

Maria Lúcia de Souza

Avaliação da incidência de *Helicobacter spp* em cães oriundos do Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Área de Concentração em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Naresse

Co-orientador: Dr. Rogério Saad Hossne

Universidade Estadual Paulista

Botucatu - SP

2003

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	07
OBJETIVOS	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
1. Animais	12
2. Preparo do animal	13
3. Seqüência das etapas experimentais.....	13
4. Técnicas utilizadas	14
4.1. Anestesia	14
4.2. Coleta de sangue	14
4.3. Coleta das amostras gástricas e duodenal	15
4.4. Processamento do material.	20
4.5. Análise estatística	26
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	32
1. Quanto à metodologia	32
2. Quanto aos resultados	38
CONCLUSÕES	45
RESUMO	46
ABSTRACT	48
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO	61

Agradecimentos

Ao *Dr. Luiz Eduardo Naresse*, meu orientador, por sua imensa paciência e ajuda na elaboração da dissertação e, principalmente, por ter concordado com a troca do projeto inicial, para garantir que os animais que participassem do estudo não fossem eutanasiados.

Ao *Dr. Renê Gamberini Prado*, grande incentivador, a quem fui pedir um estágio em endoscopia e me motivou a iniciar o Mestrado.

Ao *Dr. Rogério Saad Hossne*, por me ensinar a realizar endoscopias e ainda hoje me ajudar com meus pacientes.

À *Maria Clara F. Chaguri* e à *Luzia F. Gouveia*, da Cirurgia Experimental, por me auxiliarem na coleta e elaboração das lâminas, e também à *Maria Helena S. de Lima* e *Irene Spago*.

À *Dra. Noeme Sousa Rocha* e à *Dra. Maria Aparecida M. Rodrigues*, que me ajudaram a esclarecer a leitura das lâminas.

À *Simone Barroso Corvino*, *Marinede Ribeiro Jorge* e ao *Carlos Eduardo Borgatto*, do Departamento de Cirurgia, por ajudarem na digitação da dissertação e na aula de Qualificação.

Ao *Dr. Carlos Roberto Padovani* e *Dr. Alcides de Amorin Ramos*, pelas estatísticas.

À *Dra. Lucy Marie Ribeiro Muniz* e ao *Dr. Shoiti Kobayasi*, pela aprovação na Banca Examinadora de Qualificação.

À *Dra. Vera Lúcia Pimentel*, pelos animais do Biotério cedidos para coletas e exames.

A todos que colaboraram na elaboração desta Dissertação, meu mais sincero obrigado.

E aos **animais** que "voluntariamente" participaram de meu estudo.

O TESTAMENTO DE UM CÃO

Minhas posses materiais são poucas e eu deixo tudo para você...

Uma coleira mastigada em uma das extremidades, faltando dois botões, uma desajeitada cama de cachorro e uma vasilha de água que se encontra rachada na borda.

Deixo para você a metade de uma bola de borracha, uma boneca rasgada que você vai encontrar debaixo da geladeira, um ratinho de borracha sem apito que está debaixo do fogão da cozinha e uma porção de ossos enterrados no canteiro de rosas ou sob o assoalho da minha casinha.

Além disso, eu deixo para você as memórias, que, aliás, são muitas.

Deixo para você a memória de dois enormes e meigos olhos marrons, de uma caudinha curta e espetada, de um nariz sempre molhado e das choradeiras atrás da porta.

Deixo para você uma mancha no tapete da sala de estar junto à janela, quando nas tardes de inverno eu me apropriava daquele lugar, como se fosse meu, e me enrolava feito uma bolinha para pegar um pouco de sol. (Mas não manchava de propósito.)

Deixo para você um tapete esfarrapado em frente de sua cadeira preferida, o qual nunca foi consertado com o tipo de linha certo... isso é verdade. Eu o mastiguei todinho, quando ainda tinha cinco meses de idade, lembra-se?

Deixo para você um esconderijo que fiz no jardim debaixo dos arbustos perto da varanda da frente, onde eu encontrava asilo durante aqueles dias de forte verão.

Ele deve estar cheio de folhas agora e por isso talvez você tenha dificuldades em encontrá-lo. Sinto muito!

Deixo também, só para você, o barulho que eu fazia ao sair correndo sobre as folhas de outono, quando passeávamos pelo bosque.

Deixo ainda, a lembrança de momentos pelas manhãs, quando saíamos junto pela margem do riacho e você me dava aqueles biscoitos de baunilha.

Recordo-me das suas risadas debochadas, porque eu não consegui alcançar aquele coelho impertinente.

Deixo-lhe como herança minha devoção, minha simpatia, meu apoio quando as coisas não iam bem, meus latidos quando você levantava a voz aborrecido... e minha frustração por você ter ralhado comigo.

*Eu nunca fui à igreja e nunca escutei um sermão.
No entanto, mesmo sem haver falado sequer uma palavra em toda a minha vida, deixo para você o exemplo de paciência, amor e compreensão.*

*Talvez, (modéstia à parte) sua vida tenha sido um pouco mais alegre, porque eu estive ao seu lado! Agora, já velhinho, quando tenho que me despedir definitivamente, desejo, sinceramente, que encontre um substituto à minha altura. Eu lhe deixei alguns herdeiros, dos quais você teve que se desfazer por falta de condições de cuidar de mais de um. Pode ser que consiga algum deles de volta, ou, pelo menos, uma terceira geração.
Eu garanto que provêm "de boa família".*

Mas, se sua dor for tanta a ponto de não poder agüentar outra separação semelhante, eu compreenderei, saberei que não considerou "um alívio livrar-se de mim".

*Com a esperança de que você tenha podido me entender, olhando-me nos olhos, enquanto me acompanha nesses meus últimos momentos, apesar de estar com os seus olhos completamente molhados, embora os meus não estejam, porque os cães sofrem mas não derramam lágrimas,
peço-lhe desculpas por tudo que possa ter feito que o tenha aborrecido, e por não conseguir mais força para continuar a seu lado.*

ADEUS, meu maior amigo!

