



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

***Helicobacter* spp. e gastrite crónica em canídeos e felídeos**

Rute Saraiva Canejo dos Santos Rodrigues Teixeira

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Dr<sup>a</sup>. Joana Vidal Pontes

ORIENTADORA

Doutora Ana Cristina N. L. Vilela

CO-ORIENTADORA

Dr<sup>a</sup>. Joana V. Pontes

2010

LISBOA

---



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

***Helicobacter* spp. e gastrite crónica em canídeos e felídeos**

Rute Saraiva Canejo dos Santos Rodrigues Teixeira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Dr<sup>a</sup>. Joana Vidal Pontes

ORIENTADORA

Doutora Ana Cristina N. L. Vilela

CO-ORIENTADORA

Dr<sup>a</sup>. Joana V. Pontes

2010

LISBOA

---

*For Rex and His namesake Pharaoh*

***“See first that the design is wise and just: that ascertained, pursue it resolutely;  
do not for one repulse  
forego the purpose that you resolved to effect”***

- W.S



## **Agradecimentos**

Agradeço antes de mais à Professora Doutora Cristina L. Vilela por todo o apoio e entusiasmo durante o planeamento e elaboração deste estudo. A sua experiência e paciência com esta inexperiente estagiária foi imprescindível. A sua excelência como Professora levou-me por caminhos inesperados, que me abriram os horizontes e me obrigaram a pensar. Espero que este trabalho esteja à altura da sua confiança.

À Dr<sup>a</sup> Joana Pontes, a minha mestre no Hospital Escolar, que acendeu em mim uma chama pela ecografia que nunca mais se apagará. Os meus sinceros agradecimentos pela sua paciência, a sua vontade de partilhar o seu conhecimento clínico e pela sua amizade. Arigato Sensei!

À Professora Doutora Conceição Peleteiro e ao Mestre Hugo Pissarra agradeço a excepcional ajuda na área da Anatomia Patológica. Sem os seus ensinamentos este estudo nunca teria dado frutos.

Ao CIISA agradeço a confiança que levou ao financiamento deste trabalho.

À Doutora Manuela Oliveira agradeço a sua ampla paciência e amizade com uma estagiária facilmente entusiasmada.

A ajuda da Doutora Teresa Semedo e do Doutor Abdelhak Lemsaddek foi imprescindível e agradeço todo o tempo que despenderam comigo a transmitir alguns dos seus amplos conhecimentos.

À Técnica Sandra Carvalho e toda a equipa do Laboratório de Anatomia Patológica agradeço a sua ajuda e paciência, tal como a forma acolhedora com que me receberam.

Aos médicos do Hospital Escolar agradeço toda a ajuda prestada e conhecimentos transmitidos durante a minha estadia.

Agradeço aos auxiliares do Hospital Escolar pela amizade e pelos ensinamentos que mesmo só com a experiência se acumulam.

Às administrativas do Hospital Escolar agradeço a vossa paciência e amizade.

À Técnica Carla Carneiro agradeço todo o apoio tanto no Laboratório de Microbiologia como nos momentos cafeinados.

À Mestre Carla Mottola, à Dr<sup>a</sup> Clara Cartaxeiro, ao Mestre João Coelho, e à Assistente Técnica Ju Silva, agradeço a amizade, ajuda e ambiente positivo do qual tive o privilégio de fazer parte.

Ao meu marido e família agradeço a paciência que demonstraram ao longo de mais de um ano em que a conversa à volta da mesa de jantar voltava sempre a estas estranhas bactérias. Sem o vosso apoio eu nunca teria conseguido.

Ao Pharaoh, Iris, Garfield e Anubis agradeço as lambidelas dadas sempre no momento certo e ao Rolf, Petite, Simba, Vet e Rex a paixão para que não haja repetições.

À Mestre Rute Noiva agradeço o apoio incondicional durante todo o meu tempo na FMV. A sua amizade foi uma âncora e a sua constante presença um conforto. Os seus conhecimentos na área da Histopatologia foram uma ajuda preciosa e os seus dotes como fotógrafa em muito contribuíram para as fotografias de microscopia óptica apresentadas. Os momentos passados na “pesca” e à sombra da árvore do cacau nunca vão ser esquecidos!

*“The most beautiful thing we can experience is the mysterious.*

*It is the source of all true art and science.”*

*- A.E.*

## Resumo

### ***Helicobacter* spp. e gastrite crónica em canídeos e felídeos**

Em clínica de animais de companhia, uma das doenças mais frequentemente encontradas é a gastrite idiopática, uma situação frustrante tanto para o clínico como para os proprietários. No Homem, a bactéria *Helicobacter pylori* tem recebido muita atenção pela sua capacidade oncogénica e existe a possibilidade de algumas espécies, nomeadamente “*H. heilmannii*”, *H. salomonis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, e *H. bilis*, terem algum poder patogénico em animais de companhia. A finalidade do estudo desenvolvido ao longo do estágio foi de estabelecer a prevalência de várias espécies de *Helicobacter* numa população Portuguesa típica de animais de companhia, e de procurar eventuais relações entre estado de colonização e patologia gástrica.

Num total de 103 animais (56 canídeos, 47 felídeos) foram determinadas, com recurso a técnicas de PCR, prevalências de 37,5%/48,9% para *H. spp.*, 28,6%/34% para *H. bizzozeronii* e 17,9%/48,9% para “*H. heilmannii*” em cães e gatos respectivamente. *H. pylori* foi identificado num único gato (2,1%); *H. salomonis* e *H. felis* foram identificados exclusivamente em cães, com prevalências de 10,7% e 7,1%, respectivamente. *H. bilis* não foi identificado em qualquer animal. Em 19 das amostras fecais testadas (14 de origem canina e cinco de origem felina) 50% dos cães e 60% dos gatos acusaram a presença de *H. spp.*, sendo apenas possível identificar, a nível de espécie, *H. felis* e *H. bizzozeronii* em amostras de dois cães.

Foi identificada uma relação entre sintomatologia gástrica e colonização por “*H. heilmannii*” nos gatos, enquanto nos cães se determinou uma relação entre colonização por *H. bizzozeronii* e a presença de alterações inflamatórias na mucosa gástrica. A utilização de esfregaços da mucosa gástrica permitiu avaliar mais adequadamente o estado de colonização dos animais do que a observação de espiroquetas em cortes histológicos.

Este estudo demonstra a presença de *Helicobacter* spp. numa população Portuguesa típica e sugere uma potencial relação entre *Helicobacter* spp. e gastrite crónica em animais de companhia, especialmente em gatos. A informação sobre presença de espécies de *Helicobacter* e respectivas prevalências poderá contribuir para uma decisão mais fundamentada sobre a prescrição de antibioterapia específica para *Helicobacter* em pacientes apresentados à consulta com sinais gastrointestinais e um diagnóstico de gastrite idiopática.

*Palavras chave:* *Helicobacter*, gastrite crónica, prevalência, histopatologia, PCR, esfregaço

## **Abstract**

### ***Helicobacter* spp. and chronic gastritis in dogs and cats**

Chronic idiopathic gastritis, one of the most frequently observed diseases in companion animal practice, can be a source of frustration for both the clinician and the owner. In humans, *Helicobacter pylori* has been thoroughly investigated due to its' oncogenic capabilities. The possibility exists that some species of *Helicobacter*, namely *H. salomonis*, "*H. heilmannii*", *H. felis*, *H. bizzozeronii* and *H. bilis* may play a role in the pathogenesis of chronic gastritis in companion animals.

The current study, completed as part of the final year trainee program, was designed to investigate the prevalence of *Helicobacter* in a typical companion animal population, while searching for any eventual relationship between colonization and gastric disease.

Prevalence was determined through the use of PCR in 103 animals (56 canines, 47 felines) as 37.5%/48.9% *H. spp*, 28.6%/34% *H. bizzozeronii* and 17.9%/48.9% "*H. heilmannii*" in dogs and cats, respectively. *H. pylori* was identified in a single feline sample (2.1%) while *H. salomonis* and *H. felis* were observed exclusively in canine samples with a prevalence of 10.7% and 7.1% respectively. *H. bilis* could not be demonstrated in any of the samples analysed. Fecal samples from 19 patients were similarly tested (14 from canines, 5 from felines), 50% of dogs and 60% of cats tested positive for *H. spp*. Species specific PCR, identified the presence of *H. felis* and *H. bizzozeronii* in two dogs.

In canines, a relationship between colonization with *H. bizzozeronii* and inflammatory alterations in the gastric mucosa was shown, while in cats colonization with "*H. heilmannii*" could be related to the presence of clinical signs of gastritis. Brush cytology was found to be more effective than histology in demonstrating the presence of *Helicobacter* in the gastric mucosa of both canines and felines.

This study showed the presence of *Helicobacter* in a sample population of companion animals and the data gathered strongly suggests a relationship, especially in cats, between colonization and disease. The results obtained may contribute to an informed decision in prescribing antibiotic therapy for *Helicobacter*-associated gastritis in patients that present idiopathic chronic gastritis.

*Keywords:* *Helicobacter*, chronic gastritis, prevalence, histopathology, PCR, brush cytology

## Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo.....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas.....	xv
Índice de abreviaturas.....	xvii
1. Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio .....	1
2. Estado da Arte .....	3
2.1 Taxonomia.....	4
2.2 <i>Helicobacter</i> spp. em cão e gato .....	5
2.3. Epidemiologia.....	9
2.4. Patogenia.....	12
2.4.1 Transmissão.....	12
2.4.2 Colonização .....	13
2.4.3 Factores de virulência .....	15
2.5 Sinais Clínicos .....	21
2.6 Diagnóstico.....	22
2.6.1 Testes não invasivos.....	22
2.6.2 Testes invasivos .....	23
2.7 Terapêutica.....	26
2.7.1 Indicações.....	26
2.7.2 Antibioterapia .....	26
3. <i>Helicobacter</i> spp. numa amostra populacional.....	28
3.1 Objectivos do estudo.....	28
3.2 Materiais e métodos .....	28
3.2.1 População sujeita a investigação .....	28
3.2.2 Critérios de inclusão .....	29
3.2.3 Amostragem .....	30
3.2.4 Recolha de Amostras.....	30
3.2.5 Processamento de amostras para análise histopatológica.....	31
3.2.6 Extracção ADN de amostras para PCR.....	32
3.2.7 PCR .....	34
3.2.8 Análise Estatística.....	39
3.3 Resultados .....	40
3.3.1 PCR .....	40

3.3.2 Histopatologia .....	48
3.3.3 Esfregaços da parede gástrica.....	51
3.4. Discussão .....	54
4. Considerações finais e perspectivas para o futuro .....	70
Bibliografia .....	73
ANEXO I .....	95
Casuística observada no Hospital Escolar durante o período de estágio .....	95
ANEXO II .....	97
PCR com ADN extraído de amostras regionais .....	97
ANEXO III .....	99
Protocolo de rotina H&E .....	99
ANEXO IV .....	101
Formulário de avaliação histopatológica .....	101
ANEXO V .....	103
Fotografias de esfregaços da parede gástrica.....	103
ANEXO VI .....	105
Fotografias de cortes histopatológicos .....	105
ANEXO VII .....	107
Resumo da comunicação livre apresentada no congresso da APMVEAC.....	107
ANEXO VIII .....	109
Artigo submetido ao Journal of Feline Medicine and Surgery.....	109

## Índice de Figuras

Figura 1: Casuística seguida no Hospital Escolar da FMV, discriminada por área clínica. ....	1
Figura 2: Relações filogenéticas do género <i>Helicobacter</i> .....	5
Figura 3: Representação do envolvimento das proteínas CagA e VacA na patogénese de doença gástrica provocada por <i>H. pylori</i> .....	18
Figura 4: Resposta do hospedeiro à presença de <i>Helicobacter</i> e mecanismos de evasão da bactéria.....	21
Figura 5: Representação dos três passos utilizados num ciclo na técnica de PCR.....	24
Figura 6: Origem das amostras recolhidas da população em estudo. ....	29
Figura 7: Resumo do processo de extracção de ADN tecidual utilizando o kit comercial. ....	33
Figura 8: Resumo do processo de extracção de ADN fecal utilizando o kit comercial.....	35
Figura 9: Validação das reacções de PCR.....	38
Figura 10: Resultados de análise por PCR de ADN extraído das amostras fecais recolhidas. ....	40
Figura 11: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>Helicobacter</i> spp. e ADN extraído de amostras fecais (1200-pb).....	40
Figura 12: PCR com <i>primers</i> específicos de <i>Helicobacter</i> spp. e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas (1200-pb).....	41
Figura 13: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>H. bilis</i> e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas (537-pb). ....	42
Figura 14: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>H. felis</i> e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas (1150-pb). ....	42
Figura 15: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>H. pylori</i> e ADN extraído de uma amostra gástrica felina (298-pb). ....	43
Figura 16: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>H. bizzozeronii</i> e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas, com amplificação da banda esperada (420-pb) e bandas inespecíficas. ....	43
Figura 17: PCR com <i>primers</i> específicos para " <i>H. heilmannii</i> " e ADN extraído de amostras gástricas homogeneizadas com amplificação da banda esperada (580-pb) e bandas inespecíficas.....	44
Figura 18: Resultados dos PCR efectuados com <i>primers</i> específicos e ADN extraído de amostras de tecido gástrico homogeneizadas. ....	44
Figura 19: Composição das populações identificadas na mucosa gástrica de canídeos e felídeos.....	45
Figura 20: Resultados de PCR efectuados com ADN extraído de amostras regionais de tecido gástrico obtidas de canídeos que permitiram a amplificação de fragmentos específicos nas amostras homogeneizadas.....	46

Figura 21: Resultados dos PCR efectuados com ADN extraído de amostras regionais de tecido gástrico obtidas de felídeos que permitiram a amplificação de fragmentos específicos nas amostras homogeneizadas. ....	46
Figura 22: Re-amplificação das bandas produzidas pela reacção de PCR para <i>H. bizzozeronii</i> . ....	47
Figura 23: Resultado global da avaliação histopatológica das biopsias gástricas caninas e felinas. ....	48
Figura 24: Espiroquetas observadas na superfície da mucosa do estômago de um cão. ....	49
Figura 25: Espiroquetas observadas no lúmen de uma glândula gástrica do estômago de um gato. ....	49
Figura 26: Comparação entre observação histológica de espiroquetas e PCR. ....	50
Figura 27: Comparação entre alterações observadas na mucosa gástrica e amplificação de bandas específicas para o género. ....	50
Figura 28: Hiperplasia linfocelular (setas) identificada na mucosa gástrica de um felídeo colonizado com " <i>H. heilmannii</i> ". ....	51
Figura 29: Comparação entre os resultados obtidos através da observação dos esfregaços e os obtidos por PCR. ....	51
Figura 30: Esfregaço da mucosa gástrica, região do corpo, dum cão evidenciando várias espiroquetas identificadas como <i>H. bizzozeronii</i> por PCR. ....	52
Figura 31: Comparação entre os resultados obtidos através da observação dos esfregaços e os obtidos por PCR nas duas espécies de animais de companhia. ....	52
Figura 32: Esfregaço da mucosa gástrica, região do corpo, de um gato, evidenciando várias espiroquetas identificadas como <i>H. bizzozeronii</i> e " <i>H. heilmannii</i> " por PCR. ....	53
Figura 33: Possibilidade de amplificação de fragmentos com diferentes tamanhos. ....	59
Figura 34: Corte histológico do estômago do canídeo nº102 evidenciando a presença de espiroquetas (setas): ....	63
Figura 35: Casuística observada discriminada por espécie e por serviço. ....	95
Figura 36: Distribuição de pacientes por sexo. ....	95
Figura 37: Distribuição por grupos etários dos pacientes observados. ....	96
Figura 38: Distribuição de pacientes sujeitos ao exame ecográfico por área clínica. ....	96
Figura 39: PCR com <i>primers</i> específicos para " <i>H. heilmannii</i> " e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (580-pb) e bandas inespecíficas	97
Figura 40: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>H. salomonis</i> e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (537-pb) ....	97
Figura 41: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>H. bizzozeronii</i> e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (420-pb) ....	98
Figura 42: PCR com <i>primers</i> específicos para <i>H. felis</i> e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (1150-pb) ....	98

Figura 43: Esfregaço da mucosa gástrica de um gato, evidenciando espiroquetas. ....	103
Figura 44: Esfregaço da mucosa gástrica de um gato, evidenciando espiroquetas. ....	103
Figura 45: Esfregaço da mucosa gástrica de um cão, evidenciando espiroquetas.....	104
Figura 46: Esfregaço da mucosa gástrica de um cão, evidenciando espiroquetas.....	104
Figura 47: Espiroquetas na mucosa superficial num corte histológico de estômago de gato. .....	105
Figura 48: Espiroquetas no lúmen de uma glândula gástrica num corte histológico de estômago de gato. ....	105



## **Índice de Tabelas**

Tabela 1: Descrição morfológica das espécies de <i>Helicobacter</i> em estudo. ....	8
Tabela 2: Prevalência de <i>Helicobacter</i> spp. em várias populações de canídeos e felídeos. ....	11
Tabela 3: Alguns compostos comumente utilizados em medicina humana para tratamento de gastrite crônica relacionada com <i>H. pylori</i> , em conjunto com omeprazole. ....	27
Tabela 4: Passos do processador automático de tecidos (Leica TP 1020). ....	32
Tabela 5: <i>Primers</i> utilizados e respectivos fragmentos amplificados. ....	36
Tabela 6: Ciclos de PCR utilizados de acordo com a espécie a ser pesquisada. ....	37
Tabela 7: Populações de <i>Helicobacter</i> identificadas na mucosa gástrica de cães e gatos... ..	45



## **Índice de abreviaturas**

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ag: antigénio

Ac: anticorpo

BID: “bis in die” duas vezes ao dia

CagA – cytotoxin associated gene A

CagB – cytotoxin associated gene B

CagPAI – cytotoxin associated gene pathogenicity island

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

E.U.A: Estados Unidos de América

FISH: fluorescent *in situ* hybridization – hibridação *in situ* fluorescente

FMV/UTL: Faculdade de Medicina Veterinária / Universidade Técnica de Lisboa

Frag.: fragmento

GES: tiocianato de guanidina em EDTA

H&E: Hematoxilina - Eosina

IFN- $\gamma$ : interferão gama

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

M: molar

MGG: May-Grünwald-Giemsa

min: minuto

ml: mililitro

NO: óxido nítrico

pb: pares de bases

PCR: polymerase chain reaction – reacção da polimerase em cadeia

pH: potencial de hidrogénio

PMN: neutrófilos polimorfonucleares

PO: “per os” - por via oral

QUID: “quater in die” - quatro vezes ao dia

Ref.: referência bibliográfica

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

sec: segundo

Shh: receptor Sonic Hedgehog

SPF: specific pathogen free – livre de agentes patogénicos específicos

TE: Tris-HCl em EDTA

TID: “ter in die” - três vezes ao dia

TLR: toll-like receptores

TNF- $\alpha$ : factor de necrose tumoral alfa

TTC - 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride

$\mu$ l: microlitros

$\mu$ m: micrómetro

UV: ultra-violeta

VacA - vacuolating cytotoxin gene A

VacB – vacuolating cytotoxin gene B

## 1. Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio

Esta dissertação tem por base o trabalho realizado durante o estágio curricular que decorreu entre Setembro de 2009 e Setembro de 2010. As actividades compreenderam um estágio realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (FMV/UTL), e um trabalho de investigação realizado no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária.

No Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, foram acompanhados os vários serviços da subunidade de Clínica de Animais de Companhia, incluindo serviço de internamento, consulta de primeira opinião ou de especialidade, cirurgia e imagiologia. O trabalho no serviço de internamento consistiu no apoio ao médico veterinário responsável pelos internamentos e na orientação dos alunos destacados para esse serviço. Foram cumpridos 2 turnos de 24 horas por mês, incluindo feriados e fins-de-semana. Foi observado um total de 675 animais, que se encontram discriminados por área clínica na figura 1. Informação mais detalhada da casuística observada no Hospital Escolar encontra-se reunida no anexo 1.

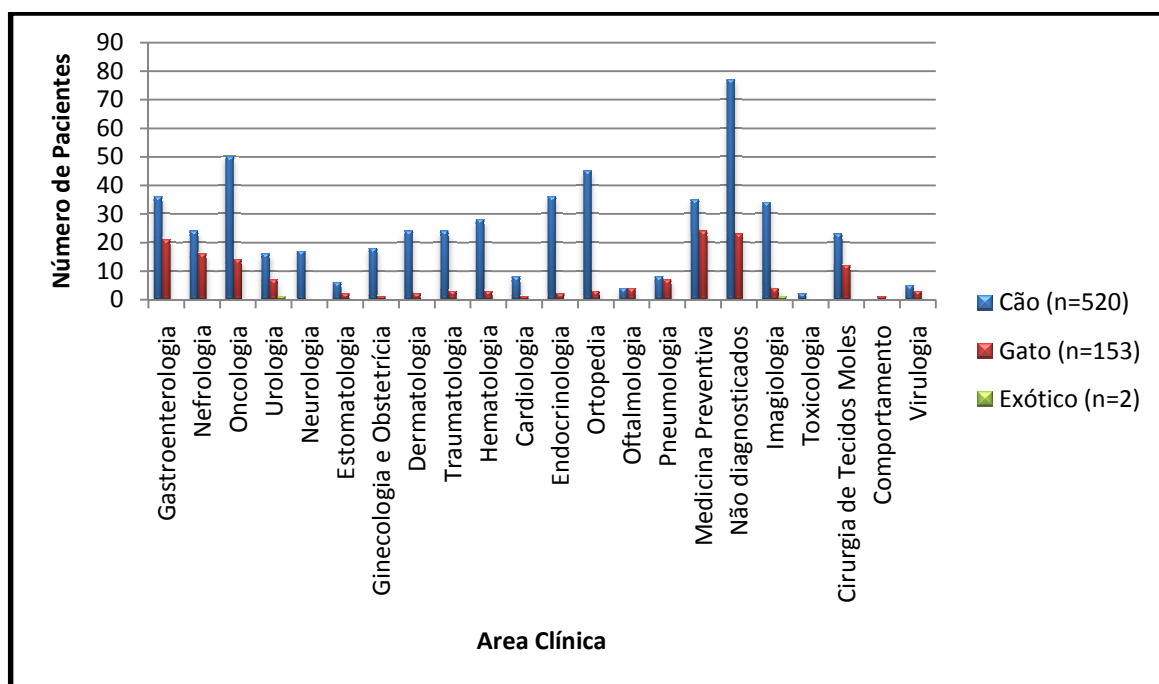


Figura 1: Casuística seguida no Hospital Escolar da FMV, discriminada por área clínica.

A componente de investigação do estágio no Laboratório de Bacteriologia da FMV/UTL, decorreu entre Março de 2009 e Setembro de 2010 e consistiu na recolha de biopsias, obtenção de esfregaços da parede da mucosa gástrica, extracção de ácido desoxirribonucleico (ADN) e identificação de microrganismos do género *Helicobacter* presentes com recurso a reacção da polimerase em cadeia (PCR). No Laboratório de Anatomia Patológica os esfregaços foram corados e observados enquanto as biopsias obtidas foram processadas e examinadas macroscopicamente.

Assim, a componente prática do estágio compreendeu cerca de 1260 horas no Hospital Escolar e 1225 horas no Laboratório de Bacteriologia e Laboratório de Anatomia Patológica da FMV/UTL, num total aproximado de 2770 horas.

## 2. Estado da Arte

Nas últimas décadas, desde que *Helicobacter pylori* foi identificado como um agente ulcerogénico e potencialmente carcinogénico nos seres humanos (Kusters, van Vliet & Kuipers, 2006), o estudo de *Helicobacter* spp em animais de companhia tem sido aprofundado, não só pelo seu potencial zoonótico (Solnick & Schauer, 2001), mas como um possível modelo da doença humana.

Existem neste momento 32 espécies de *Helicobacter* descritas (Euzéby, 2010), das quais quatro são consideradas colonizadoras comuns da mucosa gástrica dos carnívoros domésticos: *Helicobacter felis*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter salomonis*, “*Helicobacter heilmannii*”, e *Helicobacter bilis* (O'Rourke et al., 2004). O seu interesse em Medicina Veterinária advém da possibilidade de existirem espécies patogénicas que possam estar na origem de gastrites idiopáticas, em canídeos e felídeos (Neiger & Simpson, 2000; Simpson, Neiger, DeNovo & Sherding, 2000). A recente ligação estabelecida entre *Helicobacter* e linfoma alimentar nos felídeos (Bridgeford et al., 2008) veio aumentar as suspeitas de esta bactéria ser, tal como no Homem, potencialmente oncogénica em animais de companhia.

Visto alguns animais com gastrites idiopáticas demonstrarem melhorias clínicas após tratamento (Jergens et al., 2009), existe uma necessidade de avaliar a prevalência destes microrganismos em populações típicas de animais de companhia, em Portugal, tal como a observada no Hospital Escolar da FMV/UTL. Os resultados poderão contribuir para avaliar a necessidade da introdução de uma terapêutica específica para *Helicobacter* em pacientes com gastrites idiopáticas.

De facto, uma fonte de frustração tanto para os proprietários como para os veterinários assistentes é o facto de se raramente se determinar conclusivamente a etiologia das gastrites crónicas em canídeos e felídeos (Simpson, 2005; Wiinberg et al., 2005). Os pacientes são descritos como tendo uma gastrite crónica idiopática e tratados sintomaticamente (Simpson et al., 2000; Wiinberg et al., 2005). A possibilidade de algumas destas gastrites crónicas idiopáticas serem causadas pela presença de *Helicobacter* spp., permitindo a implementação de uma terapêutica eficaz preconizada para o seu tratamento, pode reverter este ciclo. Conhecendo a prevalência destas bactérias numa dada região, e face a uma gastrite idiopática, o clínico tem a possibilidade de iniciar uma terapêutica que permita eliminar os sinais clínicos evidenciados pelo paciente, melhorando a sua qualidade de vida, bem como a dos proprietários.

## 2.1 Taxonomia

A Família *Helicobacteraceae* pertence à Ordem *Campylobacteria*, Classe *Epsilonproteobacteria*, Filo *Protobacteria*. Os membros desta Família distribuem-se pelos géneros *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum*, *Thiovulum*, *Wolinella* e *Helicobacter* (Euzéby, 2010).

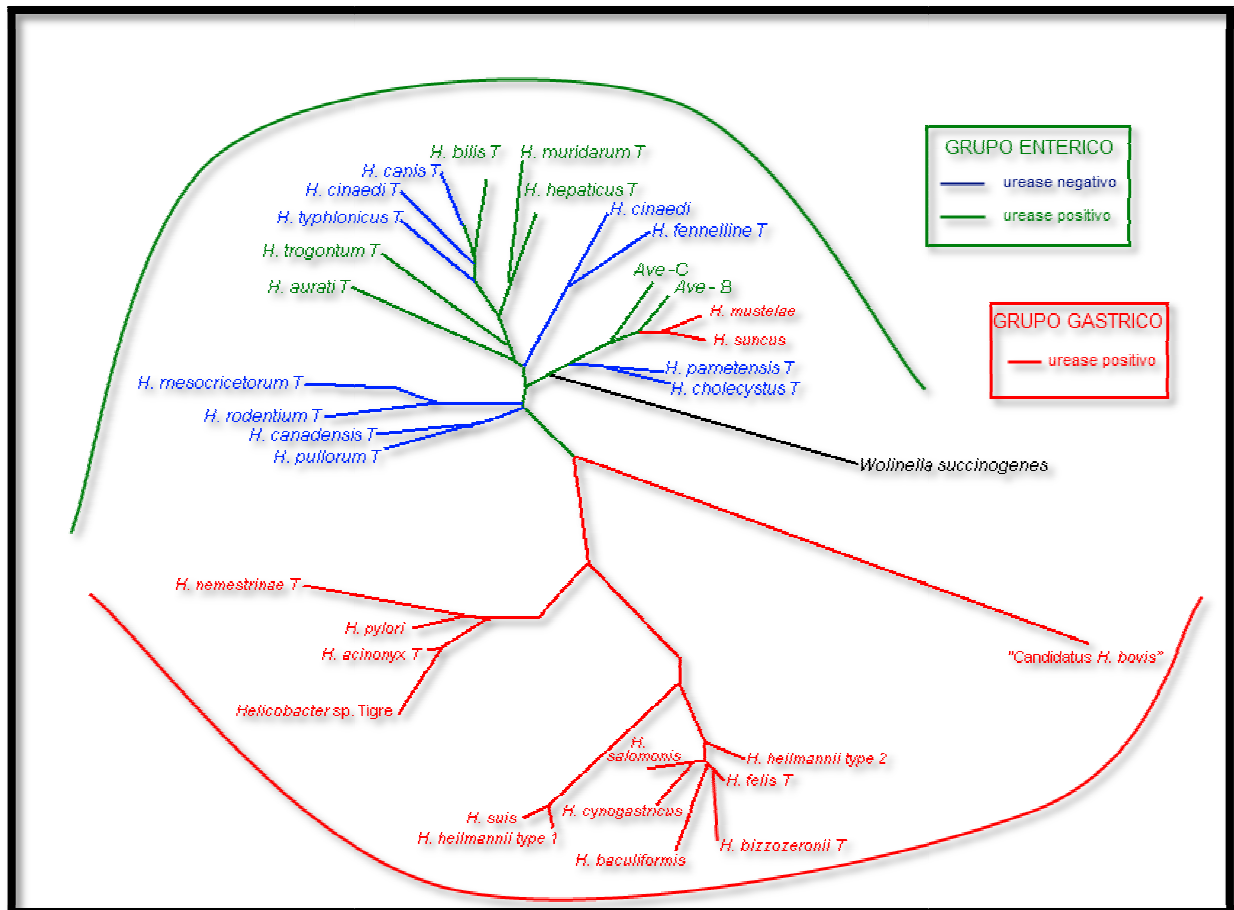
*Helicobacter* são espiroquetas não esporuladas, de Gram negativo, oxidase positivas, sendo algumas catalase positivas (Lecoindre et al., 2000; Mobley, Mendz & Hazell, 2001). São bactérias colonizadoras do tracto gastrointestinal de todo o reino animal (De Bock, Decostere, Hellemans, Haesebrouck, & Ducatelle, 2006; Van den Bulck et al., 2005a), desde aves a mamíferos marinhos (Goldman et al., 2009; Oxley, Argo & McKay, 2005), com a excepção de cabras (Gueneau et al., 2002). A sua colonização da mucosa gástrica é focal, frequentemente encontrando-se exclusivamente numa ou duas regiões gástricas (Happonen et al., 1996b; Neiger & Simpson, 2000). Tipicamente, têm um diâmetro de 0,2 a 1,2 µm com 1,5 a 10,0 µm de comprimento e a sua mobilidade é assegurada pela presença de flagelos que, dependendo da espécie, podem ser múltiplos ou únicos, com uma distribuição polar ou bipolar (Mobley et al., 2001).

Encontram-se descritas 32 espécies (Euzéby, 2010), divididas em dois grupos, gástricas e entéricas (Haesebrouck et al., 2009). De entre as espécies descritas, 20 são entéricas, colonizando vários órgãos do tracto gastrointestinal posterior, tais como o intestino e o fígado (Fox et al., 1995b). Na sua maioria são urease negativas e tolerantes à biliar (Gueneau & Loiseaux-De Goer, 2002; Solnick & Schauer, 2001; Stanley et al., 1993). Todas as 12 espécies gástricas são produtoras de urease, e é neste grupo que se encontram as espécies que podem ter um papel fundamental no desenvolvimento de gastrites crónicas (Lee et al., 1992; Takemura, Camargo, Alfieri & Bracarense, 2009).

Morfologicamente são reconhecidas quatro formas distintas de *Helicobacter* sp., inicialmente descritas por Lockard e Boler (1970): a primeira, de nome Lockard tipo 1, distingue-se por ser fusiforme, ligeiramente espiralada e pela presença de múltiplas fibras periplasmáticas ao longo de toda a superfície. Esta morfologia é típica das espécies entéricas como *H. bilis*. A segunda forma descrita, designada por Lockard tipo 2, distingue-se pela forma completamente espiral e pela presença de fibras periplasmáticas, formando grupos de duas a quatro, morfologia típica de *H. felis*. A terceira forma, Lockard tipo 3, diferencia-se da

anterior pela ausência de fibras periplasmáticas, encontrando-se representada pela espécie *H. bizzozeroni*. A última forma refere-se a uma única descrição, por Weber e Schmittiel (1962), de *H. salomonis* (Solnick & Schauer, 2001).

As relações filogenéticas entre algumas espécies de *Helicobacter* encontram-se resumidas na figura 2. Realça-se a presença clara de dois grandes agrupamentos, justificando assim a divisão do género em dois grupos, gástrico e entérico.



**Figura 2:** Relações filogenéticas do género *Helicobacter*.

Adaptado de Gueneau & Loiseaux-De Goer, 2002; Haesebrouck et al., 2009.

## 2.2 *Helicobacter* spp. em cão e gato

A presença de espiroquetas na mucosa gástrica de animais de companhia foi inicialmente descrita por Salomon em 1896 (Hermanns, Kregel, Breuer & Lechner, 1995) sendo, as suas características descritas mais tarde (Lockard & Boler, 1970; Weber & Schmittiel, 1962). Foi a ligação de uma destas espiroquetas - *Helicobacter pylori* - a gastrite crónica e úlceras em

humanos (Marshall & Warren, 1984) que despoletou o interesse intenso no estudo das populações presentes nos animais de companhia, como possíveis fontes de infecção. Lee, Hazell, O'Rourke e Kouprach (1988) isolaram a primeira espiroqueta do estômago de um gato, posteriormente classificada como *H. felis* (Paster et al., 1991), tendo sido postulada a possibilidade de se tratar de um agente zoonótico. Outros investigadores continuaram a procurar uma fonte de infecção de origem animal (Fox, 2002; Lecoindre et al., 2000; Otto et al., 1994; Queiroz et al., 1996), acreditando que existia uma grande probabilidade de se encontrarem espécies de *Helicobacter* com potencial zoonótico nos animais de companhia (De Groote et al., 2005; Ganière, Ruvoen & André-Fontaine, 2001).

Conforme se foi progredindo no estudo destas bactérias, foram descritas outras espécies para além de *H. felis*, como colonizadores da mucosa gástrica do cão e do gato. *H. bizzozeronii* foi isolado da mucosa gástrica de cães (Hanninen, Happonen, Saari & Jalava, 1996) seguido por *H. salomonis* (Jalava, Kaartinen, Utriainen, Happonen & Hanninen, 1997) e *H. bilis* (Eaton et al., 1996). Uma outra espiroqueta, inicialmente conhecida como *Gastrospirillum hominis* (Heilmann & Borchard, 1991), revelou ser de facto um grupo de bactérias geneticamente similares a *H. felis*, que foram designadas provisoriamente como "*H. heilmannii*" (Solnick et al., 1993). Hoje sabe-se que existem pelo menos quatro tipos de "*H. heilmannii*", todas elas colonizadores da mucosa gástrica dos animais de companhia (Bridgeford et al., 2008; O'Rourke et al., 2004).

Contudo, é importante referir que colonização não significa necessariamente doença. Só com a descoberta que cães inoculados experimentalmente com *H. pylori* desenvolviam gastrites linfoplasmocíticas semelhantes às presentes no Homem (Radin et al., 1990) é que se atribuiu um papel activo a *Helicobacter* nas gastrites de pequenos animais. Inicialmente o interesse nestes estudos limitava-se a encontrar um modelo animal para a doença no Homem (Dieterich, Wiesel, Neiger, Blum & Corthesy-Theulaz, 1998; Lee et al., 1988), mas rapidamente se expandiu para clarificar a importância destas bactérias em gastrites crónicas nos cães e gatos, afecções cuja causa primordial é raramente identificada e frequentemente tratadas apenas de forma sintomática (Simpson et al., 2000a; Wiinberg et al., 2005).

A demonstração de uma relação entre colonização com *Helicobacter* spp. e grau de inflamação e desgenerescência da mucosa gástrica em gatos (Hermanns et al., 1995) deu início a 15 anos de pesquisa, visando clarificar o papel de *Helicobacter* no desenvolvimento de gastrites.

Verificou-se que a presença de *Helicobacter* na mucosa de gatos sintomáticos se reflecte num maior grau de inflamação gástrica em comparação com gatos assintomáticos (Strauss-Ayali, Scanziani, Deng & Simpson, 2001), sugerindo que a bactéria interfere de alguma forma no desenvolvimento de gastrites. A observação de que gatos SPF inoculados experimentalmente com *H. felis* desenvolveram gastrites com hiperplasia linfocelular (Simpson et al., 2000a), demonstrou que o género *Helicobacter* tem mais do que uma espécie com potencial patogénico (Erginsoy & Sozmen, 2006), uma possibilidade que se confirmou com a descoberta de uma ligação entre a presença de "*H. heilmannii*" e o desenvolvimento de gastrite crónica tanto em gatos domésticos sintomáticos (Feinstein & Olsson, 1992) como em gatos vadios (El-Zaatari et al., 1997). Mais recentemente, "*H. heilmannii*" foi implicado na patogénese do linfoma alimentar felídeo (Bridgeford et al., 2008) e na hiperplasia linfóide (Takemura et al., 2009).

Relativamente aos cães, Hwang et al. (2002a) demonstraram que animais sintomáticos estavam significativamente mais colonizados com *Helicobacter* spp. do que os assintomáticos, uma situação em todo semelhante à dos gatos (Strauss-Ayali et al., 2001). *H. felis* tem sido identificado como possível agente causal, em cães com gastrite crónica, uma vez que se encontra ausente em animais sãos (Haesebrouck et al., 2009), causando gastrites linfoproliferativas quando inoculado em cães gnotobióticos (Lee, et al., 1992). Em comparação com animais não infectados, os cães colonizados com *Helicobacter* demonstram maior atrofia glandular (Neiger & Simpson, 2000), o que pode indicar uma ligação entre colonização e doença. Esta ligação é reforçada pela observação de que cães colonizados desenvolvem mais frequentemente fibrose gástrica do que os não colonizados (Wiinberg et al., 2005).

