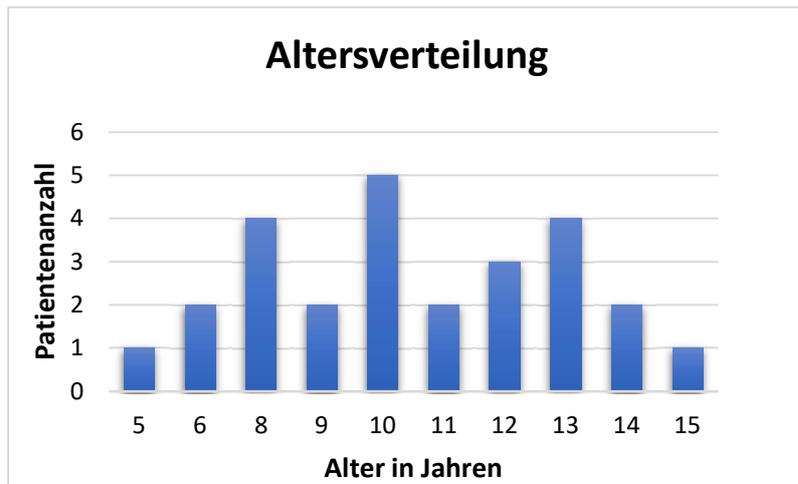


Abb. 2: Altersverteilung der Patienten



Abb. 3: Geschlechtsverteilung der Patienten

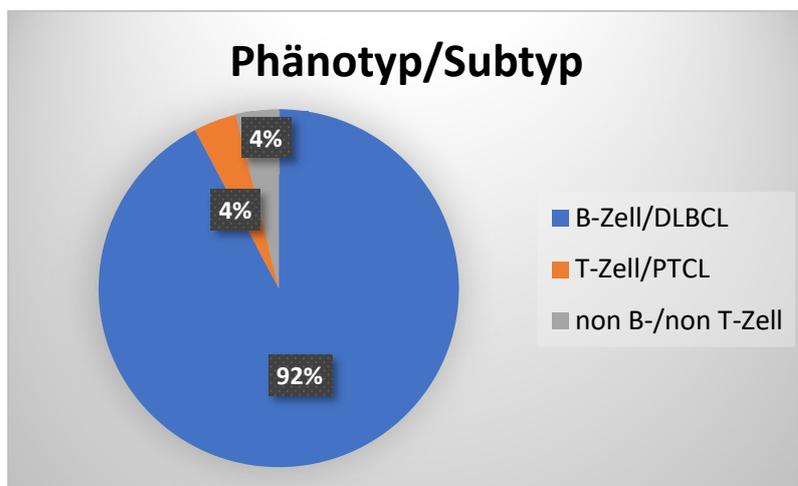


Abb. 4: Phänotypisierung und Subtypisierung der Proben

## 4.2. Probenanalyse

Von 26 Proben wurden in der HE-Färbung in elf Proben (42 %) mikroskopisch Spiralbakterien entdeckt. In 15 anderen Proben (58 %) wurden trotz intensiven Suchens, von mindestens 15 Minuten pro Probe, keine eindeutigen spiralförmigen Bakterien gefunden (Abb. 5). Von den elf Positiv-Proben waren in sieben Proben (64 %) nur sporadisch, bzw. an einer einzigen Stelle Spiralbakterien auffindbar, in drei Proben (27 %) waren Ansammlungen von mindestens drei Spiralbakterien, an mindestens drei unterschiedlichen Arealen zu sehen, und bei einer einzigen Probe (9 %) waren massenhafte Spiralbakterien in einem Großteil der Schleimhaut in mehreren Gesichtsfeldern zu finden (Abb. 6).

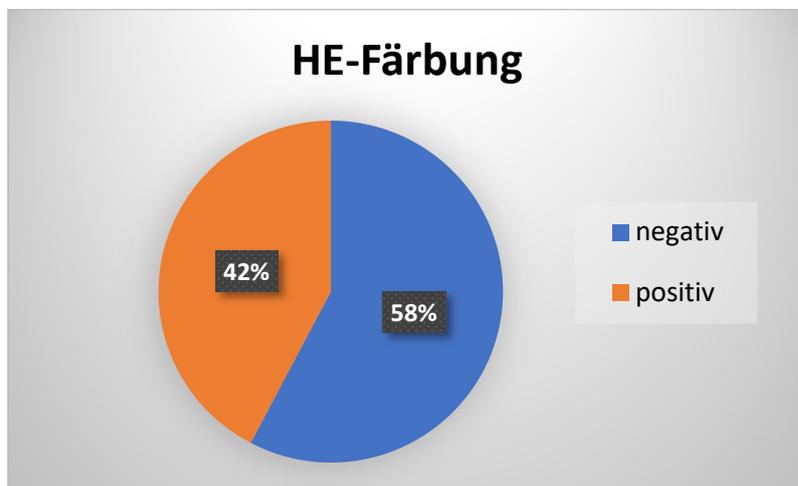


Abb. 5: Häufigkeit des positiven- und negativen Nachweises in der HE-Färbung von *Helicobacter* bei 26 Magenproben mit *felinem gastrischem Lymphom*