(autor desconhecido)

INTRODUÇÃO

A descoberta de uma associação entre a infecção pelo *Helicobacter pylori* (*Hp*) e a doença péptica por Marshall & Warren em 1983, foi um marco na compreensão das doenças do trato digestivo alto (Dooley, 1993). A importância dessa bactéria tem sido detectada na patogenia da gastrite, da úlcera gástrica e duodenal (Blaser, 1990; Cover & Blaser, 1995; Queiroz et al., 1998) e mais recentemente como agente indutor do carcinoma gástrico no ser humano (Morgner et al., 2000b, Castro et al., 2003).

Vários estudos têm demonstrado correlação entre a presença de *Hp* no homem e outras doenças, como trombocitopenia auto-imune, nefropatia membranosa, polineuropatias imunes agudas, doença cardíaca isquêmica (Gasbarrini & Franceschi, 1999), carcinoma hepático (Avenaud et al., 2000), colangite esclerosante primária e cirrose biliar primária (Nilsson et al., 2000), e também em doença coronariana (Danesh et al., 1999). Algumas espécies de *Helicobacter* foram isoladas do sangue de pacientes adéticos (Weir et al., 1999).

É estimado que metade da população mundial. esteja colonizada por este patógeno e que a maioria dela foi colonizada ainda na idade escolar (Asaka et al., 1992; Megraud, 1993). A infecção pela bactéria tem correlação inversa com o padrão socioeconômico (Graham et al., 1991). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a colonização do estômago humano pelo *H. pylori* é disseminada (Valle e Bizinelli, 1993; Coelho et al., 1996; Souto et al., 1998). Muitos indivíduos colonizados permanecem assintomáticos.

O estômago constitui reservatório habitual da bactéria, e suas características permitem que ela habite o muco que recobre o epitélio gástrico, levando danos à mucosa gástrica. Sua sobrevivência na mucosa gástrica provavelmente resulta de sua forma e de sua natureza microaerófila. A forma espiralada ou helicoidal possibilita sua movimentação no ambiente mucoso e permite mover-se para longe do ambiente ácido. O dano é decorrente da adesão da bactéria à mucosa gástrica, constituindo importante fator de virulência. A adesividade é essencial à colonização e à indução de resposta inflamatória. A adesão impede que a bactéria seja eliminada durante o “turnover” celular, secreção de muco ou pela motilidade gástrica, permitindo ao *Helicobacter* direcionar suas toxinas diretamente às células epiteliais do hospedeiro. A sobrevivência da bactéria nesse ambiente por décadas é devido à capacidade da mesma em não ser identificada pela resposta imunológica do hospedeiro.

A forma exata pela qual ocorre a transmissão desta *helicobacteriose* é desconhecida. O isolamento de *Hp* em saliva, placa dentária e nas fezes reforça a hipótese de transmissão oro-oral ou oro-fecal. Alguns relatos mostram disseminação da bactéria por meio de equipamentos gastrointestinais contaminados (Langenberg et al., 1990; Williams, 1999). Experimentalmente conseguiu-se a transmissão do *H. pylori* em cães gnotobióticos para cães não infectados (Radin et al., 1990).

Outras espécies de *Helicobacter* foram identificadas no ser humano. O *Helicobacter heilmannii* (*Hh*) foi associado à gastrite (Rodrigues et al., 1996; Honsova et al., 1999; Mention et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Cales et al., 2000; Svec et al., 2000) e ao linfoma MALT gástrico primário (Morgner et al.,

2000a; Foschini et al., 1999). Nessa associação, a erradicação da bactéria resultou no desaparecimento do linfoma gástrico (Morgner et al., 2000a). A infecção por *Hh* em seres humanos é bem menos freqüente do que a verificada com o *Hp*, sendo possível a concomitância de infecção por ambas as espécies de bactérias (Rodrigues et al., 1996, Foschini et al., 1999).

A contaminação do ser humano pelo *Hh* provavelmente deve-se ao contacto deste com o cão. Esse fato foi observado, tendo em vista a maior ocorrência desta espécie em *helicobacterioses* no homem que vive em zonas rurais em relação aos que habitam em centros urbanos, pelo fato de o cão ter contacto mais prolongado e duradouro com o homem da zona rural (Meining et al., 1998).

A presença de organismos espiralados na mucosa gástrica do cão foi primeiramente reportada em 1881 (Rappin apud Hermanns, 1995). Em 1896, foram descritas três bactérias espiraladas nessa espécie, morfologicamente distintas (Salomon apud Happonen et al., 1998). Atualmente, pelo menos 11 espécies foram isoladas em estômagos ou intestinos de mamíferos, incluindo o cão (Cover & Blaser, 1995; Jalava et al., 1997; Jalava et al., 2001).

Por outro lado, não se conseguiram evidências de correlação entre a presença da bactéria na mucosa gástrica de cães e os sintomas digestivos apresentados por esses animais. Estudos de prevalência e incidência do *Helicobacter* em cães têm sido descritos em diversos países, revelando, em sua maioria, taxas de 95-100% (Weber et al., 1958; Lee et al., 1992; Lecoindre et al., 1995; Hermanns et al., 1995; Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1996b; Happonen et al., 1998; Happonen et al., 2000; Peyrol et al., 1998; Mendes et al., 1999; Cattoli et al., 1999; Simpson et al., 2000; Hwang et al., 2002). Esses

estudos sugerem que o *Helicobacter* deve ser um dos componentes normais da flora gástrica do canino (Hermanns et al., 1995; Cattoli et al., 1999).

A avaliação histológica do estômago de cães mostrou que o corpo e fundo, principalmente, são os locais de encontro da bactéria, sendo apontada no muco, nas criptas gástricas, nas glândulas gástricas e nas células parietais. O diagnóstico de gastrite leve a moderada é achado freqüente em cães sadios e naqueles com sintomas de doença gástrica, independente, do grau de colonização gástrica pela bactéria (Hermanns et al., 1995; Haziroglu et al., 1995; Cattoli et al., 1996; Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1998; Peyrol et al., 1998; Cattoli et al., 1999; Simpson et al., 1999a). Do mesmo modo, a função secretória gástrica foi igual nos dois grupos de cães (Simpson et al., 1999b).