É importante notar que não é exclusivamente no cão, gato e Homem que o género *Helicobacter* tem potencial patogénico, com reflexos sobre o desenvolvimento de alterações gástricas. Nos mamíferos marinhos, a espécie implicada é *H. cetorum* (Harper et al., 2002), nos grandes felídeos *H. acinonyx* (Eaton et al., 1996), e em furões *H. mustelae* (Erdman et al., 1997; Fox et al., 1990). Em conjunto, estes dados reforçam o potencial patogénico do género, sendo possível a existência de uma espécie de *Helicobacter* particularmente patogénica para cada mamífero (Harbour & Sutton, 2008). Em geral, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. bilis*, "*H. heilmannii*" e *H. salomonis* - espécies já identificadas como comensais ou colonizadores oportunistas da mucosa gástrica em animais de companhia (Haesebrouck et al., 2009; Jalava et al., 1998; Priestnall et al., 2004; Van den Bulck et al., 2005b), cujas características morfológicas se encontram descritas na tabela 1, podem apresentar uma

relação causa-efeito nas gastrites crônicas do cão e do gato, tal como *H. pylori* em humanos.

Tabela 1: Descrição morfológica das espécies de *Helicobacter* em estudo.

Característica	<i>H. felis</i> <sup>ab</sup>	<i>H. bizzozeroni</i> <sup>ac</sup>	<i>H. heilmannii</i> <sup>d</sup>	<i>H. salomonis</i> <sup>a</sup>	<i>H. bilis</i> <sup>e</sup>
<b>Comprimento celular</b>	5 a 7,5	5 a 10	5 a 10	5 a 7	4 a 5
<b>Diâmetro celular</b>	0,4	0,3	0,5	0,8 a 1,2	0,5
<b>Fímbrias peripasmáticas</b>	+	-	-	-	+
<b>Localização de flagelos</b>	Bipolar	Bipolar	Bipolar	Bipolar	Bipolar
<b>Número de flagelos</b>	14 a 20	10 a 20	10 a 20	10 a 23	3 a 14
<b>Flagelos com bainha</b>	+	+	+	+	+
<b>Actividade catalase</b>	+	+	ND	+	+
<b>Actividade oxidase</b>	+	+	ND	+	
<b>Actividade urease</b>	+	+	+	+	+
<b>Redução de nitrato</b>	+	+	ND	+	+
<b>Hidrólise de hipurato</b>	-	-	ND	-	
<b>Hidrólise de acetato</b>	+	-	ND	+	-
<b>δ-glutamil aminopeptidase</b>	+	+	ND	+	ND
<b>Redução TTC</b>	+	-	ND	+	
<b>Actividade fosfatase alcalina</b>	+	+	ND	+	ND
<b>Actividade DNase</b>	+	+	ND	+	
<b>Crescimento a:</b>					
<b>25°C</b>	-	-	ND	-	-
<b>37°C</b>	+	+		+	+
<b>40°C</b>	+	ND		+	ND
<b>42°C</b>	+	-		-	+
<b>Tolerância a bilis a 1%</b>	-	-	ND	-	+
<b>Susceptível a:</b>					
<b>Ácido nalidíxico</b>	+/-	-	ND	-	-
<b>Cefalotina</b>	+	+		+	-
<b>Cefoperazona</b>	+	+		+	ND
<b>Metronidazole</b>	+	+		+	+

+, 100% de estripes positivas; -, 0% de estripes negativas; ND, informação não determinada

a Jalava et al.(1997) ; b Paster et al. (1991) ; c Hanninen et al. (1996) ; d Haesebrouck et al.(2009); e Fox et al.(1995a)

### 2.3. Epidemiologia

Existe algum grau de heterogeneidade, tanto na prevalência, como na composição das populações de *Helicobacter* identificadas na mucosa gástrica de cães e gatos. Priestnall et al. (2004) estudaram duas populações de animais de companhia oriundas dos Estados Unidos da América e da Alemanha, verificando que, apesar de ambas as populações serem colonizadas por mais do que uma espécie, a composição variava. Verificou-se igualmente uma diferença geográfica na prevalência de animais colonizados. Na Dinamarca, 76,7% dos cães foram identificados por PCR como colonizados por *Helicobacter* (Wiinberg et al., 2005), enquanto na Coreia a prevalência encontrada foi de 82,3% (Hwang et al., 2002a). Se considerarmos os estudos que utilizam outras técnicas para identificar a presença de *Helicobacter*, como a microscopia óptica, existe ainda maior variação (Hermanns et al., 1995; Wiinberg et al., 2005). Esta heterogeneidade nos resultados e metodologias aplicadas originou dados discrepantes relativamente à prevalência de *Helicobacter* em animais de companhia (Strauss-Ayali et al., 1999; Van den Bulck et al., 2005b).

Com a identificação de sequências oligonucleotídicas iniciadoras (*primers*) específicas para cada espécie, a incerteza aumentou, uma vez que alguns estudos continuam a utilizar exclusivamente *primers* para *Helicobacter* spp. (Shojaee Tabrizi et al., 2010; Takemura et al., 2009) enquanto outros aprofundam a sua pesquisa com *primers* específicos (Bridgeford et al., 2008; Wiinberg et al., 2005). Assim, quando se tenta interpretar as diferenças entre as populações e prevalências de *Helicobacter* no cão e no gato, há que ter em consideração qual a metodologia utilizada e a sua especificidade.

Relativamente aos animais de companhia, é importante diferenciar entre populações domésticas e silváticas. A maioria das doenças infecto-contagiosas tendem a disseminar-se muito mais eficazmente em populações silváticas do que em domésticas devido ao contacto íntimo, e por vezes violento, entre os indivíduos e às deficientes condições higio-sanitárias. No caso de *Helicobacter*, Ghil et al. (2009) demonstraram que a prevalência de colonização em animais domésticos é metade da observada numa população silvática. Em Portugal, onde é comum os animais de companhia - especialmente gatos - terem vida livre, permitindo livre contacto com populações silváticas, estas diferenças podem vir a ser importantes para a compreensão da transmissão de agentes potencialmente patogénicos.

Na tabela 2 encontram-se discriminadas as populações e prevalências de *Helicobacter* encontradas na América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa. Em Portugal, não existe informação disponível acerca da composição ou prevalência da população de *Helicobacter* em animais de companhia, dados essenciais para o estabelecimento de uma ligação entre colonização e gastrites crónicas (Al-Soud et al., 2003; Eaton et al., 1996; Solnick & Schauer, 2001)

Tabela 2: Prevalência de *Helicobacter* spp. em várias populações de canídeos e felídeos.

Localidade	Metodologia	Nível de Identificação	Canídeos (%)	Felídeos (%)	População <i>Helicobacter</i>	Ref.
Alemanha	FISH e PCR	Espécie	ND	100	1,2,3	<i>a</i>
Austrália	Urease	ND	ND	86	ND	<i>c</i>
Bélgica	PCR	Espécie	71,8	79,1	1, 2, 4	<i>m</i>
Brasil	Microscopia	ND	96	ND	ND	<i>q</i>
Coreia	PCR	Género	ND	56,3/91,1***	ND	<i>p</i>
Coreia	Urease	ND	78,4	64	ND	<i>b</i>
Coreia	PCR	Espécie	82,3	84	1, 3	<i>b</i>
Dinamarca	PCR	Género	76,7	ND	ND	<i>n</i>
Dinamarca	FISH e PCR	Espécie	100	ND	1, 2, 3	<i>a</i>
E.U.A.	FISH e PCR	Espécie	ND	100	1,2,3	<i>a</i>
E.U.A.	PCR*	ND	ND	41	ND	<i>d</i>
E.U.A.	Microscopia	ND	100	ND	ND	<i>e</i>
E.U.A.	PCR	Espécie	ND	100	3	<i>j</i>
E.U.A.	PCR	Género	77,2	ND	ND	<i>k</i>
E.U.A.	PCR	Espécie	ND	37,7	1, 3	<i>l</i>
Finlândia	Microscopia	Espécie	100	ND	1, 2, 4	<i>f</i>
	Cultura					
Finlândia	Cultura	Espécie	51	ND	1, 2, 3, 4	<i>g</i>
Holanda	Microscopia	ND	92	ND	ND**	<i>i</i>
Irão	PCR	Género	ND	67,5	ND	<i>o</i>
Suíça	PCR	Espécie	ND	78	3	<i>h</i>

<i>a-</i> Priestnall et al., 2004	1- <i>H. felis</i>
<i>b-</i> Hwang et al., 2002a	2- <i>H. bizzozeronii</i>
<i>c-</i> Otto et al. 1994	3- " <i>H. heilmannii</i> "
<i>d-</i> Shen, Feng, Dewhirst & Fox, 2001	4- <i>H. salomonis</i>
<i>e-</i> Eaton et al., 1996	
<i>f-</i> Happonen et al., 1998	
<i>g-</i> Jalava et al., 1998	
<i>h-</i> Neiger et al., 1998	
<i>i-</i> Cattoli et al., 1999	
<i>j-</i> Norris et al., 1999	
<i>k-</i> Strauss-Ayali & Simpson, 1999	
<i>l-</i> Strauss-Ayali et al., 2001	FISH; hibridação in situ fluorescente
<i>m-</i> Van den Bulck et al., 2005b	ND; não determinado
<i>n-</i> Wiinberg et al., 2005	* amostras fecais
<i>o-</i> Shojaee Tabrizi et al., 2010	** população 1 e 2 determinação após cultura de 5 biopsias
<i>p-</i> Ghil et al., 2009	*** gatos domésticos/gatos silvestres
<i>q-</i> Moutinho, Thomassian, Watabe, Suzano & Sequeira, 2007	

## 2.4. Patogenia

### 2.4.1 Transmissão

Em qualquer doença infecto-contagiosa, é imprescindível conhecer a forma pela qual o agente contagia ou coloniza uma dada população (El-Zaatari et al., 1997). Considerando o potencial patogénico de várias espécies de *Helicobacter*, é essencial determinar a forma de transmissão destas bactérias. Radin et al. (1990) observaram que, após inoculação com *H. pylori*, cães gnotobióticos transmitiam a bactéria para co-habitantes saudáveis e que alguns desenvolviam esofagites, concluindo que a transmissão ocorreu por via fecal-oral/oral-oral. Esta situação é em tudo semelhante à transmissão de *H. pylori* entre pessoas, na qual se pensa ser essencial a proximidade e contacto físico (Happonen et al., 1998). A observação de transmissão de *H. salomonis* de uma cadela para os seus filhos, ainda durante o período de lactação, é fortemente sugestiva de transmissão oral-oral (Hanninen, Happonen, & Jalava, 1998).

Os próprios sinais clínicos da doença gástrica crónica sugerem uma transmissão oral-oral, uma vez que o vómito é uma característica importante em animais sintomáticos colonizados com *Helicobacter* (Leib, 2005), resultando na conspurcação do meio ambiente com conteúdo estomacal contaminado. Pelo contrário, a diarreia, uma potencial via de transmissão fecal-oral, não é tão característica de gastrites crónicas (Simpson, 2006). Um estudo de Lee, Fox, Otto, Dick & Krakowka (1991) demonstrou que cães colonizados com *H. pylori* transmitiam a bactéria a co-habitantes sãos, enquanto que em ratinhos tal não se verificava, reforçando a possibilidade da ocorrência de transmissão oral-oral, uma vez que os ratinhos são coprófagos e não vomitam. *Helicobacter* spp. pode ocorrer na cavidade bucal de animais de companhia (Recordati et al., 2007). No entanto, a densidade de colonização neste local não reflecte a da mucosa gástrica (Shojaee Tabrizi et al., 2010), sugerindo que os animais podem ser reservatórios transitórios destas bactérias. Assim, um animal saudável pode transmitir a bactéria a outro animal que poderá posteriormente desenvolver uma gastrite crónica considerada idiopática.

É possível detectar *Helicobacter* spp. em amostras fecais de vários animais com recurso a técnicas de PCR (Harper et al., 2002; Oxley, 2004), pelo que não se pode pôr de parte a via de transmissão fecal-oral. A investigação da excreção de espécies de *Helicobacter* por via fecal em animais de companhia tem originado resultados divergentes. Alguns estudos demonstram que é possível detectar ADN de *Helicobacter* spp. (Fox et al., 2002; Ghil et al., 2009; Kostia, Veijalainen, Hirvi, & Hanninen, 2003; Shen et al., 2001) e *H. pylori* (Fox et al., 1996) em amostras fecais. No entanto, as tentativas de isolamento de outras espécies

gástricas a partir de material fecal não obtiveram sucesso (Hanninen et al., 1998). Como a técnica de PCR não permite a diferenciação entre bactérias viáveis e não-viáveis (Recordati et al., 2007), é necessária alguma precaução antes de concluir que a presença de ADN bacteriano em amostras fecais é indicativa de transmissão fecal-oral.

É claro que muitas questões ainda se encontram por esclarecer relativamente ao modo de transmissão de *Helicobacter* spp., mas é possível que a transmissão possa ocorrer através de fomites, não sendo estritamente necessário o contacto entre indivíduos. Há mais que uma década que se sabe que água contaminada com *H. pylori* é uma possível fonte de contaminação em países industrializados (Klein, Graham, Gaillour, Opekun & Smith, 1991), hipótese que veio mais tarde a ser confirmada com a descoberta de que *Helicobacter* spp. é mais resistente ao cloro que *Escherichia coli* (Neiger & Simpson, 2000). Recentemente, um estudo internacional com colaboração de investigadores portugueses demonstrou que, em geral, o género *Helicobacter* tem a capacidade de sobreviver quatro dias em meio aquático (Azevedo et al., 2008). Parece claro que as fomites podem constituir um interveniente importante na transmissão de *Helicobacter*, e que os animais de companhia com vida livre podem estar mais sujeitos a infecção do que os exclusivamente domésticos.

#### 2.4.2 Colonização

Na tentativa de esclarecer o papel de *Helicobacter* spp. na gastrite crónica em animais de companhia, é importante perceber a forma como estas bactérias são capazes de ultrapassar os mecanismos protectores no ambiente gástrico dos animais (Lecoindre et al., 2000). Antes de atingirem a mucosa gástrica, *Helicobacter* spp. têm de sobreviver ao ambiente ácido do estômago, devido ao ácido clorídrico, e simultaneamente contrariar o fluxo natural dos sucos gástricos, que se encontram em constante movimento. Após atingir a zona da mucosa gástrica, *Helicobacter* spp. têm de conseguir aderir à superfície, evitando ser arrastados para o intestino, onde existe bÍlis, ao qual as espécies de *Helicobacter* gástricas não são resistentes (tabela 1). *Helicobacter* possui vários factores de colonização que permitem o seu estabelecimento na mucosa gástrica.

##### *2.4.2.1 H. pylori*

Os factores que permitem a colonização da mucosa gástrica por *H. pylori* já foram amplamente estudados, sendo eles a mobilidade, a enzima urease, a quimiotaxia negativa, a disrupção da polaridade das células gástricas e a expressão de várias adesinas (Haesebrouck et al., 2009).

O primeiro factor a ser investigado foi o da mobilidade, verificando-se que só estirpes de *H. pylori* com capacidade de locomoção são capazes de colonizar o estômago de leitões (Eaton, Morgan & Krakowka, 1989). A mobilidade permite a deslocação das bactérias do lúmen gástrico, onde o pH é ácido, para a mucosa, com pH é mais próximo da neutralidade (Ottemann & Lowenthal, 2002). De igual importância em termos de mobilidade, é a expressão do receptor TlpB, que confere à bactéria uma quimiotaxia negativa em relação à acidez do meio ambiente, movimentando-se rapidamente em direcção a um pH mais alcalino e diminuindo a velocidade de deslocação à medida que o ambiente fica menos ácido (Croxen, Sisson, Melano & Hoffman, 2006). Para todos os efeitos, o receptor TlpB é de facto um detector de pH que permite à bactéria orientar a sua locomoção em direcção à mucosa gástrica e que, ao diminuir a velocidade próximo da mucosa gástrica, facilita a adesão da bactéria à mesma.

A hidrólise da ureia em amónia e dióxido de carbono, uma reacção catalisada pela enzima urease, codificada pelos genes *ureA* e *ureB* (Akada, Shirai, Takeuchi, Tsuda, & Nakazawa, 2000), neutraliza o ácido clorídrico presente no suco gástrico, alcalinizando o ambiente em torno da bactéria e permitindo a sua sobrevivência neste meio inóspito (Marshall, Barrett, Prakash, McCallum & Guerrant, 1990). Parte integral deste sistema de protecção é a bomba de protões Urel, que activa a urease em resposta a uma acidificação do meio que rodeia a bactéria, permitindo a entrada de ureia na célula (Mollenhauer-Rektorschek, Hanauer, Sachs & Melchers, 2002). Em conjunto, a enzima urease e a bomba Urel conferem a *H. pylori* a capacidade de resistir à acidez gástrica nas primeiras fases da infecção, até atingir a mucosa gástrica (Bury-Mone, Skouloubris, Labigne & De Reuse, 2001). Uma vez na mucosa gástrica, a expressão de várias adesinas permitem que a bactéria adira de forma estável à mucosa (Odenbreit, 2005).

A última arma no arsenal de *H. pylori* é a proteína CagA, cujas características citotóxicas serão abordadas na secção seguinte. Tan, Tompkins e Amieva (2009) demonstraram que a ruptura da polaridade das membranas na superfície apical das células da mucosa gástrica, levada a cabo por CagA, permite que *H. pylori* colonize zonas em que não há colonização por outras bactérias de vida livre, por estas serem arrastadas. Este facto, em conjunto com as adesinas e a alteração do pH local por acção da urease, confere a *H. pylori* a capacidade de criar um nicho, no qual a bactéria se nutre e multiplica.

#### 2.4.2.2 Outras espécies de *Helicobacter*

O conhecimento dos factores de colonização noutras espécies de *Helicobacter* é muito limitado, mas pensa-se que sejam semelhantes aos já descritos para *H. pylori* (Haesebrouck

et al., 2009). Apenas se encontram descritas a importância da mobilidade na colonização por *H. felis* (Josenhans, Ferrero, Labigne & Suerbaum, 1999), da enzima urease na colonização por *H. mustelae* (Andrutis et al., 1995) e das adesinas na colonização de gatos por *Helicobacter* spp. (Lecoindre et al., 2000). Contudo, a presença dos genes *ureA* e *ureB* em várias outras espécies de *Helicobacter* (Pot et al., 2007) permite inferir que, tal como em *H. pylori*, a enzima urease contribui para a colonização da mucosa gástrica pelos restantes membros do grupo de *Helicobacter* urease positivas (Baele et al., 2004; Gueneau & Loiseaux-De Goer, 2002; Haesebrouck et al., 2009).

#### 2.4.3 Factores de virulência

Os factores de virulência conferem às bactérias o potencial para desencadear um processo patológico no hospedeiro. O conhecimento destes factores permite uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença e o desenvolvimento de estratégias para a controlar e/ou prevenir.

Entre estes factores encontram-se a endotoxina e as exotoxinas. A endotoxina é, por definição, um componente da parede celular das bactérias de Gram negativo, libertada após a morte das mesmas. As exotoxinas, em contraste, são substâncias libertadas pelas bactérias que induzem uma resposta específica do organismo hospedeiro, frequentemente nociva. Estas exotoxinas podem ser produzidas na sequência do metabolismo normal da bactéria, ou podem ter uma acção específica de alteração das células alvo.

No caso de *Helicobacter*, a inoculação em leitões de formas cocóides inactivas da bactéria não licitou qualquer tipo de resposta nociva do hospedeiro (Eaton, Catrenich, Makin & Krakowka, 1995), sugerindo que os factores de virulência expressos por *Helicobacter* são essencialmente exotoxinas, com a possível excepção da enzima urease (Haesebrouck et al., 2009).

##### *2.4.3.1 Factores de virulência de Helicobacter pylori*

Os factores de virulência de *H. pylori* têm sido amplamente investigados, devido à sua importância na patogénese de gastrites crónicas e neoplasias gástricas no Homem. Até à data, foram identificadas a enzima urease e as proteínas CagA e VacA, como factores de virulência cuja presença tem a capacidade de alterar significativamente o metabolismo normal das células da mucosa gástrica (Haesebrouck et al., 2009). Mais recentemente, tem sido investigada a capacidade de *H. pylori* interferir com a fosforilação da cadeia leve da

miosina (Wroblewski et al., 2009) e de interagir com os receptores “sonic hedgehog” (Lee et al., 2010).

Os factores de virulência abaixo referidos não estão universalmente presentes em todas as estirpes de *H. pylori*, o que explica a existência de uma grande variação na capacidade desta bactéria de causar alterações gástricas (De Bock et al., 2005; Guttman & Finlay, 2009).

#### 2.4.3.1.1 Urease

A presença dos genes *ureA* e *ureB* já foi descrita como factor importante na capacidade de colonização, mas um dos produtos da urease também tem um forte componente virulento. A amónia, produzida como consequência da hidrólise da ureia, é citotóxica para as células gástricas, provocando a sua lise (Smoot, Mobley, Chippendale, Lewison & Resau, 1990; Zhu et al., 2002), libertando assim nutrientes importantes para a bactéria.

#### 2.4.3.1.2 CagPAI

O CagPAI é uma ilha de patogenicidade identificada no genoma de *H. pylori* que codifica para proteínas específicas capazes de causar alterações celulares que conduzem ao desenvolvimento de doença gástrica (Censini et al., 1996; Covacci et al., 1993). A CagPAI é responsável pela codificação de 18 proteínas que formam uma estrutura tipo IV, semelhante a uma seringa, conferindo a *H. pylori* a capacidade de penetrar na célula alvo, injectando a proteína CagA e peptidoglicano (Asahi et al., 2000; Christie & Vogel, 2000). Estas proteínas provocam alterações morfológicas (Moese et al., 2004; Naumann et al., 1999; Segal, Cha, Lo, Falkow & Tompkins, 1999; Selbach, Moese, Backert, Jungblut & Meyer, 2004) e respostas pró-inflamatórias (Odenbreit, Gebert, Puls, Fischer & Haas, 2001; Odenbreit et al., 2000) nas mesmas. Para além disso, a interacção entre a membrana celular das células-alvo com a estrutura tipo IV, leva à libertação de citocinas pro-inflamatórias (Naumann et al., 1999). Recentemente, Viala et al. (2004) demonstraram que a injeção de peptidoglicano também é responsável pela resposta pro-inflamatória das células-alvo, uma resposta que aparenta ser mais acentuada do que a provocada pela CagA (figura 3).

Para além de codificar a estrutura tipo IV e a CagA, a CagPAi exibe ainda a capacidade de promover a apoptose de linfócitos T, através de mecanismos ainda não completamente conhecidos (Paziak-Domanska, Chmiela, Jarosinska & Rudnicka, 2000; Wang et al., 2001).

Todavia, a relação entre a presença de CagA e capacidade patogénica de *H. pylori*, pode não ser assim tão linear. Apesar de a maior parte das estirpes CagA<sup>+</sup> de *H. pylori* serem mais patogénicas do que as CagA<sup>-</sup> (Beales, Crabtree, Scunes, Covacci & Calam, 1996; Hamlet, Thoreson, Nilsson, Svennerholm & Olbe, 1999; Kuipers, Perez-Perez, Meuwissen & Blaser, 1995; Peek et al., 1995), tal nem sempre se verifica (Go & Graham, 1996; Kusters et al., 2006), indicando que ainda existe necessidade de clarificar esta questão.

#### 2.4.3.1.3 VacA

Este factor de virulência parece conceder a *H. pylori*, pelo menos em parte, a capacidade de provocar neoplasias e úlceras gástricas (Atherton et al., 1995), através das alterações que promove nas células alvo. VacA é uma proteína que permanece ligada à membrana da bactéria, libertando-se apenas quando esta entra em contacto íntimo com a célula alvo (Ilver, Barone, Mercati, Lupetti, & Telford, 2004). Este comportamento é fortemente sugestivo da presença de receptores para VacA na membrana das células da mucosa gástrica (Fitchen et al., 2005), que ainda não foram identificados (figura 3). Uma vez em contacto com a célula-alvo, ocorre a libertação de VacA, podendo ter cinco acções possíveis (Cover & Blanke, 2005): induzir a vacuolização (figura 3) (Cover & Blaser, 1992); promover a apoptose da célula; induzir uma resposta pro-inflamatória; formar poros na membrana celular; e penetrar no espaço extracelular do tecido gástrico (Haesebrouck et al., 2009; Kusters et al., 2006). A apoptose celular é provocada por VacA quando, após a penetração na célula, esta se liga à membrana interna da mitocôndria (figura 3) (Cover, Krishna, Israel & Peek, 2003; Kuck et al., 2001; Willhite & Blanke, 2004). A criação de poros através da membrana bi-lipídica da célula-alvo resulta num aumento da permeabilidade da mesma, originando a libertação de nutrientes e catiões (figura 3) que são depois utilizados nos processos metabólicos de *H. pylori* (Kusters et al., 2006; Montecucco & de Bernard, 2003). Ao penetrar através das junções ocludentes entre as células gástricas (figura 3), VacA interage com granulócitos, monócitos e linfócitos, inibindo a proliferação e activação de linfócitos T (Kusters et al., 2006). Esta alteração das junções ocludentes e a penetração de VacA, parece resultar de algum grau de sinergia entre esta proteína e a CagA (Guttman & Finlay, 2009).

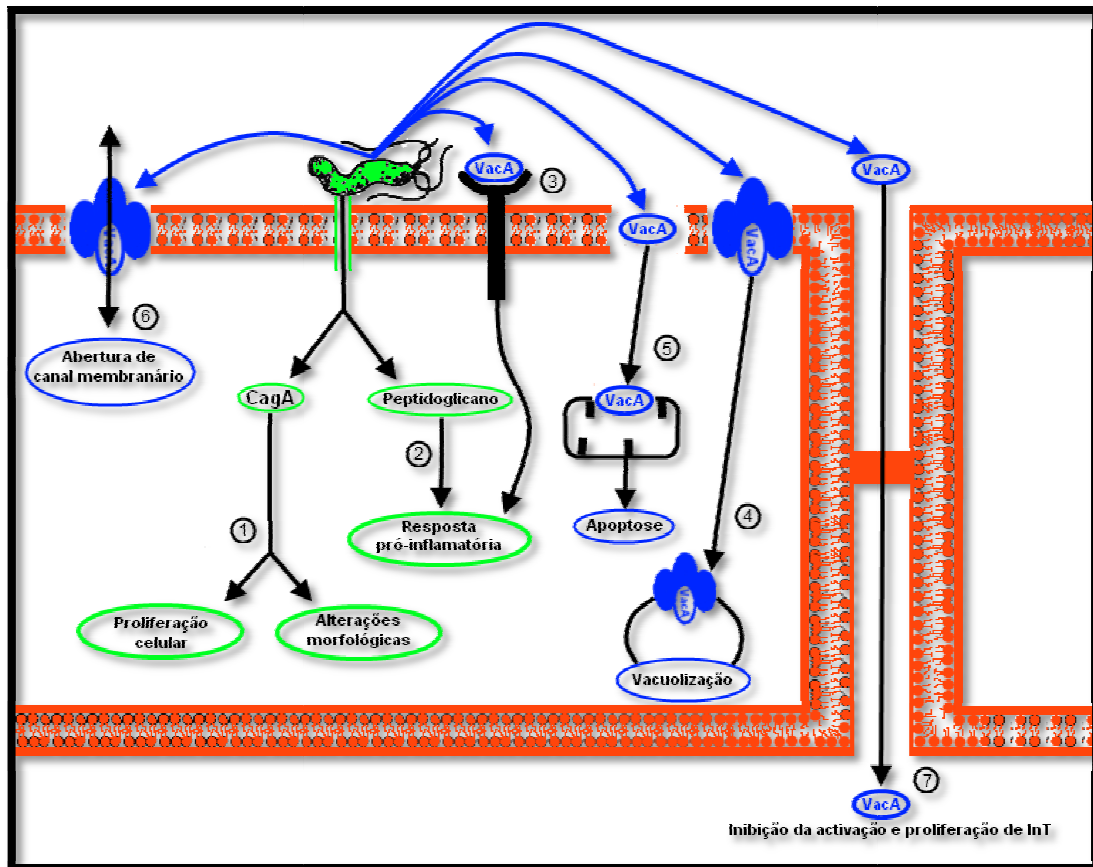


Figura 3: Representação do envolvimento das proteínas CagA e VacA na patogênese de doença gástrica provocada por *H. pylori*.

Adaptado de Kusters et al. (2006). InT – linfócitos T

#### 2.4.3.2 Factores de virulência de outras espécies de *Helicobacter*

Não existe muita informação disponível sobre os factores de virulência de outras espécies de *Helicobacter*. Contudo, uma vez que todas as espécies de *Helicobacter* gástricas são urease positivas, é muito provável que a produção de amónia resultante da actividade desta enzima tenha o mesmo efeito sobre as células da mucosa gástrica (Baele et al., 2004; Haesebrouck et al., 2009). Relativamente a *Helicobacter* colonizadores da mucosa gástrica de animais de companhia, já foram sequenciados os genes *ureA* e *ureB* de *H. felis*, *H. salomonis* (Baele et al., 2004), *H. bizzozeronii* (Zhu et al., 2002), *H. baculiformis* (Baele et al., 2008b) e “*H. heilmannii*” (Dieterich et al., 1998; O'Rourke et al., 2004; Solnick, O'Rourke, Lee & Tompkins, 1994). Interessantemente, a enzima urease de “*H. heilmannii*” aparenta ter uma actividade diferente das restantes (Solnick & Schauer, 2001).

As proteínas CagA e VacA, conhecidas como potentes factores de virulência de *H. pylori*, não foram identificadas em *H. felis* (Mohammadi, Redline, Nedrud & Czinn, 1996), nem em *H. bizzozeronii* (De Bock et al., 2006). Todavia, estas bactérias têm a capacidade de provocar alterações na mucosa gástrica de ratinhos (De Bock et al., 2005), tal como *H. pylori* (Peek et al., 2000) em gerbilos. Mesmo sem estas proteínas, *H. felis* promove degenerescência das células da mucosa gástrica em cães (Peyrol, Lecoindre, Berger, Deleforge & Chevallier, 1998) sugerindo que ainda existem factores de virulência por identificar em *Helicobacter*.

#### 2.4.4 Resposta do hospedeiro à colonização

A reacção de um hospedeiro à colonização por uma bactéria caracteriza-se por dois tipos de respostas, a imunidade inata e a imunidade específica, com as suas vertentes humoral e celular. Sabe-se que ambas intervêm no desenvolvimento de alterações gástricas provocadas por *Helicobacter* spp. (Portal-Celhay & Perez-Perez, 2006).

##### *2.4.4.1 Imunidade inata*

O reconhecimento de padrões moleculares de origem bacteriana (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) é feito através dos receptores TLR, presentes em vários tipos de células. Nos macrófagos, o TLR2 é considerado o interveniente mais importante no reconhecimento de *Helicobacter* spp. (Mandell et al., 2004). A ligação do PAMP ao receptor, induz a activação das células, com produção das citocinas pro-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8, também libertadas pelas próprias células da mucosa gástrica em resposta à presença de CagA (figura 4), e que funcionam como agentes quimiotáticos causando uma infiltração local de granulócitos (Crabtree, 1996) e promovendo apoptose celular (Monack, Mueller & Falkow, 2004). O resultado final é a presença de um infiltrado inflamatório que marca o início da alteração gástrica (Monack, et al., 2004). Os macrófagos também libertam óxido nítrico (NO), que contribui para a eliminação da bactéria (Portal-Celhay & Perez-Perez, 2006).

##### *2.4.4.2 Imunidade específica - resposta celular*

A resposta celular é inicialmente levada a cabo por neutrófilos aos quais se juntam, numa fase posterior, macrófagos, linfócitos T e B e plasmócitos (Goodwin, Armstrong & Marshall, 1986). Os macrófagos, através da IL-12, estimulam a diferenciação de linfócitos Th0 em

linfócitos Th1 e Th2 (figura 4) (Portal-Celhay & Perez-Perez, 2006). Os linfócitos Th1 são predominantes na resposta do hospedeiro à proteína VacA de *H. pylori*, sendo responsáveis pela indução de IL-2 e IFN- $\gamma$  (figura 4) (Tummala, Keates & Kelly, 2004), que mantém a inflamação da mucosa gástrica.

#### *2.4.4.3 Imunidade específica - resposta humoral*

A resposta humoral, com a sua característica produção de imunoglobulinas (Ig) por plasmócitos (figura 4) em resposta à estimulação antigénica (Ag), intervém na resposta do hospedeiro a *Helicobacter* spp. através da produção de IgA e IgG (Strauss-Ayali et al., 2001). Estas imunoglobulinas promovem a fagocitose por PMN (Tosi & Czinn, 1990), contribuindo assim para a eliminação de *Helicobacter*.

#### *2.4.4.4 Mecanismos de evasão de Helicobacter ao sistema imunológico*

A sobrevivência de *Helicobacter* na mucosa gástrica do hospedeiro requer a presença de mecanismos que permitam a evasão às defesas do sistema imunológico do hospedeiro ou ao seu comprometimento. Até à data, estão descritos dois mecanismos. O primeiro é levado a cabo pela proteína bacteriana VacA que bloqueia a proliferação de linfócitos T, interferindo com a libertação de IL-2 (figura 4) e permitindo a manutenção da colonização de forma crónica (Boncristiano et al., 2003). A capacidade de inibir a libertação de NO pelos macrófagos, através da enzima arginase, evitando assim a exposição a este composto nocivo, é o segundo mecanismo de evasão conhecido (Das, Lahiri & Chakravorty, 2010; Gobert et al., 2001).

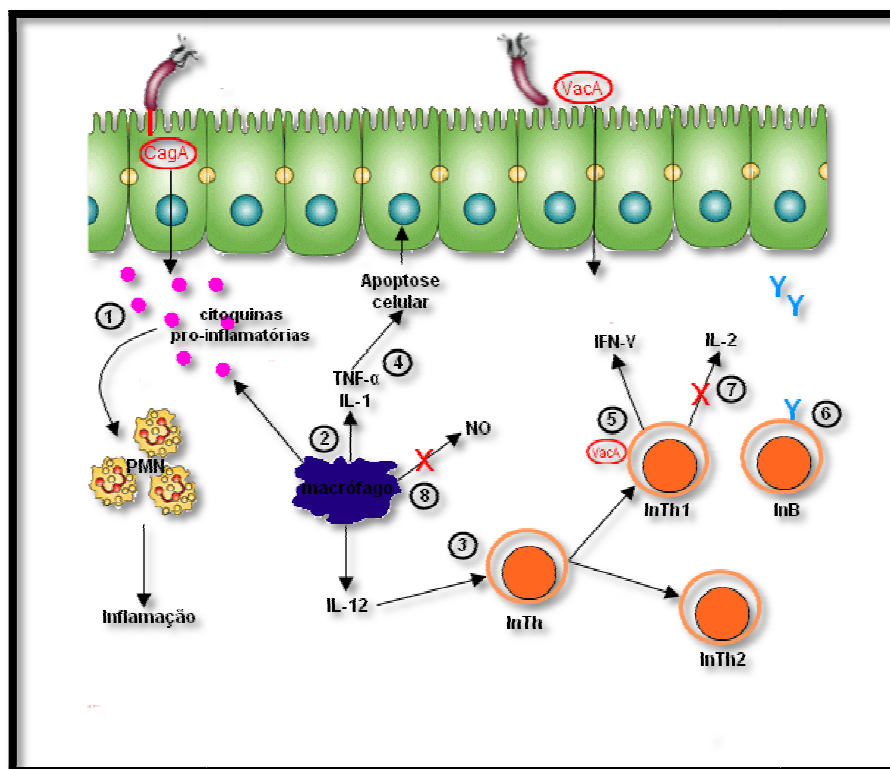


Figura 4: Resposta do hospedeiro à presença de *Helicobacter* e mecanismos de evasão da bactéria  
Adaptado Monack et al. (2004) In - linfócito

## 2.5 Sinais Clínicos

Numa gastrite crónica provocada por *Helicobacter*, o sinal clínico mais reportado é o vómito alimentar ou biliar, sendo possível existir perda de apetite e de peso (Simpson, 2006). Com o desenvolvimento de úlceras gástricas, é possível observar-se melena ou hematoquesia (Lecoindre et al., 2000). Devido à presença de uma intensa reacção inflamatória no estômago, os quimiorreceptores presentes na mucosa gástrica enviam sinais vagosimpáticos para o centro do vómito, estimulando os receptores 5-hidroxytriptamina<sub>1A</sub> e  $\alpha$ 2-adrenérgicos e provocando o vómito (Slatter, 2003), como forma de tentar controlar o agente agressor (G. Ferreira-Dias, Comunicação pessoal, 2005).

Relativamente a exames complementares de diagnóstico, o hemograma e padrões bioquímicos encontram-se frequentemente normais (Ettinger & Feldman, 2009; Jergens et al., 2009), sendo possível observar a ocorrência de anemia no caso da presença de úlceras gástricas (Lecoindre et al., 2000).

## 2.6 Diagnóstico

Existem várias estratégias de diagnóstico que podem ser seguidas para confirmar a colonização da mucosa gástrica por *Helicobacter*, tais como: evidenciação da colonização por ELISA ou PCR, detecção de ureia e, ainda, observação microscópica da presença de espiroquetas na mucosa gástrica.

### 2.6.1 Testes não invasivos

#### *2.6.1.1 Ureia no ar expirado*

Este foi o primeiro teste não-invasivo a ser utilizado para confirmação da presença de *Helicobacter* spp. em pacientes com sintomatologia gástrica, e tem como base a capacidade de *Helicobacter* transformar ureia em amónia e dióxido de carbono pela acção da enzima urease. Ureia marcada com os isótopos  $^{13}\text{C}$  ou  $^{14}\text{C}$ , é administrada ao paciente, por via oral, sendo posteriormente hidrolisada pela urease de *Helicobacter*. O resultado da clivagem é a produção de dióxido de carbono marcado com os isótopos, que se difunde para a circulação sanguínea, de onde é excretada por via pulmonar, podendo ser medida no ar expirado (Atherton & Spiller, 1994).

No Homem, esta técnica é amplamente utilizada, existindo correlação entre um resultado positivo e a presença de *Helicobacter* na mucosa gástrica (Graham, 2009; Schlenker & Surawicz, 2009). No entanto, a sua utilidade para evidenciar espécies gástricas de *Helicobacter* em animais de companhia tem-se revelado limitada, devido à presença potencial de outras bactérias com a capacidade de hidrolisar ureia, como *Proteus* spp. (Cornetta, Simpson, Strauss-Ayali, McDonough & Gleed, 1998; Strauss-Ayali et al., 1999), e à necessidade de instalações hospitalares especializadas (Neiger & Simpson, 2000; Simpson, 2005).