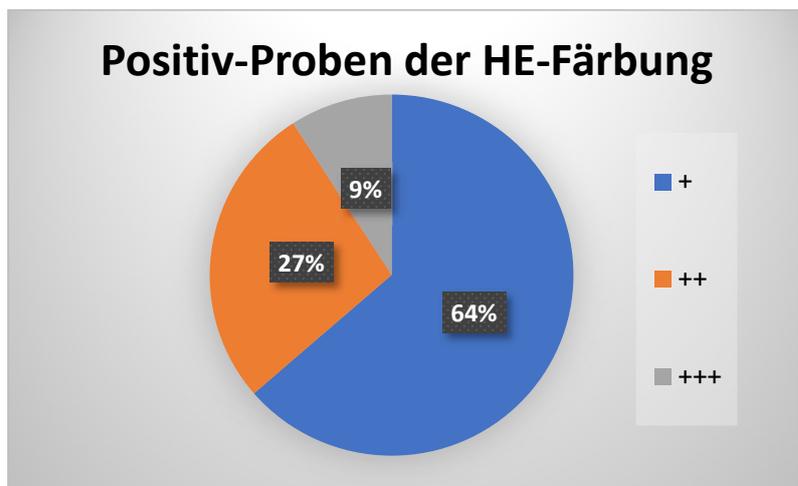


Abb. 6: Verteilung der semiquantitativen Beurteilung der Positiv-Proben in der HE-Färbung

In der Giemsa-Färbung wurden von 26 Proben in zwölf Proben (46 %) mikroskopisch Spiralbakterien gefunden. 14 Proben (54 %) waren trotz 15-minütigen Suchens pro Probe negativ (Abb. 7). Von zwölf Positiv-Proben waren in fünf Proben (42 %) nur sporadisch, bzw. an einer einzigen Stelle Spiralbakterien auffindbar, in drei Proben (25 %) waren Ansammlungen von mindestens drei Spiralbakterien, an mindestens drei unterschiedlichen Arealen zu sehen, und in vier Proben (33 %) waren massenhafte Spiralbakterien in einem Großteil der Schleimhaut in mehreren Gesichtsfeldern zu finden (Abb. 8).

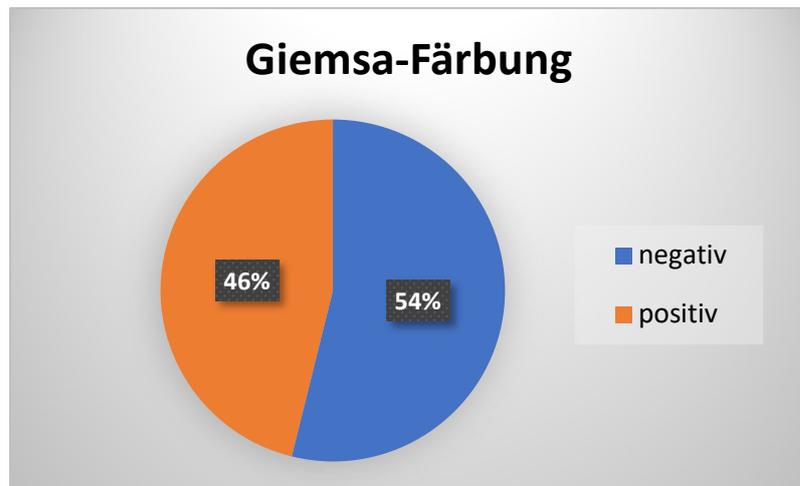


Abb. 7: Häufigkeit des positiven- und negativen Nachweises in der Giemsa-Färbung von *Helicobacter* bei 26 Magenproben mit felinem gastrischem Lymphom

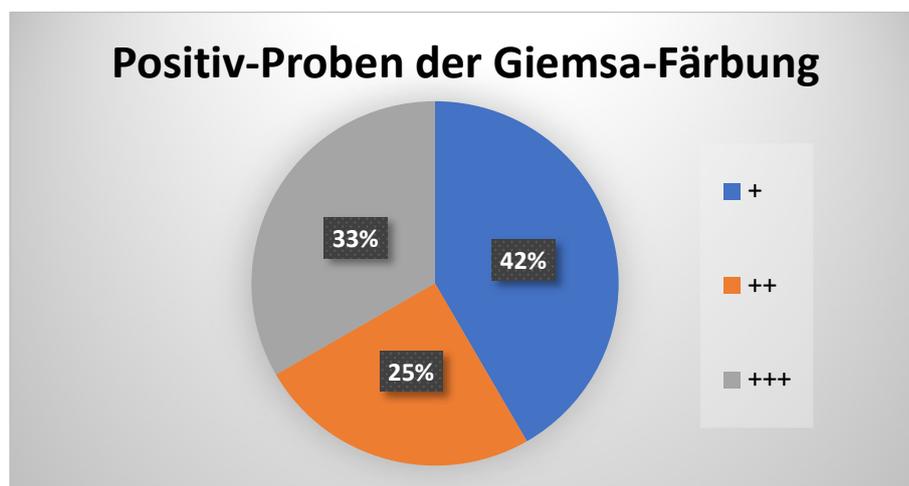


Abb. 8: Verteilung der semiquantitativen Beurteilung der Positiv-Proben in der Giemsa-Färbung

### 4.3. Vorkommen der Spiralbakterien

*Helicobacter* wurden meist direkt über der Mukosa im Lumen in Schleimansammlungen, oder in Krypten gefunden. Des Öfteren waren die Spiralbakterien erst nach längerem Suchen und vielen *Helicobacter*-freien Stellen in Clustern in einem Areal zu finden. In den Krypten waren sie oft haufenweise anzutreffen. Nicht eindeutig als Spiralform erkennbare Bakterien wurden als sonstige Stäbchen ignoriert und erst bei einer klar ersichtlichen spiralförmigen Struktur als *Helicobacter*-positiv vermerkt. In Probenarealen mit Zerstörung der Schleimhaut durch die Infiltration des Lymphoms waren keine *Helicobacter* auffindbar.