A grande maioria da pesquisa sobre *Helicobacter* em cães foi realizada com animais sadios ou com doença digestiva, pertencentes a proprietários definidos ou de criadores de animais para laboratório, sendo que cães naturalmente infectados por *Helicobacter pylori* nunca foram documentados.

A necessidade de treinamento técnico em animais de laboratório por grande parte de pesquisadores é uma realidade em nossos dias, tanto para novos procedimentos cirúrgicos quanto para a destreza a ser utilizada na prática clínica. Os cães, devido ao seu porte, são amplamente utilizados nas pesquisas experimentais. Os cães do Biotério Central do Campus de Botucatu são animais errantes, cuja alimentação e hábitos são desconhecidos pelos pesquisadores.

Levando-se em consideração esses aspectos, o presente estudo foi delineado no sentido de investigar se esses animais são naturalmente infectados por *Helicobacter pylori*.

OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido para investigar, em cães do Biotério Central do Campus de Botucatu, a frequência de infecção por *Helicobacter* e a incidência da espécie *H. pylori* na mucosa gástrica e duodenal utilizando-se os seguintes métodos:

1. Teste rápido de urease
 2. Teste imunocromotográfico
 3. Análise histológica com método histoquímico.
-

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 109 cães sem raça definida, sendo 49 machos e 60 fêmeas, pesando em média 13 quilos, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista.

Os animais foram capturados em várias cidades do Estado de São Paulo, e encaminhados ao Biotério Central da UNESP. Entre o 2º e o 10º dia da chegada ao Biotério, foram imunizados com vacina tríplice (cinomose, hepatite e leptospirose), vermifugados com solução injetável de ivermectina (0,004 µg/Kg) via subcutânea e Praziquantel oral (5mg/kg), sendo feita aplicação de Deltametrina pour on (dose total de 2mL/animal), no dorso para controle de ectoparasitas. A partir do 11º dia da chegada ao Biotério, foram imunizados contra raiva sendo, a liberação para pesquisa após 25 dias da imunização anti-rábica.

Os boxes utilizados no Biotério para o abrigo de animais são de alvenaria em toda a sua extensão, sendo lavados diariamente com água pressurizada, dão acesso ao solário e possuem um estrado de madeira, na parte destinada ao dormitório.

A alimentação dos animais foi constituída de ração de manutenção para cães[®].

[®] Nutriara

2. Preparo do animal

Na véspera do procedimento, os animais foram levados ao Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FMB-UNESP, onde foram acondicionados em boxes individuais, recebendo alimentação até 14 horas e água até 3 horas anteriormente ao exame.

3. Seqüência das etapas experimentais

3.1. Anestesia

3.2. Coleta sanguínea

3.3. Coleta das amostras gástricas e duodenal.

3.4. Processamento do material.

3.5. Análise estatística

4. Técnicas utilizadas

4.1. Anestesia

O sistema venoso do cão foi acessado por punção da veia cefálica do membro dianteiro, com introdução de abocath nº 20, sendo mantida a perfusão com solução de cloreto de sódio 0,9% na velocidade de 20 gotas/minuto.

A anestesia consistiu de injeção endovenosa de pentobarbital sódico 3% na dosagem de 30mg/kg. Após atingir o plano anestésico, caracterizado por movimentos respiratórios regulares e ausência de reflexos motores, foi iniciada a endoscopia ou a técnica cirúrgica programada.

A manutenção da anestesia foi realizada com dose suplementar do anestésico, quando necessário.

4.2. Coleta de sangue

Após a indução anestésica, foram retirados 10mL de sangue venoso do animal, por meio de punção da veia jugular, colocados em tubo de vidro sem anticoagulante, com a finalidade de analisar quantitativamente os anticorpos anti-*Helicobacter pylori*, por meio do teste sorológico *H. pylori-One Step Teste*.

4.3. Coleta das amostras gástricas e duodenal

Em 61 animais, as amostras gástricas foram coletadas por endoscopia e em 48 animais por meio da técnica aberta.

As amostras, quando obtidas por via endoscópica, foram retiradas por aparelho de endoscopia *Olympus*, modelo GIF-XQ, com canal de biópsia de 2.0mm (Fig. 1). Com o auxílio da pinça de biópsia fenestrada oval (1,8mm)[®], retiravam-se duas amostras na pequena curvatura do antro gástrico (A), duas na grande curvatura do fundo gástrico (B), duas na pequena curvatura do corpo gástrico (C) e duas no duodeno (D), as quais eram colocadas em papel de filtro com a serosa voltada para cima e imersas em solução tamponada de formaldeído a 10%. Era também retirada uma terceira amostra, no fundo gástrico (B), a qual era imediatamente colocada em solução-padrão de uréia a 10% e vermelho fenol.

Após a retirada das amostras, os animais foram conduzidos para a sala de recuperação até completa reversão da anestesia, sendo recolocados nos boxes individuais do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, para serem posteriormente utilizados em técnica cirúrgica com graduandos ou residentes do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

As amostras gástricas coletadas pela técnica aberta foram obtidas de caninos utilizados em técnica cirúrgica, nos quais o trato digestivo não tivesse

[®] GIP

sido utilizado e os animais permanecessem vivos ao término da técnica cirúrgica.

Através desta técnica, o animal foi colocado em goteiras, em decúbito dorsal, e o estômago foi acessado por laparotomia mediana ampla, imediatamente após a eutanásia com superdosagem de anestésico. Procedia-se então à abertura do mesmo pela grande curvatura, com análise de toda a mucosa gástrica, sendo as amostras retiradas dos mesmos locais quando da utilização da via endoscópica (Fig. 2) Em ambas as técnicas de retirada das amostras gástricas e duodenal, todo o procedimento foi realizado com equipamentos de proteção individual como aventais, luvas e máscaras, para todos os membros da equipe (Fig. 3). A cada realização do procedimento, em ambas as técnicas, todo o material ficava imerso em solução de glutaraldeído a 10% por 30 minutos após limpeza.