#### *2.5.1.2 Esfregaço da parede da mucosa gástrica*

A utilização da endoscopia para identificar possíveis causas de vómito, corrente em medicina humana, tem vindo a ser adoptada cada vez mais em medicina veterinária (Ettinger & Feldman, 2009). O endoscópio permite observar cuidadosamente a mucosa gástrica, obter biopsias para avaliação histopatológica, e ainda realizar esfregaços da mucosa. Um esfregaço pode ser obtido mediante a utilização de uma pequena escova ou por aposição, depois de se ter obtido uma biopsia, observando-se a presença de

espiroquetas com recurso a microscopia óptica. A utilização da escova para a realização do esfregaço tem ainda a vantagem de permitir a amostragem de uma área mais ampla, evitando assim falsos resultados negativos devido à distribuição focal da bactéria (Happonen et al., 1996a). A coloração indicada para melhor visualização das espiroquetas é May-Grünwald-Giemsa, ficando as bactérias bem distintas do fundo (Canejo Teixeira, Noiva, Peleteiro, & Vilela, 2010).

### 2.5.1.3 Serologia

Em humanos, a utilização de ELISA para detecção de infecção de *Helicobacter* tem-se revelado específica e sensível (Fox et al., 1995a; Strauss-Ayali et al., 2001). Nesta técnica são utilizados Ag (antígeno) semi-purificados de *H. pylori* para detecção de IgG anti-*Helicobacter* em circulação sanguínea, produzida na sequência de um processo de seroconversão após infecção pela bactéria (Neiger & Simpson, 2000).

Apesar de haver uma grande homogeneidade entre os Ag de *H. felis*, *H. pylori* e *H. bizzozeronii*, a utilização de ELISA em cães e gatos tem tido resultados díspares (Fox et al., 1995a; Wiinberg et al., 2005). Em ambas as espécies, a seroconversão em resposta a *Helicobacter* é irregular. Strauss-Ayali et al. (1999) demonstraram que, em alguns cães com colonização densa de *Helicobacter* não ocorreu seroconversão, sugerindo que um défice na resposta humoral em cães poderia afectar os resultados do ELISA. Wiinberg et al. (2005) observaram altos títulos de IgG em cães não colonizados, advertindo para a possibilidade da persistência de Ac após a eliminação da bactéria.

A utilização de *H. felis* para a obtenção de material antigénico em testes de ELISA tem permitido demonstrar uma relação entre a presença de IgG e colonização com *H. felis* e "*H. heilmannii*" (Strauss-Ayali et al., 2001). A utilização de serologia para determinar o estado de colonização por *Helicobacter* ainda requer optimização (Hodzic, McKisic, Feng & Barthold, 2001).

## 2.6.2 Testes invasivos

### 2.6.2.1 Histopatologia

O diagnóstico histopatológico de gastrite crónica por *Helicobacter* baseia-se na evidenciação das bactérias em biopsias de estômago, com ou sem o recurso a colorações específicas

(Neiger & Simpson, 2000; Prachasilpchai et al., 2007). Tem a vantagem de apresentar sensibilidade e especificidade elevadas, quando a observação é realizada por um patologista experiente (Wiinberg et al., 2005), e a desvantagem de requerer um procedimento invasivo, demorado e dispendioso (Strauss-Ayali et al., 1999). O facto da distribuição das bactérias ser focal, e não dispersa, cria uma outra dificuldade para o diagnóstico histopatológico, originando a necessidade da recolha de várias amostras de várias regiões, para garantir uma boa representação do grau de colonização do animal (Chisholm, 2003; Neiger et al., 1998; Simpson, Strauss-Ayali, McDonough, Chang, & Valentine, 1999).

#### 2.6.2.2 PCR

O desenvolvimento da técnica de PCR, em que sequências oligonucleotídicas iniciadoras, designados *primers*, são utilizadas para amplificar uma zona específica numa cadeia de ADN, com recurso a passos de desnaturação, ligação de *primers* e extensão (figura 5) (Mullis & Faloona, 1987), provocou uma revolução nas áreas de biologia molecular e de diagnóstico (Lutz, Leutenegger & Hofmann-Lehmann, 1999). Esta técnica de diagnóstico distingue-se de todas as outras pela sua capacidade de, através de *primers* específicos, identificar a nível de espécie *Helicobacter* presentes na mucosa gástrica, com grande sensibilidade e especificidade (Al-Soud et al., 2003; Albuquerque, Mendes, Santos, Moradas-Ferreira & Tavares, 2009). Todos os testes de diagnóstico descritos até agora têm a capacidade de identificar a presença da bactéria mas não de as distinguir a nível de espécie (Germani et al., 1997; Happonen et al., 1996a).

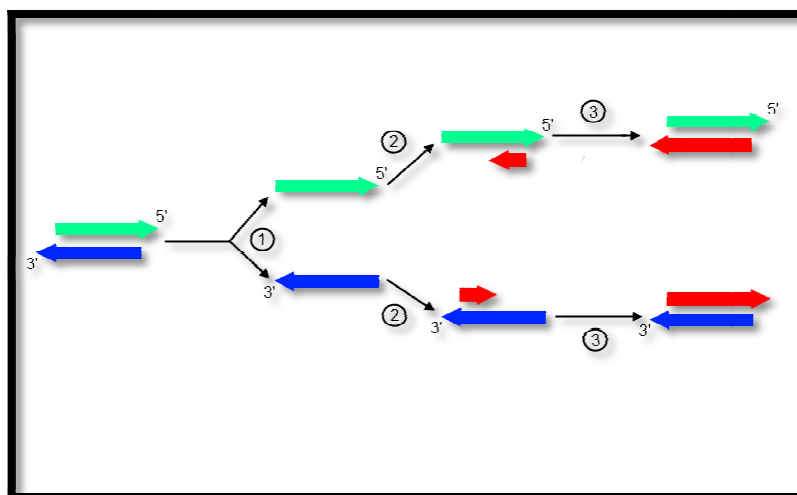


Figura 5: Representação dos três passos utilizados num ciclo na técnica de PCR. Desnaturação da cadeia de ADN (1); Ligação dos *primers* (2); Extensão (3).

A utilização da técnica de PCR requer um primeiro passo de extração de ADN das amostras biológicas, podendo ser estas ser tecido, saliva ou outros, tendo a vantagem de amplificar ADN bacteriano mesmo quando presente em quantidades diminutas (Prachasilpchai et al., 2007).

O passo mais importante de um diagnóstico por PCR prende-se com a utilização de *primers* adequados que têm de ser criteriosamente selecionados para que amplifiquem especificamente o ADN da bactéria em questão (Albuquerque et al., 2009; Lutz et al., 1999). Os *primers* mais utilizados na pesquisa de *Helicobacter* spp. são os que amplificam o gene 16s rRNA bacteriano (Neiger & Simpson, 2000). O facto de ser uma região altamente conservada ao longo do género (Sontakke, Cadenas, Maggi, Diniz & Breitschwerdt, 2009), juntamente com a grande homogeneidade do genoma de algumas espécies de *Helicobacter* (Gueneau & Loiseaux-De Goer, 2002; Handt et al., 1994), nomeadamente *H. felis*, *H. bizzozeronii*, "*H. heilmannii*" e *H. salomonis* (Baele et al., 2004; Norris et al., 1999; Solnick & Schauer, 2001) dificultou, durante algum tempo, o desenvolvimento de *primers* que permitissem a diferenciação entre espécies (Al-Soud et al., 2003; Shen et al., 2001). A sequenciação do genoma de várias espécies de *Helicobacter* tem permitido o desenho de *primers* específicos que amplificam os genes da urease (Dieterich et al., 1998; Jalava et al., 1997; O'Rourke et al., 2004; Zhu et al., 2002), entre outros (Mikkonen, Karenlampi & Hanninen, 2004a), resolvendo alguns dos problemas relacionados com a identificação a nível de espécie (Baele et al., 2008a).

A incapacidade de PCR diferenciar entre a presença de bactérias viáveis e ADN oriundo de bactérias não viáveis, constitui uma limitação desta técnica (Recordati et al., 2007).

#### 2.6.2.3 FISH

A técnica de FISH baseia-se na utilização de sondas oligonucleotídicas ligadas a um fluorocromo que hibridam com uma bactéria específica numa amostra, hibridação essa que é depois observada com recurso a um microscópio de fluorescência (Amann, Fuchs & Behrens, 2001). Tem sido aplicada com sucesso para identificação de *Helicobacter* a nível de espécie em amostras de tecido gástrico fixadas em formol, incluídas em parafina (Priestnall et al., 2004; Trebesius, Adler, Vieth, Stolte & Haas, 2001). A técnica tem-se revelado sensível e específica, apresentando a vantagem de permitir visualizar a localização específica da bactéria (Jergens et al., 2009).

## 2.7 Terapêutica

### 2.7.1 Indicações

A terapêutica específica contra *Helicobacter* está indicada em cães e gatos com vômito crônico, nos quais outras causas possíveis (sistêmicas, dietéticas, etc.) já tenham sido rejeitadas pelo clínico (Ettinger & Feldman, 2009; Simpson, 2005). Alguns autores defendem a necessidade da demonstração das bactérias no ambiente gástrico do paciente (Solnick & Schauer, 2001), enquanto outros admitem o tratamento com base no conhecimento da incidência epidemiológica na região (Graham, 2009 ; K.W. Simpson, comunicação pessoal, Maio 2010).

### 2.7.2 Antibioterapia

Em medicina humana, a terapêutica baseia-se numa antibioterapia dupla ou tripla (tabela 3), com a adição de um fármaco inibidor das bombas de prótons, como o omeprazol, devido ao efeito negativo dos sucos gástricos sobre a actividade dos compostos administrados (Lecoindre et al., 2000). Para minimizar o efeito negativo do pH ácido presente no ambiente gástrico, Lin et al. (2009) desenvolveram nanopartículas carregadas positivamente capazes de proteger os antibióticos, libertando-os quando interagem com a mucosa gástrica, garantindo assim máxima eficácia.

Contudo, em medicina veterinária verificou-se que a adição de famotidina, um antagonista dos receptores de histamina 2, não melhorou a resposta à terapêutica em cães (Leib, Duncan & Ward, 2007) pondo em questão a necessidade de utilizar compostos que modificam o ambiente gástrico em animais de companhia e reforçando a importância de simplificar a terapêutica para aumentar a cooperação dos proprietários em seguir rigorosamente as indicações terapêuticas.

A utilização de clavulanato de amoxicilina 20 mg/kg PO BID, claritromicina 7,5 mg/kg PO BID, metronidazole 10 mg/kg PO BID durante 14 dias (Simpson, 2010) e amoxicilina 22mg/kg PO BID, metronidazole 11 – 15 mg/kg PO BID, bismuto subsalicilato 0,22ml/kg PO TID/QUID durante 21 dias (Jergens et al., 2009) são, neste momento, os regimes terapêuticos considerados mais eficazes para cães e gatos.

Tabela 3: Alguns compostos comumente utilizados em medicina humana para tratamento de gastrite crônica relacionada com *H. pylori* , em conjunto com omeprazole.

<b>Tratamentos utilizados em medicina humana</b>	<b>Ref.</b>
amoxicilina/metronidazole + claritromicina	Malfertheiner et al., 2002
bismuto + metronidazole + tetraciclina	Malfertheiner et al., 2002
furazolidina + amoxicilina com ácido clavulânico + subcitrato de bismuto	Abbas et al., 2009
levofloxacina + amoxicilina	Pontone, Standoli, Angelini & Pontone, 2010
amoxicilina + claritromicina + metronidazole	Wu et al., 2010

### **3. *Helicobacter* spp. numa amostra populacional**

#### **3.1 Objectivos do estudo**

Apesar de haver vários indícios de que *Helicobacter* tem a capacidade de provocar gastrites crónicas em animais de companhia (Bridgeford et al., 2008; Jergens et al., 2009; Leib et al., 2007; Takemura et al., 2009), esta ligação directa ainda não foi estabelecida (Haesebrouck et al., 2009; Leib et al., 2007).

Para melhor clarificar esta questão, são necessários mais estudos, desenhados para preencher lacunas já identificadas no conhecimento: a existência de poucos estudos avaliando a prevalência de *Helicobacter* em varias populações (De Groote et al., 2005; Erginsoy & Sozmen, 2006; Fox, 2002); a necessidade de avaliar a prevalência individual de cada espécie de *Helicobacter* (Solnick & Schauer, 2001; Strauss-Ayali et al., 2001; Wiinberg et al., 2005); e a utilização de critérios padronizados para a avaliação de lesões histopatológicas (Leib et al., 2007; Neiger & Simpson, 2000).

Este estudo contempla cada uma destas questões, utilizando um critério padronizado para a avaliação histopatológica (Day et al., 2008) e avaliando a prevalência de *Helicobacter* numa população de animais de companhia ainda não estudados, através da utilização da técnica de PCR.

Pretende-se assim criar uma base de conhecimento acerca da prevalência e distribuição de *Helicobacter* spp. em Portugal, por amostragem numa população típica, por forma a reunir informação que permita ao clínico tomar decisões fundamentadas quanto ao tratamento de gastrites idiopáticas em cães e gatos com base em dados epidemiológicos (Graham, 2009).

#### **3.2 Materiais e métodos**

##### **3.2.1 População sujeita a investigação**

As amostras utilizadas neste estudo foram recolhidas num total de 129 animais. Destes, 8 eram animais presentes à consulta aos quais foram realizadas biopsias, 28 eram animais presentes para consulta aos quais foram efectuadas recolhas de amostras fecais, e 95 eram cadáveres presentes para necrópsia. A origem das amostras, recolhidas entre Setembro de 2009 e Junho de 2010, encontra-se discriminada na figura 6.

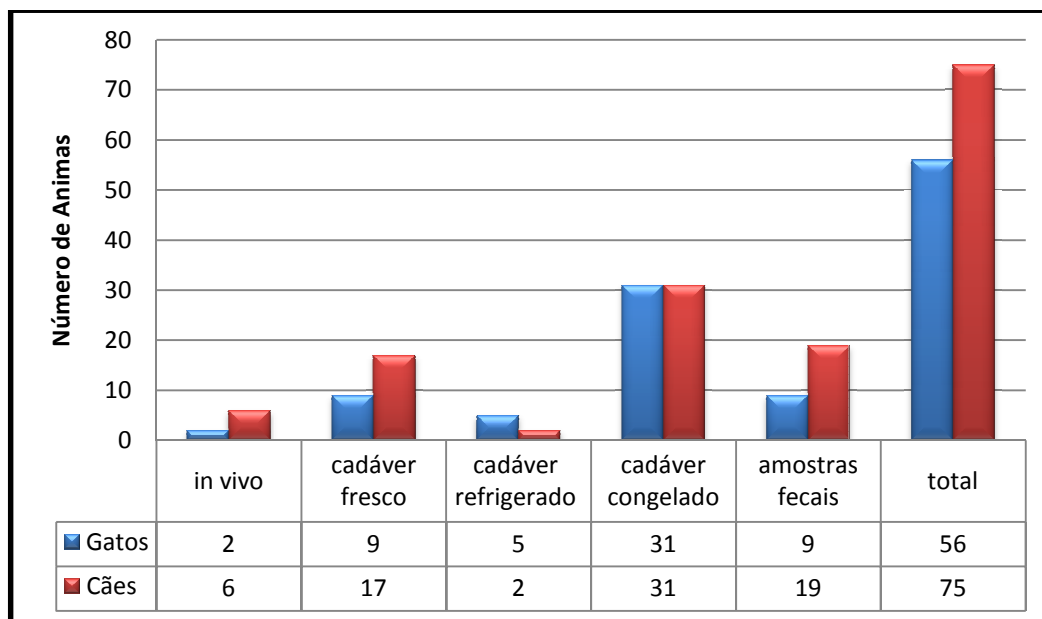


Figura 6: Origem das amostras recolhidas da população em estudo.

### 3.2.2 Critérios de inclusão

#### *3.2.2.1 Colheitas in vivo*

As colheitas de amostras *in vivo* foram efectuadas a quatro cães que se apresentaram à consulta externa do Hospital Escolar da FMV/UTL, e a dois gatos e um cão que se apresentaram à consulta na Clínica Veterinária das Laranjeiras, em Lisboa. Todos os animais apresentavam sinais clínicos gastrointestinais, caracterizados por vómito acompanhado ou não de diarreia, sem causa sistémica aparente. Foi obtido consentimento informado dos donos dos animais que integram o estudo.

#### *3.2.2.2 Colheitas post-mortem*

As colheitas de amostras *post-mortem* foram realizadas em cadáveres de canídeos e felídeos sujeitos a necropsia no Serviço de Anatomia Patológica na FMV/UTL durante o período referido. As amostras colhidas de cadáveres que se encontravam frescos ou refrigerados, sem sinais de decomposição avançada, foram consideradas tanto para análise histopatológica como PCR, enquanto amostras de cadáveres congelados foram consideradas exclusivamente para análise por PCR, uma vez que o processo de congelação altera consideravelmente o aspecto microscópico dos tecidos e órgãos.

### 3.2.3 Amostragem

#### *3.2.3.1 Amostras Fecais*

Foram recolhidas amostras fecais a 32 animais com vómito crónico, presentes à consulta externa do Hospital Escolar da FMV/UTL; destes 21 eram cães e 11 gatos, com idades médias de 5,7 e 5,4 anos respectivamente. As amostras foram voluntariamente recolhidas pelos donos que aceitaram participar no estudo, representando uma adesão de 62,5% e um total de 20 amostras fecais.

#### *3.2.3.2 Biopsias in vivo*

Foram incluídos neste grupo oito animais submetidos a laprotomia exploratória e endoscopia, seis cães e dois gatos, na Unidade de Cirurgia do Hospital Escolar da FMV/UTL (n=4) e na Clínica Veterinária das Laranjeiras (n=4). Estas amostras foram sujeitas a processamento para análise por PCR e histopatologia, com a excepção de um cão e um gato, cujas amostras eram demasiado pequenas para análise histopatológica tendo sido apenas sujeitas a análise por PCR, e um cão cuja amostra foi sujeita a análise histopatológica e de um esfregaço por aposição uma vez que uma amostra para análise por PCR não foi facultada pelo clínico.

#### *3.2.3.3 Amostras de cadáveres*

Dos animais sujeitos a necrópsia no Serviço de Anatomia Patológica na FMV/UTL, foram recolhidas amostras estomacais para análise por PCR de 95 animais - 50 cães e 45 gatos - com uma média de idades de 6,5 e 7 anos, respectivamente, dos quais 31 foram submetidos a análise histopatológica (18 cães e 13 gatos).

### 3.2.4 Recolha de Amostras

#### *3.2.4.1 Cadáveres*

A remoção dos estômagos da cavidade abdominal, a sua separação do esófago e duodeno, a abertura ao longo da grande curvatura e a remoção do conteúdo estomacal foram efectuadas conforme descrito por Happonen et al. (1996a). Os estômagos foram lavados brevemente em água corrente, e foram utilizadas ansas descartáveis esterilizadas para realizar os esfregaços da parede gástrica, em substituição das escovas de endoscopia como previamente descrito (Happonen et al., 1996a). Foram assim obtidos esfregaços do fundo,

corpo e antro de cada órgão e foram recolhidas amostras destas três regiões para posterior análise. As amostras destinadas a análise molecular, por PCR, foram mantidas congeladas a -80°C até processamento, e as destinadas a análise histopatológica foram imersas em formol a 10% (Merck).

#### 3.2.4.2 *In vivo*

Foram recolhidos dois tipos de amostras *in vivo*: biopsias gástricas e amostras fecais. As biopsias gástricas foram recolhidas de cães e de gatos submetidos a laparoscopia exploratória na Unidade de Cirurgia no Hospital Escolar da FMV/UTL e na Clínica Veterinária das Laranjeiras, após consentimento dos donos. Na FMV/UTL, os gatos foram pré-medicados com medetomidina 0,08 mg/kg (Domitor®, Esteve) e quetamina 5 mg/kg (Imalgene®, Merial) enquanto que os cães foram pré-medicados com acepromazina 0,1 mg/kg (Calmivet®, Vétoquinol) e butorfanol 0,15 – 0,2 mg/kg (Dolorex®, Intervet). A indução em ambas as espécies foi feita com propofol (Lipuro® 1% Braun) e a anestesia mantida com isoflurano (Forane®, Abbott Laboratorios, LTD.). Os pacientes da Clínica Veterinária das Laranjeiras submetidos a endoscopia foram pré-medicados com medetomidina 0,08 mg/kg (Domitor®, Esteve) e butorfenol 0,1 mg/kg (Dolorex®, Intervet) enquanto a indução foi feita com propofol (Lipuro® 1% Braun) e a anestesia mantida com isoflurano. O número de amostras colhidas variou entre uma e três, consoante o acesso cirúrgico e a estabilidade do paciente. As amostras para histopatologia foram colocadas em formol a 10% (Merck) enquanto amostras para PCR foram congeladas a -80°C até processamento.

As amostras fecais foram voluntariamente colhidas pelos donos dos pacientes incluídos no estudo para frascos de plástico com tampa de rosca (Deltalab) e mantidas a -80°C até processamento.

#### 3.2.5 Processamento de amostras para análise histopatológica

As amostras de tecido gástrico fixadas em formol a 10% foram submetidas a análise macroscópica, cortadas e colocadas em cassetes (Labometer), imersas em formol a 10% (Merck) e seguidamente colocadas no processador automático de tecidos (Leica TP 1020), cujos passos se encontram descritos na tabela 4. Após a sua remoção do processador automático, as amostras foram incluídas em parafina (Merek). Foram realizados cortes de 3 µm de espessura, utilizando um micrótomo (Leica RM 2135), que foram posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina e Giemsa. A coloração com Hematoxilina-Eosina foi efectuada consoante o protocolo em vigor no laboratório (anexo III). Resumidamente, as lâminas foram desparafinadas durante 15 minutos (min) e hidratadas durante 5 min; foram

depois coradas com Hematoxilina de Gill 2 (Sigma-GHS 280) e lavadas em água destilada e água corrente morna. Após esta coloração, as lâminas foram colocadas em álcool a 70º (Aga) durante 1 min e coradas com Eosina-Floxina (Sigma-HT110-3). As lâminas assim coradas foram depois desidratadas, diafanizadas, montadas e avaliadas utilizando um formulário de avaliação próprio (anexo IV) (Day et al., 2008) . A coloração Giemsa foi efectuada com os mesmos passos de desparafinação e hidratação, e corados com Giemsa (Merck) e depois desidratadas, diafanizadas e montadas para pesquisa de espiroquetas. Os esfregaços foram corados com May-Grünwald-Giemsa (Merck) (Happonen et al., 1996a) e avaliados por microscopia óptica para a presença do agente.

Tabela 4: Passos do processador automático de tecidos (Leica TP 1020).

Todos os reagentes foram obtidos da Merck.

<b>Passo</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo (horas)</b>
<b>1</b>	Formalina	Ambiente	1:00
<b>2</b>	Álcool 70º	Ambiente	1:00
<b>3</b>	Álcool 95º	Ambiente	1:30
<b>4</b>	Álcool 95º	Ambiente	1:30
<b>5</b>	Álcool 100º	Ambiente	1:00
<b>6</b>	Álcool 100º	Ambiente	1:30
<b>7</b>	Álcool 100º	Ambiente	1:30
<b>8</b>	Xileno	Ambiente	1:00
<b>9</b>	Xileno	Ambiente	1:00
<b>10</b>	Xileno	Ambiente	1:00
<b>11</b>	Parafina	68ºC	2:00
<b>12</b>	Parafina	68ºC	2:00

### 3.2.6 Extracção ADN de amostras para PCR

#### *3.2.6.1 Amostras de tecido*

Para um rastreio inicial para pesquisa de *Helicobacter* spp. nos animais em estudo, foi utilizada uma amostra combinada, constituída por 4 a 8 mg de tecido de cada região (antro, corpo e fundo). Das amostras positivas para *Helicobacter* spp., o ADN extraído da amostra combinada foi subseqüentemente submetido a uma análise por PCR para cada espécie de *Helicobacter* em estudo. Após identificação das espécies presentes na amostra combinada, foi extraído ADN de cada uma das amostras regionais desta amostra combinada, a fim de realizar uma pesquisa por PCR de cada espécie identificada na amostra combinada. Todas

as extracções foram efectuadas utilizando DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen™), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram lisadas com proteinase K a 56°C durante 1 a 3 horas, após o que a amostra foi colocada numa coluna Dneasy Mini spin®. Conforme descrito na figura 7, seguiram-se vários passos de centrifugação (Hermle Z233 MK-2) à temperatura ambiente, com adição de vários tampões, permitindo a ligação do ADN da amostra à membrana da coluna enquanto contaminantes e inibidores enzimáticos eram removidos. O ADN das amostras foi mantido a 4°C até análise por PCR.

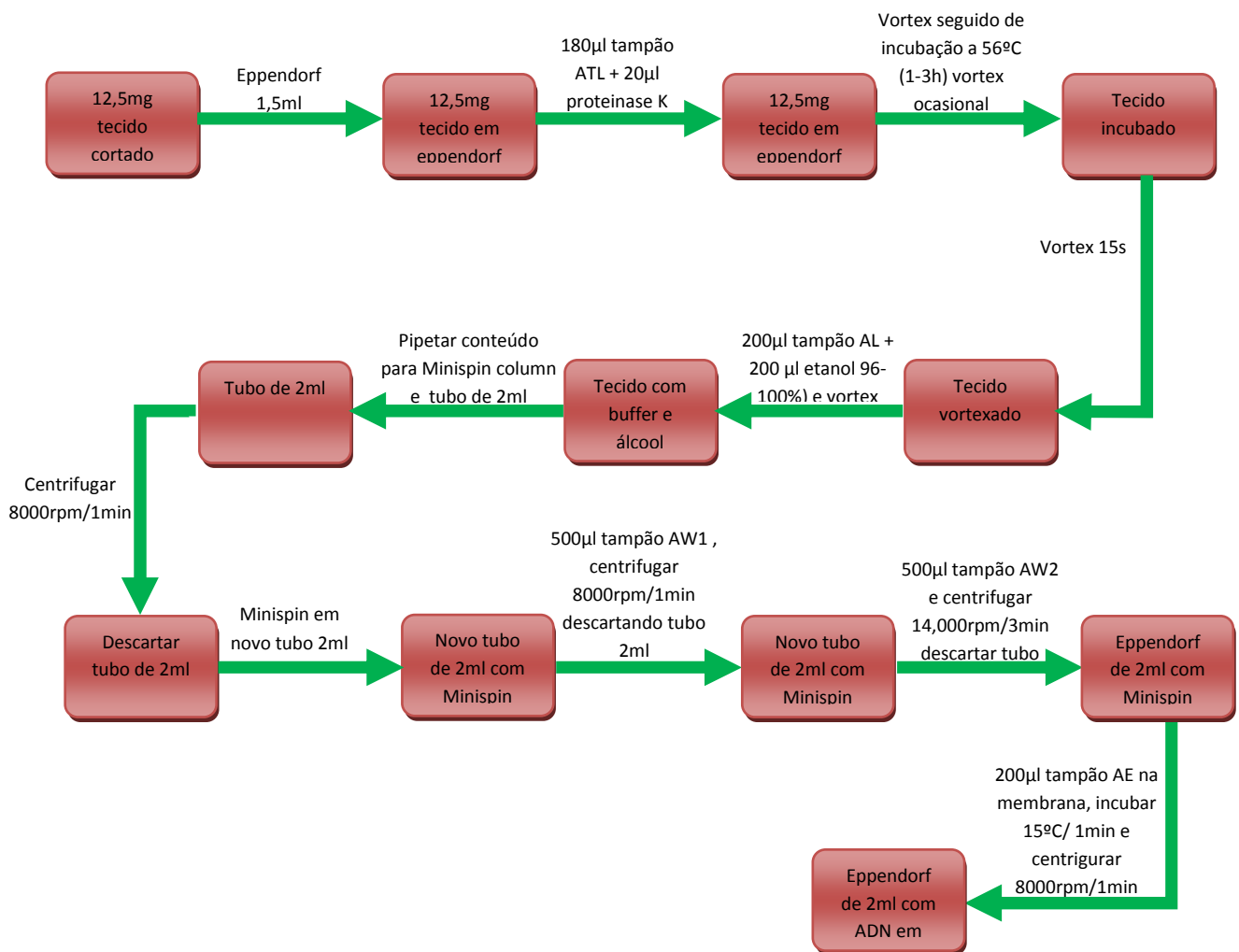


Figura 7: Resumo do processo de extracção de ADN tecidual utilizando o kit comercial.

### 3.2.6.2 Amostras fecais

Todas as extracções foram efectuadas com o QIAamp Stool Kit® (Qiagen™), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, amostras de 180mg de matéria fecal foram incubadas com o tampão ASL® (Qiagen™) a 70°C. Para absorver contaminantes e inibidores enzimáticos, foi adicionada a mistura InhibitEX® (Qiagen™), seguida de centrifugação a 14000rpm, durante 1 min (Hermle Z233 MK-2). O sobrenadante foi recuperado, adicionado à proteinase K e incubado a 70°C durante 10min. Após a lise, a amostra foi colocada numa coluna Dneasy Mini spin® seguindo-se vários passos de centrifugação (Hermle Z233 MK-2) à temperatura ambiente, com adição de vários tampões, permitindo a ligação do ADN da amostra à membrana da coluna, enquanto quaisquer contaminantes foram removidos (figura 8). As amostras foram inicialmente testadas por PCR com *primers* específicos para o género *Helicobacter* e as positivas foram seguidamente testadas, também por PCR com *primers* específicos para cada espécie de *Helicobacter* em estudo.

### 3.2.7 PCR

#### 3.2.7.1 Condições das reacções

Foram utilizados *primers* específicos para *Helicobacter spp.*, *H. pylori*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. bilis* e *H. heilmannii* (tabela 5), e as amplificações feitas num volume final de 50 µl, como previamente descrito (Feng et al., 2005; Fox et al., 1998; Hammar, Tyszkiewicz, Wadstrom & O'Toole, 1992; Jian, Zhu & Dong, 2001; Mikkonen, Karenlampi, & Hanninen, 2004b; Neiger et al., 1998; Perkins et al., 1996; Priestnall et al., 2004; Simpson, Strauss-Ayali, McDonough, Cahng & Valentine, 1999b; Simpson et al., 2000b; Zhu et al. 2002), em microtubos de 0,2ml (VWR) com FidelTaq™ MasterMix (USB® Products – Affymetrix, Inc.). Para permitir melhor visualização das bandas amplificadas com *primers* para *H. salomonis* foi efectuado um “nested”-PCR, utilizando os mesmos *primers* e condições acima citadas. A amplificação do ADN das amostras foi realizada num termociclador (BioRAD MyCycler™), nas condições descritas na tabela 6, e mantidas a 4°C. Os produtos amplificados foram separados por electroforese de um volume de 10µl de produto em 2µl de tampão carregador (BioLine) num gel de agarose a 1% numa tina horizontal pequena (BioRAD Mini-Sub® Cell GT e Wide Mini-Sub®Cell GT) com tampão Tris-borato EDTA a 0,5% (TBE) a 70mv durante 1 hora e 15min (BioRAD PowerPac Basic™). Em paralelo com os produtos amplificados, foi utilizado um marcador de pesos moleculares (HyperLadder II™, BioLine).

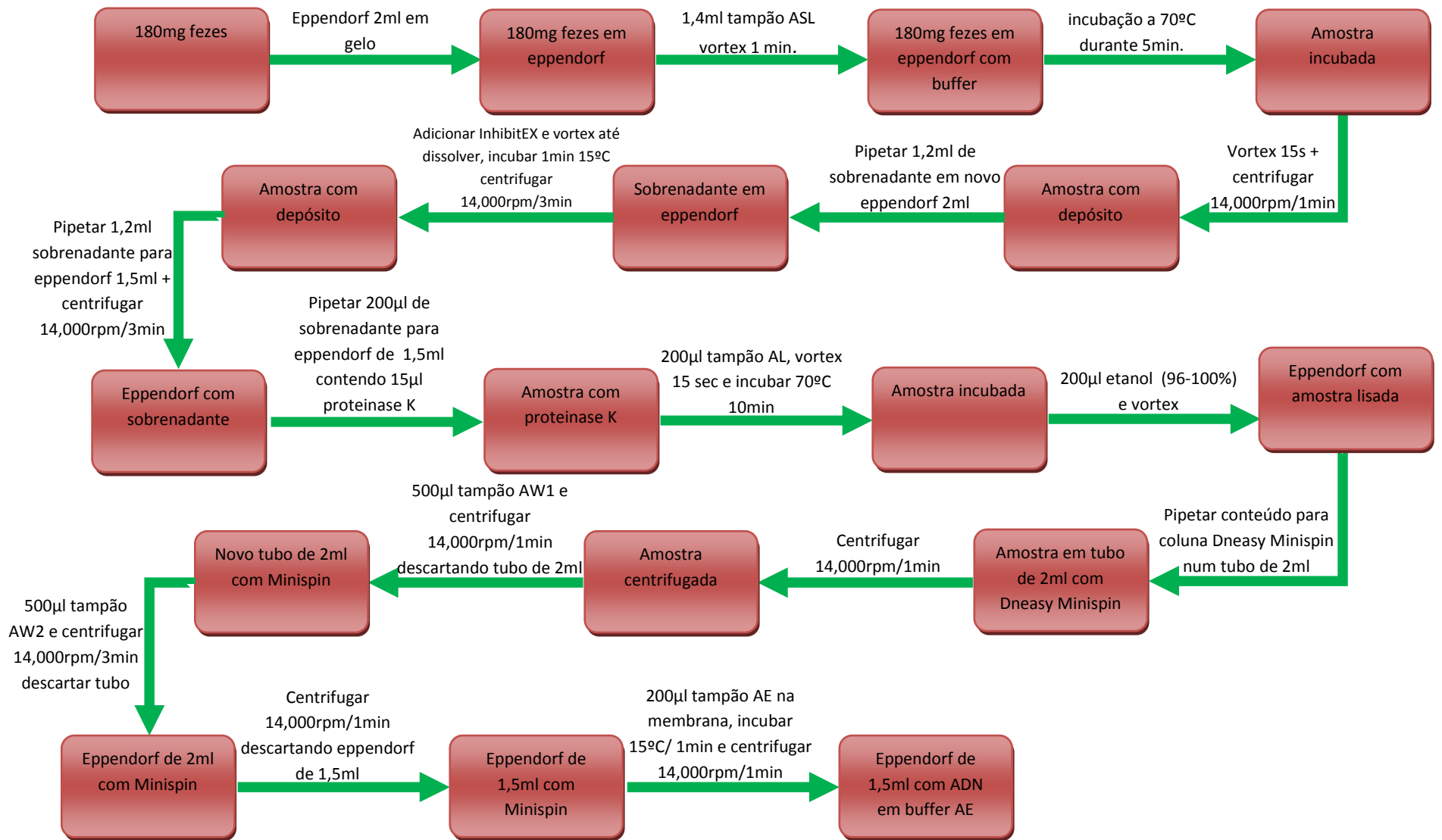


Figura 8: Resumo do processo de extracção de ADN fecal utilizando o kit comercial.

Após electroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, durante 30 min, e visualizado com transiluminador de luz ultravioleta associado a uma máquina fotográfica (ImageMaster®VDS, Pharmacia Biotech). As imagens foram registadas utilizando o software LISCAP.

Tabela 5: *Primers* utilizados e respectivos fragmentos amplificados.

<b>Espécie</b>	<b>Frag.</b>	<b>Primer</b>	<b>Ref.</b>
<b><i>Helicobacter</i> spp. (16s rRNA)</b>	1200-pb	C97 : 5'-GCTATGACGGGTATCC-3' C05 : 5'-ACTTCACCCCAGTCGCTG-3'	Fox et al.,1998; Simpson et al., 1999b
<b><i>H. pylori</i> (16s rRNA)</b>	298-pb	P3: 5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3' P4: 5'-CCTGCTGGGCATACTTCACCATG-3'	Hammar et al.,1992; Perkins et al., 1996
<b><i>H. felis</i> (ureaseB)</b>	1150-pb	F : 5'-ATGAAACTAACGCCTAAAGAACTAG-3' R: 5'-GGAGAGATAAAGTGAATATGCGT-3'	Neiger et al., 1998; Simpson et al.,1999a; Simpson et al., 2000a
<b><i>H. bizzozeronii</i> (ureaseB)</b>	420-pb	F: 5'-GAAGTCGAACATGACTGCAC-3' R: 5'-GGTCGCATTAGTCCCATCAG-3'	Priestnall et al., 2004; Zhu et al., 2002
<b><i>H. salomonis</i> (HSP60)</b>	537-pb	HSALF: 5'-CATTTCCAAAGAGGGCTTGC-3' HSALR: 5'-GCACACCCCTCAGTTTGTTT-3'	Jian et al., 2001; Mikkonen et al. 2004b
<b><i>H. bilis</i> (16s rRNA)</b>	435-pb	p17f: 5'ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAA CTTCAG-3' P17R: 5'-CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT-3'	Feng et al.(2005)
<b><i>H. heilmannii</i></b>	ureaseB 580-pb	Heil 1F : 5'-GGGCGATAAAGTGCGCTTG-3' Heil 2R : 5'-CTGGTCAATGAGAGCAGG-3'	Neiger, et al.(1998); Priestnall, et al.(2004)

Tabela 6: Ciclos de PCR utilizados de acordo com a espécie a ser pesquisada.

Espécie	Início		Desnaturação		Ligação		Extensão		Nº ciclos	Extensão final	
	°C	Min	°C	Min	°C	Min	°C	Min		°C	Min
<b><i>Helicobacter</i> spp.</b>	94	2	94	1	55	1	72	1	40	72	15
<b><i>H. pylori</i></b>	94	2	94	1	65	2	72	2	35	72	8
<b><i>H. felis</i></b>	94	2	94	1	62	1	72	1	40	72	15
<b><i>H. bizzozeronii</i></b>	94	2	94	1	57	1	72	1	35	72	15
<b><i>H. salomonis</i></b>	94	5	94	30sec	55	30sec	72	1	30	72	10
<b><i>H. bilis</i></b>	94	2	94	1	55	1	72	1	30	72	5
<b><i>H. heilmannii</i></b>	95	5	94	1	57	2	72	1	35	72	10

### 3.2.7.2 Culturas de estirpes padrão

Para validação da reacção de PCR (figura 9), estirpes padrão (*H. pylori* CCUG 17874T, *H. felis* ATCC 49179, *H. bizzozeronii* CCUG 35045, *H. salomonis* CCUG 37845 e *H. bilis* ATCC 51630) foram hidratadas, inoculadas em meio líquido (*blood heart infusion broth*, BHIB, Liofilchem S.R.L., suplementado com 5% de soro fetal bovino) e placas húmidas, bifásicas (5% soro fetal bovino), de agar Columbia™ suplementadas com 5% de sangue de carneiro (BioMérieux® 43 041) e Campyloset™ (BioMérieux® 43 361). As placas foram incubadas a 37°C durante 7 dias em atmosfera de microaerofilia (GENbag microaer, BioMérieux®), em ambiente húmido, obtido mediante colocação de algodão embebido em água na saqueta de microaerofilia.