### 4.4. Vergleich der Färbemethoden

Bei der Durchmusterung wurde von einem Patienten jeweils zuerst der HE-gefärbte Schnitt, danach im direkten Vergleich der Giemsa-gefärbte Schnitt untersucht. Bei den HE-Schnitten waren die Bakterien im selben Rosa-Ton angefärbt wie der Magenschleim, beziehungsweise nur geringgradig dunkler und nur schwer unterscheidbar. Bei Ansammlungen mehrerer Bakterien und Verdacht eines *Helicobacter*-Befalls war es herausfordernd eindeutig die Spiralstruktur festzumachen und einzelne Bakterien zu differenzieren. In den Giemsa-Färbungen stachen Bakterien deutlicher heraus, da der Mukus blasser ist und *Helicobacter* in einem dunkelblau gut von der Umgebung abgrenzbar sind. Auch die Spiralstruktur war einfacher identifizierbar, und auch Spiralbakterien in Haufenbildungen, welche in der HE-Färbung oft im rosa Schleim verschwommen dargestellt wurden, waren in der Giemsa-Färbung klar erkennbar. In der Giemsa-Färbung wurde nur eine Probe mehr als *Helicobacter*-positiv erkannt, welche in der HE-Färbung als negativ gekennzeichnet wurde. Im Durchschnitt wurden HE-Färbungen jedoch zehn Minuten länger bis zu einem positiven Befund durchgemustert als Giemsa-Färbungen. Die semiquantitative Verteilung der *Helicobacter*-positiven Proben war auffällig unterschiedlich bei den verschiedenen Färbungen. In den HE-Färbungen war nur eine einzige Probe mit massenhaft *Helicobacter* in einem großen Teil der Schleimhaut erkennbar (+++), während in der Giemsa-Färbung vier Proben mit (+++) gekennzeichnet wurden (*Abb. 9-10*).

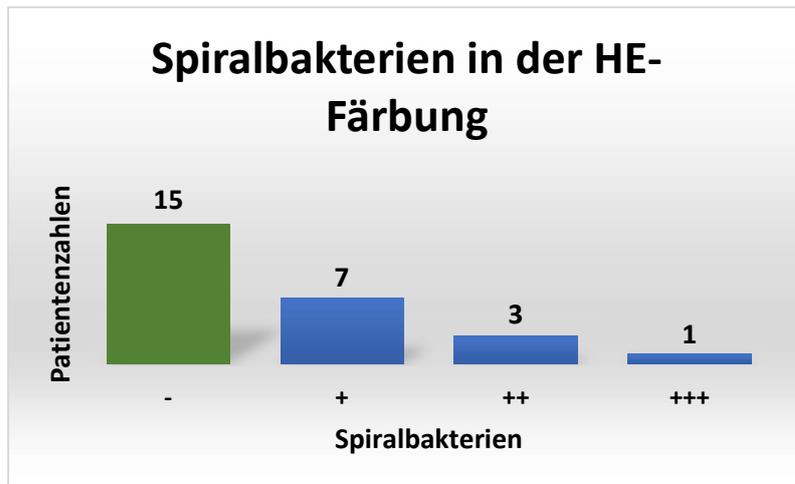


Abb. 9: Semiquantitative Darstellung der Spiralbakterien in der HE-Färbung der histopathologischen Schnitte der Magenlymphome

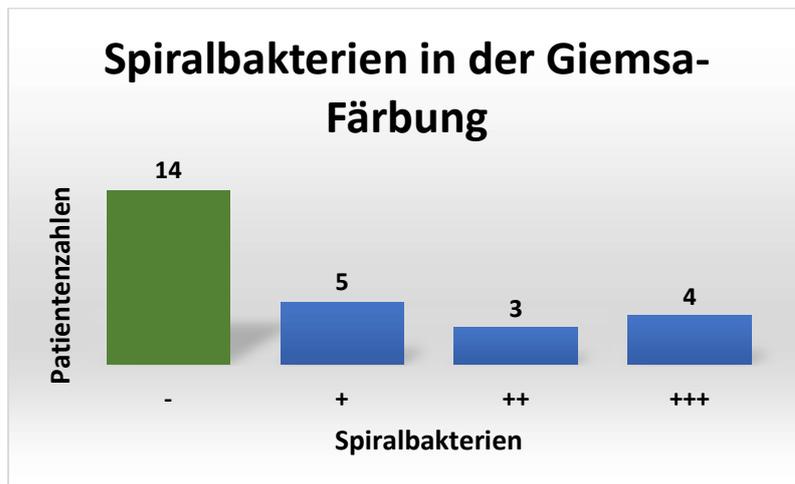


Abb. 10: Semiquantitative Darstellung der Spiralbakterien in der Giemsa-Färbung der histopathologischen Schnitte der Magenlymphome

Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Haufenbildungen in Schleimansammlungen in den Giemsa-Färbungen leichter erkennbar waren, während in den HE-Färbungen kein Unterschied zwischen den Rosa-Tönen, bzw. keine Strukturunterscheidung möglich war. Zwei Proben waren aufgrund von kaum vorhandener intakter Schleimhaut schlecht beurteilbar. In einer dieser Proben wurde in der HE-Färbung zufälligerweise genau ein eindeutiges Spiralbakterium entdeckt, welches in der Giemsa-Färbung nicht zu sehen war. Da jedoch nur ein kleiner Teil Schleimhaut beurteilbar war, ist es fraglich, ob die HE-Färbung in diesem Fall besser als die Giemsa-Färbung war, oder ob das Anschneiden des einen Helicobacter in der HE-Färbung reiner Zufall war. Insgesamt, mit beiden Färbemethoden

zusammen, sind in der vorliegenden Studie in 50 % der Proben Spiralbakterien entdeckt worden.