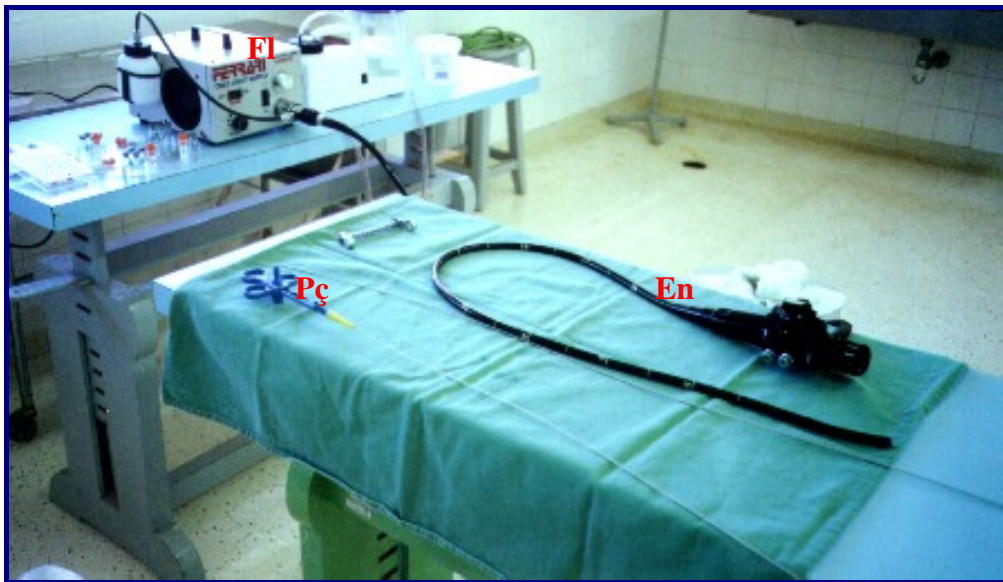


Figura 1. Equipamentos utilizados para realização da endoscopia:
Endoscópio (En), fonte de luz (Fl) e pinça de biópsia (Pç)

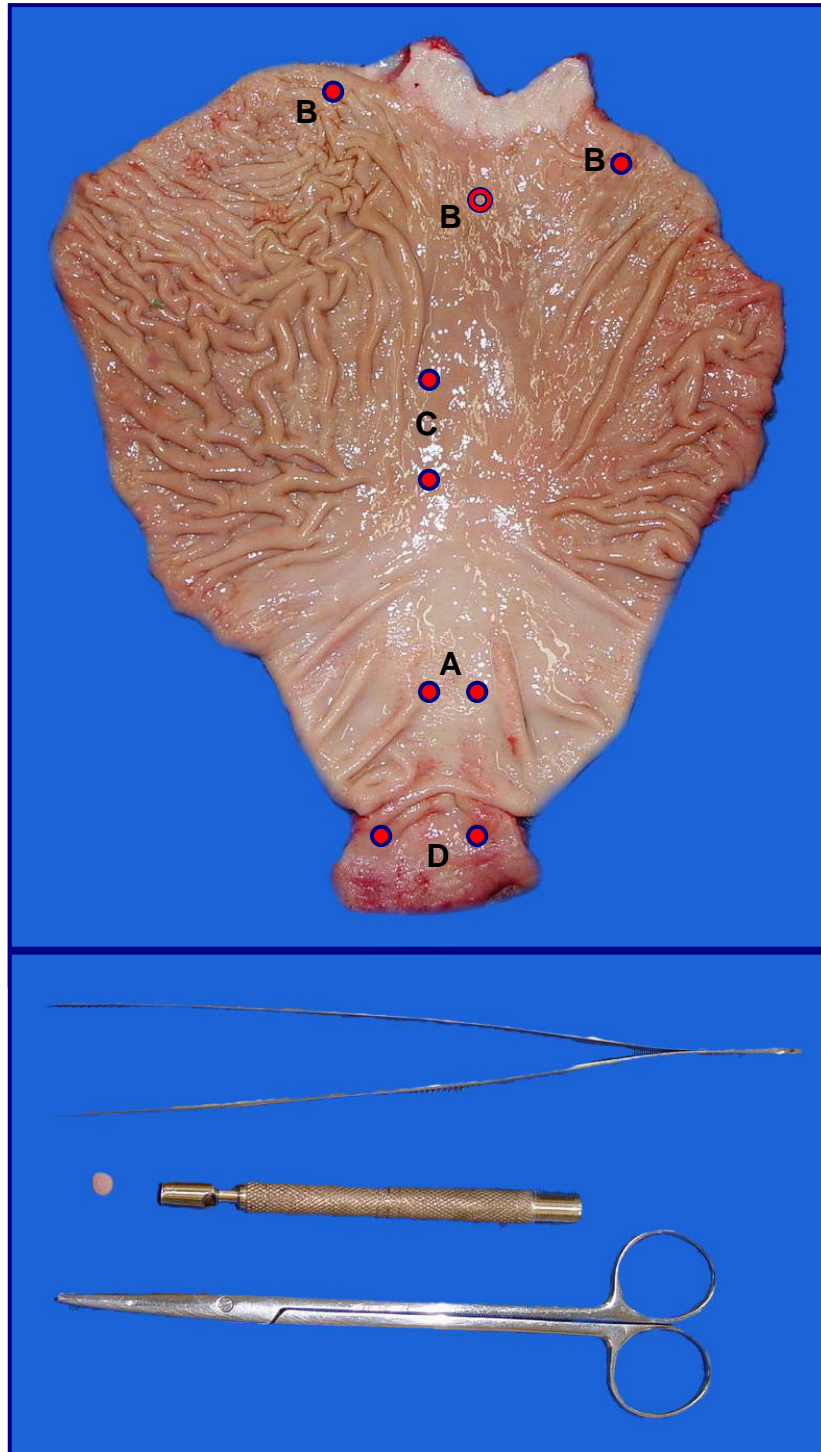


Figura 2. Estômago aberto pela grande curvatura. Técnica de retirada das amostras, pela via aberta, utilizando-se o *punch*, tesoura e pinça anatômica, dos locais identificados:

A – Amostras do antro; **B** – Amostras do fundo gástrico; **C** – Amostras do corpo gástrico, na pequena curvatura; **D** – Amostras do duodeno.



