

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Detecção do gênero *Helicobacter* em fragmentos de biopsia gástrica de cães e gatos.

PRISCILA REGINA GUERRA

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Autora: Priscila Regina Guerra*

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, especialidade na área de Bacteriologia Aplicada.

Orientador: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

PORTO ALEGRE

2014

* Médica Veterinária

CIP - Catalogação na Publicação

Guerra, Priscila Regina

Detecção do gênero *Helicobacter* em fragmentos de biópsia gástrica de cães e gatos. / Priscila Regina Guerra. -- 2014.

70 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. bacteriologia. 2. cultura bacteriana. 3. imunohistoquímica. 4. Warthin Starry. 5. Nested-PCR. I. Ribeiro de Itapema Cardoso, Marisa, orient. II. Título.

Priscila Regina Guerra

Deteção do gênero *Helicobacter* em fragmentos de biopsia gástrica de cães e gatos.

Aprovado em 28 de maio de 2014.

APROVADO POR

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADO POR

Dra. Marisa da Costa
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dr. Saulo Pavarini
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dr. Daniel Gerardi
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A professora Marisa Cardoso, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e pelos ensinamentos que levarei para a vida.

Ao professor David Driemeier, pelos ensinamentos e por acolher parte desse projeto em seu laboratório.

A professora Dulciene Queiroz e aos colegas do Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo treinamento e apoio na realização desse projeto.

Ao professor Carlos Afonso de Castro Beck, pelo apoio na realização da etapa de endoscopia.

As colegas Anelise Bonilla e Priscila Zlotowski, pelos ensinamentos, pela amizade e pela parceria durante todas as etapas de realização desse projeto.

Aos colegas Eduardo Costa, Gabriela Ledur, Simone Bianchi, Vanessa Dias e Verônica Machado, pela amizade e auxílio durante a realização do experimento.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e do Epilab, pela amizade, apoio e colaboração durante a realização do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Patológica, pela colaboração durante a realização do projeto.

Aos professores, veterinários residentes e funcionários do HCV, pela colaboração na realização desse projeto.

Aos pacientes e tutores, por acreditarem no trabalho da nossa equipe.

As amigas Larissa Carniel, Bruna Grandi, Emeline Riboldi e Renata Scaf, pela amizade e incentivo.

Aos meus animais de estimação: Totti, Chica, Lady, Preta, Guri, Pink, Cota, Nina e Toni, por trazerem alegria nos momentos difíceis.

Ao Daniel Simon, pelo carinho, dedicação e acima de tudo por me apoiar em todos os momentos.

Aos meus pais Agenor Guerra e Valkíria Guerra, pelo amor, dedicação e por me ensinarem que a educação é a maior riqueza de uma pessoa.

A todos, muito obrigada!

Detecção do gênero *Helicobacter* em fragmentos de biópsia gástrica de cães e gatos.

Autora: Priscila Regina Guerra

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

RESUMO

Sinais clínicos de dispepsia são frequentemente observados em pequenos animais, recomendando-se nesses pacientes a pesquisa de *Helicobacter* sp., pois esse agente pode estar associado com a ocorrência desses distúrbios. Há poucos relatos de isolamento dessa bactéria em animais no Brasil. Portanto, o objetivo do estudo foi investigar a presença de *Helicobacter* sp. em pacientes com indicação de endoscopia digestiva alta, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, empregando os métodos diagnósticos mais comumente adotados para sua detecção. Foram colhidos fragmentos de biópsia gástrica de um total de 30 cães e gatos submetidos à endoscopia, que não faziam uso de medicação antimicrobiana e inibidores de bomba de prótons no período mínimo de quatro semanas anteriores à coleta. Os fragmentos foram submetidos ao teste rápido da ureia (URT), colorações histológicas (H&E, Warthin Starry-WS), imunohistoquímica (IHQ), semi-nested PCR, tendo como alvo o gene 16SrRNA e cultura. Foram considerados positivos para *Helicobacter* sp. os pacientes que apresentaram resultado positivo em pelo menos dois métodos diagnósticos. Em apenas três animais foram detectadas lesões macroscópicas durante a endoscopia e 17 apresentaram lesões histopatológicas na mucosa do estômago. O URT foi positivo em 25 amostras e *Helicobacter* foi isolado de oito animais. Lâminas coradas por H&E e WS mostraram bactérias com morfologia compatível em 20 e 26 amostras, respectivamente. As técnicas de IHQ e semi-nested PCR resultaram positivas em 27 e 28 amostras, respectivamente. Ao todo, 28 pacientes foram considerados positivos, sendo que IHQ e semi-nested PCR detectaram 96,4% e 100% desses, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que ambas as técnicas podem ser recomendadas para a detecção de *Helicobacter* em pequenos animais. A presença de *Helicobacter* sp. pode ter causado os sinais gastrintestinais apresentados por cães e gatos incluídos no estudo, porém em muitos pacientes sintomáticos houve presença da bactéria na ausência de lesões microscópicas detectáveis.

Palavras-chaves: bactéria, estômago, histologia, teste rápido da urease, reação da polimerase em cadeia, imuno-histoquímica, cultura

Detection of *Helicobacter* genus from gastric biopsy fragments of dogs and cats.

Author: Priscila Regina Guerra

Adviser: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

ABSTRACT

*Dyspepsia signs are frequently observed in small animals. In these patients, *Helicobacter* sp. investigation is recommended, since this pathogen may be associated with the occurrence of this kind of disorders. In Brazil there are few reports of *Helicobacter* sp. detection in small animals. Therefore, the aim of the study was to investigate the presence of *Helicobacter* sp. by the most common methods adopted for diagnosis in patients referred for upper endoscopy at the Veterinary Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul. Thirty patients, which had not been using any antimicrobial drugs and proton pump inhibitors for at least four weeks prior the endoscopy, were selected for this study. The biopsy fragments were submitted to rapid urea test (URT), histological staining (H&E, Warthin Starry- WS), immunohistochemistry (IHC), semi-nested PCR targeting the 16S rRNA gene and culture. Patients that tested positive in at least two diagnostic methods were considered positive for *Helicobacter* sp. Macroscopic lesions were detected in only three animals during endoscopy, and seventeen had histopathological lesions in the stomach mucous. The URT resulted in 25 positive samples, while *Helicobacter* sp. was isolated from only eight patients. Histological staining (H&E and WS) showed bacteria with typical morphology in 20 and 26 samples, respectively. The IHC and semi-nested PCR were positive in 27 and 28 samples, respectively. A total of 28 patients were considered positive; among them IHC and semi-nested PCR resulted positive in 96.4% and 100%, respectively. In conclusion, both techniques can be recommended for *Helicobacter* sp. detection in small animals. *Helicobacter* infection may have been the cause of gastrointestinal signs detected in patients; however many symptomatic animals without microscopic lesions were also diagnosed positive.*

Keywords: *bacteria, stomach, histology, rapid urease test, polymerase chain reaction, immunohistochemical, culture*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Caracterização de 30 pacientes submetidos à endoscopia e resultados obtidos em métodos detecção bioquímicos, histopatológicos, moleculares e cultura de <i>Helicobacter</i> sp. em fragmentos de biópsia gástrica.....	48
TABELA 2 – Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação para Reação em Cadeia da Polimerase convencional e semi-nested para detecção do gênero <i>Helicobacter</i> sp.....	43
TABELA 3 – Concordância de resultados positivos entre métodos diagnósticos empregados na detecção de <i>Helicobacter</i> sp. em fragmentos de biópsia gástrica colhidos de 28 cães e gatos considerados positivos.....	49
TABELA 4 – Concordância estimada pelo índice Kappa entre métodos de diagnóstico empregados para detecção de <i>Helicobacter</i> sp. em fragmentos de biópsia gástrica colhidos de cães e gatos.....	49

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 Estômago do cão.....	15
FIGURA 2 – Observações ultraestruturais (Microscopia Eletrônica de Varredura) de diferentes espécies de <i>Helicobacter</i> sp. em fragmento de tecido gástrico e em meio cultura.....	28

ARTIGO

FIGURA 1 – (1) Paciente nº 21, biopsia gástrica região fúndica, presença de microrganismos de morfologia helicoidal com coloração castanho-escuro na glândula gástrica (coloração WS, 40x); (2) Paciente nº 8, biopsia gástrica região fúndica, presença de microrganismos de morfologia helicoidal com coloração castanho-escuro no muco gástrico (coloração WS, 100x).....	50
FIGURA 2 – Paciente nº 28, biopsia gástrica da região fúndica, quantidade moderada de marcações do antígeno de <i>Helicobacter</i> nas fossetas gástricas (coloração de imunoperoxidase, anti- <i>H.pylori</i> , IHQ, 40X); (2) Seta A. Paciente nº 2, biopsia gástrica da região fúndica, marcação intracelular multifocal do antígeno de <i>Helicobacter</i> (coloração de imunoperoxidase, anti- <i>H.pylori</i> , IHQ, 40X. Seta B. Paciente nº 16, biopsia gástrica da região fúndica, quantidade moderada do antígeno de <i>Helicobacter</i> no muco superficial (coloração de imunoperoxidase, anti- <i>H.pylori</i> , IHQ, 40X).....	50
FIGURA 3 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de Semi-Nested PCR, L: marcador 100pb; C+ Controle positivo; C- Controle negativo; Amostras dos pacientes de 1 a 10; 12 a 16; 18 a 30: produto de 110pb; Amostras dos pacientes 11 e 17: não houve amplificação na Semi-Nested PCR.....	51
FIGURA 4 – Imagem de MEV (1A e 1B), Paciente nº 9, biopsia mucosa gástrica, demonstram a presença <i>Helicobacter</i> sp. envolto no muco gástrico da camada mucosa do estômago; (2A) Observa-se diferenças morfológicas entre as bactérias presentes na amostra; (2B) Observa-se em maior aumento de duas bactérias de morfologia espiralada.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Estômago: Considerações anatômicas e fisiológica.....	14
2.2 O gênero <i>Helicobacter</i>	16
2.3 Patogenia.....	17
2.4 <i>Helicobacter</i> em pequenos animais.....	20
2.5 Métodos Diagnósticos.....	23
2.5.1 Teste rápido de urease	24
2.5.2 Histologia.....	25
2.5.3 Isolamento bacteriano.....	28
2.5.4 Métodos moleculares	30
2.6 Métodos diagnósticos empregados em Medicina Humana	31
3 ARTIGO- Detecção do gênero <i>Helicobacter</i> em fragmentos de biopsia gástrica de pequenos animais	34
RESUMO.....	34
<i>ABSTRACT</i>.....	35
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
Delineamento do estudo	38
Endoscopia digestiva alta.....	38
Teste rápido da urease (URT).....	39
Pesquisa de <i>Helicobacter</i> por cultura bacteriana.....	39
Histopatologia.....	40
Imunohistoquímica.....	40
Detecção de <i>Helicobacter</i> por métodos moleculares.....	41
Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
Análise dos resultados.....	44
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO.....	53
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....62

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....63

1 INTRODUÇÃO

Helicobacter sp. é o agente causador da infecção crônica mais comum em humanos e, possivelmente, também nos animais de companhia. Acredita-se que a relação ubiqüitária entre a bactéria e o humano exista desde a origem do homem moderno (VALE et al., 2009). A infecção ocorre, possivelmente, na infância, podendo persistir por toda a vida ou até que algum tratamento específico seja administrado (SINHA et al., 2004). Os indivíduos infectados podem desenvolver úlceras gástricas, adenocarcinoma e linfoma marginal da região extranodal; ou apenas apresentar sinais clínicos de dispepsia funcional (VITORIANO et al., 2011). Estima-se que entre 25% a 50% da população humana, em países desenvolvidos, esteja infectada por *Helicobacter* sp. Em países em desenvolvimento, a prevalência pode ser ainda mais elevada, alcançando cerca de 80% de infectados (ANDERSEN & RASMUSSEN, 2009; HAESEBROUCK et al., 2009).

O gênero *Helicobacter* já foi descrito em 142 espécies de vertebrados, incluindo animais domésticos e silvestres (SMET et al., 2011). Pelo menos onze espécies são passíveis de colonizar a mucosa gástrica de humanos, a maioria das quais é potencialmente patogênica (HARBOUR & SUTTON, 2008). Em animais de companhia é descrita em elevada prevalência e pode estar presente tanto em animais assintomáticos como em animais com sinais clínicos de dispepsia (HAESEBROUCK et al., 2009).

Os animais são considerados possíveis fontes de infecção para humanos; alguns relatos de casos confirmam haver a transmissão, denotando o potencial zoonótico das espécies isoladas de animais (JOOSTEN et al., 2013). Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de transmissão desse agente, apesar de haver evidências na literatura de que a transmissão possivelmente ocorra por via fecal-oral e oral-oral. A colonização de placas gengivais e dentais de cães sustenta a hipótese de que a cavidade oral seja

importante reservatório e possível fonte de infecção para humanos e animais (ARFAEE et al., 2012).

As ferramentas diagnósticas disponíveis estão subdivididas em métodos não-invasivos e invasivos, os quais requerem a realização de endoscopia digestiva. Considera-se um paciente infectado quando há resultado de cultura positiva ou há dois outros testes positivos (SIQUEIRA et al., 2007; RIMBARA et al., 2013). Em animais, apesar de haver relatos de elevada prevalência, ainda há poucas informações disponíveis sobre a infecção de *Helicobacter* sp. em pequenos animais no Brasil, bem como sobre a eficácia na detecção desse agente pelos principais métodos diagnósticos utilizados.

Tendo em vista a importância desse agente, tanto em medicina humana quanto em veterinária, o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de *Helicobacter* sp. em pacientes com indicação de endoscopia digestiva alta, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como avaliar os métodos diagnósticos mais comumente empregados para o diagnóstico desse agente em medicina veterinária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estômago: Considerações anatômicas e fisiológicas

Cães e gatos apresentam estômago simples e glandular. Nos monogástricos, esse é um órgão que exerce função endócrina e exócrina, pois ativa a digestão do alimento e secreta hormônios. Apresenta-se como uma dilatação em forma de saco do canal alimentar, sendo dividido em quatro regiões: região cárdica, fundo gástrico, corpo gástrico e região pilórica. A entrada, denominada cárdica, é a porção responsável pela passagem de alimento para interior do estômago; o fechamento do esfíncter impede o refluxo gastroesofágico. O corpo do estômago é a parte média maior, a qual se prolonga desde o fundo gástrico até o piloro. O fundo gástrico é uma invaginação cega que emerge acima do corpo e cárdica, e é responsável pelo armazenamento do conteúdo alimentar (KÖNING et al., 2011; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Toda a extensão do estômago é constituída por camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. As camadas mucosa e submucosa repousam sobre dobras direcionadas longitudinalmente, porém quando o órgão encontra-se distendido, devido à presença do alimento, estas dobras se achatam. A mucosa gástrica é revestida por um epitélio que sofre invaginações em direção à lâmina própria, o qual forma as fossetas gástricas. Nessas fossetas desemboca a secreção das glândulas tubulares ramificadas, características de cada região do estômago. Podem ser observadas numerosas invaginações do epitélio de revestimento, as quais caracterizam as aberturas das fossetas gástricas (STINSON & CALHOUN, 1982; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

As glândulas gástricas funcionam, principalmente, para produzir muco, o qual propicia a barreira protetora da mucosa contra o suco gástrico (KÖNING et al., 2011). A porção do muco que está firmemente aderida à superfície do epitélio é mais efetiva na

proteção, enquanto que a porção superficial do muco é mais solúvel, é parcialmente digerida pela ação da pepsina e misturando-se ao conteúdo luminal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). São encontrados três tipos de células na região das glândulas gástricas fúndicas: as células mucosas do colo, as quais produzem muco e servem de reserva para substituir as células epiteliais; as células principais, produtoras de pepsinogênio; e as células parietais, consideradas fonte de íons cloreto e fornecedoras do fator intrínseco essencial para a reabsorção da vitamina B₁₂ no íleo (KÖNING et al., 2011).