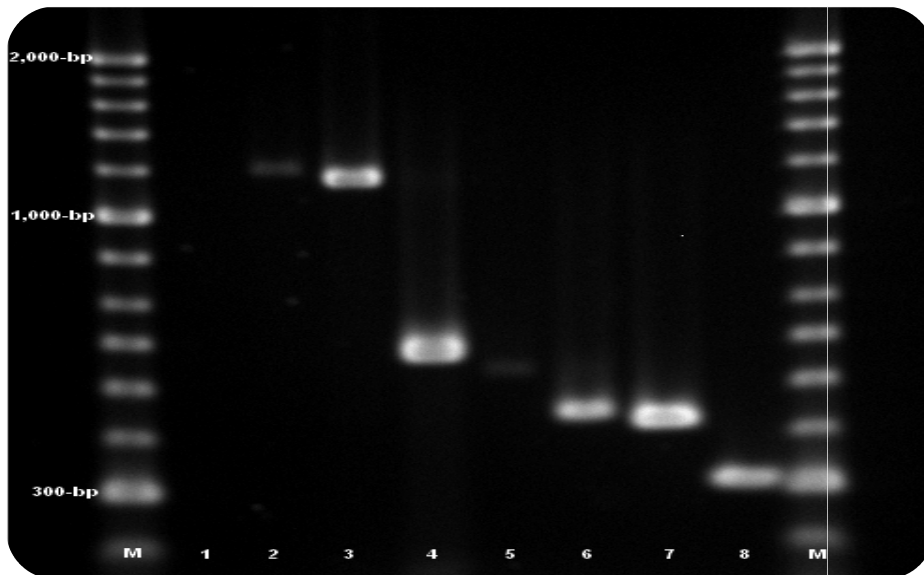


Figura 9: Validação das reacções de PCR

Coluna 1 controlo negativo, colunas 2 a 8 culturas puras de *H. spp.*, *H. felis*, "*H. heilmannii*", *H. salomonis*, *H. bilis*, *H. bizzozeronii* e *H. pylori*.

### 3.2.7.3 Extracção ADN das estirpes padrão

A extracção de ADN foi efectuada a partir da cultura em caldo BHIB, pelo método do tiocianato de guanidina adaptado de Pitcher, Saunders & Owen (1989). A cultura foi centrifugada e lavada com 500 µl de 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0 (TE) sendo o depósito ressuspendido em 250 µl de TE com lisozima (10 mg/ml) e incubado em banho seco (Rotilabo Block Heater H250), a 37°C, durante 30 min. Foram seguidamente adicionados 250 µl de 5 mol/l tiocianato de guanidina (Sigma), 100 mmol/l EDTA e 0.5% v/v sarcosil (reagente GES), sendo a mistura mantida refrigerada em gelo durante 10 min. Adicionaram-se então 250 µl de 10M NH<sub>4</sub>Ac, ao que se seguiu novo passo de refrigeração durante 10 min em gelo. Finalmente, adicionaram-se 750 µl de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1, e centrifugou-se a solução (Hermle Z233 MK-2). O sobrenadante foi recuperado, sendo adicionando a este igual volume de isopropanol (Merck) frio. A solução foi centrifugada de novo e o depósito lavado com 1 ml de 70% etanol (Roth). Após secagem, os ácidos nucleicos foram solubilizados em 250 µl de TE e mantidos refrigerados a 4°C até a sua utilização.

O ADN de *H. heilmannii* tipo 2 foi gentilmente cedido pelo Professor Kenneth W. Simpson (Section of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Cornell University, E.U.A.).

### 3.2.7.4 Reacções PCR efectuadas

#### 3.2.7.4.1 ADN de origem gástrico

No rastreio inicial, foi utilizado ADN extraído das amostras homogeneizadas de tecido gástrico, em reacções com *primers* específicos para *H. spp* (tabela 2). Seguidamente, o ADN a partir do qual se amplificou a banda esperada (1,200-pb) foi utilizado em reacções com *primers* específicos para as espécies de *Helicobacter* em estudo (tabela 2) como recomendado por Germani et al. (1997). Uma vez estabelecido quais os animais positivos para cada espécie, foi extraído ADN das amostras regionais dos mesmos e os PCR repetidos para identificação da região em que se encontrava a respectiva espécie de *Helicobacter*.

Sempre que foram observadas bandas inespecíficas, como no caso de reacções efectuadas com *primers* para *H. bizzozeronii*, estas foram re-amplicadas utilizando o protocolo já referido (tabela 5 e 6).

O programa de análise de sequências Gene Runner (Hastings Software, Inc.) e a base de dados Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997) foram utilizados para averiguar a especificidade dos *primers* utilizados para amplificação de ADN oriunda das espécies *H. bizzozeronii* e "*H. heilmannii*".

#### 3.2.7.4.2 ADN de origem fecal

O ADN extraído das amostras fecais recolhidas foi utilizado numa reacção de PCR inicial, utilizando *primers* específicos para *H. spp* (tabela 2). As amostras a partir das quais se amplificou a banda esperada foram posteriormente utilizadas em reacções com *primers* específicos para as espécies em estudo, com excepção de *H. pylori* e *H. bilis*.

### 3.2.8 Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada com recurso ao programa de statistica SPSS statistics 17.0 (IBM Inc.) utilizando os testes chi-quadrado de McNemar e Kendall's tau.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 PCR

##### 3.3.1.1 Amostras Fecais

Das 19 amostras fecais recolhidas pelos donos, foi possível, em 52,6% do ADN extraído, amplificar bandas com 1,200 pares de bases após PCR com *primers* específicos para *H. spp.* (figura 11); 50% das 14 amostras eram de origem canina e 60% das cinco amostras eram de origem felina. Os resultados dos PCR efectuados com *primers* específicos para as espécies de *Helicobacter* em consideração encontram-se resumidos na figura 10.

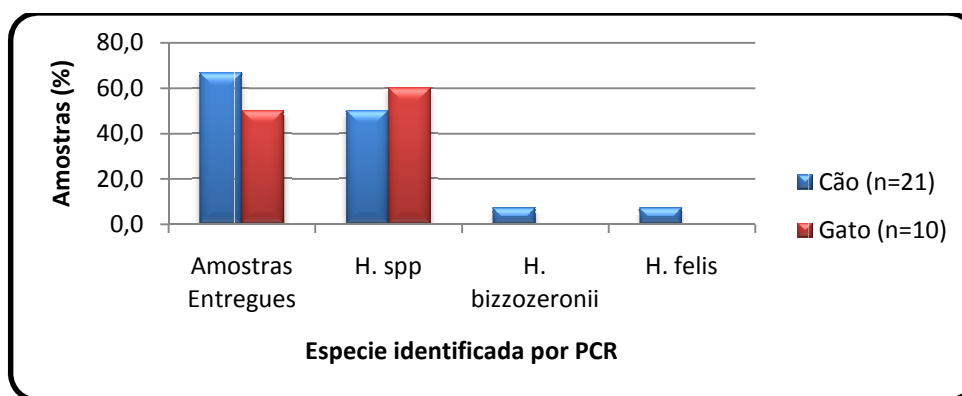


Figura 10: Resultados de análise por PCR de ADN extraído das amostras fecais recolhidas.



Figura 11: PCR com *primers* específicos para *Helicobacter* spp. e ADN extraído de amostras fecais (1200-pb).

Marcador molecular (M), controlo positivo *H. felis* (1), controlo negativo (2) amostras felinas positivas (6) e negativas (5, 11, 17), amostras caninas positivas (4, 7, 8, 9, 12, 13) e negativas (3, 10, 14, 15, 16).

### 3.3.1.2 Amostras de Tecido

Após PCR com *primers* específicos para *H. spp.* obteve-se amplificação dos fragmentos esperados em 37,5% (21/56) e 48,9% (23/47) do ADN extraído das amostras homogeneizadas de origem canina e felina, respectivamente (figura 12).

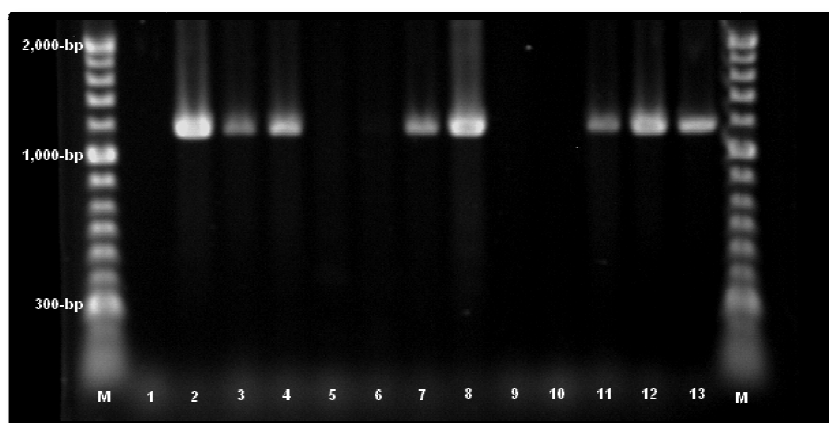


Figura 12: PCR com *primers* específicos de *Helicobacter* spp. e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas (1200-pb).

Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo *H. felis* (2), amostras felinas positivas (4,12,14) e negativas (5,10), amostras caninas positivas (3,7,8) e negativas (6,9).

A utilização de *primers* específicos para *H. bilis* não permitiu a amplificação de qualquer fragmento nas amostras testadas, seja de origem canina ou felina, (figura 13). A amplificação de bandas específicas para *H. salomonis* e *H. felis* foram detectadas exclusivamente em amostras de origem canina (figura 14) enquanto *H. pylori* foi detectado numa única amostra de origem felina (figura 15). Fragmentos específicos tanto para *H. bizzozeronii* como para "*H. heilmannii*" foram amplificadas do ADN extraído de amostras gástricas, tanto de canídeos como felídeos (figuras 16 e 17). Em dois casos, não foi possível amplificar quaisquer fragmentos em ADN extraído de amostras gástricas caninas, utilizando *primers* específicos para espécie de *Helicobacter*.

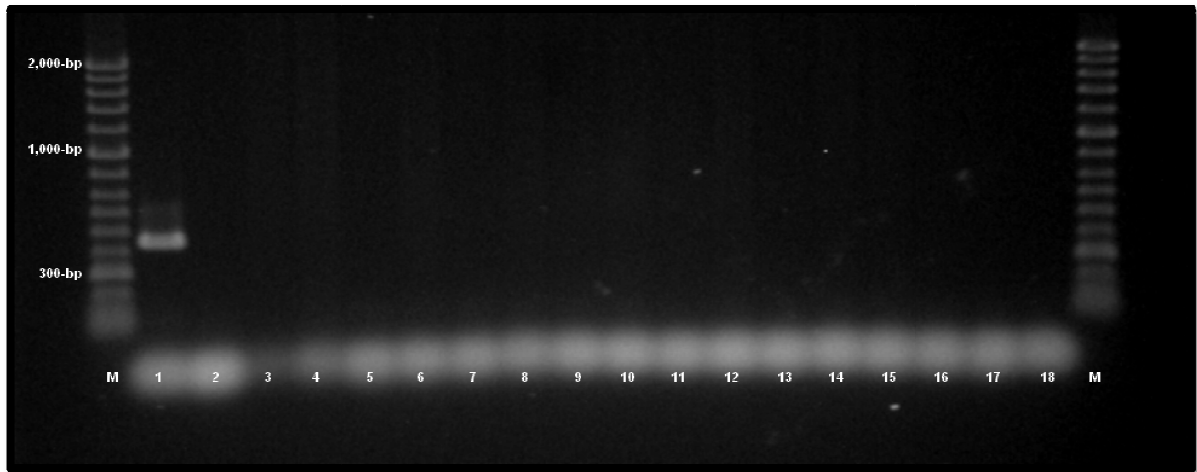


Figura 13: PCR com *primers* específicos para *H. bilis* e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas (537-pb).

Marcador molecular (M), controlo positivo (1), controlo negativo (2), amostras felinas negativas (3,5,6,7,9,11,15,18), amostras caninas negativas (4,8,10,12,13,14,16,17).

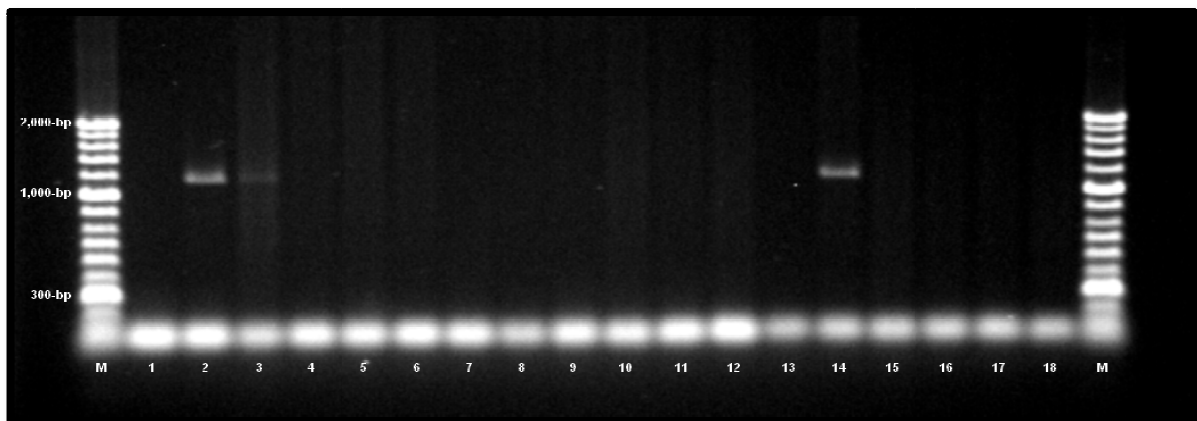


Figura 14: PCR com *primers* específicos para *H. felis* e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas (1150-pb).

Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostras caninas positivas (3,14) e negativas (5,11,13,15,17), amostras felinas negativas (4,6,7-10,12,16,18).

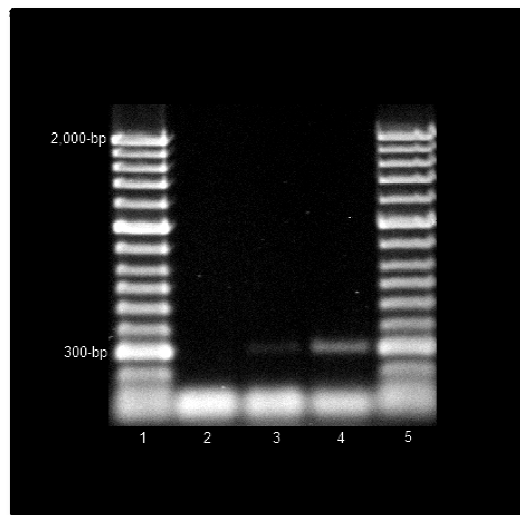


Figura 15: PCR com *primers* específicos para *H. pylori* e ADN extraído de uma amostra gástrica felina (298-pb).

Marcador molecular (1,5), controlo negativo (2), controlo positivo (3), amostra positiva (4).

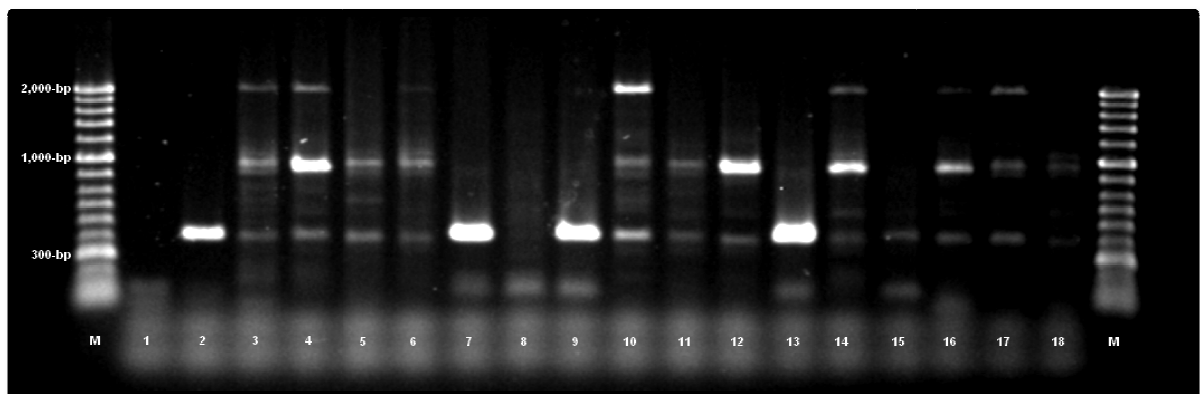


Figura 16: PCR com *primers* específicos para *H. bizzozeronii* e ADN de extraído de amostras gástricas homogeneizadas, com amplificação da banda esperada (420-pb) e bandas inespecíficas.

Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostras felinas positivas (3-6,10-13,15-18), amostras caninas positivas (7,9,14), amostras caninas negativas (8).

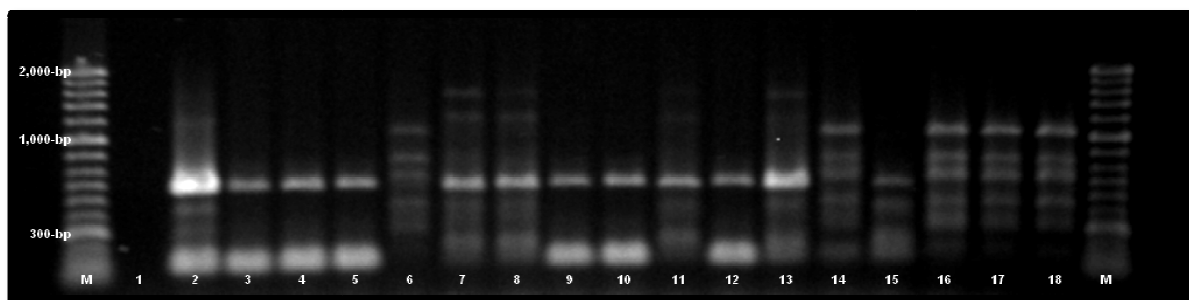


Figura 17: PCR com *primers* específicos para “*H. heilmannii*” e ADN extraído de amostras gástricas homogeneizadas com amplificação da banda esperada (580-pb) e bandas inespecíficas.

Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostras felinas positivas (11,7,8,10-13,15), amostras caninas positivas (3,5,9), amostras caninas negativas (6,14,16-18).

Os resultados das diferentes reacções de PCR feitas a partir de ADN extraído de amostras homogeneizadas com *primers* específicos para as espécies em estudo, encontram-se resumidos na figura 18 e na tabela 7. Os resultados dos PCR efectuados com *primers* específicos para as espécies de *Helicobacter* em consideração e ADN extraído das três regiões gástricas em análise (antro, corpo e fundo) (anexo II) encontram-se resumidos nas figuras 20 e 21. Nenhuma das espécies identificadas demonstrou preferência para qualquer região gástrica (McNemar, N = 51, p > 0,05).

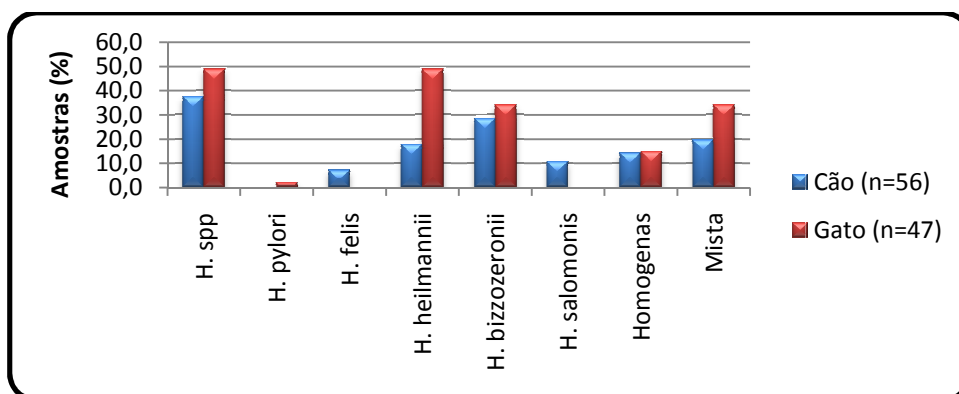


Figura 18: Resultados dos PCR efectuados com *primers* específicos e ADN extraído de amostras de tecido gástrico homogeneizadas.

Foram identificadas populações mistas de *Helicobacter* em ambas as espécies animais em estudo (figura 19). Duas populações mistas foram identificadas nos gatos, uma composta por *H. pylori*, *H. bizzozeronii* e “*H. heilmannii*”, enquanto nos cães se verificou a presença de cinco populações mistas distintas.

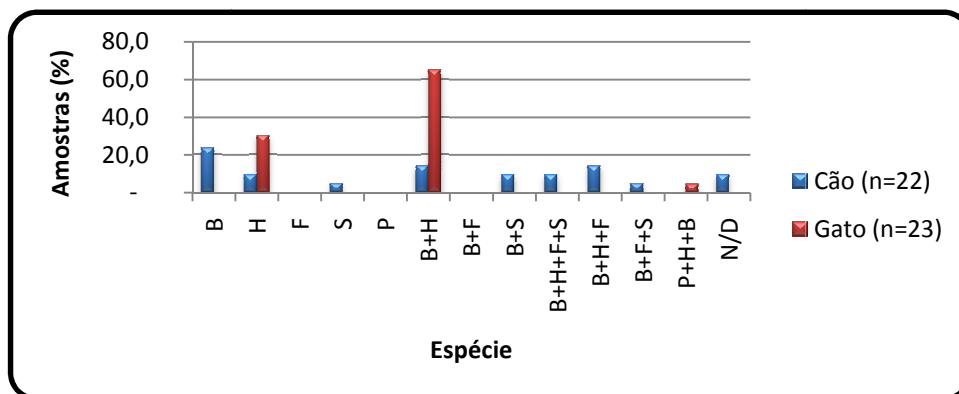


Figura 19: Composição das populações identificadas na mucosa gastrica de canídeos e felídeos B; *H. bizzozeronii*, H; “*H. heilmannii*”, F; *H. felis*, S; *H. salomonis*, P; *H. pylori*.

Tabela 7: Populações de *Helicobacter* identificadas na mucosa gástrica de cães e gatos.

Espécie de <i>Helicobacter</i>	Canídeos (%)	Felídeos (%)
<i>H. spp</i>	37,5	48,9
<i>H. pylori</i>	0,0	2,1
<i>H. felis</i>	7,1	0,0
<i>H. heilmannii</i>	17,9	48,9
<i>H. bizzozeronii</i>	28,6	34,0
<i>H. salomonis</i>	10,7	0,0
População homogénea	14,3	14,9
População mista	19,6	34,0

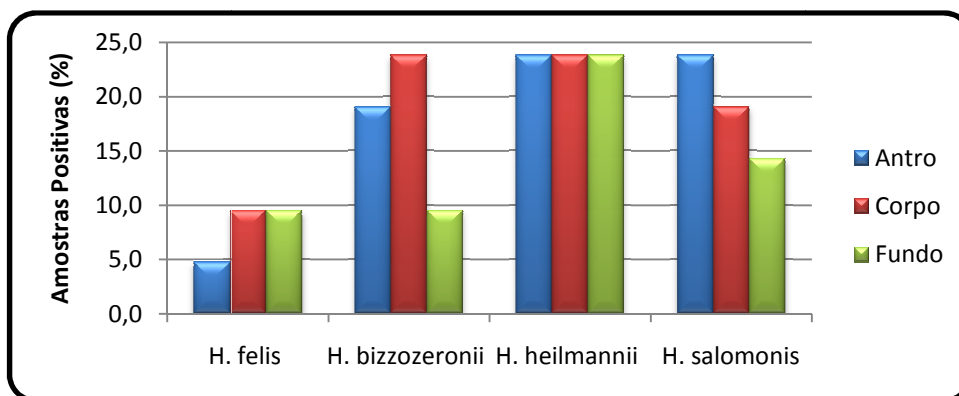


Figura 20: Resultados de PCR efectuados com ADN extraído de amostras regionais de tecido gástrico obtidas de canídeos que permitiram a amplificação de fragmentos específicos nas amostras homogeneizadas.

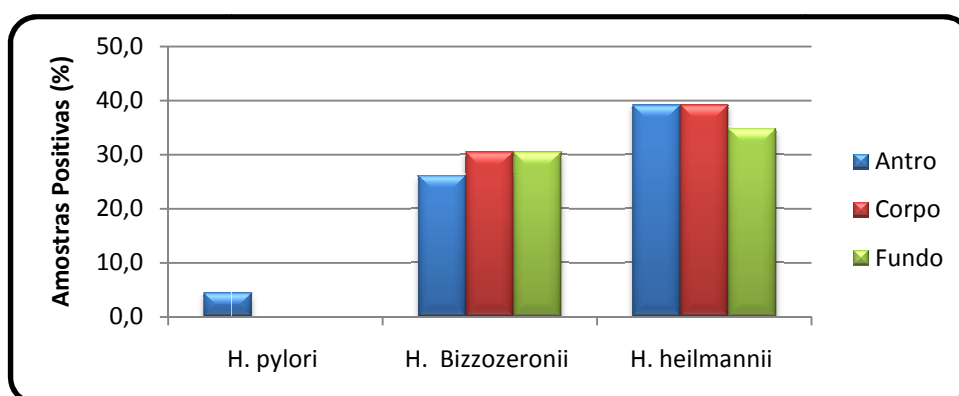


Figura 21: Resultados dos PCR efectuados com ADN extraído de amostras regionais de tecido gástrico obtidas de felídeos que permitiram a amplificação de fragmentos específicos nas amostras homogeneizadas.

Nas reacções de PCR efectuadas utilizando os *primers* específicos para *H. bizzoeronii* e “*H. heilmannii*” foram amplificados, para além das bandas esperadas (tabela 5), bandas inespecíficas (figuras 16 e 17). No caso de *H. bizzoeronii* estas duas bandas inespecíficas foram amplificadas exclusivamente em ADN extraído de amostras de tecido gástrico felino.

A re-amplificação das três bandas inicialmente amplificadas com *primers* específicos para *H. bizzoeronii* (figura 22) demonstrou que as bandas se re-amplificaram a si mesmas, não se observando hibridações internas no ADN amplificado. A utilização da base de dados Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997) não revelou sequências de qualquer outro organismo até a data sequenciados compatíveis com os *primers* utilizados.

Verificou-se que dos *primers* hibridarem com uma outra estirpe de *H. bizzozeronii* na base de dados, amplificando uma banda próxima dos 1,000-pb. A avaliação da capacidade dos *primers* utilizados para *H. bizzozeronii* hibridarem com mais que duas zonas na sequência nucleotídica da bactéria que codifica a urease (Zhu et al., 2002), utilizando Gene Runner (Hastings Software, Inc.), não revelou a existência de mais do que dois pontos de hibridação.

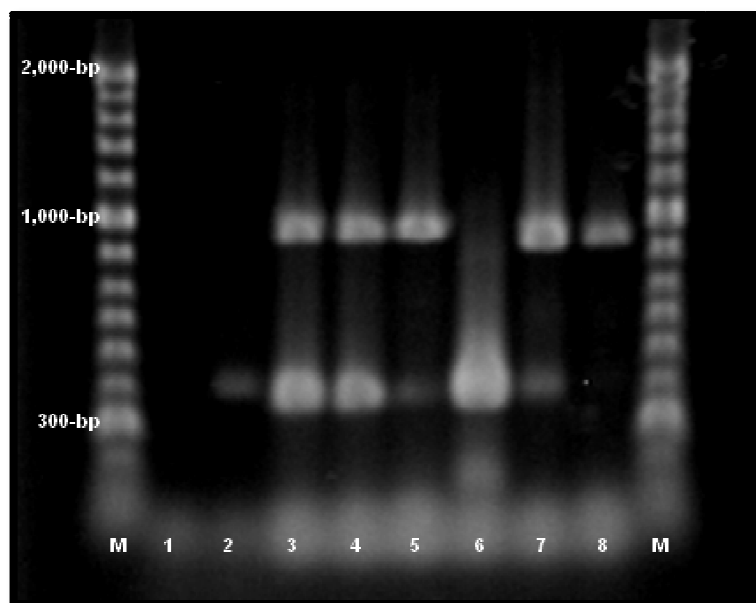


Figura 22: Re-amplificação das bandas produzidas pela reacção de PCR para *H. bizzozeronii*. Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostra originária do felídeo nº9: banda original 420-pb (3), 1000-pb (4), 2000-pb (5), amostra originária do felídeo nº10: banda original 420-pb (6), banda original 1000-pb (7), banda original 2000-pb (8).

A presença ou ausência de sinais clínicos gastrointestinais foi registada pelo médico veterinário assistente, em 42 dos animais avaliados por PCR, 22 cães e 20 gatos. Nos felídeos, foi possível demonstrar uma relação entre a presença de *Helicobacter*, mais especificamente “*H. heilmannii*” (Kendall’s tau,  $N = 20$ ,  $p = 0,015$ ), e o desenvolvimento de sinais gástricos.

### 3.3.2 Histopatologia

Dos 23 canídeos e 14 felídeos cujas biopsias gástricas foram submetidas a análise histopatológica 17,4% (4/23) e 21,4% (3/14) respectivamente não demonstraram qualquer tipo de alteração microscópica. A presença única de alterações morfológicas foi detectada exclusivamente em canídeos 21,7% (5/23) (figura 23).

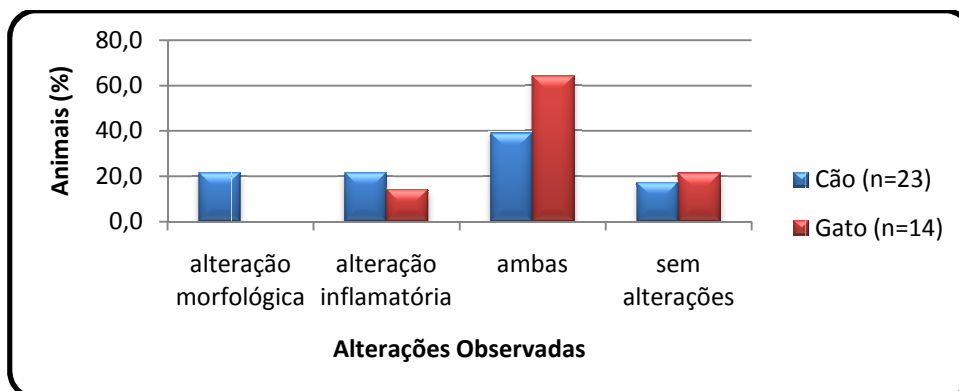


Figura 23: Resultado global da avaliação histopatológica das biopsias gástricas caninas e felinas.

Comparando os resultados de PCR com a observação microscópica de espiroquetas em 37 cortes histológicos (figura 24, 25 e 26), verifica-se que a observação microscópica de espiroquetas no corte histológico, em canídeos, está em completa concordância com os resultados de PCR, no que toca aos resultados positivos. No entanto, quando se considera a totalidade dos resultados, tanto positivos como negativos, não se encontrou concordância entre todos os resultados nem em canídeos (Kendall's tau, N = 20, p = 0,138) nem em felídeos (Kendall's tau, N = 13, p = 0,859).

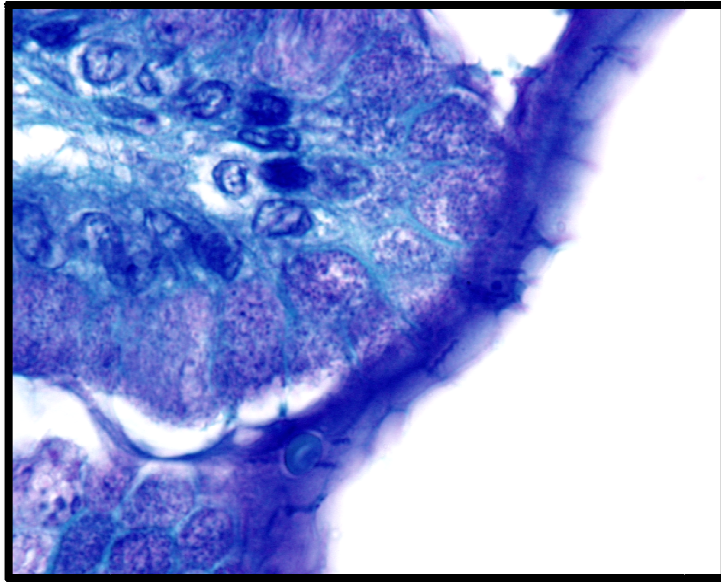


Figura 24: Espiroquetas observadas na superfície da mucosa do estômago de um cão.  
Giemsa, 1000x Original

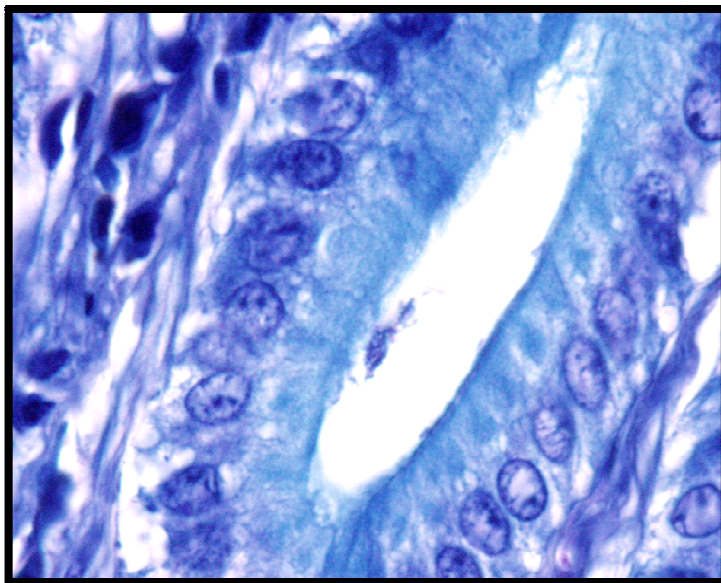


Figura 25: Espiroquetas observadas no lúmen de uma glândula gástrica do estômago de um gato.  
Giemsa, 1000x Original.

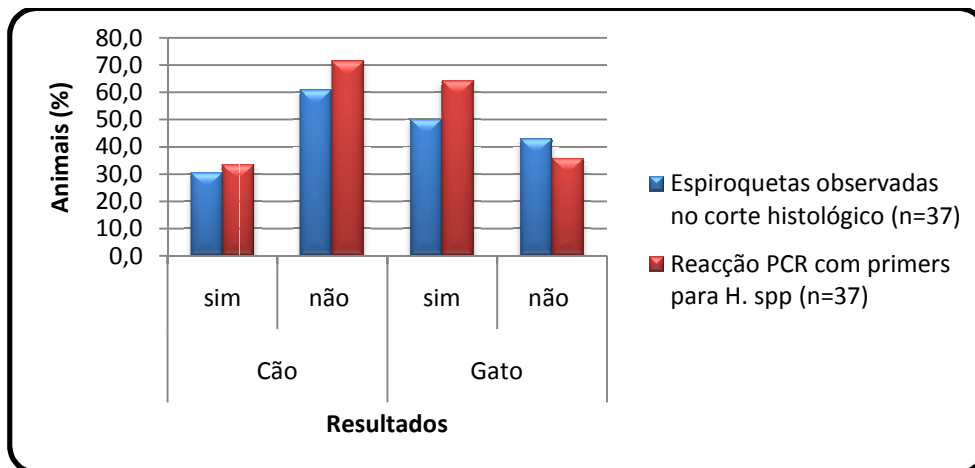


Figura 26: Comparação entre observação histológica de espiroquetas e PCR.

Comparando os resultados histopatológicos com os das reacções de PCR com *primers* específicos para o género, (figura 27) destaca-se a completa ausência de *Helicobacter* nos canídeos com mucosas gástricas consideradas normais pelo patologista e a presença de *Helicobacter* em todos os felídeos que apresentavam apenas alterações inflamatórias (figura 28). Após reacções de PCR com *primers* específicos para espécie verificou-se que, nestes casos, os gatos estavam sempre colonizados com “*H. heilmannii*”. Verificou-se uma correlação entre a presença de *H. bizzozeronii* e alterações consideradas inflamatórias pelo patologista (Kendell’s tau, N = 21, p = 0,05).

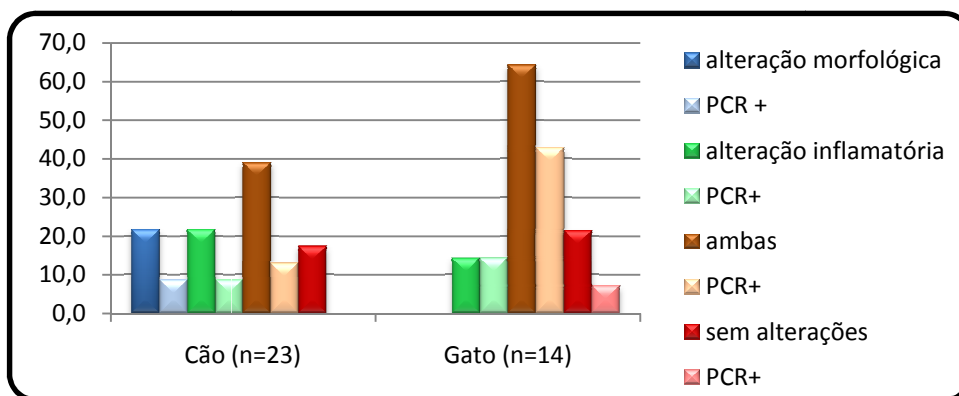


Figura 27: Comparação entre alterações observadas na mucosa gástrica e amplificação de bandas específicas para o género.