Figura 3. . Método de coleta das amostras gástrica e duodenal pela via endoscópica. Observar equipamentos de proteção individual da equipe

4.4. Processamento do material

Após retirada do sangue do animal, procedeu-se à centrifugação do mesmo a 4.000 rpm durante 10 minutos, obtendo-se soro que era transferido para um tubo esterelizado.

O dispositivo utilizado para análise qualitativa de anticorpos anti *H. pylori* é denominado *kit H. pylori One Step Teste*[®] (Fig. 4). Este teste sorológico utiliza a técnica imunocromatográfica, detectando anticorpo anti-*Helicobacter pylori* de todos os isotipos (IgG, IgM, IgA).

O dispositivo imunocromatográfico contém conjugado de cor, corante, e antígenos de *H. pylori* imobilizados.

O *kit* contém 25 dispositivos imunocromatográficos lacrados para análise de anticorpos, sendo que à abertura do *kit* era necessária a verificação de sua validade, utilizando-se as soluções controle positiva e negativa que acompanham o *kit*. O teste sorológico nos animais era realizado nos 23 dispositivos restantes.

Assim, duas a três gotas da solução controle positiva, que contém anticorpos anti-*H.pylori* conservado em soro inativado ou da solução controle negativa, isenta de anticorpos anti-*H.pylori*, eram colocadas na janela S do dispositivo imunocromatográfico por meio da micropipeta que acompanha o *kit* (Fig. 5). A seguir, adicionava-se a mesma quantidade da solução tampão de extração, sendo esta composta por fosfato de sódio 0.01M, cloreto de sódio 0.14M, BSA a 0.2% e azida sódica a 0.1% .

[®]Inlab Diagnóstica - Alamar Tecno Científica Ltda.

A formação de um complexo antígeno-anticorpo-corante, quando da utilização da solução-contrôle positiva, era visibilizado pelo aparecimento de uma faixa rósea na área T (teste) do dispositivo imunocromatográfico e a não formação desse complexo, quando da utilização da solução controle negativa, não desencadearia a formação da faixa rósea na área T (teste) do dispositivo imunocromatográfico.

Por outro lado, com o uso de ambas as soluções, deveria ocorrer o aparecimento de uma faixa rósea na área C (controle) do dispositivo imunocromatográfico, que independe da presença de anticorpos, ocorrendo por uma reação imunoquímica. Essa faixa rósea na área C indica a validade do dispositivo (Fig. 5).

O *kit*, mantido sob refrigeração, era retirado do refrigerador 15 minutos antes de sua utilização. Para a análise dos anticorpos circulantes, colocavam-se duas ou três gotas do soro de cada animal e a mesma quantidade da solução tampão de extração na janela S do dispositivo imunocromatográfico, deixando-se o mesmo à temperatura ambiente. A leitura da reação era realizada 10 minutos após a colocação do soro na placa do dispositivo.

As amostras gástricas e duodenal colocadas em formaldeído 10% tamponado, após sua fixação, foram processadas para obtenção de cortes histológicos de quatro micra de espessura. Os cortes foram corados pelo método de Giemsa modificado.

O corante Giemsa é um dos derivados do corante de Romanowsky, sendo constituído de uma mistura de eosinatos de azul de metileno, eosinato

de violeta e azul de metileno, usualmente dissolvido em álcool metílico para fixação.

A diferença entre os derivados e o corante original de Romanowsky deve-se à proporção em que se emprega o azul de metileno e a eosina, ou ao método de tratamento do azul de metileno antes de sua combinação com a eosina.

A amostra gástrica colocada em solução de uréia a 10% com vermelho fenol foi destinada ao teste rápido da urease. A leitura de reação foi realizada em até quatro horas da imersão da amostra na solução.

Esse teste da urease baseia-se na capacidade da bactéria em degradar a uréia em amônia, por esta possuir alta concentração da enzima urease. Assim, o meio de inoculação da amostra gástrica, de coloração alaranjada (composto de tampão fosfato 0,001 M/ pH 6,5, 2g de uréia/100mL do tampão, 50mg de fenol/100mL do tampão e 20mg de azida de sódio/100mL do tampão em pH ajustado para 4.5), assumia-se uma tonalidade arroxeada quando da presença da bactéria, pela mudança do pH ácido da solução para pH alcalino (Fig. 6).



Figura 4. Kit *H. pylori* One Step: A) Dispositivo imunocromatográfico lacrado; B) Solução controle negativa; C) Solução controle positiva; D) Solução tampão de extração; E) Micropipeta.

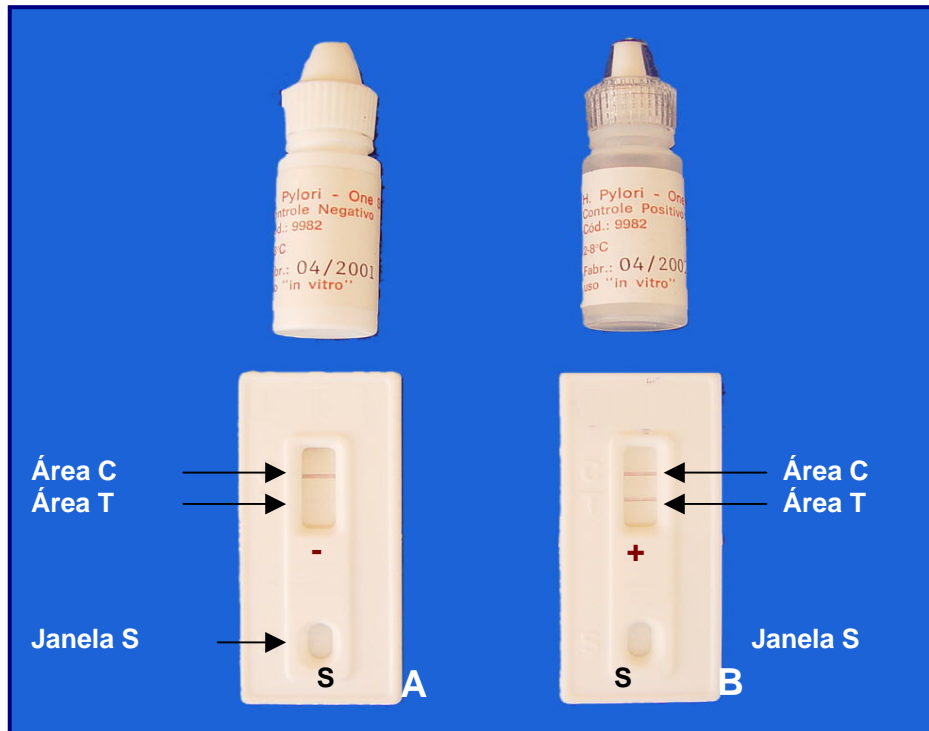


Figura. 5. Verificação da validade do *Kit H. pylori One Step Teste*:

- A) Negativa: presença da faixa rósea na região C do dispositivo.
- B) Positiva: presença das faixas róseas nas regiões C e T do dispositivo.

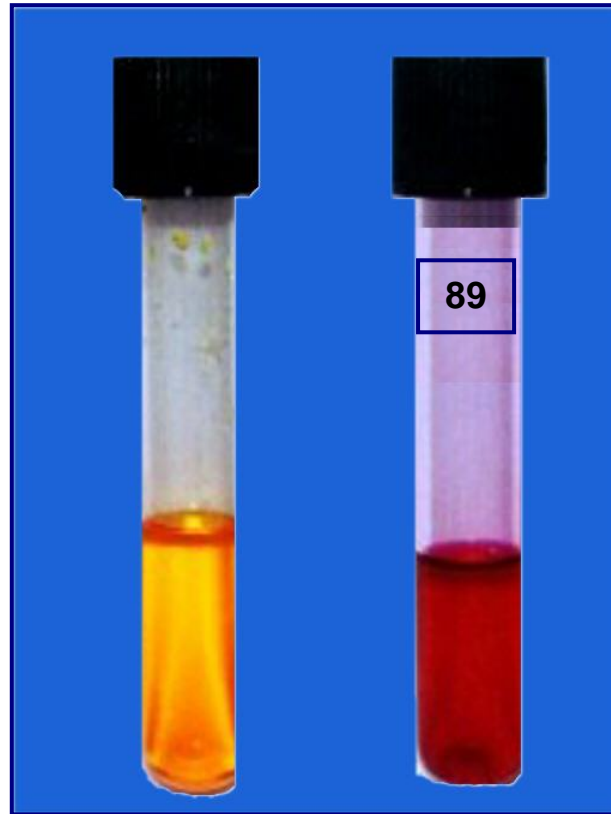


Figura 6. Teste rápido de urease. Teste positivo no animal 89, observado pela mudança da coloração alaranjada do meio de inoculação para coloração arroxeada.

4.5. Análise Estatística

O estudo do peso dos animais, considerando o total de caninos ou a distribuição por sexo, foi realizado por meio de medidas descritivas envolvendo posição e variabilidade.

Para o teste rápido da urease e para o estudo histopatológico com a coloração Giemsa nas três regiões gástricas e no duodeno, utilizou-se o limite de 95% de significância.

Os dados obtidos das reações sorológicas foram submetidos ao teste do Quiquadrado a 5% de probabilidade e teste exato de Fisher.

A análise descritiva das regiões gástricas (antro, corpo e fundo) e duodeno em relação à presença da bactéria, é descrita pela frequência absoluta e seu percentual, bem como pelo intervalo de confiança a 95% do percentual de positividade (limite inferior e superior).

Com relação à presença, concomitante ou não, de bactérias nas três regiões gástricas e duodeno, os resultados foram apresentados pela distribuição de frequência das ocorrências em zero, um, dois, três e quatro regiões concomitantemente.

Todos os procedimentos descritivos e de estimação utilizados no presente trabalho podem ser encontrados em Campana et al.(2001).

Resultados

A tabela 1 mostra a distribuição dos caninos segundo o sexo. Na tabela 2, estão as medidas descritivas do peso dos cães.

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa dos cães segundo sexo:

Sexo	Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)
Macho	49	44,95
Fêmea	60	55,05
Total	109	100,00

Tabela 2. Medidas descritivas para o peso (kg) de cães estudados segundo o sexo:

Descrição	Macho	Fêmea	Total.
Número	49	60	109
Peso			
Valor mínimo	6,0	6,0	6,0
Valor máximo	27,0	20,0	27,0
1°. Quartil	10,0	10,0	10,0
3°. Quartil	16,5	15,0	16,0
Mediana	12,0	13,0	13,0
Média e D.P.	13,3 ± 4,9	12,7 ± 3,9	13,0 ± 4,4

Estatística: $p < 0,05$

Nas tabelas 3 e 4, respectivamente, estão relacionados o número de animais, distribuídos pelo sexo, com resultado positivo para o teste rápido da urease e da detecção da bactéria pelo exame histopatológico, assim como a porcentagem correspondente ao número total dos animais utilizados.

Tabela 3. Distribuição dos animais pelo sexo, com resultado positivo para o teste rápido da urease, com a porcentagem correspondente ao total de animais utilizados.

Sexo	Animais positivos	Porcentagem	Animais utilizados
Macho	48	97,96	49
Fêmea	60	100,00	60
Total. geral	108	99,08	109

Tabela 4. Distribuição dos animais pelo sexo, com resultado positivo para a coloração pelo método Giemsa, com a porcentagem correspondente ao total de animais utilizados.

Sexo	Animais positivos	Porcentagem	Animais utilizados
Macho	48	97,96	49
Fêmea	60	100,00	60
Total geral	108	99,08	109

Na tabela 5 estão distribuídos os animais machos e fêmeas, com a porcentagem correspondente em cada sexo e em relação ao total de animais positivos para detecção do *Helicobacter pylori* pelo teste imunocromatográfico.

Tabela 5. Detecção do *Helicobacter pylori* pelo teste imunocromatográfico em cães machos e fêmeas, com a porcentagem correspondente em cada sexo ao total de animais.