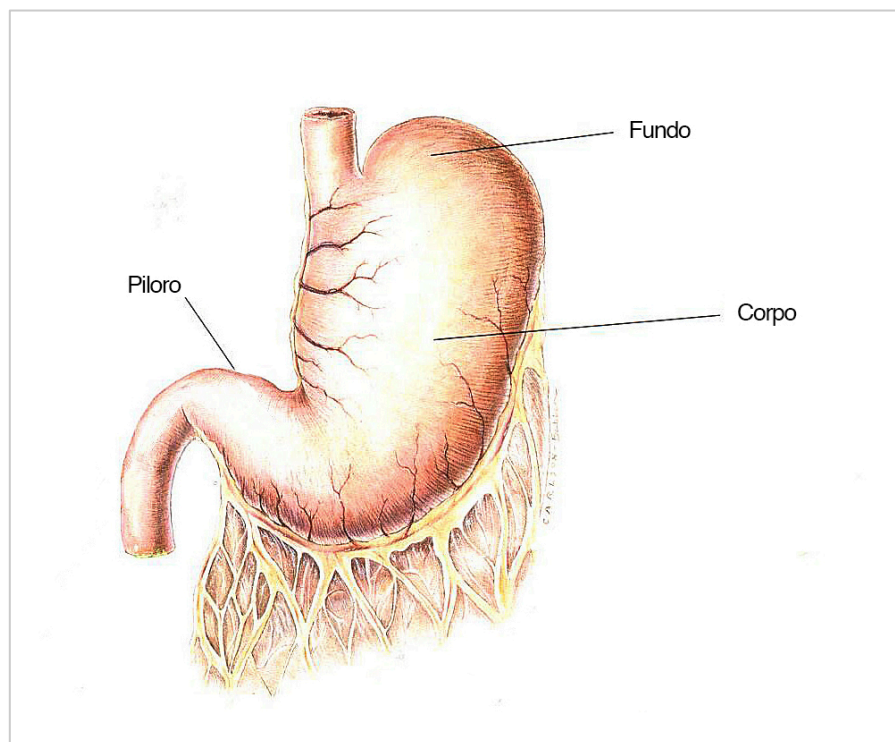


FIGURA 1 – Estômago repleto do cão (<http://morgananimalhospital.com>)

2.2 O gênero *Helicobacter*

O gênero *Helicobacter* pertence à subdivisão *Proteobacteria*, da ordem *Campylobacterales*, família *Helicobacteraceae*. Caracterizam-se por serem bacilos Gram-negativos, helicoidais, curvos ou retos. Apresentam cerca de 0,5-1,0µm de diâmetro e 2,5-5,0µm de comprimento. São micro-organismos móveis, apresentam flagelos unipolar ou multipolar (HOLT et al., 1994; KUSTERS et al., 2006; QUINN et al., 2012). Em culturas velhas com mais de 72 horas de incubação, as bactérias podem apresentar a forma cocoide, a qual é considerada forma viável-não cultivável (ANDERSEN & RASMUSSEN, 2009).

Crescem numa faixa de temperatura entre 34°C e 42°C, sendo a temperatura ótima de crescimento na faixa dos 37°C. Apresentam crescimento fastidioso e necessitam de uma atmosfera microaerofílica, constituída por O₂ (5-6%), CO₂ (8-10%) e N₂ (80-85%). As colônias são translúcidas, acinzentadas, não hemolíticas, achatadas, com cerca de 1-2 mm de diâmetro e apresentam morfologia irregular (SONGER & POST, 2005). São oxidase e catalase positivas, com exceção da espécie *H. canis*, e tem como característica, na maioria das espécies, a rápida hidrólise da ureia (HOLT et al., 1994; KUSTERS et al., 2006; QUINN et al., 2012).

Observações de bactérias espiraladas presentes no estômago de cães foram feitas pelo pesquisador Bizzozero no início do século dezanove; porém, durante muitos anos esses achados não foram mais profundamente investigados (SIQUEIRA et al., 2007). Décadas mais tarde, Warren e Marshall descreveram o primeiro isolamento de *Helicobacter pylori*, inicialmente classificado como *Campylobacter pyloridis*, em biopsias de pacientes humanos com alterações gástricas (MARSHALL & WARREN, 1984). Essa pesquisa redefiniu os rumos da gastroenterologia mundial e rendeu a ambos o Prêmio Nobel em Medicina de 2005. Atualmente, *H. pylori* é considerada a espécie

típica do gênero e a principal causadora de gastrite crônica e úlcera péptica em humanos (PATEL et al., 2013).

O gênero *Helicobacter* sp. compreende 34 espécies (LPSN, 2014), embora ainda haja muitas divergências com relação à sua classificação. Alterações na nomenclatura de espécies do gênero *Helicobacter* seguem as recomendações do Comitê Internacional de Bacteriologia e da Subcomissão de Sistemática da taxonomia de *Campylobacter* e bactérias relacionadas, os quais descrevem os requisitos mínimos para a definição de novas espécies do gênero (DEWHIRST et al., 2005).

Com o advento das análises moleculares, novas espécies foram propostas e outras reclassificadas. Por exemplo, a espécie *H.heilmannii*, a partir da análise do gene da fração 16S do rRNA, foi reclassificada em *H.heilmannii* tipos 1 e 2. O tipo 1 foi reconhecido como geneticamente idêntico à espécie *H.suis*, a qual coloniza o estômago de suínos. No entanto, o grupo *H.heilmannii* tipo 2 ainda permanece indefinido, pois alguns autores consideram esse subtipo como um grupo que engloba outras espécies isoladas de animais (BAELE, et al., 2009; HAESEBROUCK et al., 2011).

Nos últimos anos, espécies que colonizam animais e são capazes de infectar humanos têm sido descritas como não-*H. pylori* - NHPH (FLAHOU et al., 2013). Atualmente, as NHPH representam de 0,2 a 6% dos isolados em biópsias gástricas de humanos (WÜPPENHORST et al., 2012).

2.3 Patogenia

O estômago consiste em meio inóspito para a sobrevivência de bactérias, além disso, a mucina secretada pelas células da mucosa gástrica representa uma barreira física, a qual dificulta a penetração bacteriana. O gênero *Helicobacter* é capaz de resistir

apenas por alguns minutos no lúmen do estômago, portanto necessita migrar rapidamente para a superfície epitelial gástrica para assegurar a sua sobrevivência. A atividade da enzima urease também auxilia a mobilidade na camada mucosa, porque altera as propriedades de viscoelasticidade da mucina gástrica. Adicionalmente, a ativação da enzima urease é um mecanismo para neutralizar o pH ácido do estômago. A hidrólise da ureia em amônia e bicarbonato, catalisada pela enzima, propicia um microclima favorável para a multiplicação bacteriana no estômago. A amônia também é utilizada na biossíntese de aminoácidos; é, portanto, importante fonte de nutrientes para a bactéria (BURY-MONE et al., 2003). Portanto, a presença de flagelos, a forma helicoidal da bactéria, associadas à produção de urease são fatores fundamentais para a sobrevivência bacteriana (SALAMA et al., 2013).

Após ultrapassar a camada de muco e atingir a superfície epitelial e as criptas gástricas, a bactéria adere ao epitélio gástrico. O processo ocorre por meio de proteínas de adesão bacteriana que reconhecem glicanos específicos (Gly-R) expressos na mucosa gástrica (PARREIRA et al., 2013). A ligação adesina-receptor contribui para a cronicidade da infecção, visto que as adesinas auxiliam no estabelecimento da colonização persistente e contribuem para a patogenicidade ao permitir o contato direto com o epitélio (LIMA & RABENHORST, 2009). Esses eventos provocam a expressão de vários genes bacterianos, incluindo alguns que codificam fatores de virulência. Nos últimos anos várias proteínas de membrana, associadas ou envolvidas na infecção por *Helicobacter*, foram identificadas. Como, por exemplo, adesina BabA que se liga à estrutura presente nos antígenos Lewis b (grupo sanguíneo fenótipo O). Essa ligação representa a melhor caracterização da interação adesina-receptor na espécie *H.pylori* (YAMAOKA et al., 2008; PARREIRA et al., 2013).

O mecanismo de proteção do hospedeiro contra a infecção ainda não foi claramente elucidado, mas existem evidências que apoiam o papel fundamental do CD4T-auxiliares na resposta imune contra *H. pylori*. Essas células são ativadas quando antígenos são apresentados por MHC classe II, os quais são expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos. Após serem ativadas, as células passam a secretar citotoxinas pró-inflamatórias (LI et al., 2012), como: INF- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-17, IL-8 e IL-6, as quais também contribuem para a ocorrência de danos ao epitélio e resultam em gastrite inflamatória (BAGHERI et al., 2013). A infecção por *Helicobacter* sp. resulta na infiltração de neutrófilos, monócitos, linfócitos e plasmócitos. Contudo, estudos realizados em camundongos sugerem que, quando houver falhas das células apresentadoras de antígenos, poderá ocorrer resposta imune não efetiva (LI et al., 2012). Por outro lado, segundo Kusters e colaboradores (2006), a resposta do sistema imune pode provocar, em alguns casos, dano tecidual ao invés de destruir o microrganismo.

As bactérias fazem uso de inúmeros mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro, com intuito de assegurar a persistência do quadro infeccioso (SALAMA et al., 2013). Alguns desses mecanismos são citados na literatura como, por exemplo, a baixa afinidade do lipopolissacarídeo (LPS) pelos receptores *Toll-like 4* (IHAN et al., 2012) e a inibição a transcrição e da produção de óxido nítrico em macrófagos, induzida pelo LPS bacteriano (LU et al., 2012). Esse mecanismo demonstra que o agente é capaz de modular a sinalização da célula hospedeira para se proteger da reação inflamatória e, dessa forma, sobreviver no ambiente hostil do estômago (LU et al., 2012).

Cepas de *Helicobacter* podem promover sua permanência no hospedeiro, por meio da secreção de toxinas, como a proteína imunogênica (CagA) e a citotoxina vacuolizante (VacA). Indivíduos infectados por cepas CagA positiva apresentam um quadro infeccioso mais grave, com maior dano tecidual e maior risco de úlcera e

carcinoma gástrico (WANG et al., 2013). A proteína CagA é codificada pela ilha de patogenicidade *cag* (PAI) e introduzida na célula hospedeira via sistema de secreção do tipo IV, a qual induz alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução, resulta no rearranjo do citoesqueleto e em alterações morfológicas celulares (SALAMA et al., 2013). Recentemente, CagA passou a ser considerada como uma oncoproteína, visto que induz uma desregulação da atividade celular e está fortemente associada à ocorrência de câncer gástrico (DELGADO-ROSANO et al., 2011; IHAN et al., 2012). Já a citotoxina VacA é uma toxina formadora de poros, a qual rompe a polaridade celular, resultando na indução de múltiplas alterações, como a vacuolização das células, a formação de canais de membrana, a interrupção das funções endossomais e lisossomais, apoptose e imunomodulação (KUSTERS et al., 2006; LIMA & RABENHORST, 2009; SALAMA et al., 2013).

2.4 *Helicobacter* em pequenos animais

A prevalência de *Helicobacter* em pequenos animais é elevada; essas bactérias são encontradas frequentemente no estômago de cães. Entretanto, a relação com doença gástrica ainda não foi completamente estabelecida (ASL et al., 2010). Estudos estimaram valores de prevalência global entre 61 a 100% em cães assintomáticos, ou com sinais clínicos de dispepsia (HERMANNNS et al., 1995; STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999; NEIGER; SIMPSON, 2000; HWANG et al., 2002). Já em felinos, as prevalências variam entre 40% a 100% em diferentes áreas geográficas (VAN DEN BULCK et al., 2005; ARAUJO et al., 2010).

Na literatura, são referenciadas diversas espécies como possíveis causadoras de infecção gástrica em pequenos animais e as mais comumente relacionadas são: *H. felis*, *H. canis*, *H. bizzozeronii*, *H. heilmannii*, *H. salomonis*, *H. marmotae*, *H. rappini*, *H.*

baculiformis, *H. bilis* e *H. cynogastricus* (O'ROURKE et al., 2004; VAN DEN BULCK et al., 2006, HARBOUR & SUTTON, 2008; HAESEBROUCK et al., 2009, LANZONI et al., 2011, JOOSTEN et al., 2013). Essas espécies estão associadas à ocorrência de quadros clínicos de gastrite, diarreia e linfoma gástrico (HARBOUR & SUTTON, 2008). Em felinos, a espécie *H. pylori* também foi relatada, denotando o possível potencial zoonótico desta infecção (BOOMKENS et al., 2004). Há relatos da detecção do DNA dessa espécie bacteriana no conteúdo biliar de felinos, sugerindo uma possível associação com casos de colangite, doença biliar comumente descrita nessa espécie (BOOMKENS et al., 2004; GREITER-WILKE et al., 2006).

As vias de transmissão de *Helicobacter* ainda não foram completamente elucidadas. Em animais, o DNA bacteriano tem sido detectado em outros sítios além do tecido gástrico, como placas dentárias, fragmentos de duodeno, amostras de vômito, de saliva e de fezes (GHIL et al., 2009; EKMAN et al., 2013). Estudos das últimas décadas propuseram como as vias de transmissão mais plausíveis a fecal-oral e/ou oral-oral. A presença de *Helicobacter* sp. na placa dentária de animais suporta a hipótese de que a cavidade oral seja a mais provável fonte de infecção (ARFAEE et al., 2012). Acredita-se que infecção em animais seja adquirida durante a fase de crescimento, pelo contato materno ou com outros animais jovens infectados, podendo ocorrer a transmissão pelo contato com vômito e alimentos regurgitados (HANNINEN et al., 1998).

A localização das bactérias do gênero *Helicobacter* difere de acordo com a espécie animal. Essas podem estar presentes na superfície da mucosa ou no muco, nas fossas gástricas, nas glândulas gástricas, nas células parietais, no lúmen das células gástricas, dentro dos lisossomos, livres no citoplasma, ou até mesmo dentro de macrófagos localizados na lâmina própria. Contudo, o local de predileção para a maioria das espécies é a célula parietal da mucosa fúndica (WIINBERG et al., 2005; LANZONI

et al., 2011). A espécie *H. bizzozeronii*, preferencialmente, localiza-se na porção intraluminal ou intraparietal, ou seja, na base da glândula ou interior do citoplasma das células parietais. No entanto, *H. felis* é mais encontrada colonizando a superfície das glândulas gástricas de cães e pode estar presente, também, na região do istmo. *H. bizzozeronii* apresenta grande afinidade por células parietais; essa observação sugere que essa espécie possa ser mais adaptada à espécie canina. Ainda não foi elucidado como esse microrganismo penetra na célula parietal, contudo alterações degenerativas são achados ocasionais em células infectadas por *H. bizzozeronii* (LANZONI et al., 2011).

Animais infectados podem apresentar desde erosão da mucosa gástrica, gastrite até linfoma gástrico e essa bactéria também pode ser encontrada em portadores assintomáticos (AKHTARDANESH et al., 2006; GIEGER, 2011; TAKEMURA et al., 2012). Vieira e colaboradores (2012) sugeriram haver uma correlação entre grau de inflamação e número de bactérias presentes na mucosa gástrica de cães. Entretanto, outros autores não encontraram essa mesma correlação, denotando que as alterações citadas na literatura possam ser causadas por algumas espécies e sua interação com o hospedeiro, ou ser uma consequência da resposta individual frente à infecção (GOMBAC et al., 2010).

A espécie *H. felis* foi primeiramente isolada do estômago de felinos e, posteriormente, descrita em cães (HARBOUR & SUTTON, 2008). É provável que essa tenha sido a espécie descrita no primeiro relato feito por Bizzozero, em 1893. Morfologicamente, a espécie apresenta fibrilas periplasmáticas características, passíveis de identificação por meio da microscopia eletrônica (KUSTERS et al., 2006). A importância de *H. felis* em distúrbios gástricos de pequenos animais ainda não está completamente elucidada, visto que são necessários mais estudos para determinar se as

afecções gástricas dos animais são causadas pela presença dessa bactéria. Algumas pesquisas sugerem que *H. felis* possa ser mais patogênica que *H. bizzozeronii* em cães e também, experimentalmente, em roedores, visto que podem ocasionar necrose e induzir apoptose das células parietais (LEE et al., 1992; DE BOCK et al., 2006; LANZONI et al., 2011). O primeiro isolamento de *H. felis* em humanos foi descrito em uma jovem de 14 anos que apresentava quadro persistente de dor epigástrica e vômitos recorrentes (WÜPPENHORST et al., 2013).

A espécie *H. bizzozeronii* foi descrita em 1996, é considerada adaptada aos cães. É encontrada em amostras de estômago e duodeno, eventualmente está presente na saliva, não sendo detectada em amostras de fezes (EKMAN et al., 2013). Foi encontrada em pacientes com ou sem lesões de gastrite, portanto a patogenicidade dessa espécie em cães ainda não está completamente estabelecida (SCHOTT et al., 2011).

2.5 Métodos Diagnósticos

Os métodos disponíveis para o diagnóstico da infecção por *Helicobacter* são subdivididos em não invasivos e invasivos. Os métodos não invasivos têm o intuito de detectar indiretamente *Helicobacter* sp. por meio da sorologia ou teste respiratório com ureia marcada com isótopos de carbono (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999; RIMBARA et al., 2013). Apesar da sorologia ser um teste barato e acessível, esse não é considerado muito preciso para o diagnóstico, principalmente, em paciente com sangramento gástrico em que há uma redução da especificidade do teste (MCNULTY et al., 2011; CHOI et al., 2012). Além disso, os *kits* detectam anticorpos contra *Helicobacter*, como os títulos permanecem positivos após a erradicação, a desvantagem mais significativa é a incapacidade de distinguir a infecção ativa da exposição prévia

(VAKIL et al., 2004). Com relação ao teste da ureia marcada com isótopos de carbono, alguns efeitos imediatos podem influenciar no resultado como, por exemplo, alterações da motilidade gástrica ou do pH intragástrico, fator o qual pode alterar a sensibilidade do teste (GISBERT et al., 2004). De modo geral, ambos os testes são pouco descritos na literatura veterinária.