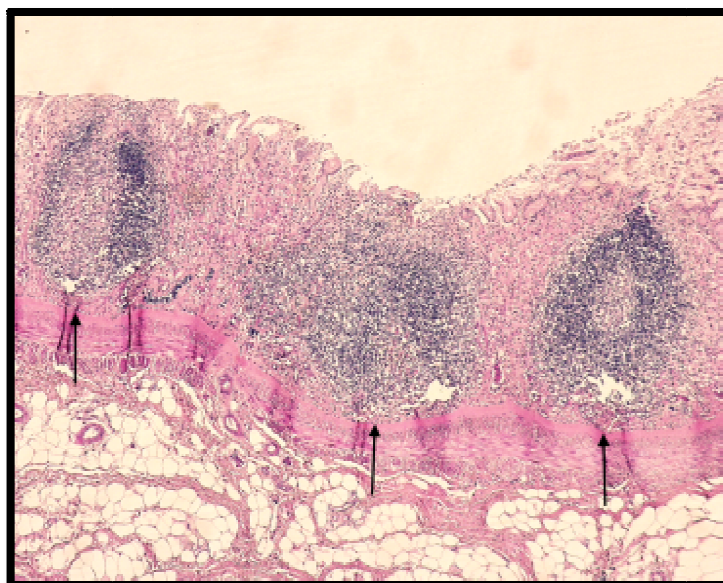


Figura 28: Hiperplasia linfocitária (setas) identificada na mucosa gástrica de um felídeo colonizado com "*H. heilmannii*". H&E 100X. Original.

### 3.3.3 Esfregaços da parede gástrica

Dos 37 animais cujas biópsias foram submetidas a análise histológica, 18 foram também avaliados através de esfregaços da mucosa gástrica. Dos cadáveres, cujas biópsias foram submetidas exclusivamente a análise por reações de PCR, foram efectuados esfregaços de 39 animais. Em 36,8% (21/57) dos esfregaços de mucosa gástrica foram observadas espiroquetas, em 36,8% (21/57) não se observaram estas bactérias, e 26,3% (15/57) dos esfregaços foram considerados inconclusivos (figura 29).

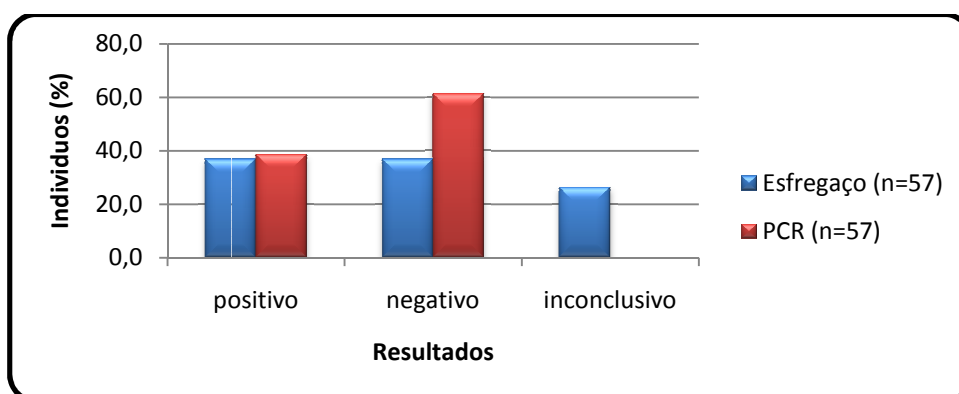


Figura 29: Comparação entre os resultados obtidos através da observação dos esfregaços e os obtidos por PCR.

Considerando individualmente as duas espécies animais em estudo, verificou-se que 30,2% (10/33) dos esfregaços de mucosa gástrica canina evidenciaram espiroquetas (figura 30), 39,4% (13/33) estavam livres da presença destas bactérias, e 30,3% (10/33) foram considerados inconclusivos (figura 31); nos felídeos, em 45,8% (11/24) dos esfregaços observaram-se espiroquetas (figura 32), 33,3% (8/24) estavam livres destas bactérias, e 20,8% (5/24) foram considerados inconclusivos (figura 31).

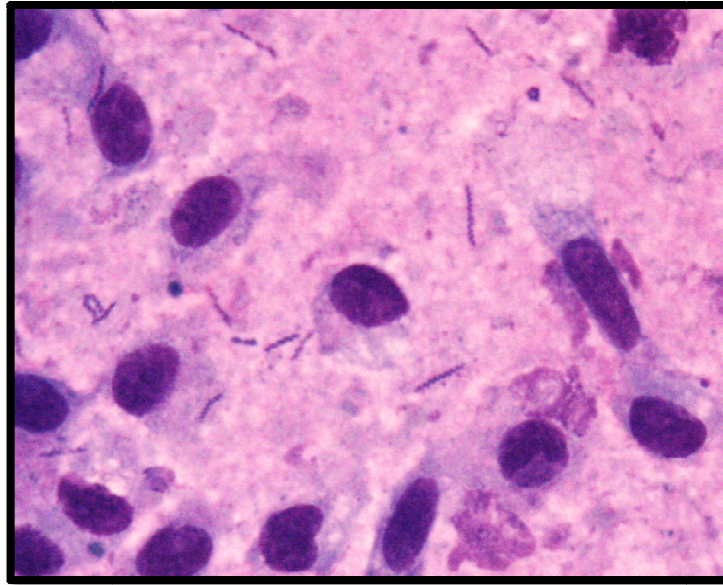


Figura 30: Esfregaço da mucosa gástrica, região do corpo, dum cão evidenciando várias espiroquetas identificadas como *H. bizzozeronii* por PCR.

Giemsa, 1000X. Original

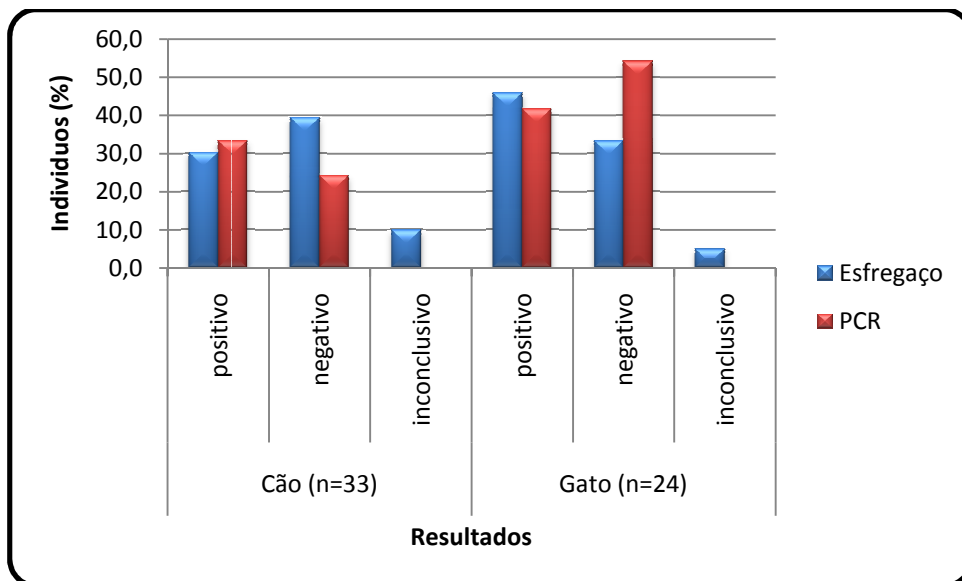


Figura 31: Comparação entre os resultados obtidos através da observação dos esfregaços e os obtidos por PCR nas duas espécies de animais de companhia.

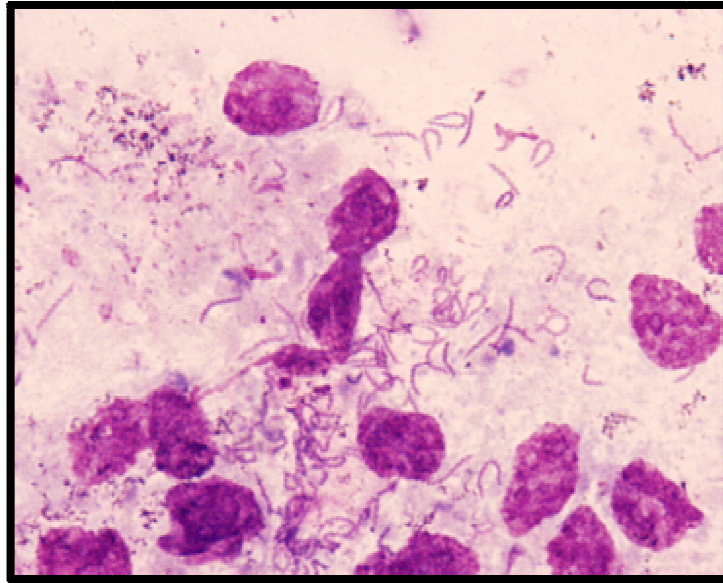


Figura 32: Esfregaço da mucosa gástrica, região do corpo, de um gato, evidenciando várias espiroquetas identificadas como *H. bizzozeronii* e "*H. heilmannii*" por PCR. Giemsa, 1000X original.

Comparando os resultados dos esfregaços da parede da mucosa gástrica com os das reacções de PCR efectuadas a partir de ADN extraído das amostras existe completa concordância entre os resultados positivos, tanto em canídeos (Kendall's tau,  $N = 23$ ,  $p = 0,002$ ) como em felídeos (Kendall's tau,  $N = 19$ ,  $p = 0,004$ ) (figuras 29 e 31).

### 3.4. Discussão

Os microrganismos da espécie *Helicobacter* têm sido alvo, nas últimas décadas, de importantes estudos, face à reconhecida importância de *Helicobacter pylori* como um agente ulcerogénico e potencialmente carcinogénico no Homem (Kusters et al., 2006). Em medicina veterinária, e para além do interesse no desenvolvimento de modelos animais para a doença no Homem, o seu potencial zoonótico (Solnick & Schauer, 2001) e a possibilidade do seu envolvimento na etiologia de gastrites idiopáticas em animais de companhia (Neiger & Simpson, 2000; Simpson et al., 2000a) tem sido alvo de várias linhas de investigação.

O presente trabalho teve como objectivos o estabelecimento da prevalência do género *Helicobacter* numa população típica de animais de companhia, determinar quais as espécies gástricas de *Helicobacter* sp. presentes nessa população e averiguar possíveis associações entre o desenvolvimento de sinais clínicos do foro gástrico e a evidenciação de *Helicobacter* spp.

Existem, na literatura disponível, informações sobre a prevalência de *Helicobacter* sp em várias populações (Eaton et al., 1996; Moutinho et al., 2007; Otto et al., 1994; Shen et al., 2001; Shojaee Tabrizi et al., 2010; Strauss-Ayali & Simpson, 1999; Wiinberg et al., 2005), bem como sobre a frequência de envolvimento das diferentes espécies deste género (Happonen et al., 1998; Hwang et al., 2002a; Neiger et al., 1998; Priestnall et al., 2004; Strauss-Ayali et al., 2001; Van den Bulck et al., 2005b). No entanto, é reconhecida a necessidade de obtenção de mais informação (De Groote et al., 2005; Erginsoy & Sozmen, 2006; Fox, 2002; Solnick & Schauer, 2001; Strauss-Ayali et al., 2001; Wiinberg et al., 2005). Ainda mais importante, é a também reconhecida necessidade de padronização tanto dos critérios de avaliação de lesões histopatológicas como das técnicas de biologia molecular utilizadas (Leib et al., 2007; Neiger & Simpson, 2000).

A população de animais de companhia sobre a qual incidiu o estudo pode ser considerada uma população típica Portuguesa – pacientes que se apresentaram à consulta externa do Hospital Escolar da FMV/UTL e na Clínica Veterinária das Laranjeiras com sinais clínicos gastrointestinais sem causa aparente. A amostragem incidiu também sobre cadáveres de canídeos e felídeos domésticos, enviados pelos donos e pelos clínicos assistentes para a necrópsia no Serviço de Anatomia Patológica na FMV/UTL. As amostras foram recolhidas *in vivo*, por meio de endoscopia ou laparotomia exploratória (biopsias e esfregaços da mucosa gástrica e amostras fecais) e *post-mortem* (fragmentos da parede do estômago e esfregaços da mucosa gástrica), efectuados segundo técnicas descritas na literatura (Happonen et al., 1996a)

No presente estudo, foi utilizado um critério padronizado para avaliação histopatológica (Day et al., 2008). A avaliação da prevalência de *Helicobacter* foi efectuada por PCR, como descrito na literatura (Feng et al., 2005; Fox et al., 1998; Hammar et al., 1992; Jian et al., 2001; Mikkonen et al., 2004b; Neiger et al., 1998; Perkins et al., 1996; Priestnall et al., 2004; Simpson et al., 1999a; Simpson et al., 2000b; Zhu et al., 2002).

A possibilidade de identificar a presença de espécies gástricas de *Helicobacter* através de PCR efectuada com ADN extraído de amostras fecais é extremamente atractiva, pois este exame complementar de diagnóstico poder-se-ia tornar determinante nos casos de gastrite crónica idiopática em animais de companhia. Dado que a recolha de fezes é um procedimento não invasivo e fácil de realizar pelos proprietários, seria uma forma fácil e rápida de confirmar uma suspeita clínica de gastrite por *Helicobacter*.

Contudo, a utilização de *primers* específicos para o género *Helicobacter* em PCR com ADN extraído de amostras fecais não implica necessariamente a presença de espécies gástricas. Sabe-se que existem espécies de *Helicobacter* entéricas que colonizam os animais de companhia (Rossi, Hänninen, Revez, Hannula, & Zanoni, 2008; Solnick & Schauer, 2001), e tais *primers* amplificariam ADN tanto de espécies entéricas como gástricas. Assim, o potencial de diagnóstico deste exame complementar é limitado. Seria interessante o desenvolvimento de um protocolo de PCR que permitisse detectar ADN de espécies exclusivamente gástricas. Apenas deste modo, e conhecendo quais as espécies mais comuns na mucosa gástrica da população local, se poderia preconizar a utilização de PCR a partir de amostras fecais como exame complementar de diagnóstico nas gastrites crónicas idiopáticas.

Para avaliar o potencial deste exame complementar extraiu-se ADN de amostras fecais de canídeos e felídeos e utilizaram-se *primers* específicos para o género *Helicobacter* em PCR. Esta reacção amplificou em 10 animais (52,6%), sete cães e três gatos, a banda de 1200-pb esperada (figura 11). As bandas inespecíficas amplificadas em ADN extraído de amostras fecais de alguns animais podem ser o resultado da presença de outras espécies, filogeneticamente próximas a *Helicobacter*, como *Wolinella* (Gueneau & Loiseaux-De Goer, 2002), devido às semelhanças na região 16s rRNA do genoma destas duas espécies, zona amplificada pelos *primers* género específico utilizados, não permitindo a diferenciação entre os dois géneros (Moyaert, Pasmans, Ducatelle, Haesebrouck & Baele, 2008). Contudo, *Wolinella* não tem sido evidenciada em amostras gástricas de animais de companhia

(Jergens et al., 2009), pelo que a utilização posterior de *primers* específicos para espécie de *Helicobacter* é suficiente para diferenciar entre estes dois géneros.

Hwang, Youn e Han (2002b) amplificaram ADN de *Helicobacter* spp. em amostras fecais de cães considerados colonizados por *Helicobacter* com base no teste da urease, microscopia óptica, e PCR em amostras de tecido gástrico. Contudo não especificaram quais os *primers* utilizados neste rastreio inicial nem utilizaram PCR específico para espécie para confirmar a amplificação de ADN de espécies gástricas. Existe então a possibilidade de a amplificação de bandas correspondentes a *Helicobacter* spp. reflectir uma colonização intestinal e não gástrica.

De modo a confirmar que as bandas amplificadas reflectiam a presença de *Helicobacter* gástrica e não intestinal ou *Wolinella*, utilizaram-se *primers* específicos para as espécies gástricas de *Helicobacter*. Os *primers* utilizados têm a capacidade de amplificar ADN das espécies *H. salomonis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii* e “*H. heilmannii*”. Não foram pesquisados *H. bilis* nem *H. pylori*.

*H. bilis* é uma espécie que tem todas as características para ser uma espécie entérica devido a sua tolerância à bilis (Fox et al., 1995b), caso que já foi confirmado por vários autores (Rossi et al., 2008; Shen et al., 2001). A única incidência reportada por Eaton et al., (1996) de *H. bilis* em amostras gástricas de cães pode ter devida a um caso de refluxo (K.W. Simpson, comunicação pessoal Maio 2010). Sendo *H. bilis* uma espécie entérica, não seria de todo inesperado encontrar ADN desta espécie em amostras fecais, não adicionando qualquer informação sobre a capacidade deste exame revelar a presença de *Helicobacter* gástricas.

No caso de *H. pylori*, há muito que se questiona se de facto não se trata de uma espécie adaptada exclusivamente a primatas e, quando encontrada em animais de companhia, se estar em presença de casos de antropozoonoses (Solnick & Schauer, 2001). Na nossa população em estudo, *H. pylori* foi identificado no estômago de único gato. Estes dois factos em conjunto levaram a que não fosse efectuada a pesquisa desta espécie em fezes de cão e gato.

Os resultados de PCR efectuados com *primers* específicos para as espécies gástricas de *Helicobacter* mostram que este método apenas permitiu detectar *H. bizzozeronii* num cão e

*H. felis* noutro cão. As restantes análises não permitiram a amplificação de qualquer fragmento de ADN.

Para que seja amplificado ADN de espécies gástricas nas fezes, as bactérias têm que sobreviver aos processos digestivos que ocorrem ao longo do tracto gastrointestinal posterior. É possível que seja necessária uma densidade de colonização muito elevada para que haja um excesso de ADN bacteriano, permitindo que algum resista à digestão e assim possa ser amplificado. Esta hipótese deverá ser considerada nos dois casos de cães em que se observou amplificação de ADN de espécies gástricas de *Helicobacter*, podendo os restantes pacientes estar colonizados com uma densidade baixa ou moderada.

Contudo, tem de se considerar a prevalência relativamente baixa de *Helicobacter* sp. na população estudada, não podendo descartar a possibilidade de os pacientes testados simplesmente não estarem colonizados. No entanto, o facto de todos os pacientes terem sintomatologia gastrointestinal sem causa aparente, em conjunto com o potencial patogénico de *Helicobacter* (Bridgeford et al., 2008; Jergens et al., 2009; Leib et al., 2007) torna esta hipótese pouco provável.

O potencial da utilização desta técnica para diagnosticar gastrites crónicas por *Helicobacter* não deve ser totalmente descartado. Um cão cuja amostra fecal resultou na amplificação de ADN de *H. bizzozeronii* tinha sido sujeito a laparotomia exploratória e foi obtida uma biópsia gástrica. A análise por PCR realizada com ADN extraído dessa amostra amplificou bandas para *H. felis*, "*H. heilmannii*" e *H. bizzozeronii*. O facto de o ADN de *H. bizzozeronii* ter sobrevivido à digestão continua do tracto digestivo posterior deste paciente demonstra que a utilização de PCR para a detecção de *Helicobacter* gástricas se pode ainda revestir de alguma importância em termos diagnóstico.

Seria necessário reavaliar a potencialidade deste exame complementar com mais pacientes com um estado de colonização de *Helicobacter* conhecido, utilizando *primers* específicos a nível de espécie. Assim, seria possível comparar resultados de amostras gástricas com amostras fecais, permitindo avaliar se de facto é possível, em amostras fecais, amplificar ADN de *Helicobacter* gástricas em indivíduos colonizados com estas bactérias.

Em relação às amostras de tecido gástrico, a técnica utilizada permitiu amplificar exclusivamente as bandas esperadas para as espécies de *Helicobacter* em estudo, com a excepção de *H. bizzozeronii* e “*H. heilmannii*” (figuras 9, 14, 15, 16, 17 e anexo II), confirmando a eficácia do processo de extracção de ADN de tecido gástrico e a especificidade dos *primers*.

No caso de “*H. heilmannii*”, para além da banda esperada de 580-pb, foram amplificados vários fragmentos entre 800-pb e 1000-pb. Estas bandas inespecíficas observadas com a utilização de *primers* específicos para “*H. heilmannii*” (figura 17) já tinham sido reportadas por Priestnall et al. (2004). Estes autores não consideram a sua presença impeditiva da interpretação da PCR, não tendo avançado qualquer explicação para o seu aparecimento, pois confirmaram a validade da PCR com FISH. Outros estudos que utilizaram os mesmos *primers* não incluíram imagens (Duquenoy & Le Luyer, 2009; Takemura et al., 2009) ou incluíram imagens incompletas das electroforeses feitas para visualizar as bandas, não permitindo avaliar a especificidade dos *primers* (Neiger et al., 1998).

Na tentativa de encontrar uma explicação para estas bandas, foi efectuada uma consulta à base de dados Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997), não revelou a existência de outros organismos com sequências passíveis de hibridar com os *primers* utilizados. Assim, é pouco provável que estas bandas correspondam a resultados inespecíficos por amplificação de sequências de diferentes espécies bacterianas. Contudo, dever-se-á considerar a possibilidade da presença de estirpes ainda não identificadas. De facto, o ADN utilizado como controlo original provém de “*H. heilmannii*” tipo 2; pelo que a simples presença dos tipos 1, 2, 3, e 4 em simultâneo poderia estar na origem das bandas inespecíficas. Uma vez que o genoma desta espécie ainda não foi sequenciado, é difícil avaliar esta questão. A sequenciação das bandas inespecíficas amplificadas poderia ajudar a clarificar este assunto.

As reacções efectuadas com *primers* específicos para *H. bizzozeronii* amplificaram sistematicamente duas bandas inesperadas de 1000-pb e de 2000-pb (figura 16), para além da esperada banda de 420-pb em ADN de origem felina. Tal como “*H. heilmannii*”, a hipótese de os *primers* utilizados amplificarem zonas do ADN de outros organismos foi descartada, com o auxílio da base de dados Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997). Foi investigada também a possibilidade de ter ocorrido hibridação dos *primers* com mais que duas zonas na sequência nucleotídica que codifica a urease de *H. bizzozeronii* utilizando o programa de análise de sequências Gene Runner. Os resultados

obtidos permitiram descartar esta hipótese. Finalmente, testamos a hipótese de estarmos em face a uma hibridação interna dos *primers*, através da re-amplificação de todas as bandas da reacção original. Caso se tratasse de hibridação interna, esperar-se-ia que a re-amplificação da banda com 2000-pb produzisse bandas com 2000-pb, 1000-pb e 420-pb; que a de 1000-pb amplificasse as de 1000-pb e 420-pb; e que a de 420-pb só se amplificasse a si mesmo. No entanto, verificamos tal apenas sucedeu no caso da banda de 420-pb do gato nº10 (figura 22), que se apresenta muito carregada e com o efeito de *smearing*, pelo que pode ser apenas resultado de excesso de ADN.

A amplificação de bandas inespecíficas pode ter várias outras causas. A presença de cópias seriadas do mesmo gene na mesma região do genoma pode levar ao aparecimento das bandas inespecíficas. A ligação dos *primers* a duas cópias distintas do mesmo gene, como demonstra a figura 33, leva a ampliação de bandas de tamanhos superiores aos esperados. No caso de *H. bizzozeronii*, como o seu genoma ainda não foi completamente sequenciado, não podemos descartar por completo esta hipótese. Todavia, o facto das duas bandas inespecíficas não serem múltiplos de 420, torna esta possibilidade mais improvável.

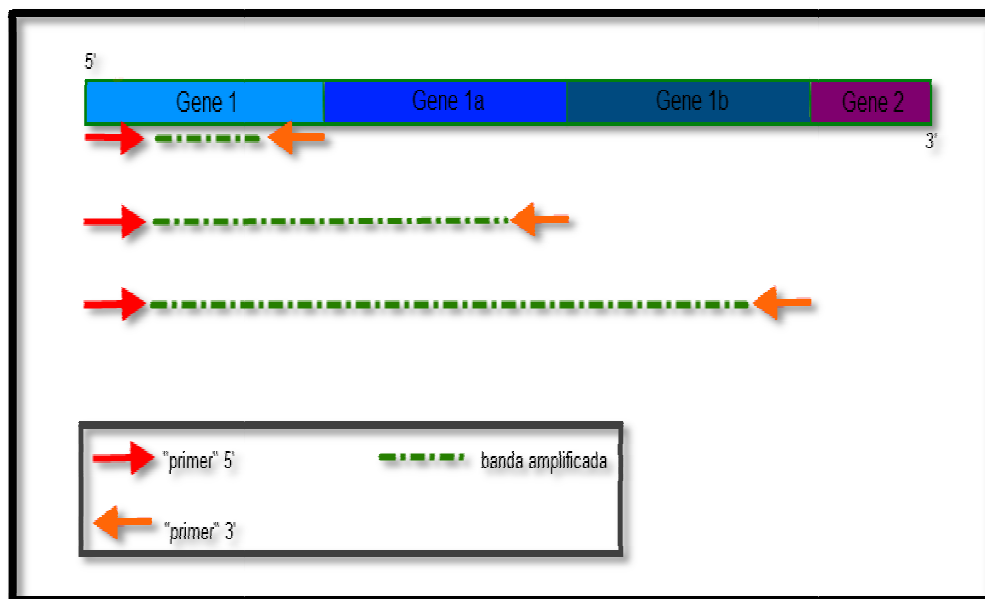


Figura 33: Possibilidade de amplificação de fragmentos com diferentes tamanhos. A existência de cópias do mesmo gene presentes no genoma de *H. bizzozeronii* poderia explicar a presença das bandas inespecíficas amplificadas.

Para encontrar a razão da amplificação destes fragmentos seria necessária a sequenciação do ADN presente nas bandas observadas. Só assim é seria possível comparar as seqüências amplificadas, podendo-se avaliar a possibilidade de terem a sua origem em

estirpes diferentes de *H. bizzozeronii* e de "*H. heilmannii*", de hibridações internas até a data desconhecidas, ou da presença de várias cópias do mesmo gene.

No caso particular de *H. bizzozeronii*, deverá ser considerada a hipótese de existirem, na população felina Portuguesa, uma ou mais estirpes diferentes ainda não identificadas. De facto, observámos que estas bandas foram exclusivamente amplificadas em amostras de ADN felino. Acresce ainda que, na base de dados Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997) há referência a uma estirpe que amplifica, com os *primers* utilizados, uma banda próxima de 1000-pb. No seu conjunto, estas observações contribuem para fundamentar a hipótese acima levantada, mas é necessário que os estudos sejam aprofundados para a confirmar.

Os nossos resultados de PCR de biopsias de estômago mostram uma prevalência global para o género *Helicobacter* de 37,5% e 48,9% em canídeos e felídeos respectivamente. As prevalências por nós encontradas são muito mais baixas que as reportadas noutros estudos (vide tabela 2). A maioria dos autores considera que a prevalência de *Helicobacter* em animais de companhia varia entre 40 e 100% (Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1996b; Neiger & Simpson, 2000; Norris et al., 1999; Otto et al., 1994; Recordati et al., 2007; Solnick & Schauer, 2001). Apenas foi descrita uma prevalência semelhante numa população de gatos nos E.U.A. (Strauss-Ayali et al., 2001).

Uma das possíveis razões para as diferenças encontradas poderá estar relacionada com o estilo de vida dos nossos animais de companhia, que tem frequentemente acesso ao exterior, não ficando limitado ao ambiente doméstico. Também deverá ser levados em consideração factores genéticos (Haesebrouck et al., 2009; Harbour & Sutton, 2008; Solnick & Schauer, 2001) e/ou alimentares dos animais que possam dificultar a colonização por *Helicobacter* spp. No entanto, a utilização de métodos muito díspares para determinar a prevalência citada na literatura torna difícil a comparação entre vários estudos e regiões. De facto, muitos estudos foram efectuados com base na identificação por observação microscópica de espiroquetas (Eaton et al., 1996; Moutinho et al., 2007; Norris et al., 1999) ou através do teste da urease (Otto et al., 1994), o que poderá ter originado valores mais inflacionados que os na realidade presentes.

Não foi possível demonstrar, em qualquer das espécies em estudo, a existência de um tropismo específico para uma das regiões gástricas, o que está de acordo com o reportado noutros estudos (Priestnall et al., 2004). Embora a associação entre o poder patogénico de

uma dada espécie de *Helicobacter* e a sua presença numa região específica da mucosa gástrica tivesse sido postulada (Jakob, Stolte, Valentin & Schroder, 1997; Lee et al., 1992), não é possível, no nosso estudo, avaliar tal relação.

As prevalências encontradas para cada uma das espécies de *Helicobacter* sp. em estudo foram, respectivamente em canídeos e felídeos, de 0,0% e 2,1% para *H. pylori*, 7,1% e 0,0% para *H. felis*, 17,9% e 48,9% para "*H. heilmannii*", 28,6% e 34,0% para *H. bizzozeronii* e 10,7% e 0,0% para *H. salomonis*. Estas prevalências individuais são também substancialmente diferentes do relatado em relação a outras populações estudadas (Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1998; Hwang et al., 2002a; Moutinho et al., 2007; Neiger et al., 1998; Otto et al., 1994; Priestnall et al., 2004; Shen et al., 2001; Shojaee Tabrizi et al., 2010; Strauss-Ayali et al., 2001; Strauss-Ayali & Simpson, 1999; Van den Bulck et al., 2005b; Wiinberg et al., 2005).

Comparando os nossos resultados com o descrito na literatura, sobressai a ausência de *H. felis* e *H. salomonis* na mucosa gástrica de felídeos e a existência de um maior número de felídeos colonizados com *H. bizzozeronii* do que canídeos.

Apesar da ausência de *H. felis* na população felina estar de acordo com a população Coreia estudada (Ghil et al., 2009), este facto contrasta com estudos realizados no E.U.A. e na Europa (Jalava et al., 1998; Neiger et al., 1998; Strauss-Ayali et al., 2001; Van den Bulck et al., 2005b), em que todas as populações compreendiam gatos colonizados com *H. felis*. Contudo, Priestnall et al. (2004) demonstraram uma diferença na prevalência de *H. felis* em populações felinas de origem Americana e Alemã. Nos gatos Americanos foi determinada uma prevalência de 18% em quanto nos Alemães foi de 7%, demonstrando que existe variações naturais nas populações colonizadoras de *H. felis*.

A não detecção de *H. salomonis* em felídeos não tinha sido reportada antes, mas a baixa prevalência geralmente associada a este organismo na população mundial de carnívoros domésticos (Haesebrouck et al., 2009; Van den Bulck et al., 2005b) não permite retirar ilações sobre o significado das pequenas diferenças entre populações. Todavia, existe a possibilidade de a colonização de *H. salomonis* ser inibida nestes indivíduos pela presença de *H. bizzozeronii* (Hanninen et al., 1998). Para se avaliar a real prevalência desta espécie seria necessário avaliar uma população muito maior do que as estudadas até a data.

A existência de um maior número de gatos colonizados com *H. bizzozeronii* do que cães na população estudada contrasta com a prevalência descrita por Van den Bulck et al. (2005b) e Priestnall et al. (2004), em que esta espécie foi encontrada em 70% e 60% das amostras de

origem canina respectivamente. A possível existência de uma nova estirpe de *H. bizzozeronii*, hipótese acima levantada, nos gatos Portugueses poderia explicar esta divergência.

A presença de um maior número de gatos colonizados com "*H. heilmannii*" do que cães na população estudada está em concordância com outros autores (Hwang et al., 2002a; Priestnall et al., 2004). O facto de não estarem disponíveis *primers* que permitam diferenciar entre os vários tipos de "*H. heilmannii*" impossibilitam uma comparação com estudos que, através da utilização de FISH, caracterizaram mais profundamente a população desta bactéria nos gatos (Bridgeford et al., 2008; Jergens et al., 2009).

Na população em estudo verificou-se a amplificação por PCR da banda esperada para género em dois cães, em que não foi possível a identificação da espécie de *Helicobacter* responsável por estas colonizações. É possível que estes casos se tratassem de animais colonizados com uma espécie recentemente identificada, *H. cynogastricus* (Van den Bulck, 2006), mas esta hipótese não foi testada pois não existem descritos *primers* específicos para esta espécie, e o seu desenho e avaliação de especificidade e sensibilidade estava para além dos objectivos do presente trabalho.

No seu conjunto, foi evidenciada a presença de populações mistas de *Helicobacter* spp. em 19,6% dos cães e 34,0% dos gatos. Comparando os nossos resultados com o descrito na literatura, sobressai a identificação de um maior número de indivíduos com populações mistas nos felídeos.

Nas populações estudadas na Bélgica (Van den Bulck et al., 2005b), Alemanha e E.U.A. (Priestnall et al., 2004) foi demonstrado que é mais comum encontrar populações mistas de *Helicobacter* em cães do que em gatos, o que contraria os nossos resultados (figura 19). É possível que esta diferença seja resultado de idiosincrasias individuais e não directamente ligada a diferenças dietéticas, face à elevada variabilidade da microbiota intestinal em cães, independentemente da sua dieta (Simpson, Martineau, Jones, Ballam & Mackie, 2002).

As prevalências evidenciadas na amostra da população de animais de companhia em estudo sugerem a possibilidade de algumas das gastrites crónicas idiopáticas identificadas em cães e gatos poderem estar relacionadas com colonização por *Helicobacter*. Com o conhecimento sobre a prevalência destas bactérias, e após eliminação de outras possíveis causas de gastrite crónica, como doença sistémica, parasitas, fármacos ou intolerância alimentar, poderá ser considerada a instituição de uma terapêutica dirigida a gastrite crónica por *Helicobacter*.

A avaliação histopatológica de biopsias gástricas tem sido amplamente utilizada, tanto para a classificação e identificação de lesões como para a pesquisa de espiroquetas (Erginsoy & Sozmen, 2006; Hermanns et al., 1995; Jakob et al., 1997; Lee et al., 1992; Simpson et al., 1999a). Contudo, a falta de padronização destas análises dificultou muito a comparação de resultados entre estudos (Neiger & Simpson, 2000). Em 2008, a *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group* publicou um conjunto de normas que visa facilitar a uniformização dos critérios utilizados aquando de uma avaliação histopatológica (Day et al., 2008). Foram estes os critérios utilizados na avaliação histopatológica das biopsias colhidas (anexo 3), acrescidos de uma escala visual primeiro preconizada por Happonen et al. (Happonen et al., 1998).

Ao enviar para análise histopatológica uma biopsia gástrica obtida de um paciente com gastrite crónica idiopática, é essencial indicar a suspeita clínica da colonização por *Helicobacter*. A importância deste ponto prende-se com a necessidade de utilizar colorações específicas para a visualização destas espiroquetas, devido à dificuldade na sua identificação em cortes corados com a coloração de rotina em histopatologia - Hematoxilina-Eosina (Scanziani et al., 2001). Mesmo na presença de uma colonização densa, a coloração de um corte histológico com Giemsa permite a visualização muito mais eficazmente do que com H&E (figura 34).

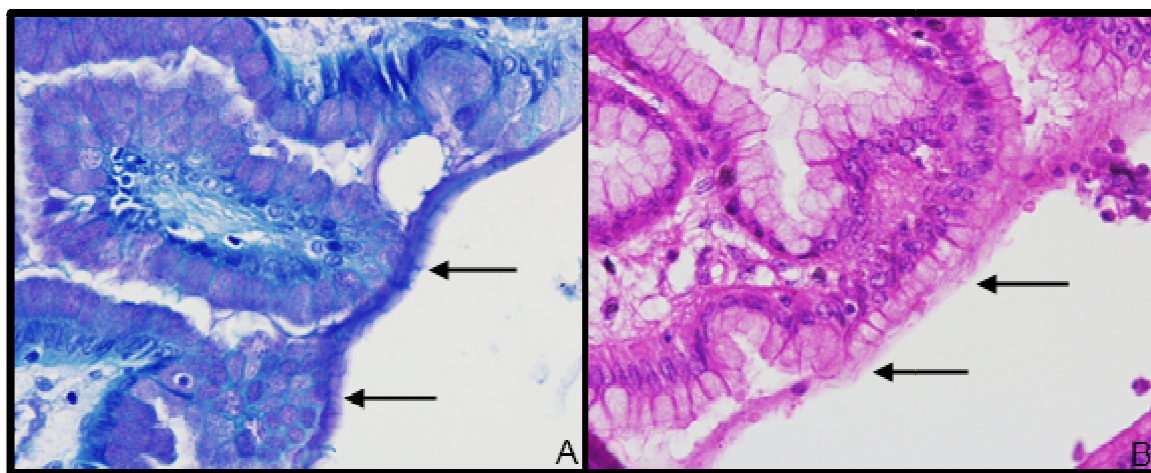


Figura 34: Corte histológico do estômago do canídeo nº102 evidenciando a presença de espiroquetas (setas): (A) Giemsa 400x, (B) H&E 400x. Original.

A distribuição focal de *Helicobacter* no ambiente gástrico requer a observação de mais do que uma região gástrica, para minimizar o número de falsos resultados negativos (Neiger & Simpson, 2000; Simpson et al., 1999a; Simpson et al., 1999b; Simpson et al., 2000b).

Nos animais incluídos no presente estudo, foram efectuados 37 cortes cortes histológicos, nos quais em 14 foi possível observar espiroquetas em das amostras, das quais 7 de cães (N=23) e 7 de gatos (N=14). Os esfregaços da parede da mucosa gástrica permitiram a visualização de espiroquetas em 21 amostras, das quais 10 de cães (N=33) e 11 de gatos (N=24).

Comparando os resultados da evidenciação microscópica de espiroquetas com os resultados de PCR foi possível constatar algumas discrepâncias.

Foram obtidos falsos resultados negativos nas análises histopatológicas, em comparação com os resultados de PCR, de três cães e quatro gatos. Cinco destas sete amostras foram obtidas a partir de cadáveres em que os processos de autólise poderão ter afectado negativamente a visualização das espiroquetas. Duas das amostras foram obtidas *in vivo*, não sendo possível imputar a fenómenos de decomposição as causas dos resultados obtidos. Contudo, o resultado pode ter sido comprometido pelas dimensões reduzidas das amostras analisadas, por se tratar de casos com baixa colonização ou pela a característica distribuição focal da bactéria. Como PCR permite a detecção de ADN a partir de um número reduzido de células, com um limite mínimo de apenas 70 bactérias (Hammar et al., 1992; Sugimoto et al., 2009) é natural que, com uma amostra pequena, sejam obtidos resultados positivos para *Helicobacter* por PCR, apesar da avaliação por microscopia óptica não permita a sua detecção. Neste aspecto, a utilização em paralelo de um esfregaço da mucosa gástrica, que permite avaliar zonas mais amplas do estômago, pode ajudar a diminuir número de falsos resultados negativos e o número de biopsias necessárias para fazer uma avaliação completa do órgão.

Todavia, mesmo com recurso à utilização de esfregaços, existe a possibilidade de falsos resultados positivos (Strauss-Ayali et al., 2001). Na população avaliada, foram observadas espiroquetas nos esfregaços obtidos da mucosa gástrica de quatro gatos, que produziram resultados negativos por PCR com *primers* específicos para *Helicobacter* spp. É claro que, mais uma vez, a distribuição focal das bactérias pode explicar esta discrepância. Assim, a amostra utilizada para extracção de ADN poderia não conter *Helicobacter*, o que não implica necessariamente que a totalidade do estômago estivesse igualmente não colonizada.