Sexo	<i>H. pylori</i>	Porcentagem	Animais utilizados
Macho	42	85,71	49
Fêmea	44	73,33	60
Total geral.	86	78,89	109

$$\chi^2=2,48 ; 0,05 < p < 0,10$$

Na tabela 6, estão relacionadas as biopsias obtidas nas três regiões gástricas e duodeno, com resultado positivo ao exame histopatológico corado pelo Giemsa, porcentagem média obtida e limite mínimo e máximo da ocorrência em relação à totalidade das biopsias retiradas de cada uma das regiões.

Tabela 6. Frequência de amostras com coloração positiva pelo Giemsa em cada uma das regiões examinadas.

	Regiões			
	Antro (%)	Fundo (%)	Corpo (%)	Duodeno (%)
Amostras positivas	94	105	104	88
Porcentagem	86,23	96,33	95,41	80,73
Limites	$79,77 \leq \text{Pos} \leq 92,71$	$92,80 \leq \text{Pos} \leq 99,86$	$91,49 \leq \text{Pos} \leq 99,34$	$73,33 \leq \text{Pos} \leq 88,14$
Total das amostras	109	109	109	109

A tabela 7 refere-se à frequência de animais com coloração positiva pelo Giemsa, quando analisadas as quatro regiões simultaneamente.

Tabela 7. Frequência absoluta e relativa de animais com ocorrência de *Helicobacter spp* à coloração pelo Giemsa, quando analisadas as quatro regiões de obtenção das amostras simultaneamente.

Região	Frequência absoluta	Frequência relativa(%)
0	1	0,92
0 1	3	2,75
0 2	6	5,51
0 3	20	18,35
0 4	79	72,47
Total	109	100

DISCUSSÃO

1. Quanto à metodologia:

A. Animal de Experimentação

Os cães são amplamente utilizados nas investigações experimentais, principalmente naquelas relacionadas ao estudo da cicatrização intestinal, tanto para a experimentação de novas técnicas cirúrgicas, quanto para o treinamento técnico em suturas (Faria et al., 1969; Faria, 1972; Guimarães, 1972; Aprilli et al., 1975; Naresse, 1985).

Destaca-se o treinamento em cirurgias vasculares, pulmonares, urológicas, ósseas e em videocirurgias, principalmente naquelas relacionadas às ressecções do cólon. O cão, pela similaridade de seu estômago ao do ser humano e também, pelo seu porte, permite ainda o treinamento em endoscopia digestiva alta e baixa, utilizando-se endoscópio do mesmo diâmetro daqueles utilizados em seres humanos.

Além das características anteriores, a revisão da literatura mostrou a existência de bactérias espiraladas na intimidade da mucosa gástrica de cães, não correlacionadas com doenças digestivas nesse animal, podendo constituir-se em fonte de disseminação dessas bactérias.

Associa-se o fato de que, sendo o cão um animal dócil, há facilidade do seu manuseio na experimentação.

B. Anestesia

Utilizou-se o pentobarbital sódico a 3% como agente anestésico na dosagem de 30mg/kg de peso corporal, o que forneceu boa margem de segurança e tempo anestésico suficiente para a realização da experimentação. No Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, há longa experiência com o uso desse anestésico (Macedo,1972; Mendes, 1973; Saad, 1977; Lastória, 1978; Naresse, 1985).

Alia-se a isso o fato de ser um anestésico barato, de fácil preparo e conservação.

C. Detecção de *Helicobacter*

A pesquisa do *Helicobacter* pode ser realizada por diversos métodos, sendo que pelo menos dois deles devem ser utilizados para avaliar o resultado positivo (Van der Ende et al.,1997; Vaira et al., 2001). Dentre estes métodos, existem os realizados por técnicas invasivas e não invasivas.

Para a detecção do *Helicobacter* por técnicas não invasivas, o teste respiratório, pela ingestão de uréia com carbono marcado ou por detecção de antígenos da bactéria nas fezes do hospedeiro, pode ser utilizado (Li et al., 1996; Calvet et al., 1999; Chey et al., 1999; Neiger et al.,1999; Agha-Amiri et al., 1999; Trevisani et al., 1999; Vaira et al., 2001). Por outro lado, dentre as técnicas invasivas, destaca-se a endoscopia para a obtenção de biopsias gástricas e coleta de sangue para a detecção de antígenos circulantes (Strauss-Ayal.i et al.,1999; Strauss-Ayal.i 2001; Ladeira et al., 2002; Portorreal

& Kawakani, 2002). Na biopsia gástrica, facilmente obtida de pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta, vários métodos diagnósticos podem ser utilizados. Assim, destacam-se o teste rápido de urease, a cultura, o exame histológico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Eaton et al., 1996; Agha-Amiri et al., 1999; Cattoli et al., 1999; Doorn et al., 2000).

A cultura de microrganismos da mucosa gástrica de cães foi testada *in vitro*, com resultados pouco animadores (Henry et al., 1987; Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1996a; Elizalde et al., 1998; Jalava et al., 1998; Cattoli et al., 1999). A baixa positividade de culturas deve-se às características da bactéria, a qual necessita, para seu cultivo, da presença de meio constituído por Agar-sangue ou achocolatado, enriquecido com soro bovino fetal, possuindo alta umidade, microaerofilia (5% de CO₂, 90% N₂, 5% H₂) e suplementado com antibióticos (trimetropina, vancomicina, polimixina B e anfotericina B) por período de cinco a sete dias de incubação.

Esse método de obtenção de amostras gástricas pela via endoscópica constitui, na prática clínica, um dos mais utilizados para o diagnóstico da infecção por *Helicobacter*. O exame histológico convencional, com o método de coloração pela hematoxilina-eosina, permite identificar a bactéria quando a densidade de colonização é alta. Os métodos histoquímicos de impregnação pela prata (método de Warthin-Starry) ou de coloração pelo Giemsa permitem a identificação de bactérias quando a densidade de colonização é baixa (Misra et al., 1997; Morais et al., 1997; Lechago, 1999; Mendonça et al., 1999; Trouillet et al., 2000).