Os métodos invasivos são os mais eficazes, porém requerem a realização de endoscopia digestiva alta para a coleta de fragmentos de mucosa gástrica. A realização da endoscopia digestiva possui a vantagem de possibilitar a visualização das alterações na mucosa gástrica, tais como úlcera ou indícios de malignidade (CHOI et al., 2011). São amplamente empregados no diagnóstico em medicina humana e veterinária, compreendendo: teste rápido da urease, histologia, cultura bacteriana e métodos moleculares (GUARNER et al., 2009, AGUDO et al., 2010).

2.5.1 Teste rápido de urease

O teste rápido da urease é um método simples, de baixo custo, o qual necessita de apenas um fragmento de mucosa gástrica para sua realização. Existem *kits* comerciais que contêm uma combinação de ureia com indicador de pH (vermelho de fenol). Os fragmentos de biopsia devem ser imersos nessa solução, imediatamente após a coleta. A hidrólise da ureia ocasiona o aumento do pH do meio e resulta na alteração da coloração do vermelho de fenol de amarelo para rosa. Quando essa mudança ocorre em intervalo de até 24 horas, o teste é considerado positivo (CHOI et al., 2011).

O método baseia-se no fato de que a maioria das espécies do gênero *Helicobacter* são potentes redutores de ureia, característica a qual permite a sobrevivência no ambiente ácido do estômago (SIQUEIRA et al., 2007). Segundo

Redéen et al. (2011) o método apresenta sensibilidade de 90% e especificidade de 98% para fragmentos da região do antro e corpo do estômago. Todavia, Choi et al. (2012) relataram haver redução na sensibilidade para 85% e na especificidade 91% quando há sangramento gástrico. Além disso, é importante salientar, que o resultado positivo no teste está diretamente relacionado com a concentração bacteriana presente no fragmento, ou seja, baixo número de bactérias pode resultar em testes falso-negativos. Por outro lado, há a possibilidade de contaminação da amostra por outros micro-organismos produtores de urease como *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, o que pode acarretar em resultados falso-positivos (SIQUEIRA et al., 2007). Para o diagnóstico de rotina, o resultado do teste da urease é comumente avaliado em conjunto com o resultado do exame histopatológico (GUARNER et al., 2009).

2.5.2 Histologia

O diagnóstico histológico é um método eficaz, pois permite avaliar as alterações teciduais e a presença de células inflamatórias, além de ser capaz de detectar a bactéria nos tecidos. Além disso, pode discriminar outras possíveis causas para os sinais clínicos apresentados pelo paciente, extremamente útil para o diagnóstico diferencial (GUARNER et al., 2009). Segundo Choi e colaboradores (2012), o exame histopatológico é muito confiável, mesmo em pacientes com úlceras hemorrágicas. Os autores reportaram uma sensibilidade entre 85-% e 96%, e especificidade de 86-99% para detecção de *Helicobacter* a partir de biopsias gástricas.

As colorações mais empregadas na avaliação histológica são Giemsa, Hematoxilina e Eosina (H&E) e Warthin-, esta última considerada de escolha para a visualização da bactéria (STRAUSS-AYALI & SIMPSON, 1999). A coloração de H&E

é menos sensível, em casos em que há reduzido número de microrganismos na amostra as colorações especiais e a técnica de imuno-histoquímica mais indicadas. Porém, a coloração de H&E é adequada para o diagnóstico, quando há ocorrência de úlcera gástrica, desde que a avaliação seja realizada por um patologista experiente (LIN et al., 2013). A coloração de Warthin-Starry consiste em uma mistura de solução de nitrato de prata, gelatina e solução reveladora (hidroquinona). Com auxílio dessa solução reveladora o composto de prata é reduzido e torna-se visível (NAM et al., 2013). Dessa forma, as bactérias impregnadas pela prata adquirem coloração castanho-escuro e as estruturas adjacentes coloração castanho-claro (PRACHASILPCHAI et al., 2007).

Os critérios estabelecidos por Day et al. (2008) e Washabau et al. (2010) para avaliação histológica, são baseados na identificação de infiltrados inflamatórios e alterações morfológicas de superfície. Os tecidos visualizados durante o exame histológico podem ser classificados conforme o grau de lesão observada como: sem alteração (0), alteração discreta (1), moderada (2) ou acentuada (3).

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) pode ser aplicada para diagnóstico de infecção por *Helicobacter*, no entanto anticorpos específicos para as espécies não-*H. pylori* não estão disponíveis comercialmente (BAELE et al., 2009). Prachasilpchai (2007) demonstrou que anticorpos policlonais comerciais contra *H. pylori* são eficazes para detecção de *Helicobacter* a partir de amostras gástricas parafinadas de cães.

Para detecção de *Helicobacter* em animais o mais comum é a utilização de anticorpo policlonal produzido em coelho, anti-*H. pylori* na diluição 1:200. Utiliza-se, também, anticorpo secundário, estreptavidina e o cromógeno fornecidos pelos kits comerciais (CASTIGLIONI et al., 2012). Por fim, os cortes devem ser contra-corados com hematoxilina, desidratados, clarificados em xilol e montados com bálsamo sintético.

A IHQ permite observar a presença de antígenos no interior das células parietais e no lúmen de glândulas gástricas. Para interpretação, pode ser utilizado o sistema de pontuação semi-quantitativa: (0) para a ausência de antígeno nas células parietais/lúmen das glândulas gástricas, (+) para presença de quantidade escassa, (++) para quantidade moderada, e (+++) para grande quantidade de antígenos nas células parietais/lúmen das glândulas gástricas (CASTIGLIONI et al., 2012). Os antígenos no interior das células parietais apresentam-se na forma de pontos bem demarcados, ou através de demarcação difusa no citoplasma dessas células (LANZONI et al., 2011).

A microscopia eletrônica possibilita a detecção da bactéria em locais como o citoplasma de macrófagos e a lâmina própria da mucosa fúndica (LANZONI et al., 2011). Além disso, a microscopia eletrônica contribui para a diferenciação das espécies, pois possibilita a distinção das características morfológicas (VAN DEN BULCK et al., 2006).

De acordo com observações ultraestruturais, a espécie *H. felis* possui formato ligeiramente cônico e apresenta dez bainhas de flagelo em cada extremidade, com duas a três fibrilas periplasmáticas ao redor de toda extensão do corpo bacteriano, padrão que é característico dessa espécie (FIGURA 1). Já a espécie *H. bizzozeronii*, ocasionalmente, apresenta uma única fibrila periplasmática ao redor do corpo, ultra estruturalmente muito similar a *H. heilmannii* (FIGURA 1) e *H. pylori* apresenta forma de “s”, apresentando flagelos que na maioria das vezes não são visualizados (FIGURA 1). *H. salomonis* é pequeno, helicoidal em cultura apresenta-se morfologia diferenciada, com ausência das fibrilas periplasmáticas. A morfologia bacteriana é uma ferramenta útil que possibilita a diferenciação entre algumas espécies, principalmente quando avaliada em hospedeiros naturalmente infectados. A análise a partir de isolados em

cultura não é recomendada, porque a maioria das cepas perdem algumas de suas características morfológicas em cultura (STOFFEL et al., 2000).

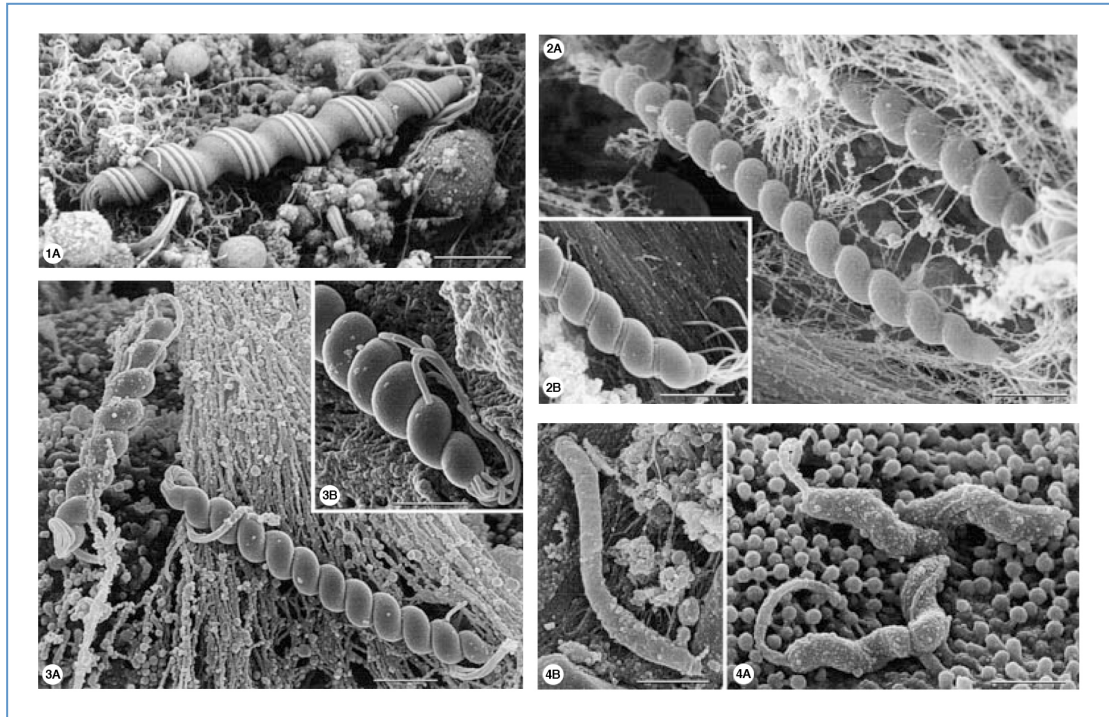


FIGURA 2 – Observações ultraestruturais (Microscopia Eletrônica de Varredura) de diferentes espécies de *Helicobacter* em fragmento de tecido gástrico e em meio cultura (1A) *H. felis* proveniente de roedores experimentalmente mono infectados; (2A/B) *H. bizzozeronii* proveniente de roedores experimentalmente mono infectados; (2B) *H. bizzozeronii* proveniente de cão naturalmente infectado (3A) *H. heilmannii* proveniente de roedores experimentalmente mono infectados; (3B) *H. heilmannii* proveniente de gato naturalmente infectado (4A) *H. pylori* em cultura bacteriana; (4B) *H. pylori* proveniente da mucosa gástrica humana (STOFFEL et al., 2000).

2.5.3 Isolamento bacteriano

O isolamento da bactéria é considerado o método de referência. Esse possui elevada especificidade (100%), porém, sua sensibilidade é limitada, em torno de 52% a 68% (MCNULTY et al., 2011; CHOI et al., 2012). A baixa sensibilidade do isolamento é devida ao fato da bactéria ser fastidiosa e necessitar de meios de cultura frescos e suplementados, fatores os quais dificultam o emprego no diagnóstico de rotina (GLUPCZYNSKI, 1998). O isolamento é realizado em meios de cultivo constituído por

meio base, como: BHI (*Brain Heart Infusion*), meio HPSPA (*Helicobacter pylori special peptone agar*) meio Glupczynski's, ágar Brucella, ágar Mueller-Hinton, ágar Chocolate, ágar Belo Horizonte ou ágar Columbia (BENAÏSSA et al., 1996; QUEIROZ et al., 1987; STEVENSON et al., 2000). Esses meios necessitam ser suplementados com sangue de carneiro ou equino, pode ser acrescido de soro fetal bovino. Para inibição da microbiota acompanhante, uma combinação de diversos antimicrobianos deve ser incluída. Como por exemplo, o meio Belo Horizonte, desenvolvido para o isolamento de *Helicobacter pylori*, possui em sua composição a associação de ácido nalidíxico, anfotericina B, vancomicina e sal de tetrazólio (QUEIROZ et al., 1987). A utilização do sal de tetrazólio confere uma coloração dourada à colônia, permitindo uma melhor visualização das mesmas no meio de cultura (KUSTERS et al., 2006).

Depois de semeadas, as amostras devem ser incubadas á 37°C, em atmosfera de microaerofilia, por 3-5 dias e deve-se monitorar o crescimento bacteriano por até 21 dias de incubação (OLIVEIRA et al., 2006; CHOI, et al., 2012). A identificação bacteriana e a determinação da espécie são realizadas por meio da observação macroscópica das colônias, da morfologia microscópica e de testes bioquímicos, tais como: detecção das enzimas catalase e oxidase e hidrólise da ureia (SONGER; POST, 2005; CHOI, et al., 2012).

O sucesso do isolamento é influenciado por vários fatores, tais como: o número de fragmentos obtidos na biópsia, o meio de cultura, a duração e a temperatura do transporte. Além disso, antimicrobianos e inibidores de bomba de prótons utilizados como tratamento de suporte ao paciente podem interferir no isolamento bacteriano (SIQUEIRA et al., 2007).

2.5.4 Métodos moleculares

Os métodos moleculares têm a vantagem da rapidez no diagnóstico e são menos influenciados pelas condições de transporte. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser empregada tanto para a pesquisa da presença de *Helicobacter* em amostras clínicas, quanto para a identificação das espécies do gênero. Além disso, métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detectar mutações que conferem resistência a antimicrobianos, como, por exemplo, à claritromicina (AGUDO et al., 2010; MCNULTY et al., 2011).

A análise do gene 16S rRNA é comumente empregada como ferramenta para investigar a presença do gênero *Helicobacter* em fragmentos de amostras clínicas, utiliza-se oligonucleotídeos iniciadores específicos (ARFAEE et al., 2012). Alguns estudos demonstraram que, filogeneticamente, as espécies são altamente relacionadas. *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* e *H. heilmannii* tipo 2 apresentam > 98% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA (PASTER et al., 1991; HANNINEN et al., 1996; JALAVA et al., 1998). Essa ferramenta serve para identificação do gênero, contudo não é a mais adequada para a discriminação entre as espécies. Portanto, outros genes com maior poder discriminatório devem ser utilizados para essa finalidade, tais como: gene 23S rRNA, gene *Hsp60*, genes da urease A e B e o gene *gyrB* (BAELE et al., 2009).

O DNA pode ser extraído de amostras de biópsia, conteúdo do suco gástrico ou de placa dentária, saliva e outros. É importante ressaltar que a extração de ácidos nucleicos é um passo fundamental, principalmente, para amostras que podem conter

inibidores da PCR e outras bactérias comensais, como, por exemplo, amostras de fezes (EKMAN et al., 2013; RIMBARA et al., 2013).

A sensibilidade da PCR convencional está em torno de 96% (THIJS et al., 1996), todavia, a PCR em tempo real (RT-PCR) tem possibilitado resultados ainda mais específicos e sensíveis (MCNULTY et al., 2011). Além disso, a RT-PCR possibilita a quantificação do agente presente na amostra, no entanto, ainda apresenta um custo elevado. Apesar da PCR possuir boa sensibilidade e especificidade quando comparada à outros métodos, existem algumas limitações intrínsecas da técnica, como os resultados falsos negativos devido ao pequeno número de bactérias presentes na amostra ou devido à presença de inibidores da reação (SUGIMOTO et al., 2009).

2.6 Métodos diagnósticos empregados em Medicina Humana

Em humanos, já foi estabelecido que *H. pylori* causa o desenvolvimento de câncer e atrofia gástrica; atualmente, o câncer gástrico figura entre as principais causas de morte por câncer em todo o mundo (LU & XIAO, 2014; PARKIN, 2006). Portanto, os métodos diagnósticos para a detecção desse agente são de extrema importância.

Com relação aos métodos histológicos empregados no diagnóstico utiliza-se a coloração de H&E, Giemsa, Warthin-Starry, Genta, Gimenez, McMullen (RICCI et al., 2007). A coloração de H&E é empregada na detecção de infiltrados inflamatórios e identificação de células indicativas de processos tumorais, para visualização bacteriana costuma-se empregar colorações especiais como Giemsa, Warthin-Starry e/ou imuno-histoquímica, pois geralmente apresentam maior sensibilidade diagnóstica (LIN et al., 2013).

Embora a cultura bacteriana possua elevada especificidade, essa tem sido pouco utilizada no diagnóstico em humanos, ficando praticamente restrita à pesquisa. Essa técnica requer cuidados como em relação ao preparo dos meios de cultura e muitos meios comerciais apresentam resultados inferiores. Além disso características de amostra como a densidade bacteriana, administração de medicamentos aos pacientes e até mesmo o consumo de bebidas alcoólicas antes da coleta podem interferir no processo de cultivo e resultar em falhas (MCNULTY et al., 2011).

Os métodos largamente empregados são o teste rápido da urease (URT) e o teste respiratório da ureia marcada (UBT), ambos baseados no fato da bactéria ser uma potente redutora da ureia, devido à enzima urease. O UBT é um método recomendado pela Associação Americana de Gastreenterologia para o diagnóstico de *H. pylori* em paciente com sinais clínicos de dispepsia, pois é considerado o teste não invasivo mais confiável. No entanto, apresenta limitações, principalmente, em pacientes que recebem medicações inibidoras da bomba de prótons, pois essas reduzem a atividade da enzima urease bacteriana no estômago, por esse motivo recomenda-se interromper o tratamento no mínimo duas semanas antes da realização dos procedimentos (LU & XIAO, 2014).