## 5. Diskussion

Bei Menschen wird *Helicobacter spp.* mit gastrointestinalen Krankheiten, wie chronischer Gastritis, Magengeschwüren und Magentumoren in Verbindung gebracht (Josenhans et al. 2007). Bei Katzen ist die Pathogenität von *Helicobacter spp.* noch nicht vollständig geklärt. Mehrere Studien, die den Zusammenhang von einer Infektion mit *Helicobacter* und Gastritis untersuchten, konnten keine Korrelation zwischen der Besiedelung mit *Helicobacter* und gastrointestinalen Krankheitszeichen feststellen (Kubota-Aizawa et al. 2017, Neiger et al. 1997, Teixeira et al. 2022). Andere Studien konnten dahingegen eine signifikante Assoziation zwischen einer *Helicobacter* Infektion, Gastritis und MALT-Lymphomen bei Katzen feststellen (Bridgeford et al. 2008). Es sind weitere Studien nötig, um die Frage nach der Pathogenität von *Helicobacter spp.* bei Katzen vollständig zu klären.

Die relevanteste Art der *Helicobacter* in der Humanmedizin ist *H. pylori*. Das Bakterium kommt weltweit vor, mit einer höheren Prävalenz in Entwicklungsländern als in Industrieländern (IARC Working Group 1994). Die Prävalenz von *H. pylori* in Menschen wird mit 20-80 % angegeben (Taylor und Blaser 1991). Die Infektion mit *H. pylori* kann langfristig zu einer chronisch-aktiven Gastritis führen, wobei ungefähr 50 % der Erkrankten infolgedessen eine atrophische Gastritis entwickeln (Kuipers et al. 1995). 80 % der Magengeschwüre scheinen durch das Spiralbakterium ausgelöst zu werden (Kuipers 1997). In 98 % der Patienten mit MALT-Lymphomen konnte histologisch *H. pylori* nachgewiesen werden (IARC Working Group 1994). Die lokalisierten gastrischen MALT-Lymphome regressieren in 60-90 % der Fälle durch eine Eradikationstherapie gegen *H. pylori* (Montalban und Norman 2006).

Die Prävalenz von *Helicobacter spp.* beträgt in klinisch gesunden Katzen >90 %. Die prädominierende Art ist *H. heilmannii* (Neiger et al. 1997, Norris et al. 1999). In zwei verschiedenen Studien wurde das mittels PCR bestätigte Vorkommen von *Helicobacter spp.* bei Katzen mit Gastritis mit 68 % angegeben. Beide Studien konnten jedoch keinen signifikanten statistischen Unterschied im Auftreten von Gastritis zwischen *Helicobacter*-positiven und *Helicobacter*-negativen Katzen erkennen (Kubota-Aizawa et al. 2017, Teixeira et al. 2022). In der vorliegenden Studie wurden insgesamt mit beiden Färbemethoden 50 % der felines Magenlymphomproben als *Helicobacter*-positiv diagnostiziert. Andere Studien

finden *Helicobacter spp.* in 64 % (Bridgeford et al. 2008), bzw. in 58 % von Proben feliner gastrischer Lymphome (Kubota-Aizawa et al. 2017). Obwohl in der Spezies Katze eine signifikante Assoziation zwischen einem positiven *Helicobacter*-Status und der Präsenz eines Lymphoms beschrieben wurde, ist die wahrscheinlich multifaktorielle Ätiologie noch nicht geklärt (Bridgeford et al. 2008).

Eine ähnliche Uneinigkeit wie bei der Pathogenitätsfrage herrscht auch in puncto beste Nachweismethode für *Helicobacter spp.*. Es sind diverse Methoden möglich, die Häufigsten hierbei sind die Histopathologie mit unterschiedlichen Färbemethoden, der Nachweis von Urease-Aktivität und die PCR (Neiger et al. 1997).

In dieser Arbeit wurden zwei Färbemethoden direkt miteinander verglichen und histopathologisch auf das Vorhandensein von *Helicobacter spp.* untersucht. Es wurde sowohl eine HE- als auch eine Giemsa-Färbung von den 26 Magenlymphomproben angefertigt. In der Anzahl der detektierten Spiralbakterien unterschieden sich die beiden Färbemethoden nur in einer Probe, die in der Giemsa-Färbung als positiv, in der HE-Färbung als negativ gewertet wurde. Die Menge an gefundenen *Helicobacter* und die Dauer bis zum Auffinden dieser haben sich jedoch stärker unterschieden. In der Giemsa-Färbung stachen in unserer Studie *Helicobacter* deutlicher heraus, und verschwammen nicht mit dem umliegenden Magenschleim. Auch andere Autoren haben diese Beobachtung gemacht (Neiger und Simpson 2000).

Technisch ist die HE-Färbung leicht und schnell durchführbar. Die Giemsa-Färbung ist eine anspruchsvolle Spezialfärbung, welche mit giftigen Substanzen arbeitet und länger dauert. Die Methode zur Differenzierung der gefärbten Schnitte sollte für *Helicobacter* an Positiv-Kontrollen erprobt werden, da diese sonst nicht routinemäßig hierfür eingesetzt wird. Generell sind wir in dieser Studie zu dem Ergebnis gekommen, dass die Giemsa-Färbung in unserer Arbeit die bessere Methode für die Detektion von Spiralbakterien ist.