Na escolha do exame complementar para detecção da presença de *Helicobacter* num paciente com gastrite crónica idiopática, é importante tomar em consideração todos os factos acima referidos. Idealmente, dever-se-á efectuar sempre um esfregaço da parede gástrica quando se obtêm uma biópsia; caso tal não seja possível, o clínico deve sempre interpretar os resultados da análise histopatológica no contexto dos sinais clínicos

apresentados pelo paciente. Face a uma gastrite crônica idiopática, é importante recordar que existe sempre a possibilidade de falsos resultados negativos para *Helicobacter* spp., sendo decisão do clínico a eventual necessidade de terapêutica para *Helicobacter*, mesmo na ausência de diagnóstico definitivo. Por exemplo, a prevalência destas bactérias na região geográfica em que o animal se encontra inserido pode ser suficiente para considerar a terapêutica mesmo quando os exames complementares indicam um resultado negativo.

A demonstração da presença de *Helicobacter* spp. nos mais variados animais (Goldman et al., 2009; Shen et al., 2001) e associação da presença destas espiroquetas com alterações gástricas (Eaton et al., 1993; Jakob et al., 1997; Queiroz et al., 1996) levanta a possibilidade de, tal como no Homem, *Helicobacter* poder ter um papel patogénico no desenvolvimento de alterações gástricas.

*H. pylori* está classificado pela Associação Mundial de Saúde como um microrganismo carcinogénico de classe I (WHO, 1994) devido à sua capacidade de causar alterações a nível da mucosa gástrica no Homem, levando, em alguns casos, ao desenvolvimento de neoplasias gástricas (Pakodi, Abdel-Salam, Debreceni & Mozsik, 2000). A resposta inflamatória que *H. pylori* provoca e mantém no hospedeiro pode, se prolongada no tempo, provocar uma atrofia de mucosa, seguida por uma hipertrofia compensatória (De Bock et al., 2006). Esta hipertrofia em conjunto com a libertação de citoquinas e outros compostos em consequência da resposta inflamatória que vão danificando o ADN celular enquanto aumentam o crescimento e sobrevivência celular, contribui para o desenvolvimento de malignidade (Balkwill & Mantovani, 2001). A presença de um maior número de receptores Shh nestas células proliferativas, permitindo um aumento na sua resistência à apoptose, contribui para uma maior de sobrevivência destas células (Martin, Donnelly, Houghton & Zavros, 2010) e a sua transformação neoplásica.

Nos canídeos e felídeos ainda não foi inequivocamente demonstrada uma ligação clara entre a presença de *Helicobacter* spp. e doença, existindo estudos que demonstram essa relação (Takemura et al., 2009) em quanto outros não a evidenciam (Moutinho et al., 2007). Contudo, está claro que animais com gastrites crônicas idiopáticas melhoram significativamente quando submetidos a antibioterapia específica contra *Helicobacter* spp. (Jergens et al., 2009; Leib et al., 2007). Estudos experimentais demonstram que *H. felis* (Simpson et al., 2000a) e *H. pylori* (Rossi et al., 1999) têm a capacidade de causar

alterações na mucosa gástrica em cães e nos gatos. Estes factos reforçam a suspeita que, pelo menos em parte, estas bactérias possam contribuir para o desenvolvimento de alterações gástricas em animais de companhia.

Em contraste com gastrites a *H. pylori* no Homem (Van den Bulck et al., 2005b), os animais de companhia podem ser colonizados por uma população mista de *Helicobacter*, sendo possível que uma espécie seja patogénica e outra o não seja (Erginsoy & Sozmen, 2006; Scanziani et al., 2001). Uma vez que vários estudos não tomaram este facto em consideração quando avaliaram a ligação entre colonização e o desenvolvimento de doença (Happonen et al., 1998; Hermanns et al., 1995; Moutinho et al., 2007; Recordati et al., 2007; Shojaee Tabrizi et al., 2010), não nos é possível eliminar a hipótese que a simples ausência de uma espécie possa explicar a baixa correlação encontrada entre colonização e doença (Strauss-Ayali et al., 2001). Dados obtidos por Lee et al. (1992) demonstram uma ligação entre *H. felis* nos cães mas não nos gatos, o que confirma a necessidade de estudar de forma mais completa as espécies de *Helicobacter* presentes em canídeos e felídeos.

Os dados epidemiológicos demonstram que existe uma grande variação na prevalência destas bactérias nas várias populações de animais de companhia no mundo (Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1998; Hwang et al., 2002a; Moutinho et al., 2007; Neiger et al., 1998; Otto et al., 1994; Priestnall et al., 2004; Shen et al., 2001; Shojaee Tabrizi et al., 2010; Strauss-Ayali et al., 2001; Strauss-Ayali & Simpson, 1999; Van den Bulck et al., 2005b; Wiinberg et al., 2005). Esta variação pode também influenciar os dados relatados nos diversos estudos, uma vez que a não observação de relação entre colonização e doença num país não pode ser directamente extrapolada para outro. Por esta razão, é importante estabelecer a prevalência de *Helicobacter* spp. em diferentes países, avaliando quais as espécies mais comuns e qualquer relação com alterações gástricas em animais de companhia.

Nos felídeos, a espécie *Helicobacter* tem uma importância potencialmente mais elevada devido à sua ligação com o desenvolvimento de hipertrofia linfocelular (Simpson et al., 2000b; Takemura et al., 2009) e sua potencial progressão para linfoma alimentar (Bridgeford et al., 2008). Em medicina humana, a eliminação de *H. pylori* contribui para a regressão de alguns linfomas (Roggero et al., 1995), permitindo-nos especular que o mesmo poderá ser verdade em gatos. O linfoma é a neoplasia mais frequentemente descrita nos gatos (Wilson, 2008), pelo que a hipótese de se poder induzir a sua regressão após uma antibioterapia adequada deve ser considerada (Bridgeford et al., 2008), sendo necessário estudar cuidadosamente esta possibilidade.

No presente estudo, foi avaliada a presença de associações significativas entre a presença de doença do foro gástrico e as diferentes espécies de *Helicobacter* sp. evidenciadas por PCR.

Em relação a felídeos, verificou-se que gatos com sinais clínicos gastrointestinais se encontravam mais frequentemente colonizados com "*H. heilmannii*" do que gatos sem esses sinais. Os nossos resultados mostram que 2 gatos colonizados com "*H. heilmannii*" apresentavam sinais clínicos gastrointestinais, enquanto que apenas 1 gato igualmente colonizado não apresentava estes sinais. Embora esta associação se tenha mostrado estatisticamente significativa, não podemos de forma alguma fazer afirmações com base numa amostragem tão reduzida. Este estudo deverá ser alargado a um maior número de casos, a fim de poder confirmar esta associação.

Contudo, esta observação está em concordância com as descrições de outros autores que demonstram que "*H. heilmannii*" é a espécie com maior potencial patogénico no gato (Bridgeford et al., 2008; Takemura et al., 2009). As manifestações clínicas dos pacientes podem representar tentativas de eliminação de *Helicobacter*, o agente agressor, do ambiente gástrico. Neste caso, uma vez eliminadas outras causas de vômito, estes pacientes beneficiavam de uma antibioterapia adequada. Tal como acontece nos cães (Leib, et al., 2007), seria espectável que os sinais clínicos se resolvam ou atenuem com a eliminação ou diminuição de *Helicobacter* na mucosa gástrica.

O facto de não se ter evidenciado qualquer relação entre sinais clínicos e alterações histopatológicas nos gatos avaliados nesta população está em perfeita concordância com Willard et al. (2002), que demonstram que alterações histopatológicas não se relacionavam com manifestações clínicas. A inexistência de relações entre colonização e alterações histopatológicas nos gatos estudados pode ser um reflexo deste facto. Contudo, estes dados deverão ser considerados com precaução, pois apenas 19 gatos foram avaliados histopatologicamente, e esta pequena amostragem pode não ser representativa da população.

Alguns autores têm demonstrado, em estudos efectuados com amostragens consideravelmente maiores do que a aqui estudada, uma ligação entre alterações histopatológicas, nomeadamente hipertrofia linfocelular, e a presença de "*H. heilmannii*" nos felídeos (Bridgeford et al., 2008; Takemura et al., 2009). Interessantemente, num dos gatos estudados, colonizado com "*H. heilmannii*", foi identificada hipertrofia linfocelular,

reforçando a possibilidade de uma ligação entre a bactéria e a alteração patológica. Outro dado importante resultante deste estudo é que todos os animais identificados com alterações inflamatórias estavam colonizados com *Helicobacter*.

O stress que pode contribuir para o desenvolvimento de gastrites crónicas provocadas por *Helicobacter* em gatos. Guo et al. (2009) demonstraram que um aumento de stress em ratinhos resultava num aumento de colonização por *H. pylori*. Nos felídeos, uma espécie muito sensível aos efeitos biológicos do stress, é possível este seja um factor que importante para o desencadeamento dos efeitos nocivos de *Helicobacter*.

Estas três observações, em conjunto com outros estudos que demonstram ligação entre a presença de bactéria e doença (Bridgeford et al., 2008; Feinstein & Olsson, 1992; Fox et al., 1995a; Hermanns et al., 1995; Jergens et al., 2009; Takemura et al., 2009), satisfazem alguns dos postulados de Hill (1965) para associação entre agente e doença: consistência, coerência, e plausibilidade. Outro postulado de Hill fica confirmado quando juntamos a semelhança de quadro clínico e das alterações histológicas encontrada entre animais de companhia e humanos colonizados com *Helicobacter* (Harbour & Sutton, 2008; Morgner, Bayerdorffer, Meining, Stolte & Kroher, 1995; Rossi et al., 2000), o da analogia. Assim os nossos resultados sugerem que, apesar de os processos serem ainda desconhecidos, é possível que exista uma ligação entre colonização por "*H. heilmannii*" e gastrite crónica em felídeos.

A avaliação de associações significativas entre a presença de doença do foro gástrico e as diferentes espécies de *Helicobacter* sp. evidenciadas por PCR em canídeos revelou que cães com alterações inflamatórias da mucosa gástrica se encontravam mais frequentemente colonizados com "*H. bizzozeronii*" do que cães sem essas alterações. Os nossos resultados mostram que todos os 5 cães colonizados com "*H. bizzozeronii*" apresentavam alterações gástricas do foro inflamatório, enquanto que apenas 1 cão igualmente colonizado não apresentava estas alterações.

Estes resultados estão em contradição com o relatado por outros autores (Simpson et al., 1999b). Contudo, o facto de não ter sido observada qualquer relação entre sinais clínicos gastrointestinais e colonização pode indicar a presença de doença sub-clínica (Willard et al., 2002). Nos cães, ao contrário dos gatos, o poder patogénico de *Helicobacter* não se

encontra exclusivamente relacionado com uma única espécie em particular (Haesebrouck et al., 2009).

Pensa-se que o desenvolvimento de doença crónica nos canídeos possa ser devido a uma interacção sinérgica entre *H. felis* e *H. bizzozeronii* (Haesebrouck et al., 2009). De facto, na população em estudo, *H. felis* nunca foi identificado como colonizador único, estando sempre presente com diferentes combinações de populações de *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* e "*H. heilmanni*". É possível que a correlação observada entre alterações inflamatórias e *H. bizzozeronii* seja um reflexo dessa acção sinérgica.

Contudo, é de realçar que nenhum cão considerado normal à análise histopatológica estava colonizado com *Helicobacter*. Isto reforça a hipótese que cães colonizados com *Helicobacter* poderem estar numa fase compensada de doença sub-clínica, só havendo desenvolvimento de sinais clínicos quando algum factor, como a imunodepressão, puser em causa este equilíbrio. O facto existir evidência de que os cães conseguem eliminar *Helicobacter* através de uma resposta humoral competente (Wiinberg et al., 2005), e que animais sintomáticos melhoram com antibioterapia (Jergens et al., 2009; Leib et al., 2007) contribuem para suportar esta teoria.

A relação entre colonização com *Helicobacter* e doença gastrointestinal em animais de companhia necessita ser clarificada, pois alguns estudos a demonstraram uma relação causa efeito (Takemura et al., 2009) enquanto outros não o evidenciaram (Norris et al., 1999; Simpson et al., 1999b). Tal como acontece em humanos, em que alguns indivíduos colonizados com *H. pylori* não desenvolvem doença, nem todos os animais colonizados com *Helicobacter* desenvolvem doença (Schlenker & Surawicz, 2009). No caso de *H. pylori*, sabe-se que existem estirpes mais virulentos que outras e que polimorfismos genéticos do próprio hospedeiro são importantes factores que influenciam o desenvolvimento, ou não, de doença crónica (De Bock et al., 2005; Harbour & Sutton, 2008). Apesar de se encontrarem descritas várias estirpes de algumas espécies que colonizam o cão e o gato (Jalava et al., 1998) o seu potencial patogénico não é conhecido. Os dados recolhidos na literatura sugerem que nem todas as espécies de *Helicobacter* são patogénicas para os animais de companhia, havendo algumas espécies que, quando presentes, causam doença e outras não (Haesebrouck et al., 2009; Solnick & Schauer, 2001).

Os resultados obtidos na população em estudo sugerem que “*H. heilmannii*” nos gatos e *H. bizzozeronii*/*H. felis* nos cães, podem ter um papel importante no desenvolvimento de patologia gástrica. Esta relação não é directa, tal como acontece em humanos colonizados com *H. pylori* (Dehghani, Erjaee, Imanieh & Haghigat, 2009; Schlenker & Surawicz, 2009; Velin et al., 2009), mas várias observações reportadas até a data (Bridgeford et al., 2008; Feinstein & Olsson, 1992; Fox et al., 1995a; Hermanns et al., 1995; Jergens et al., 2009; Lee et al., 1992; Leib et al., 2007; Simpson et al., 2000b; Takemura et al., 2009), incluindo este estudo, satisfazem todos os postulados de Hill (Hill, 1965): existe uma força de associação, consistência, especificidade, associação temporal, plausibilidade, coerência, confirmação experimental de indução de doença (Radin et al., 1990; Simpson et al., 2000b; Simpson et al., 2001) e analogia com outros modelos de causa-efeito. Assim, consideramos útil a realização de estudos mais aprofundados, que definitivamente comprovem ou contrariem a hipótese de existência de uma associação entre a *Helicobacter* e a alterações gástricas em animais de companhia.

#### **4. Considerações finais e perspectivas para o futuro**

No presente estudo encontraram-se populações de *Helicobacter* spp. numa população típica de animais de companhia em Portugal com prevalências de 37,5% em canídeos e 48,9% em felídeos. Verificaram-se duas associações importantes: a relação entre a presença de “*H. heilmannii*” em gatos e o desenvolvimento de sinais clínicos gástricos e entre a presença de *H. bizzozeronii* e o aparecimento de alterações inflamatórias na mucosa gástrica de cães. Determinou-se ainda a utilidade de esfregaços da parede da mucosa gástrica como exame complementar de diagnóstico e a necessidade de avaliar resultados histopatológicos à luz dos sinais clínicos evidenciados pelo paciente. Todos estes resultados podem ter repercussões na prática clínica.

No exercício quotidiano de clínica de animais de companhia, e face aos resultados acima apresentados, poder-se-á justificar a inclusão de pesquisa de *Helicobacter* na lista de diagnósticos diferenciais em casos de gastrite crónica, quando o paciente se apresenta a consulta com sinais clínicos do foro gástrico sem causa conhecida. A fisiopatologia da gastrite crónica provocada por *Helicobacter* é complicada e inclui factores específicos tanto de cada espécie desta bactéria como do próprio hospedeiro. Se todas as outras causas de gastrite crónica já tenham sido excluídas, a prevalência determinada poderá sustentar a

instituição de uma antibioterapia empírica, específica para gastrites a *Helicobacter*. Desta forma, poder-se-á melhorar tanto a vida dos pacientes como a dos proprietários.

Um diagnóstico definitivo de gastrite crónica por *Helicobacter* pode ser obtido através da avaliação histopatológica de biopsias gástricas. O clínico deve ter o cuidado de pedir biopsias das várias regiões gástricas e que seja efectuado um esfregaço da parede da mucosa gástrica. Com o pedido de avaliação histopatológica é imprescindível referir a suspeita de gastrite crónica por *Helicobacter*, de forma a permitir ao patologista efectuar colorações específicas nos cortes histológicos que facilitem a identificação de espiroquetas. Desta forma, maximiza-se a probabilidade de evidenciar as espiroquetas eventualmente presentes na observação microscópica.

Tudo indica que existe pelo menos uma espécie de *Helicobacter* particularmente patogénica para cada espécie de mamífero existente. Apesar de ainda não estar identificada qual a espécie mais patogénica no cão, no gato é muito provável que seja "*H. heilmanni*".

A gastrite crónica idiopática é uma fonte de frustração tanto para o médico veterinário assistente como para os proprietários. A possibilidade de que, em alguns casos, estas gastrites possam ser devidas à presença de *Helicobacter* deverá ser considerada. Assim o médico veterinário poderá optar por uma terapêutica específica, melhorando a qualidade de vida tanto dos seus pacientes como dos proprietários.

Contudo existe a necessidade de prosseguir os estudos para esclarecer cabalmente vários aspectos desta doença. A nível laboratorial, são necessários mais estudos para avaliar qual o tipo de "*H. heilmanni*" que provoca doença nos gatos, quais as populações mais representativas, sendo para isso necessário desenvolver métodos de diagnóstico mais específicos, como FISH. Será útil o conhecimento das sequências genéticas de mais espécies de *Helicobacter*, que permitam a avaliação do poder patogénico de cada um e a eventual identificação de novos factores de virulência. A possibilidade de determinação do estado de colonização de um paciente através de análises fecais deverá ser aprofundada, pela importância que tem como potencial exame complementar.

Em termos clínicos, são necessários mais ensaios para se avaliar a resposta a antibioterapia em pacientes com gastrite crônica e comprovadamente colonizados por *Helicobacter* spp. O esquema terapêutico hoje utilizado é extrapolado de ensaios realizados em humanos, pelo que existe a possibilidade de outros compostos se poderem mostrar mais eficazes contra as espécies mais frequentemente encontradas nos animais de companhia. Para confirmar a relação entre o desenvolvimento de sinais clínicos e colonização será necessário estender este estudo a animais cuja evolução dos sinais clínicos possa ser acompanhada.

Face à reconhecida associação entre a presença de *Helicobacter* e o desenvolvimento de linfoma no Homem, julgamos importante avaliar o impacto de uma terapêutica específica para *Helicobacter* em gatos em que foi diagnosticado linfoma alimentar. Esta neoplasia é cada vez mais comum em felídeos e a possibilidade de induzir uma remissão em linfomas não pode ser ignorada.

Finalmente, nunca deveremos esquecer a importância de um raciocínio clínico. Os resultados de qualquer exame complementar de diagnóstico devem ser sempre interpretados tomando em conta o enquadramento clínico, que inclui a história pregressa e os sinais clínicos evidenciados.

*Helicobacter* é uma bactéria fascinante. É um exemplo elegante do desenvolvimento de mecanismos para se evadir às defesas do sistema imunológico do hospedeiro. Tem a capacidade de sobreviver e multiplicar-se num meio agreste, e é essa capacidade que pode ser determinante na sua patogenia. O estudo desta bactéria nos animais de companhia ainda está no seu início, mas tudo indica que a colonização com *Helicobacter* pode ser a etiologia de muitas gastrites crônicas ditas idiopáticas.

## **Bibliografia**

- Abbas, Z., Yakoob, J., Abid, S., Jafri, W., Islam, M., Azam, Z. & Hilal, I. (2009). Furazolidone, co-amoxiclav, colloidal bismuth subcitrate, and esomeprazole for patients who failed to eradicate *Helicobacter pylori* with triple therapy. *Dig Dis Sci*, 54(9), 1953-1957.
- Akada, J. K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M. & Nakazawa, T. (2000). Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol*, 36(5), 1071-1084.
- Al-Soud, W. A., Bennedsen, M., On, S. L., Ouis, I. S., Vandamme, P., Nilsson, H. O., Ljungh, A. & Wadstrom, T. (2003). Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. *J Med Microbiol*, 52(Pt 9), 765-771.
- Albuquerque, P., Mendes, M. V., Santos, C. L., Moradas-Ferreira, P. & Tavares, F. (2009). DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Sci Total Environ*, 407(12), 3641-3651.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Amann, R., Fuchs, B. M. & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol*, 12(3), 231-236.
- Andrutis, K. A., Fox, J. G., Schauer, D. B., Marini, R. P., Murphy, J. C., Yan, L. & Solnick, J. V. (1995). Inability of an isogenic urease-negative mutant strain of *Helicobacter mustelae* to colonize the ferret stomach. *Infect Immun*, 63(9), 3722-3725.
- Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T. & Sasakawa, C. (2000). *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med*, 191(4), 593-602.
- Atherton, J. C. & Spiller, R. C. (1994). The urea breath test for *Helicobacter pylori*. *Gut*, 35(6), 723-725.

- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J. & Cover, T. L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, *270*(30), 17771-17777.
- Azevedo, N. F., Almeida, C., Fernandes, I., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C. W. & Vieira, M. J. (2008). Survival of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp. in water: implications for transmission. *Appl Environ Microbiol*, *74*(6), 1805-1811.
- Baele, M., Decostere, A., Vandamme, P., Ceelen, L., Hellemans, A., Mast, J., Chiers, K., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2008a). Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(6), 1350-1358.
- Baele, M., Decostere, A., Vandamme, P., Van den Bulck, K., Gruntar, I., Mehle, J., Mast, J., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2008b). *Helicobacter baculiformis* sp. nov., isolated from feline stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol*, *58*(Pt 2), 357-364.
- Baele, M., Van den Bulck, K., Decostere, A., Vandamme, P., Hanninen, M. L., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2004). Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. *J Clin Microbiol*, *42*(3), 1115-1122.
- Balkwill, F. & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, *357*(9255), 539-545.
- Beales, I. L., Crabtree, J. E., Scunes, D., Covacci, A. & Calam, J. (1996). Antibodies to CagA protein are associated with gastric atrophy in *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, *8*(7), 645-649.
- Boncrisiano, M., Paccani, S. R., Barone, S., Ulivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elis, M. M., Telford, J. L. & Baldari, C. T. (2003). The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med*, *198*(12), 1887-1897.
- Bridgeford, E., Marini, R., Feng, Y., Parry, N., Rickman, B. & Fox, J. (2008). Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: A viable hypothesis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *123*(1-2), 106-113.

- Bury-Mone, S., Skouloubris, S., Labigne, A. & De Reuse, H. (2001). [Urel: a *Helicobacter pylori* protein essential for resistance to acidity and for the early steps of murine gastric mucosa infection]. *Gastroenterol Clin Biol*, 25(6-7), 659-663.
- Canejo Teixeira, R., Noiva, R., Peleteiro, M. C. & Vilela, C. L. (2010). *Os esfregaços da parede gástrica como meio complementar de diagnóstico de infecções por Helicobacter spp., em canídeos e felídeos*. Paper presented at the 19<sup>o</sup> Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Medicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia, Belém, Lisboa.
- Cattoli, G., van Vugt, R., Zanoni, R. G., Sanguinetti, V., Chiocchetti, R., Gualtieri, M., Vandembroucke-Grauls, C. M., Gaastra, W. & Kusters, J. G. (1999). Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. *Vet Microbiol*, 70(3-4), 239-250.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25), 14648-14653.
- Chisholm, S. (2003). Development and application of a novel screening PCR assay for direct detection of 'Helicobacter heilmannii'-like organisms in human gastric biopsies in Southeast England. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 46(1), 1-7.
- Christie, P. J. & Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol*, 8(8), 354-360.
- Cornetta, A. M., Simpson, K. W., Strauss-Ayali, D., McDonough, P. L. & Gleed, R. D. (1998). Use of a [<sup>13</sup>C]urea breath test for detection of gastric infection with *Helicobacter* spp in dogs. *Am J Vet Res*, 59(11), 1364-1369.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. & Rappuoli, R. (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(12), 5791-5795.
- Cover, T. L. & Blanke, S. R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, 3(4), 320-332.

- Cover, T. L. & Blaser, M. J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 267(15), 10570-10575.
- Cover, T. L., Krishna, U. S., Israel, D. A. & Peek, R. M., Jr. (2003). Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*, 63(5), 951-957.
- Crabtree J. E. (1996). Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 215, 3-10.
- Croxen, M. A., Sisson, G., Melano, R. & Hoffman, P. S. (2006). The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol*, 188(7), 2656-2665.
- Das, P., Lahiri, A. & Chakravorty, D. (2010). Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog*, 6(6), e1000899.
- Day, M. J., Bilzer, T., Mansell, J., Wilcock, B., Hall, E. J., Jergens, A., Minami, T., Willard, M. & Washabau, R. (2008). 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*, 138, S1-S43.
- De Bock, M., Decostere, A., Van den Bulck, K., Baele, M., Duchateau, L., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2005). The inflammatory response in the mouse stomach to *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter salomonis* and two *Helicobacter felis* Strains. *J Comp Pathol*, 133(2-3), 83-91.
- De Bock, M., Decostere, A., Hellemans, A., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2006). *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii* induce gastric parietal cell loss in Mongolian gerbils. *Microbes and Infection*, 8(2), 503-510.
- De Groote, D., Van Doorn, L. J., Van den Bulck, K., Vandamme, P., Vieth, M., Stolte, M., Debongnie, J. C., Burette, A., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2005). Detection of non-*pylori* *Helicobacter* species in "*Helicobacter heilmannii*"-infected humans. *Helicobacter*, 10(5), 398-406.

- Dehghani, S. M., Erjaee, A., Imanieh, M. H. & Haghghat, M. (2009). Efficacy of the standard quadruple therapy versus triple therapies containing proton pump inhibitor plus amoxicillin and clarithromycin or amoxicillin-clavulanic acid and metronidazole for *Helicobacter pylori* eradication in children. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(8), 1720-1724.
- Dieterich, C., Wiesel, P., Neiger, R., Blum, A. & Corthesy-Theulaz, I. (1998). Presence of multiple "*Helicobacter heilmannii*" strains in an individual suffering from ulcers and in his two cats. *J Clin Microbiol*, 36(5), 1366-1370.
- Duquenoy, A. & Le Luyer, B. (2009). Gastrite à *Helicobacter heilmannii* probablement transmise à l'enfant par ses chiens. *Archives de Pédiatrie*, 16(5), 426-429.
- Eaton, K. A., Morgan, D. R. & Krakowka, S. (1989). *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, 57(4), 1119-1125.
- Eaton, K. A., Radin, M. J., Kramer, L., Wack, R., Sherding, R., Krakowka, S., Fox, J. G. & Morgan, D. R. (1993). Epizootic gastritis associated with gastric spiral bacilli in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Pathol*, 30(1), 55-63.
- Eaton, K. A., Catrenich, C. E., Makin, K. M. & Krakowka, S. (1995). Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis*, 171(2), 459-462.
- Eaton, K. A., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Tzellas, N., Coleman, B. E., Paola, J. & Sherding, R. (1996). Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *J Clin Microbiol*, 34(12), 3165-3170.
- El-Zaatari, F. A., Woo, J. S., Badr, A., Osato, M. S., Serna, H., Lichtenberger, L. M., Genta, R. M. & Graham, D. Y. (1997). Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H. pylori* in cats may be an anthroponosis--an animal infection with a human pathogen. *J Med Microbiol*, 46(5), 372-376.
- Erdman, S. E., Correa, P., Coleman, L. A., Schrenzel, M. D., Li, X. & Fox, J. G. (1997). *Helicobacter mustelae*-associated gastric MALT lymphoma in ferrets. *Am J Pathol*, 151(1), 273-280.

- Erginsoy, S. D. & Sozmen, M. (2006). Gastric Helicobacter-like Organisms in Stray Cats. *Acta Vet Brno*, 75, 91–98.
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. D. (Eds.). (2009). *Textbook of veterinary internal medicine* (7 ed. Vol. 2). St. Louis, Missouri (E.U.A.): Elsevier Saunders.
- Euzéby, J. P. (2010). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Helicobacter. Retrieved from <http://www.bacterio.cict.fr/h/helicobacter.html>
- Feinstein, R. E. & Olsson, E. (1992). Chronic gastroenterocolitis in nine cats. *J Vet Diagn Invest*, 4(3), 293-298.
- Feng, S., Ku, K., Hodzic, E., Lorenzana, E., Freet, K. & Barthold, S. W. (2005). Differential detection of five mouse-infecting helicobacter species by multiplex PCR. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(4), 531-536.
- Fitchen, N., Letley, D. P., O'Shea, P., Atherton, J. C., Williams, P., & Hardie, K. R. (2005). All subtypes of the cytotoxin VacA adsorb to the surface of Helicobacter pylori post-secretion. *J Med Microbiol*, 54(Pt 7), 621-630.
- Fox, J. G. (2002). The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*, 50(2), 273-283.
- Fox, J. G., Correa, P., Taylor, N. S., Lee, A., Otto, G., Murphy, J. C. & Rose, R. (1990). Helicobacter mustelae-associated gastritis in ferrets. An animal model of Helicobacter pylori gastritis in humans. *Gastroenterology*, 99(2), 352-361.
- Fox, J. G., Batchelder, M., Marini, R., Yan, L., Handt, L., Li, X., Shames, B., Hayward, A., Campbell, J. & Murphy, J. C. (1995a). Helicobacter pylori-induced gastritis in the domestic cat. *Infect Immun*, 63(7), 2674-2681.
- Fox, J. G., Yan, L. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Shames, B., Murphy, J. C., Hayward, A., Belcher, J. C. & Mendes, E. N. (1995b). Helicobacter bilis sp. nov., a novel Helicobacter species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol*, 33(2), 445-454.

- Fox, J. G., Perkins, S., Yan, L., Shen, Z., Attardo, L. & Pappo, J. (1996). Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *H. pylori* in saliva, gastric fluid and faeces. *Immunology*, *88*(3), 400-406.
- Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Shen, Z., Feng, Y., Taylor, N. S., Paster, B. J., Ericson, R. L., Lau, C. N., Correa, P., Araya, J. C. & Roa, I. (1998). Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology*, *114*(4), 755-763.
- Fox, J. G., Shen, Z., Xu, S., Feng, Y., Dangler, C. A., Dewhirst, F. E., Paster, B. J. & Cullen, J. M. (2002). *Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestines of cats. *J Clin Microbiol*, *40*(7), 2513-2519.
- Ganière, J. P., Ruvoen, N. & André-Fontaine, G. (2001). Zoonoses infectieuses d'origine canine et féline. *Médecine Malade et Infectieuses*, *31*(Suppl 2), 109-125.
- Germani, Y., Dauga, C., Duval, P., Huerre, M., Levy, M., Pialoux, G., Sansonetti, P. & Grimonte, P. A. (1997). Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. *Res Microbiol*, *148*(4), 315-326.
- Ghil, H. M., Yoo, J. H., Jung, W. S., Chung, T. H., Youn, H. Y. & Hwang, C. Y. (2009). Survey of *Helicobacter* infection in domestic and feral cats in Korea. *J Vet Sci*, *10*(1), 67-72.
- Go, M. F. & Graham, D. Y. (1996). Presence of the *cagA* gene in the majority of *Helicobacter pylori* strains is independent of whether the individual has duodenal ulcer or asymptomatic gastritis. *Helicobacter*, *1*(2), 107-111.
- Gobert, A. P., McGee, D. J., Akhtar, M., Mendz, G. L., Newton, J. C., Cheng, Y., Mobley, H. L. & Wilson, K. T. (2001). *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(24), 13844-13849.
- Goldman, C. G., Loureiro, J. D., Matteo, M. J., Catalano, M., Gonzalez, A. B., Heredia, S. R., Zubillaga, M. B., Solnick, J. V. & Cremaschi, G. A. (2009). *Helicobacter* spp. from gastric biopsies of stranded South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *Res Vet Sci*, *86*(1), 18-21.

- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A. & Marshall, B. J. (1986). *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J Clin Pathol*, 39(4), 353-365.
- Graham, D. Y. (2009). Efficient identification and evaluation of effective *Helicobacter pylori* therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 7(2), 145-148.
- Gueneau, P. & Loiseaux-De Goer, S. (2002). *Helicobacter*: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. *Infect Genet Evol*, 1(3), 215-223.
- Gueneau, P., Fuenmayor, J., Aristimuno, O. C., Cedeno, S., Baez, E., Reyes, N., Michelangeli, F. & Dominguez-Bello, M. G. (2002). Are goats naturally resistant to gastric *Helicobacter* infection? *Vet Microbiol*, 84(1-2), 115-121.
- Guo, G., Jia, K., Shi, Y., Liu, X. F., Liu, K., Qi, W., Guo, Y., Zhang, W., Xiao, B. & Zou, Q. (2009). Psychological stress enhances the colonization of the stomach by *Helicobacter pylori* in the BALB/c mouse. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 12(6), 478-485.
- Guttman, J. A. & Finlay, B. B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta*, 1788(4), 832-841.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Decostere, A., Ducatelle, R. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin Microbiol Rev*, 22(2), 202-223, Table of Contents.
- Hamlet, A., Thoreson, A. C., Nilsson, O., Svennerholm, A. M. & Olbe, L. (1999). Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in *cagA* genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology*, 116(2), 259-268.
- Hammar, M., Tyszkiewicz, T., Wadstrom, T. & O'Toole, P. W. (1992). Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30(1), 54-58.
- Handt, L. K., Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Fraser, G. J., Paster, B. J., Yan, L. L., Rozmiarek, H., Rufo, R. & Stalis, I. H. (1994). *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect Immun*, 62(6), 2367-2374.

- Hanninen, M. L., Happonen, I., Saari, S. & Jalava, K. (1996). Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int J Syst Bacteriol*, 46(1), 160-166.
- Hanninen, M. L., Happonen, I. & Jalava, K. (1998). Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. *Vet Microbiol*, 62(1), 47-58.
- Happonen, I., Saari, S., Castren, L., Tyni, O., Hanninen, M. L. & Westermarck, E. (1996a). Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats. *J Comp Pathol*, 115(2), 117-127.
- Happonen, I., Saari, S., Castren, L., Tyni, O., Hanninen, M. L. & Westermarck, E. (1996b). Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. *Zentralbl Veterinarmed A*, 43(5), 305-315.
- Happonen, I., Linden, J., Saari, S., Karjalainen, M., Hanninen, M. L., Jalava, K. & Westermarck, E. (1998). Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J Am Vet Med Assoc*, 213(12), 1767-1774.
- Harbour, S. & Sutton, P. (2008). Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. *Vet Immunol Immunopathol*, 122(3-4), 191-203.
- Harper, C. G., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N. S., Kinsel, M., Dewhirst, F. E., Paster, B., Greenwell, M., Levine, G., Rogers, A. & Fox, J. G. (2002). *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J Clin Microbiol*, 40(12), 4536-4543.
- Heilmann, K. L. & Borchard, F. (1991). Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut*, 32(2), 137-140.
- Hermanns, W., Kregel, K., Breuer, W. & Lechner, J. (1995). *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J Comp Pathol*, 112(3), 307-318.

- Hill, A. B. (1965). The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med*, 58, 295-300.
- Hodzic, E., McKisic, M., Feng, S. & Barthold, S. W. (2001). Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice. *Comp Med*, 51(5), 406-412.
- Hwang, C. Y., Han, H. R. & Youn, H. Y. (2002a). Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. *J Vet Sci*, 3(2), 123-133.
- Hwang, C. Y., Youn, H. Y. & Han, H. R. (2002b). Development of non-invasive fecal PCR assay for detecting the *Helicobacter* species infection in dogs. *J Vet Clin*, 19(3), 295-298.
- Ilver, D., Barone, S., Mercati, D., Lupetti, P., & Telford, J. L. (2004). *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol*, 6(2), 167-174.
- Jakob, W., Stolte, M., Valentin, A. & Schroder, H. D. (1997). Demonstration of *Helicobacter pylori*-like organisms in the gastric mucosa of captive exotic carnivores. *J Comp Pathol*, 116(1), 21-33.
- Jalava, K., Kaartinen, M., Utriainen, M., Happonen, I. & Hanninen, M. L. (1997). *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4), 975-982.
- Jalava, K., On, S. L., Vandamme, P. A., Happonen, I., Sukura, A. & Hanninen, M. L. (1998). Isolation and identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. *Appl Environ Microbiol*, 64(10), 3998-4006.
- Jergens, A. E., Pressel, M., Crandell, J., Morrison, J. A., Sorden, S. D., Haynes, J., Craven, M., Baumgart, M & Simpson, K. W. (2009). Fluorescence in situ hybridization confirms clearance of visible *Helicobacter* spp. associated with gastritis in dogs and cats. *J Vet Intern Med*, 23(1), 16-23.
- Jian, W., Zhu, L. & Dong, X. (2001). New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 5), 1633-1638.

- Josenhans, C., Ferrero, R. L., Labigne, A. & Suerbaum, S. (1999). Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes of *Helicobacter felis*. *Mol Microbiol*, 33(2), 350-362.
- Klein, P. D., Graham, D. Y., Gaillour, A., Opekun, A. R. & Smith, E. O. (1991). Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet*, 337(8756), 1503-1506.
- Kostia, S., Veijalainen, P., Hirvi, U. & Hanninen, M. L. (2003). Cytolethal distending toxin B gene (*cdtB*) homologues in taxa 2, 3 and 8 and in six canine isolates of *Helicobacter* sp. *flexispira*. *J Med Microbiol*, 52(Pt 2), 103-108.
- Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P. H., Stremmel, W. & Rudi, J. (2001). Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun*, 69(8), 5080-5087.
- Kuipers, E. J., Perez-Perez, G. I., Meuwissen, S. G. & Blaser, M. J. (1995). *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst*, 87(23), 1777-1780.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M. & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449-490.
- Lecoindre, P., Chevallier, M., Peyrol, S., Boude, M., Ferrero, R. L. & Labigne, A. (2000). Gastric helicobacters in cats. *J Feline Med Surg*, 2(1), 19-27.
- Lee, A., Hazell, S. L., O'Rourke, J. & Kouprach, S. (1988). Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun*, 56(11), 2843-2850.
- Lee, A., Fox, J. G., Otto, G., Dick, E. H. & Krakowka, S. (1991). Transmission of *Helicobacter* spp. A challenge to the dogma of faecal-oral spread. *Epidemiol Infect*, 107(1), 99-109.
- Lee, A., Krakowka, S., Fox, J. G., Otto, G., Eaton, K. A. & Murphy, J. C. (1992). Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. *Vet Pathol*, 29(6), 487-494.