Os métodos moleculares têm como vantagem a rápida obtenção do resultado e o fato de não serem afetados por limitações como transporte (MCNULTY et al., 2011). Esses têm sido utilizados em larga escala para o diagnóstico de *Helicobacter* em humanos. Métodos moleculares têm demonstrado grande utilidade em pacientes com úlceras pépticas hemorrágica, em especial a PCR em tempo real (SAEZ et al., 2012). Outras técnicas também baseadas na detecção do DNA bacteriano como Nested PCR, PCR-RFLP têm demonstrado bons resultados e apresenta sensibilidade e especificidade elevada se comparados a outros métodos diagnósticos (MENONI et al., 2013; OTTIWET et al., 2010).

Uma característica do diagnóstico em humanos, é a utilização de testes não invasivos para o diagnóstico, estima-se que no futuro esses métodos sejam ainda mais empregados (LU & XIAO, 2014). Dentre os testes sorológicos, a pesquisa de antígenos fecais através do método de ELISA destaca-se como alternativa viável. Há alguns *kits* comerciais disponíveis para o diagnóstico, no entanto ainda não comercializados no Brasil (CHEHTER et al., 2013).

Em contrapartida em veterinária, devido à pesquisa ainda ser incipiente nessa área, ainda existem muitas lacunas do conhecimento que devem ser preenchidas como, por exemplo, a associação de diferentes espécies de *Helicobacter* sp. na colonização a cavidade oral e o estômago de cães (ARFAEE et al., 2012). Portanto, tendo em vista essas questões se faz necessário consolidar os métodos de diagnósticos mais empregados para poder aprimorar a compreensão do real papel dessas bactérias nos quadros de doenças gástricas nos animais e quais os riscos de transmissão desses agentes entre humanos e animais.

3. ARTIGO

Detecção do gênero *Helicobacter* em fragmentos de biópsia gástrica de cães e gatos¹

Detection of *Helicobacter* genus from gastric biopsy fragments of small animals

GUERRA, P.R.¹; TRINDADE, A.B.²; ZLOTOWSKI, P.³; BIANCHI, S.P.²; LEDUR, G.R.³; COSTA, E. F.⁴; DRIEMEIER, D.²; CARDOSO, M.R.I.¹

¹ Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto alegre, Brasil.

² Setor de Videocirurgia Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto alegre, Brasil.

³ Setor de Anatomia Patológica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

⁴ Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

⁵ Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

Sinais clínicos de dispepsia são frequentemente observados em pequenos animais, recomendando-se nesses pacientes a pesquisa de *Helicobacter* sp., pois esse agente pode estar associado com a ocorrência desses distúrbios. Há poucos relatos de isolamento dessa bactéria em animais no Brasil. Portanto, o objetivo do estudo foi investigar a presença de *Helicobacter* sp. em pacientes com indicação de endoscopia digestiva alta, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, empregando os métodos diagnósticos mais comumente adotados para sua detecção. Foram colhidos fragmentos de biópsia gástrica de um total de 30 cães e gatos submetidos à endoscopia, que não faziam uso de medicação antimicrobiana e inibidores de bomba de prótons no período mínimo de quatro semanas anteriores à coleta. Os fragmentos foram submetidos ao teste rápido da ureia (URT), colorações histológicas (H&E, Warthin Starry-WS), imunohistoquímica (IHQ), semi-nested PCR, tendo como alvo o gene 16SrRNA e cultura. Foram considerados positivos para *Helicobacter* sp. os pacientes que apresentaram resultado positivo em pelo menos dois métodos diagnósticos. Em apenas três animais foram detectadas lesões macroscópicas durante a endoscopia e 17 apresentaram lesões histopatológicas na mucosa do estômago. O URT foi positivo em 25 amostras e *Helicobacter* foi isolado de oito animais. Lâminas coradas por H&E e WS mostraram bactérias com morfologia compatível em 20 e 26 amostras, respectivamente. As técnicas de IHQ e semi-nested PCR resultaram positivas em 27 e 28 amostras, respectivamente. Ao todo, 28 pacientes foram considerados positivos, sendo que IHQ e semi-nested PCR detectaram 96,4% e 100% desses, respectivamente.

¹Artigo será traduzido para língua inglesa e submetido à comissão editorial da revista: “*Research in veterinary Science*”

Dessa forma, conclui-se que ambas as técnicas podem ser recomendadas para a detecção de *Helicobacter* em pequenos animais. A presença de *Helicobacter* sp. pode ter causado os sinais gastrintestinais apresentados por cães e gatos incluídos no estudo, porém em muitos pacientes sintomáticos houve presença da bactéria na ausência de lesões microscópicas detectáveis.

Palavras-chaves: bactéria, estômago, histologia, teste rápido da urease, reação da polimerase em cadeia, imuno-histoquímica, cultura

ABSTRACT

Dyspepsia signs are frequently observed in small animals. In these patients, Helicobacter sp. investigation is recommended, since this pathogen may be associated with the occurrence of this kind of disorders. In Brazil there are few reports of Helicobacter sp. detection in small animals. Therefore, the aim of the study was to investigate the presence of Helicobacter sp. by the most common methods adopted for diagnosis in patients referred for upper endoscopy at the Veterinary Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul. Thirty patients, which had not been using any antimicrobial drugs and proton pump inhibitors for at least four weeks prior the endoscopy, were selected for this study. The biopsy fragments were submitted to rapid urea test (URT), histological staining (H&E, Warthin Starry- WS), immunohistochemistry (IHC), semi-nested PCR targeting the 16S rRNA gene and culture. Patients that tested positive in at least two diagnostic methods were considered positive for Helicobacter sp. Macroscopic lesions were detected in only three animals during endoscopy, and seventeen had histopathological lesions in the stomach mucous. The URT resulted in 25 positive samples, while Helicobacter sp. was isolated from only eight patients. Histological staining (H&E and WS) showed bacteria with typical morphology in 20 and 26 samples, respectively. The IHC and semi-nested PCR were positive in 27 and 28 samples, respectively. A total of 28 patients were considered positive; among them IHC and semi-nested PCR resulted positive in 96.4% and 100%, respectively. In conclusion, both techniques can be recommended for Helicobacter sp. detection in small animals. Helicobacter sp. infection may have been the cause of gastrointestinal signs detected in patients; however many symptomatic animals without microscopic lesions were also diagnosed positive.

Keywords: *bacteria, stomach, histology, rapid urease test, polymerase chain reaction, immunohistochemical, culture*

INTRODUÇÃO

O quadro clínico de dispepsia engloba uma série de sinais, incluindo dor, distensão abdominal, náuseas e vômitos (YOKOO et al., 2012). A realização da endoscopia digestiva em pacientes dispépticos é indicada por possibilitar a visualização das alterações na mucosa gástrica, tais como úlceras, doença do refluxo ou indícios de malignidade, contribuindo para o diagnóstico diferencial das alterações gástricas (CHOI et al., 2011; YOKOO et al., 2012). Nesses casos, deve-se considerar também a pesquisa de *Helicobacter*, visto que o agente está frequentemente associado com distúrbios gastrointestinais em pequenos animais (ELLIS et al., 2010).

A partir da identificação de *Helicobacter pylori* (MARSHALL & WARREN, 1984), as doenças gástricas passaram a ser estudadas sob uma nova perspectiva. O gênero *Helicobacter* já foi descrito em 142 espécies de vertebrados, incluindo animais domésticos e silvestres (SMET et al., 2011). Pelo menos onze espécies desse gênero são passíveis de colonizar a mucosa gástrica de humanos, a maioria das quais é potencialmente patogênica (HARBOUR & SUTTON, 2008). Atualmente, os animais são considerados reservatório em potencial de espécies não-*H. pylori*, portanto o diagnóstico de sua presença não pode ser negligenciado (FLAHOU et al., 2013).

A presença de *Helicobacter* sp. em pequenos animais tem sido descrita na cavidade oral, no estômago, no duodeno e nas fezes (EKMAN et al., 2013). Em animais de companhia é descrita elevada prevalência, presente em animais com sinais clínicos de dispepsia tanto como em assintomáticos (HAESEBROUCK et al., 2009; ASL et al., 2010; SCHOTT et al., 2011; COSTA et al., 2012). Estima-se que a prevalência global varie entre 61 a 100% em cães sintomáticos e assintomáticos (NEIGER & SIMPSON, 2000; HWANG et al., 2002). Já em felinos os estudos apontam valores de prevalência

superiores a 40% (VAN DEN BULCK et al., 2005; ERGINSOY & SOZMEN, 2006). No entanto, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de transmissão desse agente, apesar de haver evidências na literatura de que a transmissão possivelmente ocorra por via fecal-oral e oral-oral (ARFAEE et al., 2012).

De acordo com nosso conhecimento, existem poucos estudos no Brasil que investigaram a etiologia das doenças gástricas em pequenos animais, em especial em relação à colonização de *Helicobacter* sp. em pacientes. Portanto, o presente estudo objetivou investigar a presença do gênero *Helicobacter* sp. em cães e gatos com indicação de endoscopia digestiva alta, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), empregando os métodos diagnósticos mais frequentemente adotados para animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS), em parceria com o Setor de Videocirurgia e Endoscopia e com os Laboratórios de Anatomia Patológica e Medicina Veterinária Preventiva da mesma Universidade. O Hospital HCV-UFRGS possui uma das maiores casuísticas de atendimento clínico-cirúrgico da América Latina, abrangendo cerca de 20.000 animais atendidos anualmente. A área de Gastrenterologia em Pequenos Animais foi responsável por 220 atendimentos entre 2012-2013, contabilizando um total de 78 endoscopias digestivas realizadas nesse período. Foram incluídos no estudo todos os pacientes com indicação clínica de realização de endoscopia digestiva alta, que não

faziam uso de terapia antimicrobiana e inibidores de bomba de prótons no período mínimo de quatro semanas anteriores a data coleta e cujo tutor aceitou participar da pesquisa, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Um total de 30 animais, 26 cães e 4 gatos, de diferentes raças, de ambos os sexos e com idade variada (Tabela 1) foram incluídos no estudo. O estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, processo número 23967.

Endoscopia Digestiva Alta

Os animais encaminhados para a endoscopia foram examinados por meio da avaliação da coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar, ausculta cardiopulmonar, temperatura retal, palpação abdominal e dos linfonodos (mandibulares, cervical superficial, axilares, inguinais e poplíteos). Quando necessário, foram realizados exames laboratoriais complementares e ultrassonografia abdominal.

Os pacientes incluídos no estudo foram anestesiados e submetidos à endoscopia digestiva alta, com vídeo endoscópio de 14 mm de diâmetro (Pentax® FG-29P) para animais de maior porte (acima de 20 kg) e gastroscópio de 9,8 mm de diâmetro (Fujinon®) para animais de pequeno porte (abaixo de 20 kg). Os equipamentos empregados na endoscopia foram imersos em glutaraldeído a 2% por um tempo mínimo de 30 minutos. Após este período, foram lavados com solução destilada estéril antes de serem utilizados.

Durante o procedimento de endoscopia, foram colhidos seis fragmentos da região fúndica de cada paciente. O primeiro fragmento era destinado à cultura bacteriana e imediatamente imerso em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e

acondicionado em refrigeração até o processamento. Posteriormente, eram coletados os fragmentos: para o teste rápido da urease; para os métodos histopatológicos; para detecção de *Helicobacter* por métodos moleculares (em duplicata); e um fragmento era mantido em glutaraldeído a 2,5% em refrigeração para a microscopia eletrônica de varredura.

Teste rápido da urease (URT)

Os fragmentos de biopsia foram imersos, imediatamente após a coleta, em 500µL de meio comercial (Uretest®; Renylab, Brasil) contendo ureia e o indicador de pH vermelho de fenol. Considerou-se a alteração da coloração de amarelo para róseo escuro como resultado positivo. Os testes foram monitorados para a mudança de cor durante 24 horas (CHOI et al., 2012).

Pesquisa de *Helicobacter* sp. por cultura bacteriana

Os fragmentos foram macerados e semeados em ágar Belo Horizonte, contendo meio base ágar BHI (brain heart infusion), foi adicionado 10% de sangue ovino, 20mg/L ácido nalidíxico, 6mg/L vancomicina, 50mg/L ciclohexamida, 3,3 mg/L polimixina B, 200 mg/L bacitracina e 40mg/L sal de tetrazólio (QUEIROZ et al., 1987). As amostras foram incubadas à 37°C em jarras contendo gerador de microaerofilia (Anaerocult C®, Darmstadt, Alemanha). O crescimento bacteriano foi observado durante três a 21 dias de incubação. Como controle do meio de cultura utilizou-se a cepa *H. pylori* TX-30. A identificação de colônias suspeitas foi realizada pela morfologia

colonial, morfologia da célula bacteriana, teste de catalase, oxidase e urease (HOLT et al., 1994).

Histopatologia

Os fragmentos de biopsia gástrica foram fixados em solução formalina 10% por um período de até 48 horas e processados pelas técnicas rotineiras de histologia (PROPHET et al., 1992). Os cortes histológicos eram realizados com a espessura de 4µm e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) e Warthin-Starry (WS). Nas lâminas coradas por HE foram avaliadas: infiltrado inflamatório; as alterações morfológicas (lesão da superfície do epitélio, hiperplasia das criptas, fibrose e atrofia da mucosa) e a presença de bactérias. A mucosa gástrica foi considerada normal quando apresentava padrão histológico característico. Amostras coradas por WS foram consideradas positivas quando houve a presença de bactérias helicoidais com coloração castanho-escura em fundo amarelo.

Imuno-histoquímica

Foram utilizadas lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA Sigma Aldrich) para os cortes histológicos realizados no material emblocado em parafina. A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica da Streptavidina biotina peroxidase (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rabbit/Mouse/Goat Dako®) com anticorpo policlonal anti-*H.pylori* produzido em coelho (Dako®, Glostrup, Dinamarca) na diluição 1:200 à 37°C, durante duas horas. Realizou-se a recuperação antigênica com a Protease XIV (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), durante 15 minutos

e bloqueio das reações inespecíficas pela imersão em solução de leite desnatado a 5% diluído em PBS. Como cromógeno utilizou-se o 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC Dako®, Carpinteria CA-USA) e contra coloração com hematoxilina de Mayer (Dako®, Carpinteria CA-USA) e meio de montagem aquoso (Ultramont Aqueous Permanent Mounting Medium, Dako®) para cobrir as lâminas com as lamínulas. Controles positivos conhecidos foram adicionados em cada ensaio de imunomarcação (CÔRREA et al., 2008). Considerou-se positivas amostras que apresentaram a presença de antígeno de *Helicobacter* sp. evidenciado pela coloração vermelha.

Foi determinada a presença de antígenos de *Helicobacter* no interior das células e glândulas, fossetas gástricas e no muco superficial. Foi atribuída graduação de acordo com modelo de sistema semi-quantitativo descrito por Lanzoni et al., (2011) e Castiglioni et al., (2012). Considerando ausência de antígeno de *Helicobacter* (0); ou presença de antígeno *Helicobacter*: discreta(+); moderada (++); acentuada quantidade (+++). Essa avaliação das amostras foi realizada sempre pelo mesmo patologista.

Detecção de *Helicobacter* por métodos moleculares

O DNA extraído foi obtido diretamente dos fragmentos de biopsia gástrica. A purificação foi realizada através do DNeasy Blood & Tissue Kit® e InhibitEx Tablets® (Quiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A presença do gênero *Helicobacter* foi investigada por PCR convencional e Semi-Nested PCR, tendo como alvo o gene 16S rRNA. Na tabela 2 estão descritos os oligonucleotídeos e as condições das reações descritas por Ho e colaboradores (1991), com algumas adaptações. A amplificação da PCR foi realizada em volume de 25µL, contendo 1mmol de cada oligonucleotídeo, 200 µmol de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1X Tampão de

PCR (10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl [pH 8,3]), 1 unidade de Taq polimerase, 6,0uL de DNA extraído/produto da PCR e água bidestilada estéril para completar o volume. Em todas as reações foram incluídos controles negativo (sem DNA) e positivo (*H.pylori* TX-30). Os produtos da PCR foram submetidos à separação em gel de agarose 1,5%, corados com 10mg/mL de solução de Blue Green® (LGC, Brasil), os controles positivos e negativos foram incluídos. Utilizou-se marcador de 100 pares de base (bp) (Promega, Madison, USA) com o intuito de identificar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi documentado em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Pro).