Probleme bei dieser Studie finden sich in der geringen Probennahme aus unterschiedlichen Stellen der Katzenmägen. Bei den meisten Proben wurde nur eine einzige Stelle des Magens biopsiert. Hierbei wurde vor allem Wert auf die veränderten Gewebeteile gelegt, welche das Lymphom beinhalten. Auf der Suche nach *Helicobacter* waren jedoch vor allem intakte

Mukosa und Krypten wichtig, welche häufig durch das Lymphom zerstört wurden. Proben mit großflächigen Zerstörungen durch infiltrierende Lymphome stellten sich daher als besondere Herausforderung dar, da in diesen Arealen oft keine Krypten und keine intakte Mukosa mehr vorhanden war und sich das Suchareal mit intakter Schleimhaut teils auf sehr kleine Bereiche beschränkt hat. Wie in mehreren Studien erwähnt, ist es bei der Suche nach *Helicobacter* essenziell verschiedene Magenareale zu biopsieren, da die Spiralbakterien fleckenhaft und clusterförmig in der Mukosa angesiedelt sind und durch eine einzige Biopsie leicht verfehlt werden können (Lecoindre et al. 2000, Neiger und Simpson 2000). In unserer Studie wurden weitreichend freie Areale durch einzelne, teils massenhafte Ansiedlungen von spiralförmigen Bakterien unterbrochen. Da in einigen Proben nur kleine Schleimhautareale zu finden waren, ist es möglich, dass diese Proben eventuell falsch negativ beurteilt wurden und wir daher eine niedrigere *Helicobacter*-Positivrate beobachteten als Kubota-Aizawa et al. 2017 und Bridgeford et al. 2008.

Eine weitere Limitation dieser Studie stellt ein mögliches Bestätigungsbias dar, da der Betrachter der Proben nicht verblindet wurde, und der Giemsa-gefärbte Schnitt einer Probe jeweils nach dem HE-gefärbten Schnitt derselben Probe untersucht wurde. Obwohl eine genormte Durchmusterungsmethode der angefärbten Schnitte festgelegt wurde, ist es trotzdem denkbar, dass es eine Beeinflussung bei der Zeitdauer der Auffindung von *Helicobacter* in der Giemsa-Färbung gegeben haben könnte.

Eine interessante Nachweismethode um Probleme in der Bakterien-detektion von defekter Schleimhaut, und der fleckenhaften Verteilung von *Helicobacter* zu umgehen, ist die Magenspülung. Diese in der Veterinärmedizin nicht routinemäßig durchgeführte Methode kann einfach und nicht-invasiv bei Gastroskopien angewandt werden und scheint durch die flächendeckende Spülung der Magenschleimhaut eine hohe Zuverlässigkeitsrate im Nachweis von geringen und clusterförmigen *Helicobacter*-Besiedlungen aufzuweisen. In der Studie wurden die Magenspülproben mittels May-Grünwald/Giemsa-Färbung mikroskopisch untersucht, sowie mittels PCR auf *Helicobacter*-DNA überprüft. Bei der Färbung konnten in 73 % *Helicobacter* gefunden werden, während in der PCR in 91 % *Helicobacter* nachgewiesen werden konnten. Probleme bei dieser Studie zeigen sich jedoch in der geringen Anzahl an Probanden, da nur elf Katzen beprobt wurden. Des Weiteren wurden die Proben

der Magenspülung zwar mittels zwei verschiedener Techniken (PCR und Färbemethoden) nach *Helicobacter* untersucht, jedoch wurde die Probennahme selbst nicht mit einer anderen Diagnostikmethode, wie einer Magenbiopsie, verglichen (Pregel et al. 2008). Dadurch ist die Effektivität der Methode schwer vergleichbar. Weitere Studien in diesem Bereich werden zum Vergleich benötigt.

In der Studie von Teixeira et al. 2022 wurden Gewebeproben von 71 Katzenmägen mit vier verschiedenen Nachweismethoden auf das Vorhandensein von *Helicobacter spp.* überprüft. Histologisch wurden die Proben mittels HE-Färbung, modifizierter Giemsa-Färbung, sowie der Immunhistochemie getestet. Mit 71,2 % hatte die Immunhistochemie die höchste Detektionsrate, gefolgt von der modifizierten Giemsa-Färbung mit 48,5 % und der HE-Färbung mit 37,9 %. Molekular wurden die Proben mittels konventioneller PCR auf die DNA von *Helicobacter spp.* kontrolliert. Ein positives Ergebnis konnte in 39,4 % festgestellt werden (Teixeira et al. 2022).

In der Studie von Neiger et al. 1997 wurden morphologische Nachweismethoden, Urease-basierte Tests, und die PCR zur Detektion von *Helicobacter spp.* in 58 Katzenmägen verwendet. In der Gram-Färbung von Abklatschpräparaten aus Gastroskopie-Biopsien konnten in 79 %-, in der Warthin-Starry-Färbung in 78 % Spiralbakterien gesehen werden. Im Rapid Urease Test konnten in 78 % Urease-positive Organismen festgestellt werden, der Urea Breath Test war für 85 % positiv. Die PCR zeigte DNA-Treffer in 78 % (Neiger et al. 1997).

Sowohl Teixeira et al. 2022, als auch Neiger et al. 1997 kommen zu dem Ergebnis, dass idealerweise eine Kombination der verschiedenen Nachweismethoden für eine sichere Diagnostik für *Helicobacter spp.* bei Katzen durchgeführt werden sollte (Neiger et al. 1997, Teixeira et al. 2022). Daher wird der nächste Schritt in unserer *Helicobacter*-Studie sein, bei den gesammelten Proben weitere Nachweismethoden, vor allem die PCR als molekulare Nachweisteknik, anzuwenden. In Zukunft wären zusätzliche prospektive Studien mit gesunden- und Gastritis-erkrankten Katzen, sowie Katzen mit gastrischem Lymphom, wo Färbungen und PCR sowohl von Magenbiopsien, als auch von Magenspülproben untersucht werden, ebenfalls von wissenschaftlichem Interesse.