- Lee, K. M., Lee, J. S., Jung, H. S., Park, D. K., Park, H. S., & Hahm, K. B. (2010). Late reactivation of sonic hedgehog by *Helicobacter pylori* results in population of gastric epithelial cells that are resistant to apoptosis: Implication for gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*, 287(1), 44-53.
- Leib, M. S. (2005). *Chronic GI disease: a new look at some common problems*. Paper presented at the North American Veterinary Conference, Orlando, Florida (E.U.A). Disponivel em [www.ivis.org](http://www.ivis.org).
- Leib, M. S., Duncan, R. B. & Ward, D. L. (2007). Triple antimicrobial therapy and acid suppression in dogs with chronic vomiting and gastric *Helicobacter* spp. *J Vet Intern Med*, 21(6), 1185-1192.
- Lin, Y.-H., Chang, C.-H., Wu, Y.-S., Hsu, Y.-M., Chiou, S.-F. & Chen, Y.-J. (2009). Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Biomaterials*, 30(19), 3332-3342.
- Lockard, V. G. & Boler, R. K. (1970). Ultrastructure of a spiraled microorganism in the gastric mucosa of dogs. *Am J Vet Res*, 31(8), 1453-1462.
- Lutz, H., Leutenegger, C. & Hofmann-Lehmann, R. (1999). The role of polymerase chain reaction and its newer developments in feline medicine. *J Feline Med Surg*, 1(2), 89-100.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Hungin, A. P., Jones, R., Axon, A., Graham, D. Y. & Tytgat, G. (2002). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther*, 16(2), 167-180.
- Mandell, L., Moran, A. P., Cocchiarella, A., Houghton, J., Taylor, N., Fox, J. G., Wang, T. C. & Kurt-Jones, E. A. (2004). Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun*, 72(11), 6446-6454.
- Marshall, B. J. & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390), 1311-1315.

- Marshall, B. J., Barrett, L. J., Prakash, C., McCallum, R. W. & Guerrant, R. L. (1990). Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, *99*(3), 697-702.
- Martin, J., Donnelly, J. M., Houghton, J. & Zavros, Y. (2010). The Role of Sonic Hedgehog Reemergence During Gastric Cancer. *Digestive Diseases and Sciences*, *55*(6), 1516-1524.
- Mikkonen, T. P., Karenlampi, R. I. & Hanninen, M. L. (2004a). Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, *54*(3), 753-758.
- Mikkonen, T. P., Karenlampi, R. I. & Hanninen, M. L. (2004b). Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, *54*(Pt 3), 753-758.
- Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. & Hazell, S. L. (Eds.). (2001). *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press.
- Moese, S., Selbach, M., Kwok, T., Brinkmann, V., Konig, W., Meyer, T. F. & Backert, S. (2004). *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun*, *72*(6), 3646-3649.
- Mohammadi, M., Redline, R., Nedrud, J. & Czinn, S. (1996). Role of the host in pathogenesis of *Helicobacter*-associated gastritis: *H. felis* infection of inbred and congenic mouse strains. *Infect Immun*, *64*(1), 238-245.
- Mollenhauer-Rektorschek, M., Hanauer, G., Sachs, G. & Melchers, K. (2002). Expression of UreI is required for intragastric transit and colonization of gerbil gastric mucosa by *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol*, *153*(10), 659-666.
- Monack, D. M., Mueller, A. & Falkow, S. (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol*, *2*(9), 747-765.
- Montecucco, C. & de Bernard, M. (2003). Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect*, *5*(8), 715-721.

- Morgner, A., Bayerdorffer, E., Meining, A., Stolte, M. & Kroher, G. (1995). *Helicobacter heilmannii* and gastric cancer. *The Lancet*, *246*, 511-512.
- Moutinho, F. Q., Thomassian, A., Watanabe, K., Suzano, S. M. C. & Sequeira, J. L. (2007). Prevalência de helicobacterias e alterações na mucosa gastrica de caes saudaveis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, *59*(4), 1080-1083.
- Moyaert, H., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Baele, M. (2008). Evaluation of 16S rRNA gene-based PCR assays for genus-level identification of *Helicobacter* species. *J Clin Microbiol*, *46*(5), 1867-1869.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, *155*, 335-350.
- Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R. & Meyer, T. F. (1999). Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island. *J Biol Chem*, *274*(44), 31655-31662.
- Neiger, R. & Simpson, K. W. (2000). *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *J Vet Intern Med*, *14*(2), 125-133.
- Neiger, R., Dieterich, C., Burnens, A., Waldvogel, A., Corthesy-Theulaz, I., Halter, F., Lauterburg, B. & Schmassmann, A. (1998). Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *J Clin Microbiol*, *36*(3), 634-637.
- Norris, C. R., Marks, S. L., Eaton, K. A., Torabian, S. Z., Munn, R. J. & Solnick, J. V. (1999). Healthy cats are commonly colonized with "*Helicobacter heilmannii*" that is associated with minimal gastritis. *J Clin Microbiol*, *37*(1), 189-194.
- O'Rourke, J. L., Solnick, J. V., Neilan, B. A., Seidel, K., Hayter, R., Hansen, L. M. & Lee, A. (2004). Description of '*Candidatus Helicobacter heilmannii*' based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. *Int J Syst Evol Microbiol*, *54*(6), 2203-2211.
- Odenbreit, S. (2005). Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int J Med Microbiol*, *295*(5), 317-324.

- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. & Haas, R. (2000). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 287(5457), 1497-1500.
- Odenbreit, S., Gebert, B., Puls, J., Fischer, W. & Haas, R. (2001). Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol*, 3(1), 21-31.
- Ottemann, K. M. & Lowenthal, A. C. (2002). *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun*, 70(4), 1984-1990.
- Otto, G., Hazell, S. H., Fox, J. G., Howlett, C. R., Murphy, J. C., O'Rourke, J. L. & Lee, A. (1994). Animal and public health implications of gastric colonization of cats by *Helicobacter*-Like Organisms. *J Clin Microbiol*, 32(4), 1043-1049.
- Oxley, A. (2004). Fecal shedding of *Helicobacter* spp. by co-housed Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) and Australian fur seals (*Arctocephalus pusillus doriferus*). *Vet Microbiol*, 101(4), 235-243.
- Oxley, A. P. A., Argo, J. A. & McKay, D. B. (2005). *Helicobacter* spp. from captive bottlenose dolphins (*Tursiops* spp.) and polar bears (*Ursus maritimus*). *Vet J*, 170(3), 377-380.
- Pakodi, F., Abdel-Salam, O. M., Debreceni, A. & Mozsik, G. (2000). *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. *J Physiol Paris*, 94(2), 139-152.
- 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. (1991). Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 41(1), 31-38.
- Paziak-Domanska, B., Chmiela, M., Jarosinska, A. & Rudnicka, W. (2000). Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. *Cell Immunol*, 202(2), 136-139.
- Peek, R. M., Jr., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Zhao, X., Atherton, J. C. & Blaser, M. J. (1995). Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*, 73(6), 760-770.

- Peek, R. M., Jr., Wirth, H. P., Moss, S. F., Yang, M., Abdalla, A. M., Tham, K. T., Zhang, T., Tang, L. H., Modlin, I. M. & Blaser, M. J. (2000). *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*, *118*(1), 48-59.
- Perkins, S. E., Yan, L. L., Shen, Z., Hayward, A., Murphy, J. C. & Fox, J. G. (1996). Use of PCR and culture to detect *Helicobacter pylori* in naturally infected cats following triple antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, *40*(6), 1486-1490.
- Peyrol, S., Lecoindre, P., Berger, I., Deleforge, J. & Chevallier, M. (1998). Differential pathogenic effect of two *Helicobacter*-like organisms in dog gastric mucosa. *J Submicrosc Cytol Pathol*, *30*(3), 425-433.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A. & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*, *8*, 151-156.
- Pontone, S., Standoli, M., Angelini, R. & Pontone, P. (2010). Efficacy of *H. pylori* eradication with a sequential regimen followed by rescue therapy in clinical practice. *Dig Liver Dis*, *In Press*, Accepted Proof.
- Portal-Celhay, C. & Perez-Perez, G. I. (2006). Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clin Sci (Lond)*, *110*(3), 305-314.
- Pot, R. G., Stoof, J., Nuijten, P. J., de Haan, L. A., Loeffen, P., Kuipers, E. J., van Vliet, A. H. & Kusters, J. G. (2007). UreA2B2: a second urease system in the gastric pathogen *Helicobacter felis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *50*(2), 273-279.
- Prachasilpchai, W., Nuanualsuwan, S., Chatsuwat, T., Techangamsuwan, S., Wangnaitam, S. & Sailasuta, A. (2007). Diagnosis of *Helicobacter* spp. infection in canine stomach. *J Vet Sci*, *8*(2), 139-145.
- Priestnall, S. L., Wiinberg, B., Spohr, A., Neuhaus, B., Kuffer, M., Wiedmann, M. & Simpson, K. W. (2004). Evaluation of "*Helicobacter heilmannii*" subtypes in the gastric mucosae of cats and dogs. *J Clin Microbiol*, *42*(5), 2144-2151.
- Queiroz, D. M., Rocha, G. A., Mendes, E. N., De Moura, S. B., De Oliveira, A. M. & Miranda, D. (1996). Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. *Gastroenterology*, *111*(1), 19-27.

- Radin, M. J., Eaton, K. A., Krakowka, S., Morgan, D. R., Lee, A., Otto, G. & Fox, J. (1990). *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect Immun*, *58*(8), 2606-2612.
- Recordati, C., Gualdi, V., Tosi, S., Facchini, R. V., Pengo, G., Luini, M., Simpson, K. W. & Scanziani, E. (2007). Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. *Vet Microbiol*, *119*(2-4), 346-351.
- Roggero, E., Zucca, E., Pinotti, G., Pascarella, A., Capella, C., Savio, A., Pedrinis, E., Paterlini, A., Venco, A. & Cavalli, F. (1995). Eradication of *Helicobacter pylori* infection in primary low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Ann Intern Med*, *122*(10), 767-769.
- Rossi, G., Rossi, M., Vitali, C. G., Fortuna, D., Burrioni, D., Pancotto, L., Capecchi, S., Sozzi, S., Renzoni, G., Braca, G. Del Giudice, G., Rappuoli, R., Ghiara, P. & Taccini, E. (1999). A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, *67*(6), 3112-3120.
- Rossi, G., Fortuna, D., Pancotto, L., Renzoni, G., Taccini, E., Ghiara, P., Rappuoli, R. & Del Giudice, G. (2000). Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, *68*(8), 4769-4772.
- Rossi, M., Hänninen, M. L., Revez, J., Hannula, M. & Zanoni, R. G. (2008). Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet Microbiol*, *129*(3-4), 304-314.
- Scanziani, E., Simpson, K. W., Monestiroli, S., Soldati, S., Strauss-Ayali, D. & Del Piero, F. (2001). Histological and immunohistochemical detection of different *Helicobacter* species in the gastric mucosa of cats. *J Vet Diagn Invest*, *13*(1), 3-12.
- Schlenker, C. & Surawicz, C. M. (2009). Emerging infections of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *23*(1), 89-99.
- Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1999). Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(25), 14559-14564.

- Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P. R. & Meyer, T. F. (2004). The Helicobacter pylori CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics*, 4(10), 2961-2968.
- Shen, Z., Feng, Y., Dewhirst, F. E. & Fox, J. G. (2001). Coinfection of enteric Helicobacter spp. and Campylobacter spp. in cats. *J Clin Microbiol*, 39(6), 2166-2172.
- Shojaee Tabrizi, A., Jamshidi, S., Oghalaei, A., Zahraei Salehi, T., Bayati Eshkaftaki, A. & Mohammadi, M. (2010). Identification of Helicobacter spp. in oral secretions vs. gastric mucosa of stray cats. *Vet Microbiol*, 140(1-2), 142-146.
- Simpson, J. (2005). Helicobacter infection in dogs and cats: to treat or not to treat. *In Practice*, 27, 204 - 207.
- Simpson, K. W. (2006). *Chronic gastritis in companion animals*. Paper presented at the World small animal veterinary association, Prague, Republica Checa. Disponivel em [www.ivis.org](http://www.ivis.org).
- Simpson, K. W. (2010). *Gastritis in companion animals*. Paper presented at the 19th Conferência nacional da Associação Portuguesa de Medicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.
- Simpson, K. W., McDonough, P. L., Strauss-Ayali, D., Chang, Y. F., Harpending, P. & Valentine, B. A. (1999a). Helicobacter felis infection in dogs: effect on gastric structure and function. *Vet Pathol*, 36(3), 237-248.
- Simpson, K. W., Strauss-Ayali, D., McDonough, P. L., Chang, Y. F. & Valentine, B. A. (1999b). Gastric function in dogs with naturally acquired gastric Helicobacter spp. infection. *J Vet Intern Med*, 13(6), 507-515.
- Simpson, K. W., Neiger, R., DeNovo, R. & Sherding, R. (2000a). The relationship of Helicobacter spp. infection to gastric disease in dogs and cats. *J Vet Intern Med*, 14(2), 223-227.
- Simpson, K. W., Strauss-Ayali, D., Scanziani, E., Straubinger, R. K., McDonough, P. L., Straubinger, A. F., Chang, Y. F., Domeneghini, C., Arebi, N. & Calam, J. (2000b). Helicobacter felis infection is associated with lymphoid follicular hyperplasia and mild gastritis but normal gastric secretory function in cats. *Infect Immun*, 68(2), 779-790.

- Simpson, K. W., Strauss-Ayali, D., Straubinger, R. K., Scanziani, E., McDonough, P. L., Straubinger, A. F., Chang, Y. F., Esteves, M. I., Fox, J. G., Domeneghini, C., Arebi, N. & Calam, J. (2001). *Helicobacter pylori* infection in the cat: evaluation of gastric colonization, inflammation and function. *Helicobacter*, 6(1), 1-14.
- Simpson, J. M., Martineau, B., Jones, W. E., Ballam, J. M. & Mackie, R. I. (2002). Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb Ecol*, 44(2), 186-197.
- Slatter, D. (Ed.). (2003). *Textbook of small animal surgery* (3 ed. Vol. 1). Philadelphia (E.U.A.): Saunders.
- Smoot, D. T., Mobley, H. L., Chippendale, G. R., Lewison, J. F. & Resau, J. H. (1990). *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun*, 58(6), 1992-1994.
- Solnick, J. V. & Schauer, D. B. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev*, 14(1), 59-97.
- Solnick, J. V., O'Rourke, J., Lee, A., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Tompkins, L. S. (1993). An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans. *J Infect Dis*, 168(2), 379-385.
- Solnick, J. V., O'Rourke, J., Lee, A. & Tompkins, L. S. (1994). Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. *Infect Immun*, 62(5), 1631-1638.
- Sontakke, S., Cadenas, M. B., Maggi, R. G., Diniz, P. P. & Breitschwerdt, E. B. (2009). Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*, 76(3), 217-225.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A. P., Dewhirst, F. E., Owen, R. J., Porter, A., On, S. L. & Costas, M. (1993). *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J Gen Microbiol*, 139(10), 2495-2504.
- Strauss-Ayali, D. & Simpson, K. W. (1999). Gastric *Helicobacter* infection in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 29(2), 397-414.

- Strauss-Ayali, D., Simpson, K. W., Schein, A. H., McDonough, P. L., Jacobson, R. H., Valentine, B. A. & Peacock, J. (1999). Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* spp. and uninfected dogs. *J Clin Microbiol*, 37(5), 1280-1287.
- Strauss-Ayali, D., Scanziani, E., Deng, D. & Simpson, K. W. (2001). *Helicobacter* spp. infection in cats: evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric *Helicobacter* spp. *Vet Microbiol*, 79(3), 253-265.
- Sugimoto, M., Wu, J. Y., Abudayyeh, S., Hoffman, J., Brahem, H., Al-Khatib, K., Yamaoka, Y. & Graham, D. Y. (2009). Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples. *J Clin Microbiol*, 47(3), 738-742.
- Takemura, L. S., Camargo, P. L., Alfieri, A. A. & Bracarense, A. P. F. R. L. (2009). *Helicobacter* spp. in cats: association between infecting species and epithelial proliferation within the gastric lamina propria. *J Comp Pathol*, 141(2-3), 127-134.
- Tan, S., Tompkins, L. S. & Amieva, M. R. (2009). *Helicobacter pylori* Usurps Cell Polarity to Turn the Cell Surface into a Replicative Niche. *PLoS Pathogens*, 5(5), e1000407.
- Tosi, M. F. & Czinn, S. J. (1990). Opsonic activity of specific human IgG against *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis*, 162(1), 156-162.
- Trebesius, K., Adler, K., Vieth, M., Stolte, M. & Haas, R. (2001). Specific detection and prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent in situ hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, 39(4), 1510-1516.
- Tummala, S., Keates, S. & Kelly, C. P. (2004). Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. *Curr Opin Gastroenterol*, 20(6), 592-597.
- Van den Bulck, K. (2006). *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(7), 1559-1564.
- Van den Bulck, K., Baele, M., Hermans, K., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Decostere, A. (2005a). First report on the occurrence of '*Helicobacter heilmannii*' in the stomach of rabbits. *Vet Res Commun*, 29(4), 271-279.

- Van den Bulck, K., Decostere, A., Baele, M., Driessen, A., Debongnie, J. C., Burette, A., Stolte, M., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2005b). Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *J Clin Microbiol*, 43(5), 2256-2260.
- Velin, D., Favre, L., Bernasconi, E., Bachmann, D., Pythoud, C., Saiji, E., Bouzourene, H. & Michetti, P. (2009). Interleukin-17 is a critical mediator of vaccine-induced reduction of *Helicobacter* infection in the mouse model. *Gastroenterology*, 136(7), 2237-2246 e2231.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J. & Ferrero, R. L. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 5(11), 1166-1174.
- Wang, J., Brooks, E. G., Bamford, K. B., Denning, T. L., Pappo, J. & Ernst, P. B. (2001). Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol*, 167(2), 926-934.
- Weber, A. F. & Schmittiel, E. F. (1962). Electron microscopic and bacteriologic studies of spirilla isolated from the fundic stomachs of cats and dogs. *Am J Vet Res*, 23, 422-427.
- WHO (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 61(5), 1-241.
- Wiinberg, B., Spohr, A., Dietz, H. H., Egelund, T., Greiter-Wilke, A., McDonough, S. P., Olsen, J., Priestnall, S., Chang, Y. F. & Simpson, K. W. (2005). Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. infection. *J Vet Intern Med*, 19(1), 4-14.
- Willard, M. D., Jergens, A. E., Duncan, R. B., Leib, M. S., McCracken, M. D., DeNovo, R. C., Helman, R. G., Slater, M. R. & Harbison, J. L. (2002). Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 220(8), 1177-1182.

- Willhite, D. C. & Blanke, S. R. (2004). Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol*, 6(2), 143-154.
- Wilson, H. M. (2008). Feline alimentary lymphoma: demystifying the enigma. *Top Companion Anim Med*, 23(4), 177-184.
- Wroblewski, L. E., Shen, L., Ogden, S., Romero-Gallo, J., Lapierre, L. A., Israel, D. A., Turner, J. R. & Peek, R. M. Jr. (2009). Helicobacter pylori dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation. *Gastroenterology*, 136(1), 236-246.
- Wu, D. C., Hsu, P. I., Wu, J. Y., Opekun, A. R., Kuo, C. H., Wu, I. C., Wang, S. S., Chen, A., Hung, W. C. & Graham, D. Y. (2010). Sequential and concomitant therapy with four drugs is equally effective for eradication of H pylori infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 8(1), 36-41 e31.
- Zhu, J., Teng, C. H., Chang, C. F., Chang, C. D., Simpson, K. W., Wei, C., McDonough, P., McDonough, S. & Chang, Y. (2002). Cloning and characterization of a Helicobacter bizzozeronii urease gene cluster. *DNA Seq*, 13(6), 321-331.

## ANEXO I

### **Casuística observada no Hospital Escolar durante o período de estágio**

Durante o período de estágio no Hospital Escolar da FMV/UTL foram observados um total de 675 pacientes, dos quais 520 eram canídeos, 153 eram felídeos e 2 eram animais de espécies exóticas (figura 35). Foi possível seguir 132 pacientes de uma forma mais contínua, uma vez que foram observados mais do que uma vez nos vários serviços hospitalares.

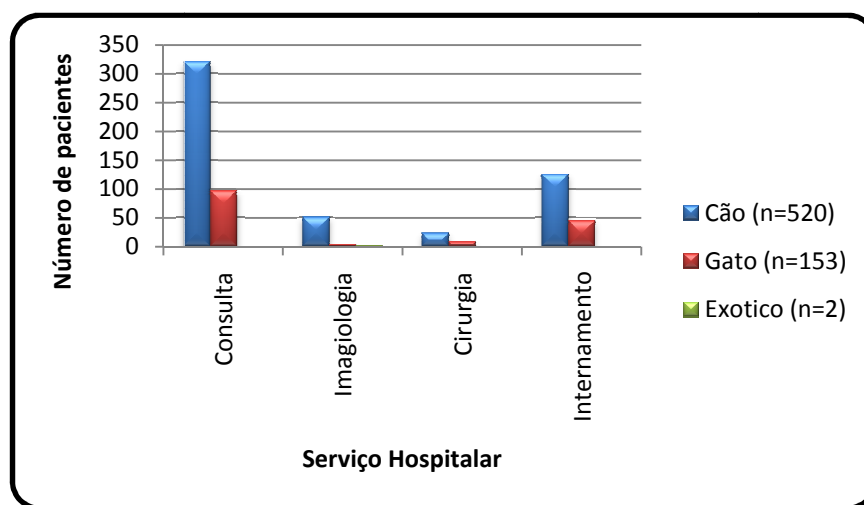


Figura 35: Casuística observada discriminada por espécie e por serviço.

A distribuição dos pacientes por idade e sexo encontra-se resumida nas figuras 36 e 37. Nos felídeos, foram vistos um maior número de machos orquiectomizados, enquanto nos canídeos foram fêmeas ovariectomizadas. A faixa etária até aos cinco anos foi a mais vista nos felídeos e a dos seis aos 10 nos canídeos.

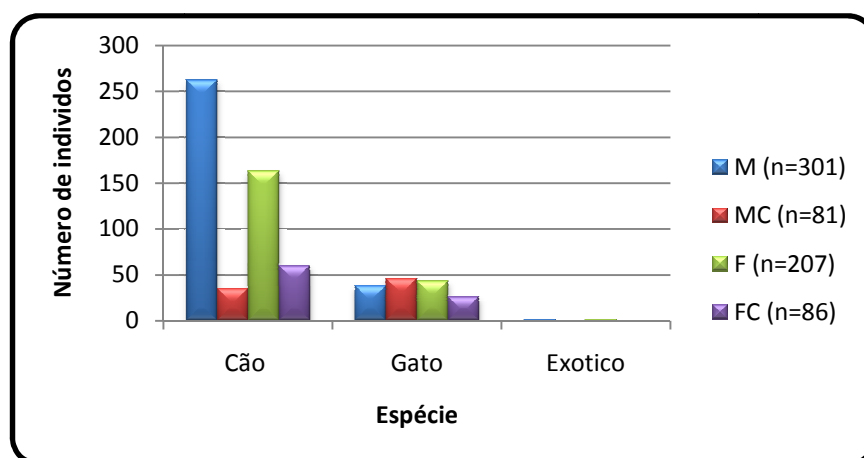


Figura 36: Distribuição de pacientes por sexo.

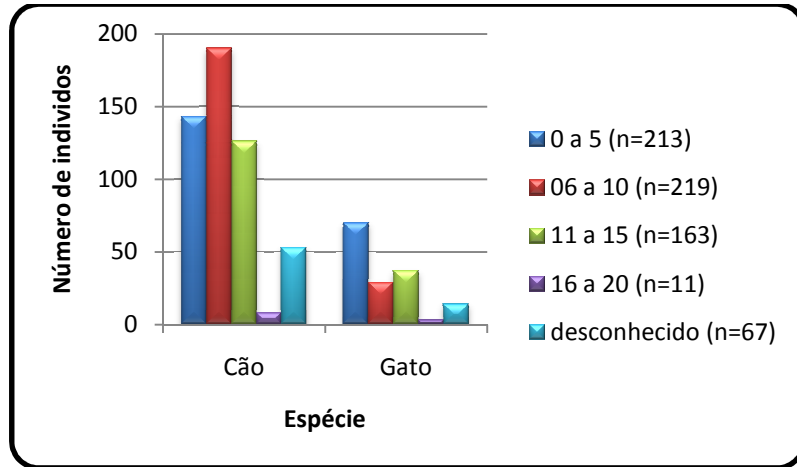


Figura 37: Distribuição por grupos etários dos pacientes observados.

A ultrasonografia é um exame complementar imprescindível no estudo de várias doenças, desde as gastróintestinais as endócrinas. É um exame não invasivo, bem tolerado pelos pacientes, que possibilita a visualização dos órgãos internos. Permite avaliar através da ecogenicidade, ecotextura, e localização dos órgãos, a existência e possíveis causas das mais variadas doenças. A utilização da ultrasonografia permite ainda a obtenção de amostras biológicas, como citologias e biopsias, sendo uma alternativa à laparotomia exploratória. Durante o período de estágio hospitalar, houve a oportunidade de observar vários exames ecográficos e procedimentos eco-guiados num total de 84 pacientes: 66 canídeos e 18 felídeos (figura 38).

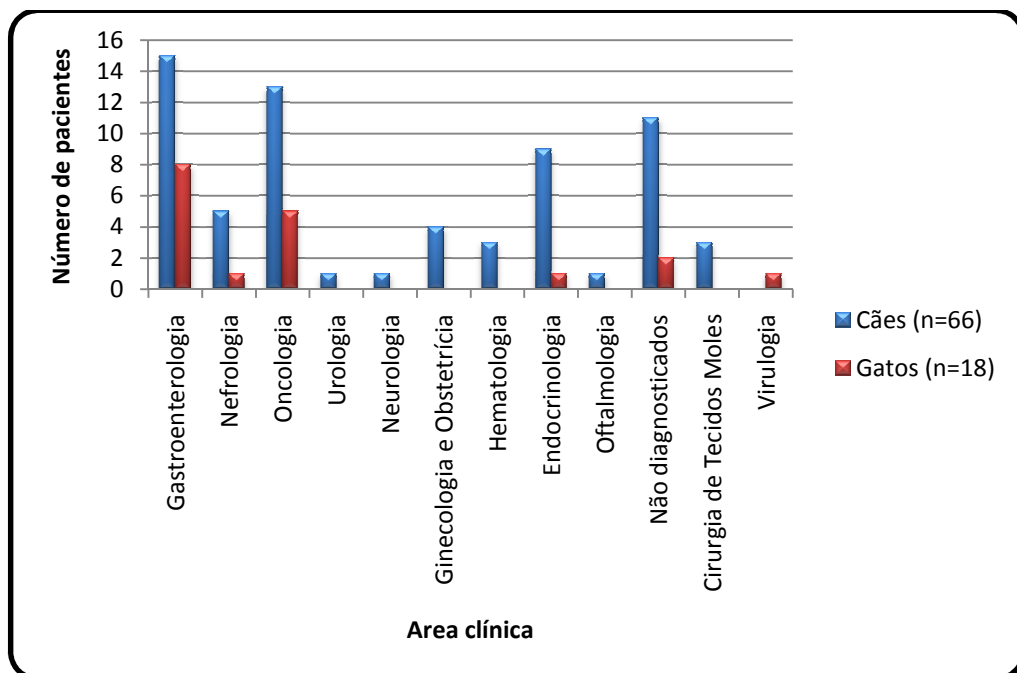


Figura 38: Distribuição de pacientes sujeitos ao exame ecográfico por área clínica.

## ANEXO II

### PCR com ADN extraído de amostras regionais

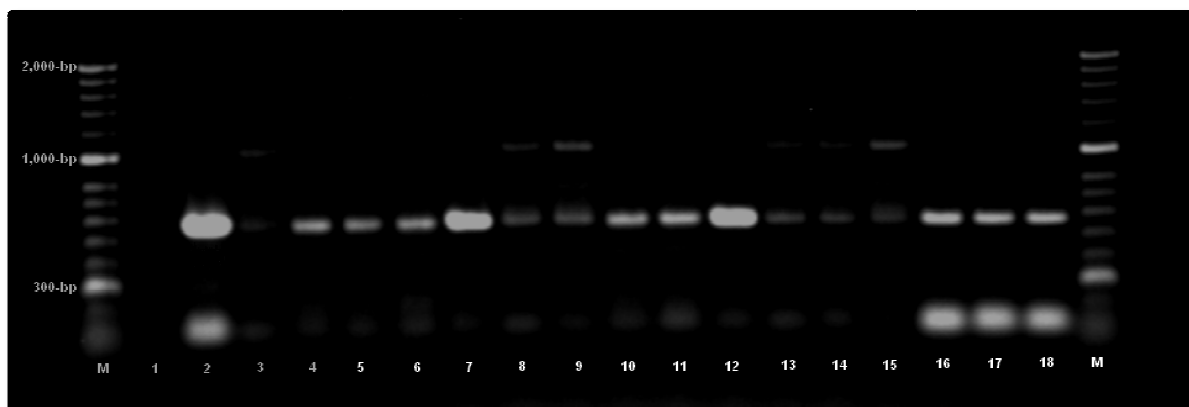


Figura 39: PCR com *primers* específicos para "*H. heilmannii*" e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (580-pb) e bandas inespecíficas  
Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostras felinas positivas do antro (4,10,16), corpo (4,11,17), e fundo (6,12,18); amostras caninas positivas de antro (7,13), corpo (8,14), e fundo (3,9,15).

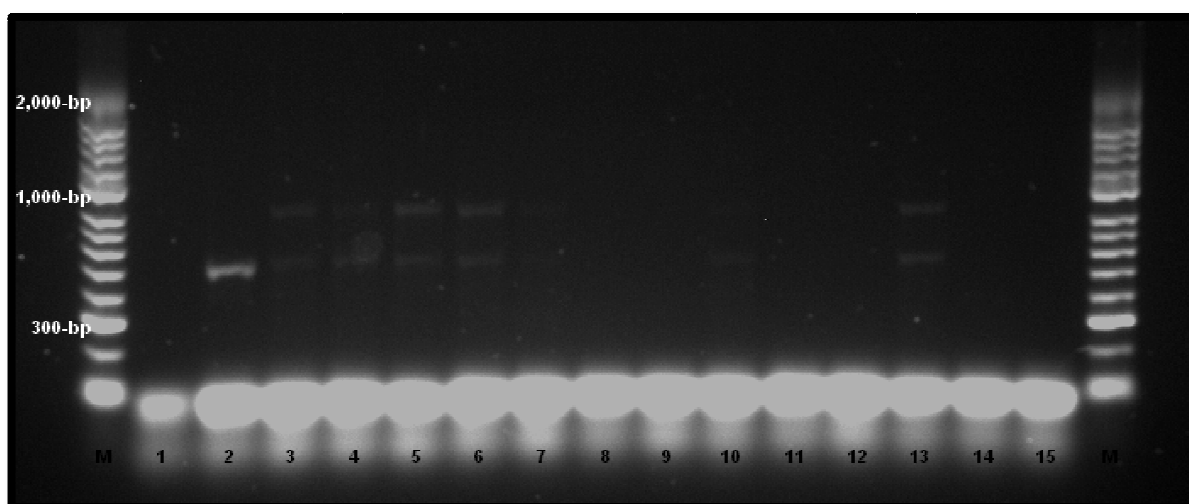


Figura 40: PCR com *primers* específicos para *H. salomonis* e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (537-pb)  
Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostras caninas positivas do antro (3,6,13), corpo (4,7,10,13), e fundo (5); amostras caninas negativas do antro (9,12,15) e fundo (8,11,14).

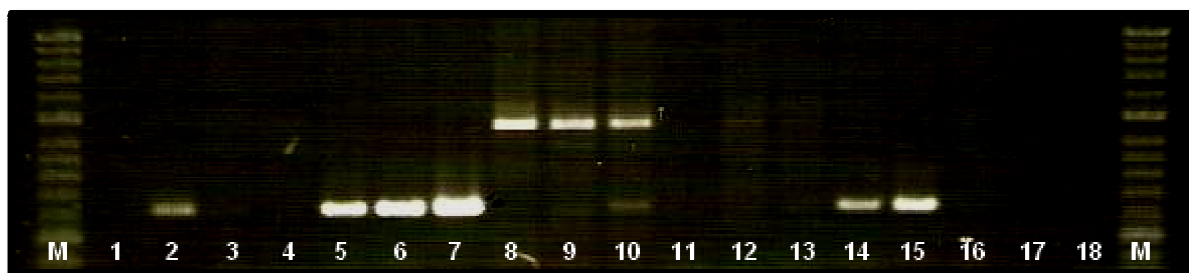


Figura 41: PCR com *primers* específicos para *H. bizzozeronii* e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (420-pb)

Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostras felinas antro (8), corpo (9), fundo (10), amostras felinas negativas antro (11), corpo (12) e fundo (13), amostras caninas positivas antro (5, 14), corpo (6, 15), fundo (7), amostras caninas negativas corpo (3) e fundo (16); amostras fecais caninas negativas (17, 18).

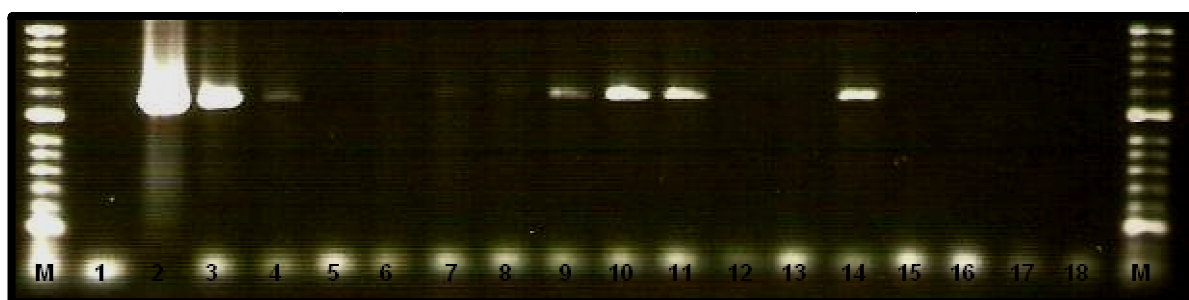


Figura 42: PCR com *primers* específicos para *H. felis* e ADN extraído de amostras gástricas regionais com amplificação da banda esperada (1150-pb)

Marcador molecular (M), controlo negativo (1), controlo positivo (2), amostras caninas positivas antro (3, 9), corpo (4, 7, 10) e fundo (8, 11, 14), amostras caninas negativas antro (6, 12), corpo (13) e fundo (5); amostras fecais negativas caninas (15, 16, 18), amostra fecal felina negativa (17).

## **ANEXO III**

### **Protocolo de rotina H&E**

#### **Procedimentos**

- |                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| 1. Desparafinar                     | 15 min |
| 2. Hidratar                         | 5 min  |
| 3. Hematoxilina de Gill 2           | 30 sec |
| 4. Lavar em água destilada          |        |
| 5. Lavar em água corrente morna     | 2 min  |
| 6. Álcool 70º                       | 1 sec  |
| 7. Eosina-Floxina                   | 1 sec  |
| 8. Desidratar, diafinaizar e montar |        |

#### **Resultados**

Núcleos	Azul/Preto
Citoplasma e outros elementos	Vários tons de Rosa a Laranja



## ANEXO IV

### Formulário de avaliação histopatológica

Patologista:

Número do caso:

Número de amostras de tecido no slide:

Tecido presente:

Inadequado

Demasiado Superficial

Adequado

Número de tecidos anormais:

#### Características morfológicas

	<u>Normal</u>	<u>Ligeiro</u>	<u>Moderado</u>	<u>Marcado</u>
Lesão epitelial superficial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lesão epitelial das criptas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fibrose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atrofia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ulceração	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Displasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### Inflamação

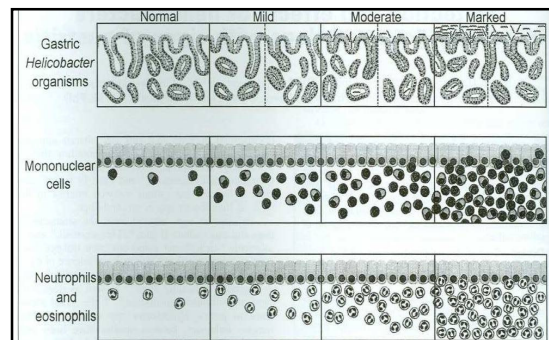
Linfócitos intra-epiteliais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Linfócitos e plasmócitos na lâmina própria	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eosinófilos na lâmina própria	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neutrófilos na lâmina própria	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outras células inflamatórias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperplasia linfocitária gástrica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### Helicobacter

Densidade de colonização	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

#### Diagnóstico Final

- Tecido normal
- Inflamação linfoplasmocítica
- Inflamação eosinofílica
- Inflamação neutrofilica
- Atrofia/Fibrose (não inflamatória)
- Outro



Guia de classificação

Comentários:



## ANEXO V

### Fotografias de esfregaços da parede gástrica

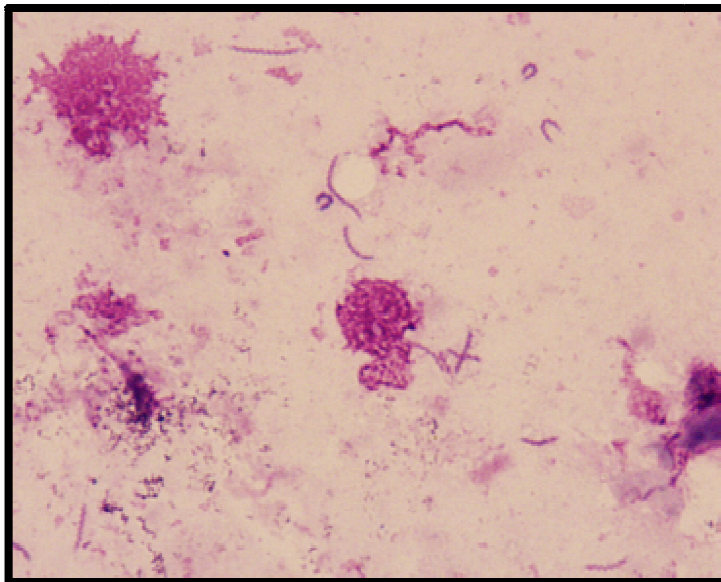


Figura 43: Esfregaço da mucosa gástrica de um gato, evidenciando espiroquetas. Giemsa 1000x. Original.