Antes de iniciar a análise das amostras clínicas, a sensibilidade e a especificidade das reações foi determinada. A sensibilidade foi avaliada através de diluição seriada (base 10) do DNA de *H.pylori* TX-30, sendo o procedimento repetido cinco vezes de forma independente. A especificidade da reação foi determinada utilizando 15 diferentes cepas bacterianas e uma fúngica: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella* sp., *Proteus mirabilis*, *Salmonella* Thyphimurium, *Salmonella* Bredney, *Salmonella* Enteritidis, *Corynebacterium* sp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Aspergillus* sp. A reação de PCR convencional apresentou sensibilidade de 2,5pg, enquanto a Semi-Nested PCR apresentou sensibilidade de 0,0025pg. No teste de especificidade não houve amplificação de qualquer outro DNA bacteriano ou fúngico, além da cepa controle *H. pylori* TX-30.

TABELA 2 – Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação para Reação em Cadeia da Polimerase convencional e semi-nested para detecção do gênero *Helicobacter*

Gene alvo	Região	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do fragmento amplificado	Condições de amplificação
16S rRNA	S1	Hp1: 5'- TGGAGAGACTAAGCCCTCC -3' Hp3: 5'- AGGATCAAGGTTTAAGGATT -3'	446 pb	95°C por 1 min, 30 ciclos (95°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30 s), 72°C por 5 min.
16S rRNA	S1	Hp1: 5'- TGGAGAGACTAAGCCCTCC -3' Hp2: 5'- ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'	110pb	95°C por 1 min, 28 ciclos (95°C por 30s, 62°C por 30s, 72°C por 30 s), 72°C por 5 min.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Fragmentos com isolamento de *Helicobacter* sp. foram selecionados para avaliação por microscopia eletrônica de varredura, com intuito de realizar análise tridimensional e detectar a presença de diferentes espécies do gênero no tecido gástrico. Os fragmentos foram lavados com solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M, por seis vezes durante 15 minutos. Após, as amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de álcool e acetona, seguindo as seguintes etapas: álcool etílico 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, após solução 50% álcool etílico e 50% acetona, 100% acetona. Por fim, as amostras ficaram imersas em acetona 100% até acondicioná-las no suporte do aparelho de ponto crítico. Os fragmentos foram transferidos para o aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD030), no qual ocorre a secagem do material ao ponto crítico de CO₂, por fim as amostras foram metalizadas (camada de ouro, paládio 35 nm de espessura e em íon *sputter coater* durante dois minutos). A leitura foi

realizada no microscópio de varredura (JSM 6060) operado a 10kv utilizando aumento entre 20 a 1000 vezes. As etapas finais do processo e a leitura das amostras foram realizadas no Centro de Microscopia (CME) da UFRGS. A interpretação das imagens seguiu os critérios descritos por Stoffel e colaboradores (2000).

Análise dos resultados

Os resultados obtidos em cada método diagnóstico foram primeiramente submetidos à análise descritiva de frequência. Posteriormente, determinaram-se os valores do teste de McNemar (χ^2) e a concordância entre os métodos diagnósticos através do índice Kappa (Coehn Kappa, k) ambos calculados pelo Software SAS/SAT, versão 9.2.

O teste de McNemar foi realizado para observar se havia diferença em relação à porção de sucesso entre dois métodos (PETRIE & WATSON, 2006), em nível de confiança de 5%. A hipótese nula indica que as diferenças em relação às frequências de sucesso ocorrem ao acaso entre os dois métodos comparados, ao passo que a hipótese alternativa indica que há diferença significativa entre as frequências de sucesso nos métodos comparados; nesse último caso, a avaliação pelo índice Kappa não deve ser conduzida (DOHOO et al., 2003). A interpretação dos resultados de Kappa seguiram os seguintes critérios: concordância fraca $k \leq 0,20$; concordância razoável entre 0, $21 \leq k \leq 0,40$; concordância moderada entre 0, $41 \leq k \leq 0,60$; concordância substancial entre 0, $61 \leq k \leq 0,8$, concordância perfeita $>0,8$ (PETRIE & WATSON, 2006).

Um paciente foi considerado positivo para *Helicobacter* sp., quando apresentou no mínimo dois testes diagnósticos com resultado positivo, conforme recomendado por

CHOI et al. (2012) e LIN et al. (2013). A análise histológica utilizando a coloração de H&E e WS foi considerado como um único teste diagnóstico.

RESULTADOS

Do total de pacientes incluídos no estudo, 50% (15/30) eram sem raça definida (SRD), 60% (18/30) machos, com idades variadas entre sete meses a 14 anos. Dos animais amostrados, 76,6% (23/30) apresentavam êmese não responsiva ao tratamento com antiemético, os demais pacientes evidenciavam outros sinais clínicos indicativos para realização de endoscopia digestiva alta, como: pesquisa de alterações esofagogastroduodenais secundárias ao mastocitoma, anorexia, presença de diarreia e sinais de algia abdominal. Durante o procedimento endoscópico, foram observadas alterações macroscópicas em três pacientes, classificadas como lesão necrótica, erosiva e enantemática.

O teste rápido da urease foi positivo em 83,3% (25/30) dos pacientes. Lesões histopatológicas na região fúndica do estômago foram encontradas em 56,6% (17/30) dos animais, sendo mais frequente a gastrite erosiva (9/17), seguida por gastrite linfoplasmocitária (7/17) e necrótica (1/17). A presença de *Helicobacter* sp. foi identificada em 66,6% (20/30) das amostras por meio da coloração de H&E, a bactéria foi observada na região das fossetas gástricas e na superfície da mucosa do estômago. A avaliação histológica pela coloração de WS revelou a presença de *Helicobacter* em 86,6% (26/30) dos fragmentos, também sendo observada sua maior presença na região de fossetas gástricas e na mucosa do estômago (Figura 1).

A técnica de IHQ revelou positividade em 90,0% (27/30) dos pacientes; as amostras apresentaram marcação no muco superficial, na região das fossetas, glândulas

gástricas e, principalmente, no interior das células parietais (Figura 2). Por meio dessa técnica, foi possível detectar marcações intracelulares em 80,0% (24/30) das amostras, o que não foi demonstrado claramente através das colorações histológicas. Resultados positivos foram obtidos em 93,3% (28/30) das análises pela técnica de Semi-Nested PCR (Figura 3). Não houve amplificação em nenhuma das amostras analisada pela PCR convencional.

Com relação à cultura bacteriana houve isolamento de *Helicobacter* sp. em apenas 26,6% (8/30) das amostras coletadas, eram três provenientes de felinos (3/5; 60%) e cinco de cães (5/25; 20%). Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) avaliou-se a presença de *Helicobacter* sp. na mucosa gástrica em sete pacientes positivos ao isolamento (Figura 4), sendo observados tipos distintos de morfologia bacteriana, sugestivo de coinfeção por diferentes espécies do gênero. No entanto, não foi possível diferenciar as espécies envolvidas, com base nas observações morfológicas pela MEV.

Do total de animais coletados, 28 pacientes foram considerados positivos para a presença de *Helicobacter* e dois cães (pacientes número 12 e 20) foram considerados negativos, de acordo com o critério estabelecido (apresentar resultado positivo em no mínimo dois métodos diagnósticos). Os pacientes negativos apresentavam sinal clínico de êmese. Um dos pacientes (número 12) foi positivo apenas no teste rápido da urease e o outro paciente foi positivo na análise histológica tanto com a coloração de H&E como WS. Ambos apresentaram lesão histopatológica compatível com gastrite linfoplasmocitária. Entre os 28 pacientes positivos, dois animais apresentaram resultado positivo em apenas dois dos métodos diagnósticos empregados (Tabela 1), critério mínimo para serem considerados como positivos. Seis pacientes foram positivos em

todos os testes diagnósticos conduzidos, porém a maioria apresentou resultado positivo em quatro (n=17) dos métodos adotados.

Das dez possibilidades de comparação entre métodos (Tabela 3), cinco não refutaram a hipótese nula no teste de McNemar ($P > 0,05$) e foram analisados pelo índice Kappa (Tabela 4). Entre essas, observou-se haver concordância perfeita apenas entre semi-Nested PCR e imuno-histoquímica, as demais concordâncias avaliadas apresentaram índice Kappa entre fraca e razoável.

TABELA 1 – Espécie, raça, idade e sexo dos 30 pacientes amostrados nesse estudo, informando os resultados observados em cada método diagnóstico empregado.

Registro	Idade	Sexo	Raça	Espécie	Indicação de Endoscopia	Macro	Micro	URT	H&E	WS	IHQ	Nested-PCR	Cultura
1	3 anos	M	Lhasa apso	Canina	Êmese	0	LF	1	1	1	1	1	0
2	1 ano	M	SRD	Canina	Êmese	0	0	1	1	1	1	1	1
3	2 anos	M	SRD	Canina	Êmese	0	0	1	1	1	1	1	1
4	3 anos	M	SRD	Canina	Êmese	0	0	1	1	1	1	1	0
5	3 anos	M	SRD	Canina	Êmese	0	ER	1	0	1	1	1	0
6	2 anos	F	Terrie	Canina	Hematoemese	NE	NE	0	0	0	1	1	0
7	9 anos	M	Bichon-Frisé	Canina	Êmese/Disquesia	0	0	1	1	1	1	1	1
8	1 ano	M	Chow-Chow	Canina	Êmese	0	0	0	1	1	1	1	1
9	6 anos	M	SRD	Canina	DG	0	LF	1	1	1	1	1	1
10	7 anos	M	Dauschshund	Canina	Êmese	0	ER	1	1	1	1	1	0
11	9 anos	F	SRD	Canina	Êmese	0	LF	1	0	0	0	0	0
12	7 anos	F	Boxer	Canina	Êmese	0	0	1	0	1	1	1	1
13	6 anos	M	Bulldog	Canina	Êmese/Anorexia	0	ER	0	0	1	0	1	0
14	8 anos	M	SRD	Felino	Êmese	0	ER	1	0	1	1	1	0
15	9 anos	F	Pitbull	Canina	PAESM	0	0	1	1	1	1	1	0
16	1 ano	F	SRD	Felino	Êmese	0	ER	1	1	1	1	1	1
17	7 anos	M	Schnauzer	Canina	Êmese	0	LF	0	1	1	0	0	0
18	1 ano	F	SRD	Felino	Êmese/Diarreia	0	ER	1	1	1	1	1	0
19	14 anos	F	SRD	Felino	Êmese	0	ER	1	1	1	1	1	1
20	6 anos	M	SRD	Canina	PAESM	0	ER	1	0	0	1	1	0
21	7 anos	F	SRD	Canina	Êmese	EN	LF	0	1	1	1	1	0
22	7 meses	M	American	Canina	Êmese	0	0	0	1	1	1	1	0
23	2 anos	F	SRD	Canina	Êmese	0	LF	1	1	1	1	1	0
24	3 anos	F	Boxer	Canina	Êmese	0	LF	1	1	1	1	1	0
25	7 anos	M	Shih-Tzu	Canina	PAESM	0	0	1	1	1	1	1	0
26	7 anos	F	Pinscher	Canina	Regurgitação	0	0	1	0	1	1	1	0
27	8 anos	M	Rottweiler	Canina	PAESM	0	0	1	0	1	1	1	0
28	2 anos	M	SRD	Felino	Êmese	0	0	1	0	0	1	1	1
29	9 anos	M	Pitbull	Canina	PAESM	0	0	1	1	1	1	1	0
30	7 anos	F	SRD	Canina	Êmese	ER	ER	1	1	1	1	1	0

*SRD: sem raça definida; 0: resultado negativo; 1: resultado positivo; URT: Teste Rápido da Urease; H&E: coloração de Hematoxilina e Eosina; WS: coloração de Warthin-Starry; IHQ: técnica de Imunohistoquímica; DG: Desconforto Gastrointestinal; PAESM: Pesquisa de Alterações Estágogastroduodenais Secundárias do Mastocitoma; Macro: Avaliação Macroscópica; Micro: Avaliação Microscópica; NE: Lesão Necrótica; EN: Gastrite Enantemática; ER: Lesão Erosiva; LF: Gastrite Linfoplasmocitária

TABELA 3 – Concordância de resultados positivos entre métodos diagnósticos empregados na detecção de *Helicobacter* sp. em fragmentos de biópsia gástrica colhidos de 28 cães e gatos considerados positivos.

	URT (n=24)	Cultura (n=8)	H&E/WS (n=25)	IHQ (n=27)	Semi-Nested PCR (n=28)
URT	-	7	21	23	23
Cultura	7	-	7	8	8
H&E/WS	23	7	-	24	25
IHQ	23	8	24	-	27
Semi-Nested PCR	23	8	24	27	-

* URT: teste rápido da urease; Cultura: cultura bacteriana; H&E: coloração de Hematoxilina e Eosina; WS: coloração de Warthin-Starry; IHQ: técnica de imuno-histoquímica.

TABELA 4 – Concordância estimada pelo índice Kappa entre métodos de diagnóstico empregados para detecção de *Helicobacter* sp. em fragmentos de biópsia gástrica colhidos de cães e gatos.

Métodos	Valor Kappa	IC 95%	Concordância
IHQ x Semi-Nested PCR	0,96	0,37 - 1,0	Perfeita
IHQ x URT	0,35	-0,07- 0,78	Razoável
H&E/WS x Semi-Nested PCR	0,26	-0,23- 0,77	Razoável
H&E/WS x IHQ	0,19	-0,27- 0,66	Fraca
URT x Semi-Nested PCR	0,16	-0,22- 0,56	Fraca

*IHQ: Imuno-histoquímica; H&E: Coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E) e WS: Coloração de Warthin-Starry; URT: Teste rápido da Urease

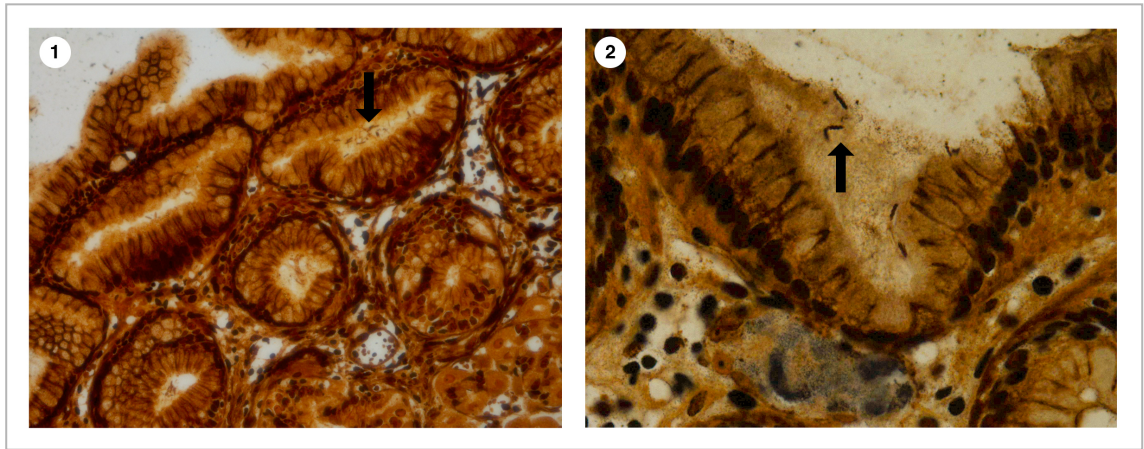


FIGURA 1 – (1) Paciente nº 21, biopsia gástrica região fúndica, presença de microrganismos de morfologia helicoidal com coloração castanho-escuro na glândula gástrica (coloração WS, 40x); (2) Paciente nº 8, biopsia gástrica região fúndica, presença de microrganismos de morfologia helicoidal com coloração castanho-escuro no muco gástrico (coloração WS, 100x).

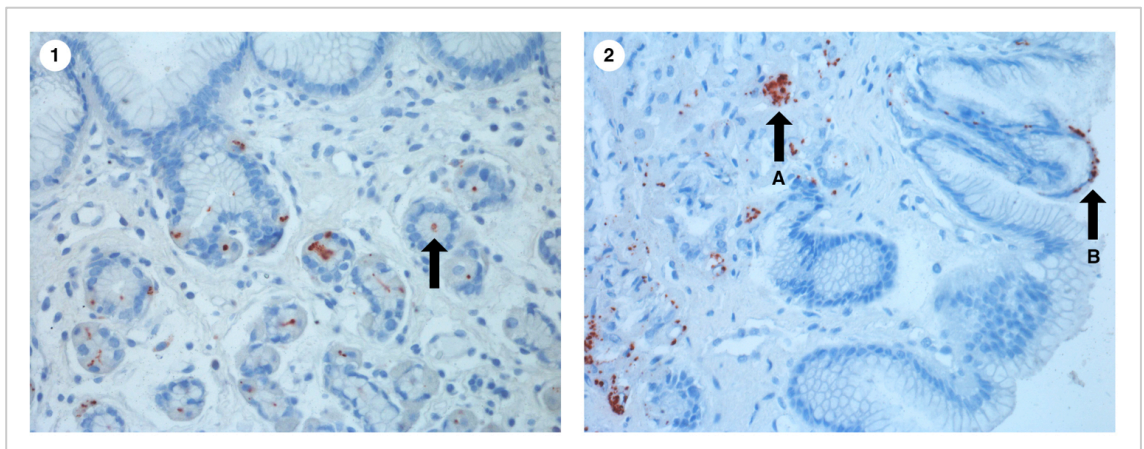


FIGURA 2 – (1) Paciente nº 28, biopsia gástrica da região fúndica, quantidade moderada de marcações do antígeno de *Helicobacter* nas fossetas gástricas (coloração de imunoperoxidase, anti-*H.pylori*, IHQ, 40X); (2) Seta A. Paciente nº 2, biopsia gástrica da região fúndica, marcação intracelular multifocal do antígeno de *Helicobacter* (coloração de imunoperoxidase, anti-*H.pylori*, IHQ, 40X. Seta B. Paciente nº 16, biopsia gástrica da região fúndica, quantidade moderada do antígeno de *Helicobacter* no muco superficial (coloração de imunoperoxidase, anti-*H.pylori*, IHQ, 40X).