## 6. Zusammenfassung

Die Pathogenität von *Helicobacter spp.*, insbesondere von *Helicobacter pylori* steht bei Menschen schon seit Jahrzehnten fest. Als cancerogen der Klasse I gilt eine Infektion mit *Helicobacter pylori* bei Menschen nicht nur als Ursache für Gastritis und Magen-Darmgeschwüre, sondern auch als Auslöser für das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe-Lymphom. In der Frühphase ist die Humanmedizin in der Lage diesen Tumor erfolgreich durch eine Therapie gegen besagtes Bakterium zu behandeln. Ein Großteil der klinisch gesunden Katzen ist mit *Helicobacter spp.* besiedelt, am häufigsten mit *Helicobacter heilmannii*. Bei multiplen Untersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen der Ausprägung von Gastritis in *Helicobacter*-infizierten Katzen und *Helicobacter*-freien Katzen gefunden werden. Studien, die sich speziell mit feline Magenlymphomen und der Präsenz von *Helicobacter* Bakterien beschäftigen, sind rar. Der Nachweis von Spiralbakterien ist aufwendig; auch in der Humanmedizin existiert noch keine Goldstandard Methode. In der vorliegenden Studie wurden das Vorkommen in 26 feline Magenlymphomproben und die Vor- und Nachteile zweier Färbemethoden zum histopathologischen Nachweis von *Helicobacter spp.* untersucht. Bei der HE-Färbung waren 42 %, bei der Giemsa-Färbung 46 % der Proben *Helicobacter* positiv. Die Giemsa-Färbung ist für den mikroskopischen Nachweis die bessere Methode, da die gesuchten Spiralbakterien deutlicher farblich herausstechen und strukturell besser erkennbar sind. In der Vorbereitung und Färbung selbst ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung jedoch schneller und leichter durchführbar. Für beide Varianten sollten mehrere verschiedene Biopsien von unterschiedlichen Arealen der Katzenmägen entnommen werden, um die Gefahr einer Verfehlung der fleckenhaften Besiedelung von *Helicobacter* zu minimieren. Die Probleme der Cluster-Anordnungen der Spiralbakterien könnten mit einer Magenspülung als nicht-invasiver Probengewinnung umgangen werden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass eine Kombination verschiedener Nachweismethoden die Trefferquote für *Helicobacter spp.* bei Katzen verbessern kann. Daher ist als nächster Schritt in unserer *Helicobacter*-Studie eine PCR-Analyse der vorliegenden Magenlymphomproben geplant.

## 7. Summary

The pathogenicity of *Helicobacter spp.*, especially *Helicobacter pylori* has been established in humans for decades. As a class I carcinogen, *Helicobacter pylori* infection in humans is not only considered to cause gastritis and gastrointestinal ulcers, but also to trigger mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. In the early stages, human medicine can successfully treat this tumor by therapy against said bacterium. A large proportion of clinically healthy cats are colonized with *Helicobacter spp.*, most frequently with *Helicobacter heilmannii*. Multiple studies have found no differences between the severeness of gastritis in *Helicobacter*-infected cats and *Helicobacter*-free cats. Studies that deal specifically with feline gastric lymphoma and the presence of *Helicobacter* colonization are very scarce. The detection of spiral bacteria is complex; even in human medicine there is no gold standard method. In the present study, the occurrence in 26 feline gastric lymphoma samples and the advantages and disadvantages of two staining methods for the histopathological detection of *Helicobacter spp.* were examined. 42 % of the samples were *Helicobacter* positive with the hematoxylin and eosin staining and 46 % with the Giemsa staining. Giemsa staining is the better method for microscopic detection, as the spiral bacteria stand out more clearly in color and are structurally more recognizable. However, in terms of preparation and staining itself, hematoxylin and eosin staining is faster and easier to perform. For both variants, several different biopsies should be taken from multiple areas of the cat's stomachs to minimize the risk of missing the patchy colonization of *Helicobacter*. The problems of the cluster arrangements of the spiral bacteria could be circumvented with a gastric lavage as a non-invasive-sample collection. There are indications in the literature that a combination of different detection methods can improve the hit rate for *Helicobacter spp.* in cats. Therefore, as the next step in our *Helicobacter* study, a PCR analysis of the existing gastric lymphoma samples is planned.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
FeLV	Felines Leukämie-Virus
FIV	Felines Immundefizienz-Virus
<i>H. heilmannii</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
I/HGAL	Intermediär- und high grade Lymphome
IBD	Inflammatory bowel disease
LGAL	Low grade alimentäres Lymphom
MALT	mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
PTCL	Peripheres T-Zell Lymphom
SOP	Standard Operating Procedure

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Rasseverteilung der Patienten.....	17
Abb. 2: Altersverteilung der Patienten .....	18
Abb. 3: Geschlechtsverteilung der Patienten.....	18
Abb. 4: Phänotypisierung und Subtypisierung der Proben.....	18
Abb. 5: Häufigkeit des positiven- und negativen Nachweises in der HE-Färbung von Helicobacter bei 26 Magenproben mit felinem gastrischem Lymphom .....	19
Abb. 6: Verteilung der semiquantitativen Beurteilung der Positiv-Proben in der HE-Färbung .....	19
Abb. 7: Häufigkeit des positiven- und negativen Nachweises in der Giemsa-Färbung von Helicobacter bei 26 Magenproben mit felinem gastrischem Lymphom .....	20
Abb. 8: Verteilung der semiquantitativen Beurteilung der Positiv-Proben in der Giemsa-Färbung.....	20
Abb. 9: Semiquantitative Darstellung der Spiralbakterien in der HE-Färbung der histopathologischen Schnitte der Magenlymphome.....	22
Abb. 10: Semiquantitative Darstellung der Spiralbakterien in der Giemsa-Färbung der histopathologischen Schnitte der Magenlymphome.....	22