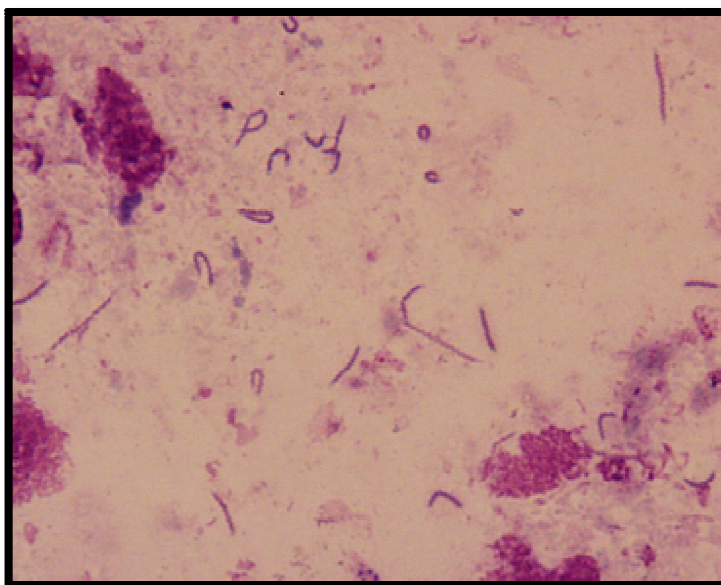


Figura 44: Esfregaço da mucosa gástrica de um gato, evidenciando espiroquetas. Giemsa 1000x. Original.

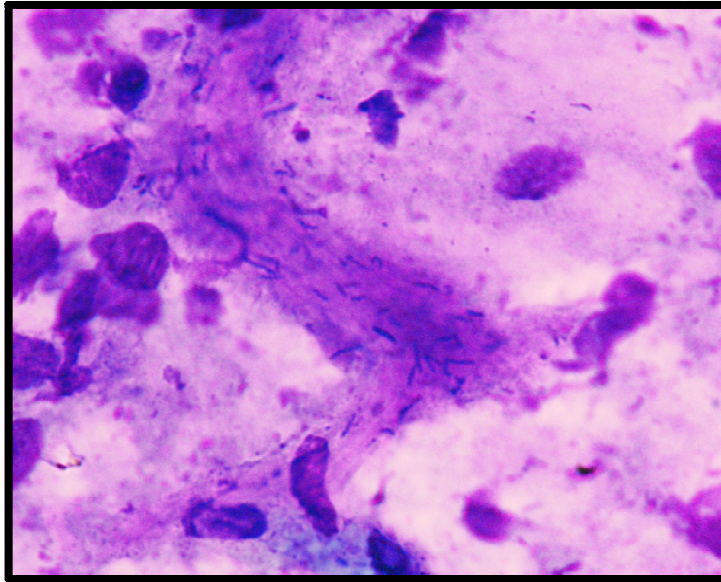


Figura 45: Esfregaço da mucosa gástrica de um cão, evidenciando espiroquetas. Giemsa 40x. Original.

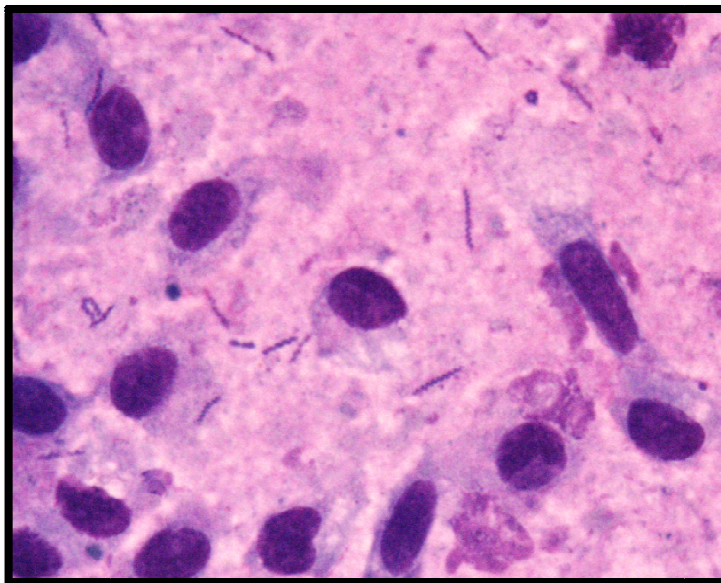


Figura 46: Esfregaço da mucosa gástrica de um cão, evidenciando espiroquetas. Giemsa 1000x. Original.

## ANEXO VI

### Fotografias de cortes histopatológicos

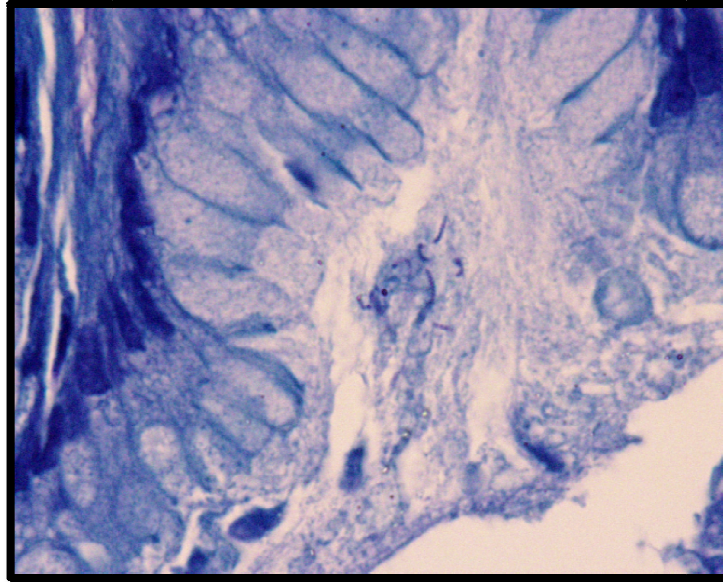


Figura 47: Espiroquetas na mucosa superficial num corte histológico de estômago de gato. Giemsa 1000x. Original.

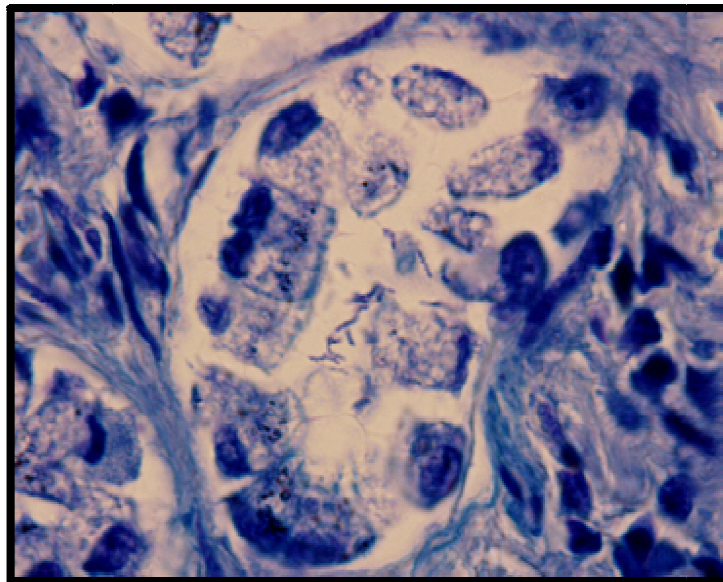


Figura 48: Espiroquetas no lúmen de uma glândula gástrica num corte histológico de estômago de gato. Giemsa 1000x. Original.



## **ANEXO VII**

### **Resumo da comunicação livre apresentada no congresso da APMVEAC**

#### **OS ESFREGAÇOS DA PAREDE GÁSTRICA COMO MEIO COMPLEMENTAR DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES POR *HELICOBACTER SPP.*, EM CANÍDEOS E FELÍDEOS**

R. Canejo Teixeira, R. Noiva, M.C. Peleteiro<sup>1</sup>, C. Vilela<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa

Nas últimas décadas, desde que *Helicobacter pylori* foi identificado como um agente ulcerogénico e potencialmente carcinogénico nos seres humanos, o estudo de *Helicobacter spp* em pequenos animais tem sido aprofundado, não só pelo seu potencial zoonótico, mas como um possível modelo da doença humana. O seu interesse em Medicina Veterinária deriva ainda da possibilidade de existirem espécies patogénicas, que possam estar na origem de gastrites idiopáticas, em canídeos e felídeos.

Perante um paciente com sintomas de gastrite de causa desconhecida é frequente a utilização de endoscopia com biópsia e posterior avaliação histopatológica, para obtenção de um diagnóstico. A endoscopia permite, ainda, a utilização de outra técnica de diagnóstico, facilmente exequível, económica, e fiável: o esfregaço. A detecção de *Helicobacter spp* poderá justificar a utilização de antibioterapia tripla.

O potencial da utilização de esfregaços para detectar este género bacteriano foi avaliado em estômagos de canídeos e felídeos apresentados para necrópsia na FMV/UTL, tendo sido efectuados esfregaços e biópsias de antro, fundo, e corpo gástricos. A técnica utilizada visou replicar, tanto quanto possível, as colheitas para citologia por escovagem disponíveis em endoscopia como meio de diagnóstico complementar de gastrite idiopática.

Os esfregaços foram corados com May-Grunwald-Giemsa e as biópsias foram submetidas a processamento histológico de rotina. Foram avaliadas, até ao momento, 32 esfregaços, dos quais 59,4% foram positivos para a presença de *Helicobacter spp* (19/32), 34,4% negativos (11/32) e 6,2% (2/32) considerados duvidosos devido a fenómenos de autólise.

Os resultados obtidos sugerem que a utilização de esfregaços como meio complementar de diagnóstico de infecções por *Helicobacter spp.*, em pacientes com gastrite de causa desconhecida, permite demonstrar a presença destas espiroquetas de forma rápida e sem recursos laboratoriais complexos, e assim equacionar a necessidade de utilização de antibioterapia específica.



## ANEXO VIII

### Artigo submetido ao Journal of Feline Medicine and Surgery

Elsevier Editorial System(™) for Journal of Feline Medicine and Surgery  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: A mixed population of *Helicobacter pylori*, *Helicobacter bizzozeronii*, and "*Helicobacter heilmannii*" evidenced in the gastric mucosa of a domestic cat.

Article Type: Short communications

Corresponding Author: Mrs. Rute Saraiva Canejo Teixeira, BScH, BEd

Corresponding Author's Institution: CIISA/FMV

First Author: Rute Saraiva Canejo Teixeira, BScH, BEd

Order of Authors: Rute Saraiva Canejo Teixeira, BScH, BEd; Manuela Oliveira; Hugo Pissarra; Maria Manuela R Niza; Cristina L Vilela

**Abstract:** *Helicobacter* within the gastric mucosa is responsible for producing pathology in many animal species, including man, raising concern over their zoonotic potential. *Helicobacter pylori*, responsible for gastritis and gastric cancer in humans, produces similar pathology in pet carnivores, but is considered an example of anthroponosis as it has been notoriously absent from pet populations. At necropsy, the stomach of a 13 year-old mixed breed spayed female cat was analysed for the presence of *Helicobacter* spp. using cytology, histopathology and PCR. Histopathological changes where observed in the fundus and antrum while *Helicobacter*-like organisms where present in the corpus and fundus but not antrum. PCR was positive in all regions for *Helicobacter* spp., *H. heilmannii* and *H. bizzozeronii*, while only the antrum was positive for *H. pylori*. The spayed female under study could represent either a yet un-described population of domestic cats infected with *H. pylori* or a case of anthroponosis.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

A mixed population of *Helicobacter pylori*, *Helicobacter bizzozeronii*, and  
“*Helicobacter heilmannii*” evidenced in the gastric mucosa of a domestic cat.

Canejo Teixeira, R., BScH, BEd; Oliveira, M., Lic., MSc, PhD; Pissarra, H., DVM, MSc;  
Niza, M.M.R.E., DVM, PhD; Vilela, C.L., DVM, PhD.

Corresponding author:

Rute Saraiva Canejo Teixeira, BScH, BEd

Address:

Faculdade de Medicina Veterinária  
Laboratório de Bacteriologia  
Pólo Universitário do Alto da Ajuda,  
Rua Prof. Cid dos Santos  
1300-477 Lisboa  
Portugal

Phone: + 351 213852800 ext.1249

Fax: + 351 213852822

e-mail: [rute.canejo@gmail.com](mailto:rute.canejo@gmail.com)

1 A mixed population of *Helicobacter pylori*, *Helicobacter bizzozeronii*, and  
2 “*Helicobacter heilmannii*” evidenced in the gastric mucosa of a domestic cat.

3  
4 Canejo Teixeira, R., BScH, BEd; Oliveira, M., Lic., MSc, PhD; Pissarra, H., DVM, MSc;  
5 Niza, M.M.R.E., DVM, PhD; Vilela, C.L., DVM, PhD.  
6

7  
8 **Short Communication**  
9

10 *Helicobacter pylori* is a gram negative, urease positive, spiral bacteria classified by the  
11 World Health Organization as a class 1 carcinogen <sup>1</sup> as its relationship to human  
12 gastritis and gastric cancer has been firmly established <sup>2,3</sup>. The majority of the 32  
13 species described to date <sup>4</sup> are enteric microorganisms of mammals, while 12 species  
14 are gastric inhabitants. Four species are now considered to be common in the gastric  
15 mucosa of domestic carnivores: *Helicobacter felis*, *Helicobacter bizzozeronii*,  
16 *Helicobacter salomonis*, “*Helicobacter heilmannii*” types 1, 2 and 4 <sup>5,6</sup>, while *H. bilis*'  
17 role as a primary gastric organism remains questionable <sup>10</sup>. Although the pathogenic  
18 role of these species in gastritis and/or gastric cancer has yet to be firmly established in  
19 pets <sup>11,12</sup>, felines seem to be much more susceptible than canines <sup>8,13</sup>. Gastric fibroses  
20 and atrophy have been linked to *H. felis* infection in cats <sup>14</sup> while the presence of  
21 lymphoid follicles <sup>15,16</sup> and inflammation have been related to *Helicobacter* spp. and “*H.*  
22 *heilmannii*” colonization <sup>17,18</sup>.

23  
24 It has been suggested that, similarly to *H. pylori* infected humans, the presence of “*H.*  
25 *heilmannii*” could play a role in feline alimentary lymphoma <sup>19</sup>. There has been growing  
26 concern regarding the zoonotic potential of these bacteria <sup>20-24</sup> since humans have  
27 been shown to harbour species other than *H. pylori* with pathological consequences <sup>25</sup>,  
28 that no environmental source for these bacteria has been found <sup>22</sup>, and that  
29 epidemiological studies show a link between animal contact and infection <sup>26</sup>. Although  
30 *H. pylori* produces similar pathology in pet carnivores and in humans <sup>27,28</sup>, this species  
31 has yet to be found in normal domestic carnivore populations <sup>29-32</sup>, making these cases  
32 examples of anthroponosis <sup>11,13,31</sup>. Recently, however, Buczoilts et al. <sup>33</sup> have identified  
33 two sequences from *Helicobacter*-like organisms identical to *H. pylori* in the gastric  
34 mucosa of canines, re-kindling the debate on the role of pet carnivores in the  
35 transmission of this bacterium to humans. The present work describes the presence of  
36 *H. pylori* in a mixed population of *Helicobacter* species in the gastric mucosa of a  
37 domestic short-hair cat.  
38

39 A 13 year-old mixed breed spayed female cat with a history of mammary tumors and  
40 pleural effusion, euthanised at the owners' request, was presented for necropsy to the  
41 Pathology Department of the Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of  
42 Lisbon. The stomach was opened along the greater curvature, brush cytology was  
43 performed and four full thickness biopsies were obtained from the fundus, corpus and  
44 antrum for histopathology and PCR analyses. Brush cytologies were obtained using  
45 sterile, single use inoculation loops and stained with May-Grünwald-Giemsa <sup>34</sup>. One  
46 biopsy from each gastric region was stored in 10% formalin for histology processing. A  
47 combined sample, comprising one sample from each region, and the remaining  
48 biopsies from the three regions were kept frozen at -80°C, until DNA extraction with  
49 Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit, according to the manufacturer's instructions.  
50 PCR reactions for *Helicobacter* spp., *H. pylori*, *H. felis*, “*H. heilmannii*”, *H. bizzozeronii*,  
51 *H. salomonis* and *H. bilis* were performed as previously described <sup>8,14,28,35-40</sup>, using  
52 Fidelity™ MasterMix (USB® Products – Affymetrix, Inc.). Reference strains *H. pylori*  
53 CCUG 17874T, *H. felis* ATCC 49179, *H. bizzozeronii* CCUG 35045, *H. salomonis*  
54 CCUG 37845, *H. bilis* ATCC 51630 and *H. heilmannii* type 2 DNA (kindly provided by  
55 Professor K.W. Simpson) were used as positive controls. Biopsies for histopathology

56 were imbedded in paraffin blocks, processed and stained with Hematoxylin and Eosin  
57 and with Giemsa.  
58  
59 Based on the World Small Animal Veterinary Association histopathological standards  
60 <sup>41</sup>, mild mucosal atrophy was observed in the fundus and antrum, while  
61 lymphoplasmocytic infiltrates were noted in the lamina propria of the antrum.  
62 *Helicobacter*-like organisms were observed in the corpus and antrum, occupying  
63 gastric glands and surface mucosa (figure 1a), where colonization was classified as  
64 mild. Brush cytology was positive in the fundus and corpus, but negative in the antrum  
65 (figure 1b). PCR on the combined sample was positive for *Helicobacter* spp., *H. pylori*,  
66 *H. helmannii* and *H. bizzozeronii*, originating 1200-bp, 298-bp, 580-bp and 420-bp  
67 amplicons, respectively (figure 2). When tested individually, the three regions were  
68 positive for *Helicobacter* spp., "*H. helmannii*" and *H. bizzozeronii*, while only the antrum  
69 was positive for *H. pylori*.  
70  
71 The presence of a *Helicobacter* mixed population has been previously described in  
72 feline gastric biopsies <sup>42</sup>. Our finding of mild mucosal atrophy is consistent with other  
73 studies <sup>13,43</sup>, however Simpson et al. <sup>14</sup> linked changes in the architecture of the gastric  
74 mucosa with the presence of *H. felis*, a species not found in this cat. "*H. helmannii*" has  
75 been shown to alter gastric architecture but through epithelial proliferation and  
76 lymphoid follicular hyperplasia <sup>18</sup>, not atrophy. It is possible however that the presence  
77 of *H. pylori* and *H. bizzozeronii* altered the pathogenic capacity of "*H. helmannii*" as  
78 described for mixed infections of *H. bizzozeronii*/*H. felis* <sup>21</sup> and *H. salomonis*/*H.*  
79 *bizzozeronii* <sup>44</sup>. The fact that the fundus and antrum were the most affected regions is  
80 consistent with others findings <sup>17</sup> and the presence of inflammation in the antrum is  
81 similar to that found in felines experimentally infected with *H. pylori* <sup>27,42</sup>.  
82  
83 The occurrence of *H. pylori* in the gastric mucosa of felines has been only reported in a  
84 particular commercial breeder <sup>45</sup> but has been notoriously absent in stray and domestic  
85 populations <sup>26,31,32,46</sup>. The spayed female under study could represent either a yet un-  
86 described population of domestic cats infected with *H. pylori* or a case of  
87 anthroponosis, as hypothesized by some authors <sup>11,12,31</sup>. Considering *H. pylori*'s ability  
88 to survive in water <sup>47,48</sup> and the tendency for keeping indoor/outdoor cats in Portugal,  
89 colonization of this animal through a contaminated water source must also be  
90 considered. It was not possible to determine whether human co-inhabitants were *H.*  
91 *pylori* positive or if the animal had outdoor access. Further studies aiming at  
92 characterising the population of *Helicobacter* spp. in the domestic carnivore population  
93 around Lisbon are currently ongoing and should help clarifying the issue.  
94  
95 The presence of "*H. helmannii*" in cats has been linked to various alterations in gastric  
96 mucosa <sup>18</sup> and alimentary lymphoma <sup>19</sup>. Jergens et al. <sup>43</sup> have shown that treatment  
97 leads to the improvement of gastritis clinical signs and bacterial clearance, although  
98 histological signs of gastritis remain, suggesting a causal relationship similar to that  
99 seen in *H. pylori* infected humans <sup>26</sup>. However, as other studies could not evidence  
100 such relationship <sup>26,49</sup>, other factors such as the effect of mixed infections <sup>20</sup> and the  
101 possibility of strain dependent virulence <sup>21</sup>, should be considered. The presence of a  
102 mixed infection of "*H. helmannii*" and *H. pylori*, as found in this cat, could explain the  
103 development of pathology in some animals and not in others infected only with "*H.*  
104 *helmannii*". Given *H. pylori*'s focal distribution pattern <sup>9,13</sup>, the small sample size  
105 normally obtained through endoscopy and even biopsy <sup>26,42</sup> may explain the high rate  
106 of negative results for *H. pylori*.  
107  
108 The role played by *Helicobacter* in feline gastritis, associated or not with lymphoma,  
109 remains controversial. Several factors, such as the species of *Helicobacter* present, the

110 virulence of the strain, and the genetic predisposition of the animal, should be further  
111 investigated in order to better understand their relation to clinical disease.  
112

### 113 Acknowledgements

114  
115 The authors would like to thank CIISA/FMV for their financial support, Professor  
116 Kenneth W. Simpson for the kind donation of *H. heilmannii* type 2 DNA used as a  
117 positive control for PCR, Professor Maria Conceição Peleteiro for her expert advice, as  
118 well as and Tec. Sandra Carvalho for her assistance with histopathology and Tec.  
119 Carla Carneiro for her assistance in the bacteriology laboratory.  
120

### 121 Figure Captions

122  
123 Figure 1: (A) Spiral bacteria, consistent with *Helicobacter* spp. in the surface mucosa.  
124 Giemsa. (B) A spiral bacteria in brush cytology. May-Grünwald-Giemsa . (Original  
125 photographs).

126  
127  
128 Figure 2: PCR reactions using a molecular ladder in lane 1 and 14 (Hyperladder II™  
129 Bioline); negative controls in lane 2, 5, 8 and 11; positive controls *H. spp* (lane 3 using  
130 *H. felis* ATCC 49179), *H. pylori* (lane 6), *H. heilmannii* type 2 (lane 9), *H. bizzozeronii*  
131 (420-bp, lane 12); sample results *H. spp* (1,200-bp, lane 4), *H. pylori* (298-bp, lane 7),  
132 '*H. heilmannii*' (580-bp, lane 10) and *H. bizzozeronii* (420-bp, lane 13).  
133

134 **References**

- 135
- 136 1. Anonymous. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working  
137 Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the  
138 Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1994; 61(5): 1-241.
- 139 2. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* In Health and Disease.  
140 Gastroenterology. 2009; 136(6): 1863-73.
- 141 3. Kusters JG, van Vliet AH, Kulpers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*  
142 Infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 449-90.
- 143 4. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus  
144 *Helicobacter*. 2010. <http://www.bacterio.cict.fr/h/helicobacter.html> (accessed Aug. 12,  
145 2005)
- 146 5. O'Rourke JL, Solnick JV, Nellan BA, Seidel K, Hayter R, Hansen LM, et al.  
147 Description of 'Candidatus *Helicobacter hellmannii*' based on DNA sequence analysis  
148 of 16S rRNA and urease genes. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54(Pt 6): 2203-11.
- 149 6. Jalava K, On SL, Vandamme PA, Happonen I, Sukura A, Hanninen ML.  
150 Isolation and Identification of *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa.  
151 Appl Environ Microbiol. 1998; 64(10): 3998-4006.
- 152 7. Happonen I, Linden J, Saari S, Karjalainen M, Hanninen ML, Jalava K, et al.  
153 Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. J  
154 Am Vet Med Assoc. 1998; 213(12): 1767-74.
- 155 8. Simpson K, Nelger R, DeNovo R, Sherding R. The relationship of *Helicobacter*  
156 spp. infection to gastric disease in dogs and cats. J Vet Intern Med. 2000; 14(2): 223-7.
- 157 9. Priestnall SL, Wilnberg B, Spohr A, Neuhaus B, Kuffer M, Wiedmann M, et al.  
158 Evaluation of "*Helicobacter hellmannii*" subtypes in the gastric mucosae of cats and  
159 dogs. J Clin Microbiol. 2004; 42(5): 2144-51.
- 160 10. Eaton KA, Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman BE, Paola J, et al.  
161 Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet  
162 dogs: animal and public health implications. J Clin Microbiol. 1996; 34(12): 3165-70.
- 163 11. Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the  
164 pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(1):  
165 59-97.
- 166 12. Harbour S, Sutton P. Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter*  
167 Infections of veterinary animals. Vet Immunol Immunopathol. 2008; 122(3-4): 191-203.
- 168 13. Nelger R, Simpson KW. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and  
169 fiction. J Vet Intern Med. 2000; 14(2): 125-33.
- 170 14. Simpson KW, Strauss-Ayall D, Scanziani E, Straubinger RK, McDonough PL,  
171 Straubinger AF, et al. *Helicobacter* fells infection is associated with lymphoid follicular  
172 hyperplasia and mild gastritis but normal gastric secretory function in cats. Infect  
173 Immun. 2000; 68(2): 779-90.
- 174 15. Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hanninen ML, Westermarck E.  
175 Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their  
176 association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. Zentralbl  
177 Veterinarmed A. 1996; 43(5): 305-15.
- 178 16. Hermanns W, Kregel K, Breuer W, Lechner J. *Helicobacter*-like organisms:  
179 histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. J Comp Pathol.  
180 1995; 112(3): 307-18.
- 181 17. Strauss-Ayall D, Scanziani E, Deng D, Simpson KW. *Helicobacter* spp. Infection  
182 in cats: evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric  
183 *Helicobacter* spp. Vet Microbiol. 2001; 79(3): 253-65.
- 184 18. Takemura LS, Camargo PL, Afferi AA, Bracarense AP. *Helicobacter* spp. in  
185 cats: association between infecting species and epithelial proliferation within the gastric  
186 lamina propria. J Comp Pathol. 2009; 141(2-3): 127-34.

- 187 19. Bridgford EC, Marini RP, Feng Y, Parry NM, Rickman B, Fox JG. Gastric  
188 *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet*  
189 *Immunol Immunopathol.* 2008; 123(1-2): 106-13.
- 190 20. Tuzio H, Edwards D, Elston T, Jarboe L, Kudrak S, Richards J, et al. Feline  
191 zoonoses guidelines from the American Association of Feline Practitioners. *J Feline*  
192 *Med Surg.* 2005; 7(4): 243-74.
- 193 21. Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Chiers K, Baele M, Meyns T, et al.  
194 Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their  
195 significance for human health. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(2): 202-23, Table of  
196 Contents.
- 197 22. Fox JG. The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal  
198 and systemic diseases. *Gut.* 2002; 50(2): 273-83.
- 199 23. Dieterich C, Wiesel P, Neiger R, Blum A, Corthesy-Theulaz I. Presence of  
200 multiple "*Helicobacter* *hellmannii*" strains in an individual suffering from ulcers and in  
201 his two cats. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(5): 1366-70.
- 202 24. Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, Driessen A, Debongnie JC, Burette A,  
203 et al. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from  
204 humans, dogs, and cats. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5): 2256-60.
- 205 25. Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, et al.  
206 *Helicobacter* *hellmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma:  
207 complete remission after curing the infection. *Gastroenterology.* 2000; 118(5): 821-8.
- 208 26. Melning A, Kroher G, Stolte M. Animal reservoirs in the transmission of  
209 *Helicobacter* *hellmannii*. Results of a questionnaire-based study. *Scand J*  
210 *Gastroenterol.* 1998; 33(8): 795-8.
- 211 27. Fox JG, Balchelder M, Marini R, Yan L, Handt L, Li X, et al. *Helicobacter pylori*-  
212 induced gastritis in the domestic cat. *Infect Immun.* 1995; 63(7): 2674-81.
- 213 28. Simpson KW, Strauss-Ayall D, Straubinger RK, Scanziani E, McDonough PL,  
214 Straubinger AF, et al. *Helicobacter pylori* infection in the cat: evaluation of gastric  
215 colonization, inflammation and function. *Helicobacter.* 2001; 6(1): 1-14.
- 216 29. Neiger R, Dieterich C, Burnens A, Waldvogel A, Corthesy-Theulaz I, Haller F, et  
217 al. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *J Clin Microbiol.*  
218 1998; 36(3): 634-7.
- 219 30. Strauss-Ayall D, Simpson KW, Schein AH, McDonough PL, Jacobson RH,  
220 Valentine BA, et al. Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter*  
221 spp. and uninfected dogs. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5): 1280-7.
- 222 31. El-Zaatari FA, Woo JS, Badr A, Osato MS, Serna H, Lichtenberger LM, et al.  
223 Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H. pylori* in cats may  
224 be an anthroponosis--an animal infection with a human pathogen. *J Med Microbiol.*  
225 1997; 46(5): 372-6.
- 226 32. Ghil HM, Yoo JH, Jung WS, Chung TH, Youn HY, Hwang CY. Survey of  
227 *Helicobacter* infection in domestic and feral cats in Korea. *J Vet Sci.* 2009; 10(1): 67-  
228 72.
- 229 33. Buczollits S, Hirt R, Rosengarten R, Busse HJ. PCR-based genetic evidence for  
230 occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric  
231 mucosa. *Vet Microbiol.* 2003; 95(4): 259-70.
- 232 34. Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hanninen ML, Westermarck E.  
233 Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in  
234 dogs and cats. *J Comp Pathol.* 1996; 115(2): 117-27.
- 235 35. Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, et al. Hepatic  
236 *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic  
237 cholecystitis. *Gastroenterology.* 1998; 114(4): 755-63.
- 238 36. Perkins SE, Yan LL, Shen Z, Hayward A, Murphy JC, Fox JG. Use of PCR and  
239 culture to detect *Helicobacter pylori* in naturally infected cats following triple  
240 antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(5): 1486-90.

- 241 37. Simpson KW, McDonough PL, Strauss-Ayall D, Chang YF, Harpending P,  
 242 Valentine BA. *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and  
 243 function. *Vet Pathol.* 1999; 36(3): 237-48.
- 244 38. Zhu J, Teng CH, Chang CF, Chang CD, Simpson KW, Wei C, et al. Cloning and  
 245 characterization of a *Helicobacter bizzozeronii* urease gene cluster. *DNA Seq.* 2002;  
 246 13(6): 321-31.
- 247 39. Mikkonen TP, Karenlampi RI, Hanninen ML. Phylogenetic analysis of gastric  
 248 and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J*  
 249 *Syst Evol Microbiol.* 2004; 54(Pt 3): 753-8.
- 250 40. Feng S, Ku K, Hodzic E, Lorenzana E, Freet K, Barthold SW. Differential  
 251 detection of five mouse-infecting *Helicobacter* species by multiplex PCR. *Clin Diagn*  
 252 *Lab Immunol.* 2005; 12(4): 531-6.
- 253 41. Day MJ, Blizer T, Mansell J, Wilcock B, Hall EJ, Jergens A, et al.  
 254 Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in  
 255 endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal  
 256 Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J Comp Pathol.* 2008;  
 257 138 Suppl 1: S1-43.
- 258 42. Scanziani E, Simpson KW, Monestroll S, Soldati S, Strauss-Ayall D, Del Piero  
 259 F. Histological and immunohistochemical detection of different *Helicobacter* species in  
 260 the gastric mucosa of cats. *J Vet Diagn Invest.* 2001; 13(1): 3-12.
- 261 43. Jergens AE, Pressel M, Grandell J, Morrison JA, Sorden SD, Haynes J, et al.  
 262 Fluorescence in situ hybridization confirms clearance of visible *Helicobacter* spp.  
 263 associated with gastritis in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2009; 23(1): 16-23.
- 264 44. Hanninen ML, Happonen I, Jalava K. Transmission of canine gastric  
 265 *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. *Vet*  
 266 *Microbiol.* 1998; 62(1): 47-58.
- 267 45. Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, et al.  
 268 *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect*  
 269 *Immun.* 1994; 62(6): 2367-74.
- 270 46. Shojaee Tabrizi A, Jamshidi S, Oghalaei A, Zahraei Salehi T, Bayati Eshkaftaki  
 271 A, Mohammadi M. Identification of *Helicobacter* spp. in oral secretions vs. gastric  
 272 mucosa of stray cats. *Vet Microbiol.* 2010; 140(1-2): 142-6.
- 273 47. Azevedo NF, Almolda C, Fernandes I, Gerqueira L, Dias S, Keevil CW, et al.  
 274 Survival of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp. in water: implications for  
 275 transmission. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(6): 1805-11.
- 276 48. Erginsoy SD, Sozmen M. Gastric *Helicobacter*-like Organisms in Stray Cats.  
 277 *Acta Vet Bmo.* 2006; 75: 91-8.
- 278 49. Norris CR, Marks SL, Eaton KA, Torabian SZ, Munn RJ, Solnick JV. Healthy  
 279 cats are commonly colonized with "*Helicobacter helmannii*" that is associated with  
 280 minimal gastritis. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(1): 189-94.
- 281 50. O'Conner D, Lee A. Microbial interference between gastric *Helicobacters*:  
 282 Competitive exclusion of *Helicobacter felis* by "*Gastrosprillum hominis*.". *Microbial*  
 283 *Ecology In Health and Disease.* 1991; 4(5): S200-S2.
- 284 51. Lecoindre P, Chevallier M, Peyrol S, Boude M, Ferrero RL, Labigne A. Gastric  
 285 *Helicobacters* in cats. *J Feline Med Surg.* 2000; 2(1): 19-27.

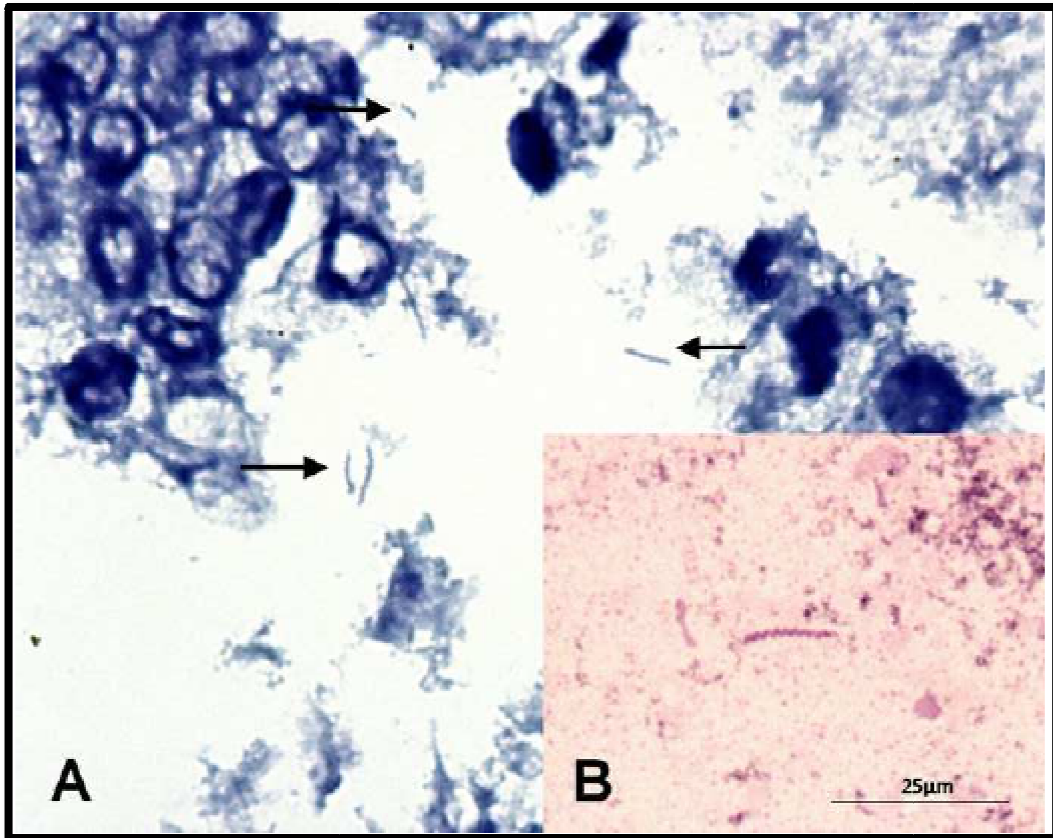


Figura 1

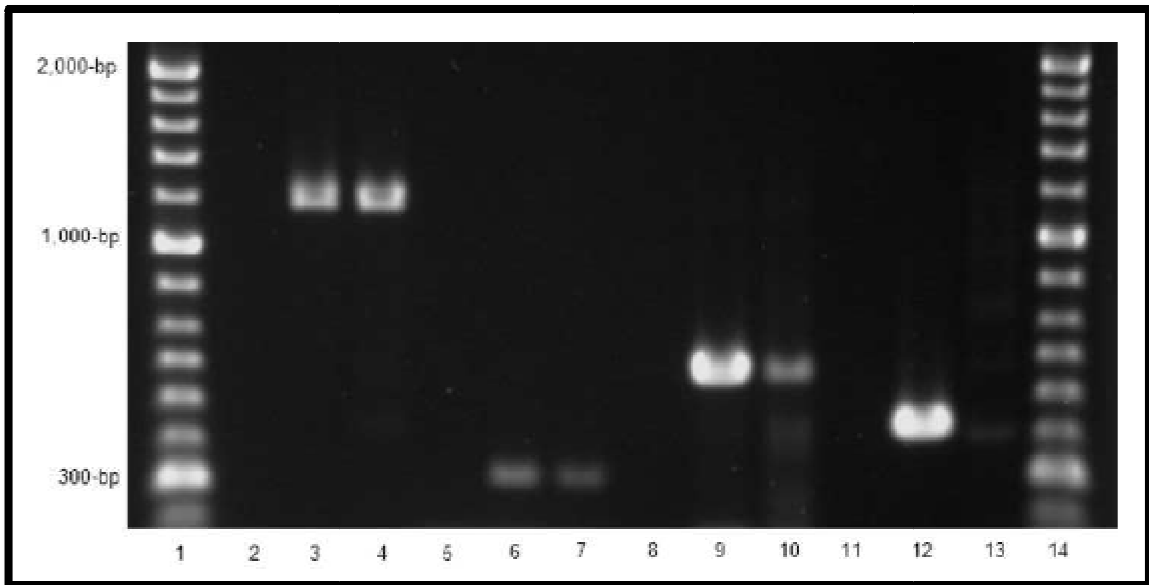


Figura 2