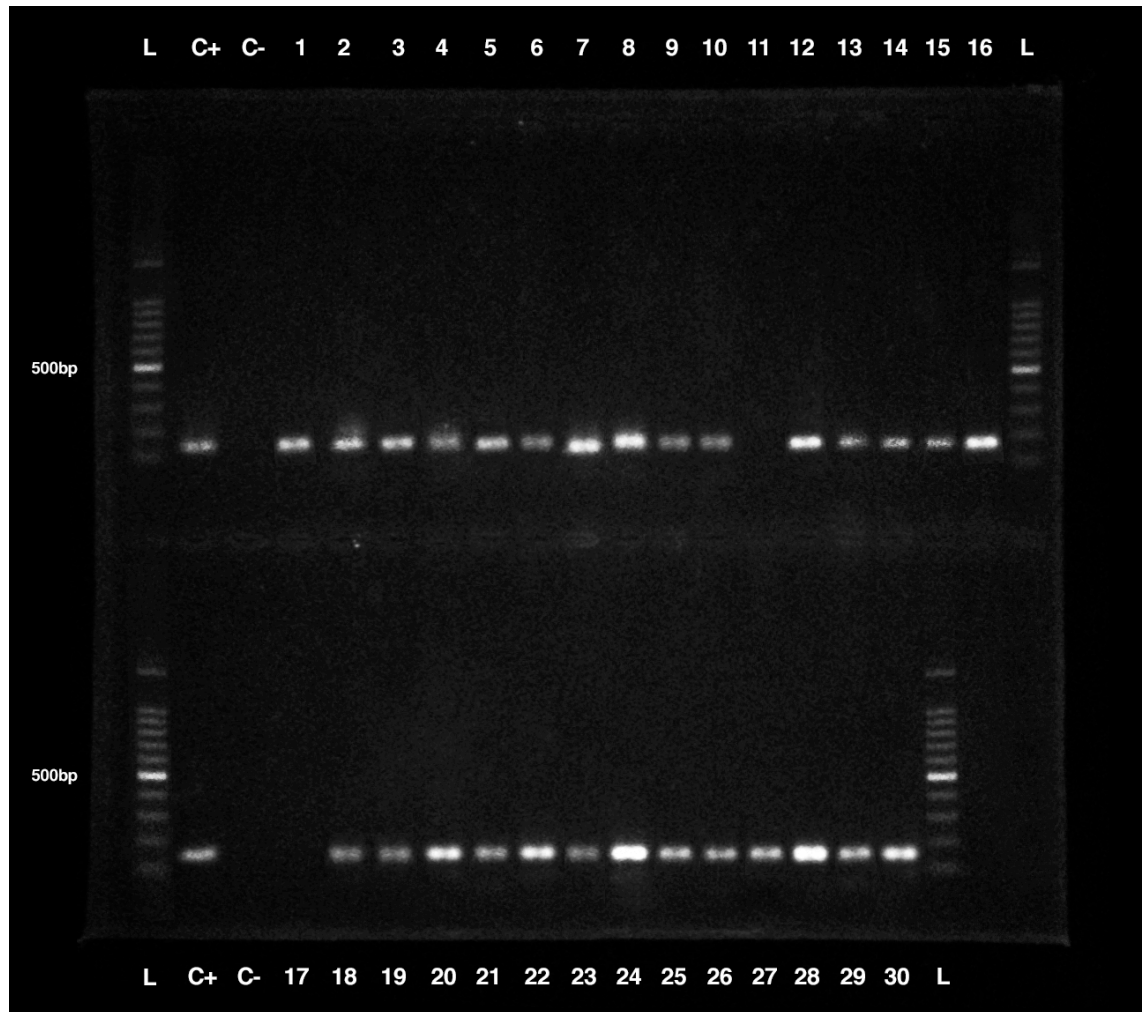


FIGURA 3 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de Semi-Nested PCR, L: marcador 100pb; C+ Controle positivo; C- Controle negativo; Amostras dos pacientes de 1 a 10; 12 a 16; 18 a 30: produto de 110pb; Amostras dos pacientes 11 e 17: não houve amplificação na Semi-Nested PCR.

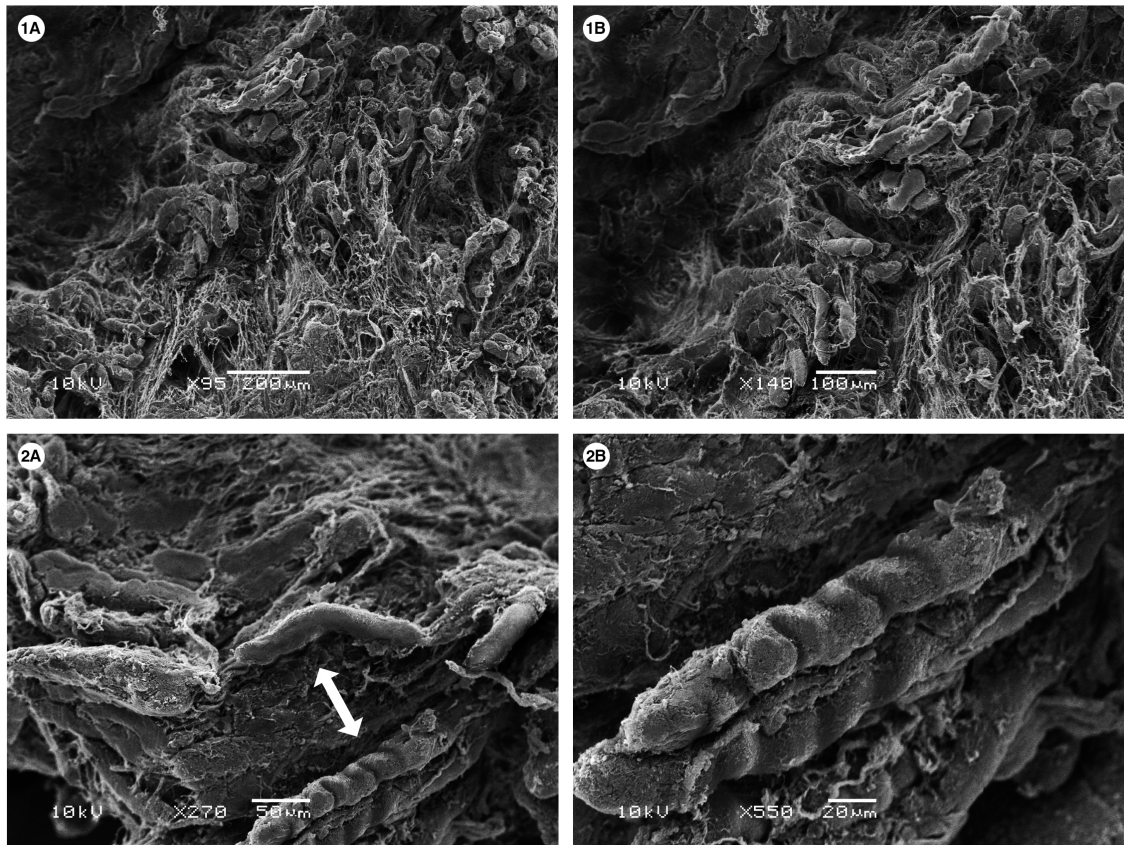


FIGURA 4 – Imagem de MEV (1A e 1B), Paciente nº 9, biopsia mucosa gástrica, demonstram a presença *Helicobacter* sp. envolto no muco gástrico na superfície da mucosa gástrica; (2A) Observa-se diferenças morfológicas entre as bactérias presentes na amostra; (2B) Observa-se em maior aumento de duas bactérias de morfologia espiralada.

DISCUSSÃO

De acordo com o critério recomendado por CHOI et al. (2012) e LIN et al. (2013) e adotado no presente estudo, 93,3% dos pacientes amostrados foram considerados positivos para *Helicobacter* sp., demonstrando haver elevada prevalência dessa bactéria em pacientes com indicação clínica para a realização de endoscopia digestiva alta. Apesar de *Helicobacter* sp. estar presente no tecido gástrico, apenas três pacientes apresentaram lesões macroscópicas visualizadas durante a endoscopia e evidências histológicas de lesão gástrica só foram observadas em pouco mais da metade dos casos (53,6%). Isso indica que a presença da bactéria nem sempre está relacionada com a ocorrência de dano tecidual detectável. A ausência de relação direta entre inflamação gástrica e a presença da bactéria foi relatada em outros estudos (GOMBAC et al., 2010; POLANCO et al., 2011), tornando o papel do gênero *Helicobacter* como determinante primário de gastrites que ocorrem em pequenos animais tema de controvérsia (EKMAN et al., 2013). Uma das razões para as lacunas do conhecimento, relativas à associação de diferentes espécies de *Helicobacter* colonizando a cavidade oral e o estômago de cães e seu papel em quadros de doença gástrica, está relacionada à dificuldade de seu isolamento.

Essa limitação pode ser observada em nosso estudo, pois entre os 28 pacientes positivos para a presença de *Helicobacter* sp., em apenas oito houve sucesso no isolamento bacteriano. Estudos anteriores, com o uso de técnicas semelhantes de cultivo, também observaram percentual reduzido de isolamento bacteriano a partir de biópsias gástricas de pequenos animais, denotando sua baixa sensibilidade em relação a outros métodos diagnósticos disponíveis (HANNINEN et al., 1996; JALAVA et al., 1998; ASL et al., 2010). Em muitos casos, falhas no cultivo bacteriano se devem à difícil multiplicação *in vitro*, devido ao crescimento fastidioso, necessitando de umidade atmosférica elevada e de meio de cultura recém-preparado. Além de cuidados com a viabilidade do transporte, a quantidade e o local de coleta das biópsias e a administração de medicações aos pacientes podem influenciar no sucesso do isolamento (JALAVA et al., 1998; SIQUEIRA et al., 2007). Outros fatores, como baixo número de microrganismo, microbiota contaminante na amostra e a forma cocoide assumida pela bactéria em condições adversas, podem também interferir no sucesso do cultivo e identificação (OTTIWET et al., 2010). Por essa razão, a cultura bacteriana na medicina

humana e animal tem seu uso restrito, basicamente, à pesquisa, visto que o isolamento requer muitos dias de incubação o que torna o diagnóstico oneroso e demorado.

Nos estudos que obtiveram sucesso no isolamento e identificação de espécies de *Helicobacter* sp., observou-se elevada frequência de coinfeção na mucosa gástrica de animais, com relatos de até quatro espécies coabitando o estômago canino (VAN DEN BULCK et al., 2005; EKMAN et al., 2013). No presente estudo, os achados na microscopia eletrônica de varredura permitem concluir que há diferenças na morfologia das bactérias presentes nos fragmentos gástricos positivos na cultura bacteriana, indicado que os pacientes estavam infectados por duas ou mais espécies de *Helicobacter* sp. Entre as espécies do gênero, *H. bizzozeronii* e *H. salomonis* são as mais comumente encontradas em pequenos animais (RECORDATI et al., 2009). A morfologia das bactérias encontrada nos fragmentos analisados é compatível com a descrita na literatura para as espécies *H. bizzozeronii* e/ou *H. heilmannii* e *H. pylori* (STOFFEL et al., 2000). No entanto, algumas características morfológicas que permitiriam a distinção conclusiva entre espécies não puderam ser observadas no presente estudo devido à quantidade de muco presente nas amostras, fato que impediu que essa identificação fosse realizada.

Em virtude das limitações do isolamento do gênero *Helicobacter*, outros métodos diagnósticos têm sido adotados, dentre eles os testes rápidos como a detecção da urease, bem como técnicas histológicas e moleculares. O teste rápido da urease tem como vantagem a fácil execução, rapidez em obter resultado, o baixo custo; serve como um indicativo da infecção. Em nosso estudo, a produção de urease foi detectada em pacientes considerados positivos, no entanto o teste resultou positivo também em um paciente considerado negativo (cão, número 12). O resultado falso-positivo encontrado pode estar relacionado à presença na amostra de bactérias contaminantes também produtoras da enzima urease. Apesar de o ambiente estomacal ser inóspito para a maioria das bactérias, a contaminação pode ocorrer durante a passagem do endoscópio pelo trato gastrintestinal (SMITH et al., 2004), possibilitando a presença de outras bactérias na amostra. Por outro lado, a falha de obter resultados positivos na URT pode estar relacionada à presença de baixo número de *Helicobacter* sp., o que tem sido apontado como fator limitante para esse método, pois são necessários no mínimo 10^4 organismos para haver resultado positivo (RICCI et al., 2007; ANACLETO et al., 2011). Além disso, a fraca ou ausência de concordância com outros métodos

diagnósticos que apresentaram melhor desempenho na detecção de *Helicobacter* sp. (Tabelas 3 e 4) demonstram a limitação do teste rápido da urease.

A observação de lesões histológicas em fragmentos de biópsia é conduzida rotineiramente e pode ser adotada para a detecção de *Helicobacter* sp. A análise histopatológica rotineira emprega a coloração de H&E, por ser extremamente útil para avaliação de inflamação e para exclusão de malignidade (LIN et al., 2013). Entretanto, essa coloração não é a mais indicada para a pesquisa bacteriana, em virtude de não propiciar uma boa visualização de bactérias, principalmente quando há um número reduzido na amostra (ARAUJO et al., 2010). A adoção de outras colorações, como o método de WS, pode contribuir para a melhor detecção de *Helicobacter* sp., fato que foi constatado no presente estudo. Além dos 19 pacientes positivos detectados pela coloração de H&E, a coloração WS foi capaz de evidenciar *Helicobacter* sp. em outros seis pacientes positivos, possibilitando a detecção da bactéria em 89,3% dos casos. Por outro lado, um dos pacientes negativos apresentou bactérias com morfologia compatível com *Helicobacter* sp., demonstrando que há possibilidade de resultados duvidosos apenas com a utilização do diagnóstico histológico.

A aplicação da técnica de IHQ nos cortes histológicos possibilitou o incremento na detecção do gênero *Helicobacter* nos fragmentos de biópsia gástrica de pacientes positivos. Houve a detecção de antígenos em 96,4% dessas amostras, estavam esses localizados no muco superficial, na região das fossetas, glândulas gástricas e no interior das células. A visualização de marcações intracelulares pode ser considerada uma vantagem adicional em relação aos métodos de coloração. Em estudos anteriores, os quais investigaram a distribuição de *Helicobacter* sp. no trato gastrintestinal de animais, foi observado que a bactéria está apta a residir no interior das células gástricas, principalmente em células parietais. A infecção em nichos intracelulares pode variar conforme a espécie e a cepa bacteriana; além disso, tem impacto em relação à patogenicidade e capacidade de evadir ao tratamento com antimicrobianos (RECORDATI et al., 2009; LANZONI et al., 2011).

Os métodos de detecção molecular de micro-organismos já são amplamente utilizados no diagnóstico clínico, principalmente pela sua rapidez e capacidade de detecção de agentes de difícil isolamento. No presente estudo, a técnica de Semi-Nested PCR, tendo como alvo o gene do 16S rRNA, possibilitou a detecção de *Helicobacter* sp. em 100% dos pacientes positivos. Por outro lado, não houve amplificação nas mesmas amostras quando foi utilizada a PCR convencional. Atribui-se esse resultado à

provável baixa colonização e conseqüente pequena quantidade de DNA bacteriano presente nas amostras. Em estudo semelhante, apenas 10,7% de amostras positivas de um total de 75 fragmentos gástricos caninos amostrados obtiveram diagnóstico positivo pela PCR convencional. Segundo os autores, esses resultados demonstraram que a PCR convencional apresenta significativas limitações ao diagnóstico, sobretudo quando há baixa densidade bacteriana (PRACHASILPCHAI et al., 2007). No entanto, a sensibilidade da PCR pode ser consideravelmente aumentada através de uma segunda rodada de amplificação, como ocorre na Nested PCR, possibilitando detectar menor quantidade de ácido nucléico em amostras clínicas (RECORDATI et al., 2007; OTTIWET et al., 2010).