## 10. Literaturverzeichnis

- Barrs VR, Beatty JA. 2012. Feline alimentary lymphoma: 2. Further diagnostics, therapy and prognosis. *Journal of feline medicine and surgery*, 14 (3): 191–201. DOI 10.1177/1098612X12439266.
- Bergey DH, Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*; George M. Garrity, editor-in-chief. Zweite. ed. New York: Springer, 1169.
- Bonde A, Daly S, Kirsten J, Kondapaneni S, Mellnick V, Menias CO, Katabathina VS. 2021. Human Gut Microbiota-associated Gastrointestinal Malignancies: A Comprehensive Review. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 41 (4): 1103–1122. DOI 10.1148/rg.2021200168.
- Bridgeford EC, Marini RP, Feng Y, Parry NMA, Rickman B, Fox JG. 2008. Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 123 (1-2): 106–113. DOI 10.1016/j.vetimm.2008.01.016.
- Chey WD, Wong BC. 2007. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *The American Journal of Gastroenterology*, 102 (8): 1808–1825. DOI 10.1111/j.1572-0241.2007.01393.x.
- Elyasi B, Rezaie A, Moori Bakhtiari N, Mosallanejad B. 2020. *Helicobacter* genus in the intestine and liver of stray cats: the molecular, histopathological, and immunohistochemical study. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 51 (4): 2123–2132. DOI 10.1007/s42770-020-00359-1.
- Floch P, Mégraud F, Lehours P. 2017. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins*, 9 (4). DOI 10.3390/toxins9040132.
- Gaschen L. 2011. Ultrasonography of small intestinal inflammatory and neoplastic diseases in dogs and cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 41 (2): 329–344. DOI 10.1016/j.cvsm.2011.01.002.

- Gieger T. 2011. Alimentary lymphoma in cats and dogs. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 41 (2): 419–432. DOI 10.1016/j.cvsm.2011.02.001.
- Goggin JM, Biller DS, Debey BM, Pickar JG, Mason D. 2000. Ultrasonographic Measurement of Gastrointestinal Wall Thickness and the Ultrasonographic Appearance of the Ileocolic Region in Healthy Cats. *JOURNAL of the American Animal Hospital Association*, (36): 224–228.
- Gualtieri M, Monzeglio MG. 1999. Gastric Neoplasia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 29 (2): 415–440. DOI 10.1016/S0195-5616(99)50029-6.
- Gustafson TL, Villamil A, Taylor BE. 2014. A Retrospective Study of Feline Gastric Lymphoma in 16 Chemotherapy-Treated Cats. *JOURNAL of the American Animal Hospital Association*: 46–52.
- IARC Working Group. 1994. IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon: World Health Organisation, 218-220.
- IARC Working Group. 2012. Biological Agents. A Review Of Human Carcinogens. Lyon: World Health Organisation, 390-391.
- Janeczko S, Atwater D, Bogel E, Greiter-Wilke A, Gerold A, Baumgart M, Bender H, McDonough PL, McDonough SP, Goldstein RE, Simpson KW. 2008. The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. *Veterinary microbiology*, 128 (1-2): 178–193. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.10.014.
- Josenhans C, Beier D, Linz B, Meyer TF, Suerbaum S. 2007. Pathogenomics of helicobacter. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 297 (7-8): 589–600. DOI 10.1016/j.ijmm.2007.02.006.
- Kessler M, Hrsg. 2022. Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze. Vierte. vollständig überarbeitete Aufl. Stuttgart: Thieme, 773-774.
- Kieler IN, Osto M, Hugentobler L, Puetz L, Gilbert MTP, Hansen T, Pedersen O, Reusch CE, Zini E, Lutz TA, Bjørnvad CR. 2019. Diabetic cats have decreased gut microbial diversity

and a lack of butyrate producing bacteria. *Scientific reports*, 9 (1): 4822. DOI 10.1038/s41598-019-41195-0.

Kiselow MA, Rassnick KM, McDonough SP, Goldstein RE, Simpson KW, Winkle TK, Erb Hollis N. 2008. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma\_41 cases (1995–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*: 405–410.

Kiupel M, Smedley RC, Pfent C, Xie Y, Xue Y, Wise AG, DeVaul JM, Maes RK. 2011. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Veterinary pathology*, 48 (1): 212–222. DOI 10.1177/0300985810389479.

Krick EL, Little L, Patel R, Shofer FS, Sorenmo K, Clifford CA, Baez JL. 2008. Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of feline large granular lymphocyte lymphoma (1996-2004). *Veterinary and comparative oncology*, 6 (2): 102–110. DOI 10.1111/j.1476-5829.2007.00146.x.

Kristal O, Lana SE, Ogilvie GK, Rand WM, Cotter SM, Moore AS. 2001. Single Agent Chemotherapy with Doxorubicin for Feline Lymphoma: A Retrospective Study of 19 Cases (1994-1997). *Journal of veterinary internal medicine*, 15 (2): 125–130. DOI 10.1111/j.1939-1676.2001.tb01243.x.

Kubota-Aizawa S, Ohno K, Kanemoto H, Nakashima K, Fukushima K, Uchida K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Mimuro H, Watanabe T, Sekizaki T, Tsujimoto H. 2017. Epidemiological study on feline gastric *Helicobacter* spp. in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, 79 (5): 876–880. DOI 10.1292/jvms.16-0567.

Kuipers EJ. 1997. *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 11 Suppl 1: 71–88. DOI 10.1046/j.1365-2036.11.s1.5.x.

Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Peña AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HPM, Meuwissen SGM. 1995. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *The Lancet*: 1525–1528.

Lecoindre P, Chevallier M, Peyrol S, Boude M, Ferrero RL, Labigne A. 2000. Gastric *Helicobacter* in cats. *Journal of feline medicine and surgery*.