A aplicação do índice kappa para comparar os métodos diagnósticos demonstrou que a imuno-histoquímica e a Semi-nested PCR apresentaram concordância perfeita, indicando que qualquer uma pode ser adotada sem prejuízo ao diagnóstico. O método a ser eleito dependerá dos recursos laboratoriais disponíveis; ou seja, se há um serviço de histopatologia com a técnica de imuno-histoquímica implantada ou uma estrutura para realização de técnicas moleculares. O significado da detecção de *Helicobacter* sp. para a determinação da etiologia primária de gastrite em pequenos animais ainda permanece por ser esclarecida, pois em nosso estudo nem todos os pacientes positivos apresentavam lesões histopatológicas e os dois pacientes negativos apresentavam lesões microscópicas de gastrite linfoplasmocitária. Mesmo considerando que esse tipo de lesão pode ser decorrente de outras causas de alteração gástrica, as quais também estão relacionadas à formação de processos inflamatórios da mucosa (KANAT & ORTATATLI, 2011) e que todos os pacientes positivos eram sintomáticos, investigações relativas à capacidade patogênica de espécies de *Helicobacter* sp. que infectam os animais ainda são necessárias.

CONCLUSÃO

Observou-se elevada prevalência de *Helicobacter* sp. em pacientes com indicação clínica para a realização de endoscopia digestiva alta. A presença desse gênero bacteriano pode ser a causa da manifestação dos sinais gastrintestinais apresentados por cães e gatos, porém em muitos casos de onde havia presença da bactéria não houve lesões microscópicas detectáveis. Para detecção de *Helicobacter* sp. em fragmentos de biópsia de estômago de pequenos animais, a adoção da técnica de semi-nested PCR, tendo como alvo o gene 16S rRNA, ou da técnica de imunohistoquímica é recomendada, pois essas técnicas apresentaram a melhor sensibilidade e perfeita concordância de resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANACLETO, T.P.; LOPES, L.R.; ANDREOLLO, N.A.; FILHO, W.O.B.; RESCK, M.C.C; MACEDO, A. Studies of distribution and recurrence of *Helicobacter* spp. gastric mucosa of dogs after triple therapy. **Acta Cirúrgica Veterinária**. v.26, n.2. p.82-87, 2011.
- ARAUJO, I.C.; MOTA S.B.; DE AQUINO M.H.C.; FERREIRA A.M.R. *Helicobacter* species detection and histopathological changes in stray cats from Niterói, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. p.12, p.509-511, 2010.
- ARFAEE, F., JAMSHIDI, S., AZIMIRAD, M., DABIRI, H., TABRIZI, A.S.; ZALIET, M.R. PCR-based diagnosis of *Helicobacter* species in the gastric and oral samples of stray dogs. **Comparative Clinical Pathology**. v.23, p.135-139. 2012.
- ASL, A. S.; JAMSHIDI, S.; MOHAMMADI, M.; SOROUSH, M. H.; BAHADORI, A.; OGHALAIE, A. Detection of Atypical Cultivable Canine Gastric *Helicobacter* Strain and its Biochemical and Morphological Characters in Naturally Infected Dogs. **Zoonoses and Public Health**. v.57, p.244-248, 2010.
- CASTIGLIONI, V.; FACCHINI, R.V.; MATTIELLO, S.; LUINI, M.; GUALDI, V.; E. SCANZIANI, E.; RECORDATI, C. Enterohepatic *Helicobacter* spp. in colonic biopsies of dogs: molecular, histopathological and immunohistochemical investigations. **Veterinary Microbiology**. v.159, p.107-114, 2012.
- CHOI, J.; KIM, C. H.; KIM, D.; CHUNG, S.J. et al. Prospective evaluation of a new stool antigen test for the detection of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, rapid urease test, 13C-urea breath test and serology. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v.26, p.1053–1059, 2011.
- CHOI, Y.J., KIM, N., LIM, J., SHIN, C.M., LEE, H.S., LEE, S.H., PARK, Y.S., et al. Accuracy of Diagnostic Tests for *Helicobacter pylori* in Patients with Peptic Ulcer Bleeding. **Helicobacter**. v.17, p.77-85, 2012.
- CÔRREA, A.M.R.; ZLOTOWSK, P.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIR, D. Gastric ulcers in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, n.12, p.601-605, 2008.
- COSTA, P.R.S.C.; MAIA, R.E.N.; COSTA, M.C.; MOREIRA, J.C.L.; SILVA, J.C.P. Identification of *Helicobacter* spp. in gastric mucosa samples asymptomatic dogs and associate histological alterations. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 49, n. 4, p.285-292, 2012.
- DOHOO, I.; WAYNE, M.; STRYHN, H. In: **Veterinary Epidemiologic Research**. 2th.ed. Canada. 2003, p.85–120.
- EKMAN, E., FREDRIKSSON, M.; TROWALD-WIGH, G. *Helicobacter* spp. in the saliva, stomach, duodenum and faeces of colony dogs. **The Veterinary Journal**. v.195, n.1, p.127-129, 2013.

ELLIS, A. E.; BROWN, C. A.; MILLER D. L. Diagnostic Exercise: Chronic Vomiting in a Dog. *Veterinary Pathology*. v.47, n.5., p.991-993, 2010

ERGINSOY, S.D.; SOZMEN, M. Gastric *Helicobacter*-like organisms in stray cats. *Acta Veterinaria Brno*. v.75, p.91-98, 2006.

FLAHOU, B.; HAESBROUCK, F.; SMET, A.; YONEZAWA, A.; OSAKI, T.; KAMIYA, S. Gastric and Enterohepatic Non-*Helicobacter pylori* Helicobacters. *Helicobacter*. v. 18, p.66-72, 2013.

GOMBAC, M.; TANJA, S.; MANICA, C.; POGANIK, M. Histological changes in stomachs of apparently healthy dogs infected with *Helicobacter*. *Acta Veterinaria*, v.60, p.173-182, 2010.

HANNINEN, M. L., HAPPONEN, I., SAARI, S. & JALAVA, K. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.46, p.160–166, 1996.

HARBOUR, S.; SUTTON, P. Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.122, p.191–203, 2008.

HAESBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHOU, B., CHIERS, K.; BAELE, M.; MEYNS, T.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Gastric Helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews*. v.22, p.202–223, 2009.

HO, S-A; HOYLE, J.A.; LEWIS, F.A.; SECKER, A.D.; CROSS, D.; MAPSTONE, N.P.; DIXON, M.F.; WYATT, J.I.; TOMPKINS, D.S.; TAYLOR, G.R.; QUIRKE, P. Direct Polymerase Chain Reaction Test for Detection of *Helicobacter pylori* in Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*. v.29, n.9, p.2543-2549, 1991.

HOLT, J.G; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. In: _____ **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: Facultatively anaerobic Gram-negative rods**. 9th.ed. Baltimore, 1994. Group.2, p.42-43.

HWANG, C. Y.; HAN, H. R.; YOUN, H. Y. Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection in dogs and cats in Korea. *Journal of Veterinary Science*. v.3, p.123–133, 2002.

JALAVA, K.; ON, S.L.W.; HARRINGTON, C.S.; ANDERSEN, L.P.; HANNINEN, M. L.; VANDAMME, P. A cultured strain of '*Helicobacter heilmannii*', a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence for zoonotic potential of Helicobacter. *Emerging Infectious Diseases*. v.7, p.1036–1038, 1998.

KANAT, O. & ORTATATLI, M. Pathological and microbiological investigation on alimentary system lesions of dogs: Oral, oesophagus and stomach. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. v.10, n.22, p.2892-2901, 2011.

LANZONI, A.; FAUSTINELLI, I.; CRISTOFORI, P.; LUINI, M.; SIMPSON, K. W.; SCANZIANI, E.; RECORDATI, C. Localization of *Helicobacter* spp. in the fundic mucosa of laboratory Beagle dogs: an ultrastructural study. **Veterinary Research**. v.42, p.1-9, 2011.

LIN, M.H.; CHENG, H.T.; CHUANG, H.T.; YU, L.K.; TSOU, Y.K.; LEE, M.S. Histological examination of ulcer margin for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric ulcers. **Annals of Diagnosis Pathology**. v.17, n.1, p.63-66, 2013.

NEIGER, R. & SIMPSON, K.W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.14, n.2, p.125-33, 2000.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**. v.1; p.1311-1315, 1984.

OTTIWET, O.; CHOMVARIN, C.; CHAICUMPAR, K.; NAMWAT, W.; MAIRIANG, P. Nested Polymerase Chain Reaction for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v.41, n.6, p.1423-1431, 2010.

PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J.B. Clinical appliance of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection - A brief review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. p.1-9, 2013 [in press].

PETRIE, A.; WATSON, P. In:___ **Statistics for Veterinary and Animal Science: Additional techniques**. 2th.ed. Oxford, 2006. cap.14, p.200-201.

POLANCO, R.; SALAZAR, V.; REYES, N.; GARCÍA-AMADO, M. A.; MICHELANGELI, F.; CONTRERAS, M. High prevalence of DNA from non-*H. pylori* helicobacters in the gastric mucosa of Venezuelan pet dogs and its histological alterations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 53, n.4, p.207-212, 2011.

PRACHASILPCHAI, W., NUANUALSUWAN, T. CHATSUWAN, S.; TECHANGAMSUWAN, S.; WANGNAITHAM, S.; SAILASUTA, A. Diagnosis of *Helicobacter* spp. infection in canine stomach. **Journal of Veterinary Science**. v.8, n.2, p.139-145, 2007.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N; ROCHA, G.A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.25, p.2378-2379, 1987.

RAMIS, I.B.; MORAES, E.P.; FERNANDES, M.S.; MENDOZA-SASSI, R., RODRIGUEZ, O.; JULIANO, C.R.V.; SCAINI, C.J.; SILVA, P.E.A. Evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. **Brazilian Journal of Microbiology**. p.903-908, 2012.

RECORDATI, C.; GUALDI, V.; CRAVEN, M. et al. Spatial distribution of *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract of dogs. **Helicobacter**. v.14, p.180-191, 2009.

RICCI, C.; HOLTON, J.; VAIRA, D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v.21, n.2, p.299-313, 2007.

SCHOTT, T.; KONDADI, P.K.; HÄNNINEN, M-L.; ROSSI, M. Comparative Genomics of *Helicobacter pylori* and the human-derived *Helicobacter bizzozeronii* CIII-1 strain reveal the molecular basis of the zoonotic nature of non-pylori gastric *Helicobacter* infections in humans. **BMC Genomics**. v.12, 2011.

SIQUEIRA, J.S.; LIMA, P.S.S.; BARRETO, A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* –Revisão. **RBAC**. v.39, n.1, p.9-13, 2007.

SMET, A.; FLAHO, B.; MUKHOPADHYA, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, D.; HAESBROUCK, F.; HOLD, G. The other *Helicobacters*. **Helicobacter**. v.16, p.70–75, 2011.

SMITH, S.I.; OYEDEJI, K.S.; ARIGBABU, A.O.; OJO, O.O.; UWAIFO, A.O.; COKER, A.O. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **World Journal of Gastroenterology**. v.10, p.1958-1960, 2004.

STOFFEL, M. H.; FRIESS, A.E.; BURNENS, A.; SCHMASSMANN, A.; NEIGER, R. Distinction of gastric *Helicobacter* spp. in humans and domestic pets by scanning Electron Microscopy. **Helicobacter**. v.5, n.4, p.233-239, 2000.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DRIESSEN, A.; DEBONGINE, J.C.; BURETTE, A.; STOLTE, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs and cats. **Journal Clinical Microbiology**. v.43, p.2256-2260, 2005.

YOKOUB, J.; ABBAS, Z.; KHAN, R.; NAZ, S.; AHMAD, Z.; ISLAM, M.; AWAN, S.; JAFRI, F.; JAFRI, W. Prevalence of non *Helicobacter pylori* species in patients presenting with dyspepsia. **BMC Gastroenterology**. v.12, n.3, p.1-8, 2012.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi observada uma elevada prevalência de *Helicobacter* em pacientes com indicação clínica de endoscopia digestiva alta. No entanto, evidências histológicas de lesão gástrica só foram observadas em pouco mais da metade dos casos, demonstrando que alguns pacientes mesmo com a presença da bactéria no estômago não apresentavam dano tecidual considerável. Com base nisso, sugerimos que mais pesquisas devem ser realizadas para investigar o papel desse agente nos casos de pacientes positivos, porém sem lesão gástrica significativa.

O estudo também propôs avaliar os métodos diagnósticos disponíveis para a detecção de *Helicobacter* sp. a partir de biopsia gástrica. Sendo assim, concluímos que a Semi-Nested PCR e a técnica de IHQ apresentaram concordância considerada substancial. Dentre as metodologias testadas, esses métodos foram os mais indicados para o diagnóstico de *Helicobacter* sp. Por fim, recomenda-se a utilização da Semi-Nested PCR e da técnica de IHQ associadas ou em adição a outro método diagnóstico. Consideramos também que técnica de IHQ pode ser uma alternativa viável para laboratórios que não possuam a infraestrutura para utilização de métodos moleculares. No entanto, é importante ressaltar que o indicado é utilizar a associação de métodos para obter maior confiabilidade do resultado.

Por conseguinte, em estudos futuros pretendemos dar continuidade a pesquisa, visando métodos moleculares para a detecção das principais espécies envolvidas, além de investigar uma melhor compreensão do papel da infecção por *Helicobacter* sp. em pequenos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDO, S.; ALARCÓN, T.; URRUZUNO, P.; MARTÍNEZ, M.J.; LÓPEZ-BREA, M. Detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin resistance in gastric biopsies of pediatric patients by using a commercially available real-time polymerase chain reaction after NucliSens semi automated DNA extraction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**.v.67, p.213–219, 2010.
- AKHTARDANESH, B.; JAMSHIDI, S.; SASANI, F.; MOHAMMADI, M.; BOKAEE, S.; SALEHI, T.Z. *Helicobacter* spp. infection and gastric lesions in domestic and stray cats. **Veterinarski Arhiv**. v.76, n.6, p.479-488, 2006.
- ANDERSEN, L.P.; RASMUSSEN, P. *Helicobacter pylori* coccoid forms and biofilm formation. **FEMS Immunology Medical of Microbiology**. v.56, p.112-115, 2009.
- ARAUJO, I.C.; MOTA S.B.; DE AQUINO M.H.C.; FERREIRA A.M.R. *Helicobacter* species detection and histopathological changes in stray cats from Niterói, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**.v.12, p.509-511, 2010.
- ARFAEE, F., JAMSHIDI, S., AZIMIRAD, M., DABIRI, H., TABRIZI, A.S.; ZALIET, M.R. PCR-based diagnosis of *Helicobacter* species in the gastric and oral samples of stray dogs. **Comparative Clinical Pathology**. v.23, p.135-139. 2012.
- ASL, A. S.; JAMSHIDI, S.; MOHAMMADI, M.; SOROUSH, M. H.; BAHADORI, A.; OGHALAIE, A. Detection of atypical cultivable canine Gastric *Helicobacter* strain and its biochemical and morphological characters in naturally infected dogs. **Zoonoses and Public Health**. v.57, p.244-248, 2010.
- BAELE, M.; PASMANS, F.; FLAHO, B.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Non-*Helicobacter pylori* helicobacters detected in the stomach of humans comprise several naturally occurring *Helicobacter* species in animals. **FEMS Immunology Medical of Microbiology**. v.55, p.306–313, 2009.
- BAGHERI, N.; TAGHIKHANI, A.; RAHIMIAN, G.; SALIMZADEH, L.; DEHKORDI, F.A.; ZANDI, F.; CHALESHTORI, M.H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SHIRZAD, H. Association between virulence factors of *Helicobacter pylori* and gastric mucosal interleukin-18 mRNA expression in dyspeptic patients. **Microbial Pathogenesis**. v.65, p.7-13, 2013.
- BENAÏSSA, M.; BABIN, P.; QUELLARD, N.; PEZENNEC, L.; CENATIEMPO, Y.; FAUCHÈRE, J.L. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. **Infection and Immunity**. v.96, n.6, p.2331-2335, 1996.
- 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. Detection of *Helicobacter pylori* in bile of cats. **FEMS Immunology Medical of Microbiology**. v.42, p.307-311, 2004.
- BURY-MONE, S., SKOULOUBRIS, S.; DAUGA, C.; THIBERGE, J. M.; DAILIDIENE, D.; BERG, D. E.; LABIGNE, A.; REUSEH. Presence of active a lipthatic amidases in

Helicobacter species able to colonize the stomach. **Infection and Immunity**. v.71, p.5613–5622, 2003.

CASTIGLIONI, V.; FACCHINI, R.V.; MATTIELLO, S.; LUINI, M.; GUALDI, V.; E. SCANZIANI, E.; RECORDATI, C. Enterohepatic *Helicobacter* spp. in colonic biopsies of dogs: molecular, histopathological and immunohistochemical investigations. **Veterinary Microbiology**. v.159, p.107-114, 2012.

CHEHTER, E.Z.; BACCI, M.R.; FONSECA, F.L.A.; GONÇALVES, J.A.C.; BUCHALLA, G.; SHIRAICHI, S.A.R.; MARIANO, R.C. Diagnosis of the infection by the *Helicobacter pylori* through stool examination: Method standardization in adults. **Clinical Biochemistry**. v. 46, p.1622-1624, 2013.