- Lingard AE, Briscoe K, Beatty JA, Moore AS, Crowley AM, Krockenberger M, Churcher RK, Canfield PJ, Barrs VR. 2009. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. *Journal of feline medicine and surgery*, 11 (8): 692–700. DOI 10.1016/j.jfms.2009.05.021.
- Mayenaaz Sidhu, David van der Poorten. 2017. The gut microbiome. *The Royal Australian College of General Practitioners*, (Vol. 46, No. 4): 206–211.
- Mladenova-Hristova I, Grekova O, Patel A. 2017. Zoonotic potential of *Helicobacter* spp. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 50 (3): 265–269. DOI 10.1016/j.jmii.2016.11.003.
- Montalban C, Norman F. 2006. Treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: *Helicobacter pylori* eradication and beyond. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6 (3): 361–371. DOI 10.1586/14737140.6.3.361.
- Moore PF, Rodriguez-Bertos A, Kass PH. 2012. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Veterinary pathology*, 49 (4): 658–668. DOI 10.1177/0300985811404712.
- Neiger R, Dietrich 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*, (Vol. 36, No. 3): 634–637.
- Neiger R, Simpson KW. 2000. *Helicobacter* Infection in Dogs and Cats: Facts and Fiction. *Journal of veterinary internal medicine*: 125–133.
- Norris CR, Marks SL, Eaton KA, Torabian SZ, Munn RJ, and Solnick JV. 1999. Healthy Cats Are Commonly Colonized with “*Helicobacter heilmannii*”. *Journal of clinical microbiology*, (Vol. 37, No. 1): 189–194.
- On SLW, Miller WG, Houf K, Fox JG, Vandamme P. 2017. Minimal standards for describing new species belonging to the families Campylobacteraceae and Helicobacteraceae: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* spp. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67 (12): 5296–5311. DOI 10.1099/ijsem.0.002255.
- Owen LN. 1980. *TNM Classification Of Tumors in Domestic Animals*: 26.

Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. 2014. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World journal of gastroenterology*, 20 (36): 12847–12859. DOI 10.3748/wjg.v20.i36.12847.

Paulin MV, Couronné L, Beguin J, Le Poder S, Delverdier M, Semin M-O, Bruneau J, Cerf-Bensussan N, Malamut G, Cellier C, Benchekroun G, Tiret L, German AJ, Hermine O, Freiche V. 2018. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. *BMC veterinary research*, 14 (1): 306. DOI 10.1186/s12917-018-1635-5.

Pereira M-I, Medeiros JA. 2014. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World journal of gastroenterology*, 20 (3): 684–698. DOI 10.3748/wjg.v20.i3.684.

Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG, and Johnson CM. 2009. Immunophenotypic and Histologic Classification of 50 Cases of Feline Gastrointestinal Lymphoma. *Veterinary pathology*, (46): 259–268.

Pokhrel N, Khanal B, Rai K, Subedi M, Bhattarai NR. 2019. Application of PCR and Microscopy to Detect *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsy Specimen among Acid Peptic Disorders at Tertiary Care Centre in Eastern Nepal. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2019: 1–6. DOI 10.1155/2019/3695307.

Pregel P, Rota A, Palmerini D, Guarda F, Appino S. 2008. Detection of *Helicobacter* in gastric washing of cats. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 20 (6): 780–782. DOI 10.1177/104063870802000610.

Ritchie LE, Steiner JM, Suchodolski JS. 2008. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS microbiology ecology*, 66 (3): 590–598. DOI 10.1111/j.1574-6941.2008.00609.x.

Sasani F, Javanbakht J, Kabir FR, Agha Mohammad Hassan M, Pashaei AR. 2014. Evaluation of Gastric Lesions Based on *Helicobacter pylori* and *Helicobacter*-Like Organisms

(HLOs) in Cats; A Histopathological and Bacteriological Study. *Jundishapur journal of microbiology*, 7 (6): e9129. DOI 10.5812/jjm.9129.

Schreurs E, Vermote K, Barberet V, Daminet S, Rudolf H, Saunders JH. 2008. Ultrasonographic anatomy of abdominal lymph nodes in the normal cat. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 49 (1): 68–72. DOI 10.1111/j.1740-8261.2007.00320.x.

Sepich-Poore GD, Zitvogel L, Straussman R, Hasty J, Wargo JA, Knight R. 2021. The microbiome and human cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 371 (6536). DOI 10.1126/science.abc4552.

Suchodolski JS. 2022. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Veterinary clinical pathology*, 50 Suppl 1 (Suppl 1): 6–17. DOI 10.1111/vcp.13031.

Summers SC, Quimby JM, Isaiah A, Suchodolski JS, Lunghofer PJ, Gustafson DL. 2019. The fecal microbiome and serum concentrations of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate in cats with chronic kidney disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 33 (2): 662–669. DOI 10.1111/jvim.15389.

Taylor DN, Blaser MJ. 1991. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiologic reviews*, 13: 42–59. DOI 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036078.

Teixeira S, Filipe D, Cerqueira M, Barradas P, Cortez Nunes F, Faria F, Haesebrouck F, Mesquita JR, Gärtner F, Amorim I. 2022. *Helicobacter* spp. in the Stomach of Cats: Successful Colonization and Absence of Relevant Histopathological Alterations Reveals High Adaptation to the Host Gastric Niche. *Veterinary sciences*, 9 (5). DOI 10.3390/vetsci9050228.

Vail DM, Moore AS, Ogilvie GK, Volk LM. 1998. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 12 (5): 349–354. DOI 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02134.x.

Vail DM, Thamm DH, Liptak JM. 2020. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. Sixth edition. Elsevier, 716-717.

Valli V, Bienzle D, Meuten D, Hrsg. 2017. Tumors in domestic animals. Tumors of the Hemolymphatic System. Fifth edition. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc, 203-278.

Valli V, Kiupel M, Bienzle D. 2016. Hematopoietic System. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, (6th Edit.): 213–235.

Williams LE, Pruitt AF, Thrall DE. 2010. Chemotherapy followed by abdominal cavity irradiation for feline lymphoblastic lymphoma. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 51 (6): 681–687. DOI 10.1111/j.1740-8261.2010.01723.x.