CHOI, J.; KIM, C. H.; KIM, D.; CHUNG, S.J. et al. Prospective evaluation of a new stool antigen test for the detection of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, rapid urease test, 13C-urea breath test and serology. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v.26, p.1053–1059, 2011.

CHOI, Y.J., KIM, N., LIM, J., SHIN, C.M., LEE, H.S., LEE, S.H., PARK, Y.S., et al. Accuracy of Diagnostic Tests for *Helicobacter pylori* in Patients with Peptic Ulcer Bleeding. **Helicobacter**. v.17, p.77-85, 2012.

DAY, M.J., BILZER, T., MANSELL, J., WILCOCK, B., HALL, E.J., JERGENS, A., MINAMI, T., WILLARD, M., WASHABAU, R. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. **Journal of Comparative Pathology**. v.38, p.1–43, 2008.

DE BOCK, M.; DECOSTERE, A.; HELLEMANS, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii* induce gastric parietal cell loss in Mongolian gerbils. **Microbes Infection**. v.8, p.503-510, 2006.

DELGADO-ROSADO, G.; DOMINGUEZ-BELLO M.G.; MASSEY, S.E. Positive selection on a bacterial oncoprotein associated with gastric cancer. **Gut Pathogens**. v.3, n.18, 2011.

DEWHIRST, F.E.; SHEN, Z. SCIMECA, M.S.; STOKES, L.N.; BOUMENNA, T.; CHEN, T.; PASTER, B.J.; FOX, J.G. Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. **Journal of Bacteriology**. p.6106–6118, 2005.

EKMAN, E., FREDRIKSSON, M.; TROWALD-WIGH, G. *Helicobacter* spp. in the saliva, stomach, duodenum and faeces of colony dogs. **The Veterinary Journal**. v.195, n.1, p.127-129, 2013.

FLAHO, B.; HAESEBROUCK, F.; SMET, A.; YONEZAWA, A.; OSAKI, T.; KAMIYA, S. Gastric and Enterohepatic Non-*Helicobacter pylori* Helicobacters. **Helicobacter**. v. 18, p.66-72, 2013.

GUARNER, J.; KALACH, N.; ELITSUR, Y.; KOLETZKO, S. *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. **European Journal Pediatrics**. v.169, p.15–25, 2009.

GHIL, H.M.; YOO, J-H.; JUNG, W-S.; YOUN, H-Y.; HWANG, C-Y Survey of *Helicobacter* infection in domestic and feral cats in Korea. **Journal Veterinary Science**. v. 10, n.1, p.67-72, 2009.

GIEGER, T. Alimentary Lymphoma in Cats and Dogs. **Veterinary Clinical Small Animals**.v.41, p.419–432, 2011.

GISBERT, J.P.; PAJARES, J.M. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection—a critical review. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**. v.20, p.1001-17, 2004.

GLUPCZYNSKI, Y. Microbiological and serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: an overview. **British Medical Bulletin**. v.54, n. 1, p.175-118, 1998.

GOMBAC, M.; TANJA, S.; MANICA, C.; POGANIK, M. Histological changes in stomachs of apparently healthy dogs infected with *Helicobacter*.**ActaVeterinaria**.v.60, p.173-182, 2010.

GREITER-WILKE, A., SCANZIANI, E.; SOLDATI, S.; MCDONOUGH, S.P.; MCDONOUGH, P.L.; CENTER, S.A.; RISHNIW, M.; SIMPSON, K.W. Association of *Helicobacter* with hepatitis in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.20, n.4, p.822-827, 2006.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHOU, B.,CHIERS, K.; BAELE, M.; MEYNS, T.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Gastric *Helicobacters* in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 22, p. 202–223, 2009.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHOU, B.; SMET, A.; VANDAMME, P.; DUCATELLE, R. Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* Species in the Human Gastric Mucosa: A Proposal to Introduce the Terms *H. heilmannii* SensuLato and SensuStricto. **Helicobacter**. v.16, p.339–340, 2011.

HANNINEN, M. L., HAPPONEN, I., SAARI, S. & JALAVA, K. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. **International Journal of Systematic Bacteriology**.v.46, p.160–166, 1996.

HANNINEN, M.; HAPPONEN, I.; JALAVA, K. Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to off spring and between puppies. **Veterinary Microbiology**. v.62, p.47–58,1998.

HARBOUR, S.; SUTTON, P. Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.122, p.191–203, 2008.

HERMANN, W., K. KREGEL, W. BREUER, J. LECHNER. *Helicobacter* like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**. v.112, p.307–318,1995.

- HOLT, J.G; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. In: ___ **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: Facultative anaerobic Gram-negative rods**. 9th.ed. Baltimore, 1994. Group. 2, p.42-43.
- HWANG, C. Y.; HAN, H. R.; YOUNG, H. Y. Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection in dogs and cats in Korea. **Journal of Veterinary Science**. v.3, p.123–133, 2002.
- IHAN, A.; PINCHUK, I.V.; BESWICK, E. J. Inflammation, Immunity, and Vaccines for *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**. v.17, p.16-21, 2012.
- JALAVA, K.; ON, S.L.W.; HARRINGTON, C.S.; ANDERSEN, L.P.; HANNINEN, M. L.; VANDAMME, P. A cultured strain of '*Helicobacter heilmannii*', a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence for zoonotic potential of Helicobacter. **Emerging Infectious Diseases**. v.7, p.1036–1038, 1998.
- JOOSTEN, M.; FLAHOUE, B.; MEYNS, T.; SMET, A.; ARTS, J.; DE COOMAN, J. PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK F. Case Report: *Helicobacter suis* infection in a Pig Veterinarian. **Helicobacter**. v.18, p.392-396, 2013.
- JUNQUEIRA, L.C & CARNEIRO, J. In: ___ **Histologia Básica: O trato digestivo**. 10th.ed. São Paulo, 2004. cap. 15, p.292-298.
- KUSTERS, J.G.; ARNOUD, H.M.; VLIET, V.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p.449–490, 2006.
- KÖNING, H.E.; SÓTONYI, P.; LIEBICH, H-G. In: ___ **Anatomia dos animais domésticos: Sistema Digestório**. 4th.ed. Porto Alegre, 2011. cap. 7, p.346-349.
- LANZONI, A.; FAUSTINELLI, I.; CRISTOFORI, P.; LUINI, M.; SIMPSON, K. W.; SCANZIANI, E.; RECORDATI, C. Localization of *Helicobacter* spp. in the fundic mucosa of laboratory Beagle dogs: an ultrastructural study. **Veterinary Research**. v.42, p.1-9, 2011.
- LEE, A.; KRAKOWKA, S. FOX, J.G.; OTTO G.; EATON, K.A.; MURPHY, J.C. Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. **Veterinary Pathology**. n.29, p.487-494, 1992.
- LIMA, V.P.; RABENHORST, S.H.B. Genes associados a virulência de *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.55, n.4, p.389-396, 2009.
- LIN, M.H.; CHENG, H.T.; CHUANG, H.T.; YU, L.K.; TSOU, Y.K.; LEE, M.S Histological examination of ulcer margin for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric ulcers. **Annals of Diagnosis Pathology**. v.17, n.1, p. 63-66, 2013.
- LPSN. Euzéby: List of Prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Helicobacter*. 2014. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/h/helicobacter.html>>. Acesso em: 09 abril. de 2014.
- LU, H.; XIAO, S.D. New ideas for future studies of *Helicobacter pylori*. **Journal of Digestive Diseases**. v.15, p.1– 4, 2014.
- MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients

with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet.** v.1, p.1311-1315, 1984.

MCNULTY, C.A.M.; LEHOURS, P.; MEGRAUD, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter.**v.16, p.10-18, 2011.

MENONI, S.M.F.; BONON, S.H.A.; ZEITUNE, J.M.R.; COSTA, S.C.B. PCR-Based Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* in Endoscopic Biopsy Samples from Brazilian Patients. **Gastroenterology Research and Practice.** 2013.

NAM, C.; OHMACHI, Y.; KOKUBO, T.; NISHIKAWA, T.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Histopathological Studies on Cases of Chronic Mouse Hepatitis by Natural *Helicobacter* Infections. **The Journal Veterinarian Medicine Science.** v.75, n.9, p.1231–1235, 2013.

NEIGER, R.; SIMPSON, K.W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal of Veterinary Internal Medicine.**v.14, n.2, p.125-33, 2000.

OTTIWET, O.; CHOMVARIN, C.; CHAICUMPAR, K.; NAMWAT, W.; MAIRIANG, P. Nested Polymerase Chain Reaction for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** v.41, n.6, p.1423-1431, 2010.

OLIVEIRA, A.G., ROCHA, G.A., ROCHA, A.M.C., SANNA, M.G.P., MOURA, S.B., DANI, R., MARINHO, F.P., MOREIRA, L.S., FERRARI, M.L.A., CASTRO, L.P.F., QUEIROZ, D.M.M. Isolation of *Helicobacter pylori* from the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. **Helicobacter.** v.11, p.2-9, 2006.

O'ROURKE, J.L.; SOLNICK, J.V.; NEILAN, B.A.; SEIDEL, K.; HAYTER, R.; HANSEN, L.M.; LEE, A. Description of "*Candidatus Helicobacter heilmannii*" based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology.** v.54, p.2203-2211, 2004.

PARKIN, D.M. The global health burden of infection- associated cancers in the year 2002. **International Journal of Cancer.** v.118, p.3030–44, 2006.

PARREIRA, P.; MAGALHÃES, A.; REIS, C.A.; BORÉN T.; LECKBAND, D.; MARTINS, M.C.L. Bioengineered surfaces promote specific protein–glycan mediated binding of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Acta Biomaterialia.** v.9, p.8885–8893, 2013.

PASTER, B. J., LEE, A., FOX, J. G., DEWHIRST, F. E., TORDOFF, L. A., FRASER, G. J., O'ROURKE, J. L., TAYLOR, N. S.; FERRERO, R. *Helicobacter felis* sp. nov. *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. **International Journal Systematic Bacteriology.**v.41, p.31–38, 1991.

PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J.B. Clinical appliance of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection—A brief review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection.** p.1-9, 2013 [in press].

PRACHASILPCHAI, W.; NUANUALSUWAN, S.; CHATSUWAN, T.; TECHANGAMUSUWAN, S.; WANGNAITHAM, S, SAILASUTA, A. Diagnosis of *Helicobacter* spp. infection in canine stomach. **Journal Veterinary Science.** v.8, n.2, p.139-145, 2007.

PROPHET E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. In: ___ **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington, 1992. cap.9 e 21, p.214 e 274.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N; ROCHA, G.A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.25, p.2378-2379, 1987.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. *Helicobacter* species. In: ___. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease: The Genera Campylobacter, Helicobacter and Arcobacter**. 2th.ed. Iowa, 2012. cap.34, p.745-746.

RIMBARA, E.; SASATSU, M.; GRAHAM, D.Y. PCR Detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. **Methods in Molecular Biology**. v. 943, p.279-287, 2013.

SAEZ, J.; BELDA, S.; SANTIBÁÑEZ, M.; RODRÍGUEZ, J.C.; SOLA-VERA, J.; GALIANA, A.; RUIZ-GARCÍA, M.; BROTONS, A.; LÓPEZ-GIRONA, E.; GIRONA, E.; SILLERO, C.; ROYO, C. Real-Time PCR for Diagnosing *Helicobacter pylori* Infection in Patients with Upper Gastrointestinal Bleeding: Comparison with Other Classical Diagnostic Methods. **Journal of Clinical Microbiology**. v.50, n.10, p.3233–3237, 2012.

SALAMA, N.R.; HARTUNG, M.L.; MÜLLER, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature Reviews**. v.11, p.385-399, 2013.

SCHOTT, T.; KONDADI, P.K.; HÄNNINEN, M-L.; ROSSI, M. Comparative Genomics of *Helicobacter pylori* and the human-derived *Helicobacter bizzozeronii* CIII-1 strain reveal the molecular basis of the zoonotic nature of non-pylori gastric *Helicobacter* infections in humans. **BMC Genomics**. v.12, 2011.

SINHA, S.K.; MARTIN, B.; GOLD, B.D.; SONG, Q.; SARGENT, M.; BERNSTEIN, C.N. The incidence of *Helicobacter pylori* acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parent-to-child transmission. **Helicobacter**. v.9, p.59–68, 2004.

SIQUEIRA, J.S.; LIMA, P.S.S.; BARRETO, A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori*–Revisão. **RBAC**. v.39, n.1, p.9-13, 2007.

SMET, A.; FLAHOU, B.; MUKHOPADHYA, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, D.; HAESEBROUCK, F.; HOLD, G. The other Helicobacters. **Helicobacter**. v.16, p.70–75, 2011.

SONGER, J.G., POST, K.W. The genera *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Arcobacter*. In: ___. **Veterinary Microbiology: Bacterial and fungal agents of Animal disease**. St. Louis: Elsevier, 2005. cap.28, p.223-231.

STEVENSON, T.H.; CASTILLO, A.; LUCIA, L.M.; ACUFF, G.R. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. **Applied Microbiology**. v.30, p.192–196, 2000.

STINSON, A.W.; CALHOUN, M.L.; DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. In: ___ **Histologia Veterinária: Sistema Digestivo**. 1982. cap.10, p.181-182.

STOFFEL, M.H.; FRIESS, A.E.; BURNENS, A.; SCHMASSMANN, A.; NEIGER, R. Distinction of gastric *Helicobacter* spp. in humans and domestic pets by scanning Electron Microscopy. **Helicobacter**. v.5, n.4, p.233-239, 2000.

STRAUSS-AYALI, D.; SIMPSON, KW. Gastric *Helicobacter* infection in dogs. **Veterinary Clinical of North American Small Animals Practice**. v.29, n.2, p.397-414, 1999.

SUGIMOTO, M.; WU, J-Y.; ABUDAYYEH, S.; HOFFMAN, J.; BRAHEM, H.; AL-KHATIB, K.; YAMOAKA, Y.; GRAHAM, D.Y. Unreliability of Results of PCR Detection of *Helicobacter pylori* in Clinical or Environmental Samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47, n.3, p. 738-742, 2009.

TAKEMURA, L.S.; LOT, R.E.; CAMARGO, P.L.; SILVA, E.O.; ALFIERI, A.A.; RODRIGUES, A.P.F.; BRACARENS, E, L. *Helicobacter* spp. infection in dogs is not associated with changes in epithelial proliferation or E-cadherin expression in gastric mucosa. **Semina. Ciências agrárias**, v.33, n.2, p.3211-3222, 2012.

VALE, F.F.; MÉGRAUD, F.; VÍTOR, M.B.J. Geographic distribution of methyl transferases of *Helicobacter pylori*: evidence of human host population isolation and migration. **BMC Microbiology**. v.9, n.193, p.1-10, 2009.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M. et al. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs and cats. **Journal Clinical Microbiology**. v.43, p.2256-2260, 2005.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; MARECHAL, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Low frequency of *Helicobacter* species in the stomachs of experimental rabbits. **Laboratory Animals**. v.40, p.282–287, 2006.

VAKIL, N.; VAIRA, D. Non-invasive tests for the diagnosis of *H. pylori* infection. **Reviews in Gastroenterology Disorders**. v.4, p. 1–6, 2004.

VIEIRA, F.T.; SILVA, J.C.P.; VILORIA, M.I.V.; VIEIRA, M.T.; PEREIRA, C.E.R. Frequência e distribuição de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de cães. **Revista Ceres**. v. 59, n.1, p. 25-31, 2012.

VITORIANO, I.; SARAIVA-PAVA, K.D.; ROCHA-GONÇALVES, A.; SANTOS A.; LOPES, A.L. OLEASTRO, M.; ROXO-ROSA, M. Ulcerogenic *Helicobacter pylori* strains isolated from Children: A contribution to get insight into the virulence of the bacteria. **Plus one**. v.6, n.10, 2011.

WASHABAU, R.J.; DAY, M.D.; WILLARD, M.D.; HALL, E.J.; JERGENS, A.E., Endoscopic, biopsy, and histopathological guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**.v.24, p.10–26, 2010.

WIINBERG, B.; SPOHR, A.; DIETZ, H.H.; EGELUND, T.; GREITER-WILKE, A.; MCDONOUGH, S.P.; OLSEN, J.; PRIESTNALL, S.; CHANG, Y.S.; SIMPSON K.W. Quantitative Analysis of Inflammatory and Immune Responses in Dogs with Gastritis and Their Relationship to *Helicobacter* spp. Infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.19, p.4–14, 2005.

WÜPPENHORST, N.; VON LOEWENICH, F.; HOBMAIER, N.; VETTER-KNOLL, M.; SONA MOHADJER, S.; KIST, M. Culture of a Gastric Non-*Helicobacter pylori* Helicobacter from the Stomach of a 14-Year-Old Girl. **Helicobacter**. v.18, p.1-5, 2013.

YAMAOKA, Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**. v.14, n.27, p. 4265-4272, 2008.