Como era desconhecida a densidade de bactérias nas amostras gástricas, foi utilizado o método histoquímico de Giemsa modificado para

avaliar a real incidência de cães acometidos, dada à possibilidade deste método em detectar pequena densidade de bactérias. Associa-se ao fato o seu baixo custo operacional e a grande experiência do examinador com essa técnica.

Por outro lado, o método de coloração empregado permite, além da detecção da bactéria, a possibilidade de identificar a espécie visualizada.

A utilização do teste da urease nas amostras gástricas deveu-se principalmente ao reduzido tempo de obtenção do resultado (1-12 horas), baixo custo operacional e alta sensibilidade do método (Marshal & Warren, 1983; Eaton et al., 1996; Castellote et al., 2001). Destaca-se, por outro lado, a impossibilidade em identificar a espécie, já que todas as espécies de *Helicobacter* que habitam o estômago produzem urease, apresentando portanto, a capacidade de degradar a uréia em amônia, com conseqüente mudança do pH da solução e mudança da tonalidade do meio de inoculação.

A introdução do teste sorológico, para avaliar a presença de *Helicobacter pylori*, foi relacionado às informações do fabricante, em que a reação positiva desse teste correlaciona-se com a presença de *H.pylori* no estômago, com sensibilidade de 92% e especificidade de 96,6%. A reação positiva para *H.pylori* no teste sorológico era considerada quando do aparecimento de faixa rósea nas áreas C e T do dispositivo (Fig. 7) e reação negativa quando apenas a faixa rósea era presente na faixa C (Fig. 8), à semelhança do ocorrido quando da utilização das soluções controle positiva e negativa que acompanham o kit sorológico. A eventual ocorrência de não aparecimento da faixa rósea na área C de algum dispositivo

imunocromatográfico indicaria um teste inválido, devendo o mesmo ser repetido, mas esta eventualidade citada pelo fabricante não ocorreu.

Os testes sorológicos impossibilitam, por outro lado, a distinção entre infecção pelo *H. pylori* atual ou no passado (Doorn et al., 2000), além da possibilidade de reação cruzada. Nesse aspecto, conforme também citado pelo fabricante, o *kit* utilizado foi submetido à reatividade cruzada com antígenos de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli* e de *Escherichia coli*, captando apenas antígenos do *H.pylori*.

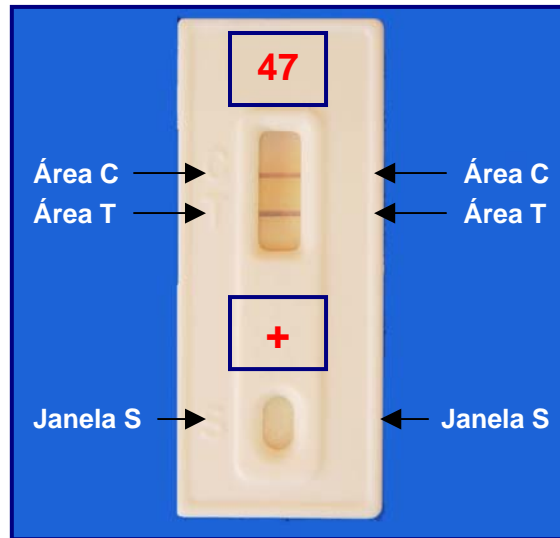


Figura 7. Dispositivo imunocromatográfico com reação positiva para anticorpos anti-*H. pylori* no canino 47. Observa-se a faixa rósea nas áreas C e T do dispositivo.

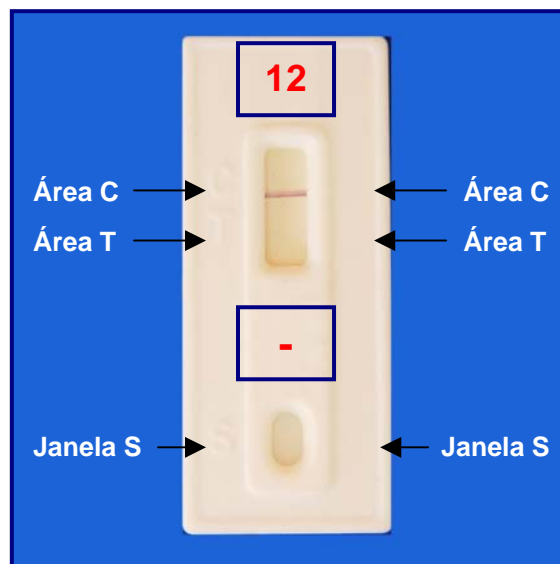


Figura 8. Dispositivo imunocromatográfico com reação negativa para anticorpos anti-*H. pylori* no canino 12. Observa-se faixa rósea somente na área C.

2. Quanto aos resultados

A amostra de cães utilizada no presente estudo, composta de 49 machos e 60 fêmeas, quando submetida à análise estatística, mostrou não haver diferença significativa em relação ao sexo. Do mesmo modo, o peso dos animais, comparando-se machos e fêmeas, não mostrou diferença estatisticamente significativa. Trata-se, portanto, de amostra homogênea.

Utilizando-se dos resultados referentes ao exame histopatológico das biopsias gástricas coradas pelo Giemsa, observa-se a presença da bactéria em 108 animais (99,08%). Desses animais, o resultado positivo ocorreu, respectivamente, em 86,23%, 96,33%, 95,41% e 80,73% nas regiões do antro, fundo gástrico, corpo gástrico e duodeno. A análise mostrou também, maior ocorrência da bactéria no fundo e corpo gástricos, com valores entre 92,8 a 99,86% no fundo gástrico e de 91,49 a 99,34% no corpo gástrico. Ressalta-se que em apenas um dos animais (0,92%), o resultado positivo não ocorreu em nenhuma das quatro regiões examinadas. As bactérias encontravam-se nas criptas foveolares, em grupos, não invadindo as células. No maior aumento, mostravam-se alongadas e espiraladas, tipo “saca-rolhas” (Fig. 9).

Estes resultados obtidos, coincidem com os relatados na literatura, em que a colonização de cães pela *helicobacteriose* varia de 67 a 100% dos animais, independente do estado clínico dos mesmos (Lecoindre et al., 1995; Hermans et al., 1995; Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1996b, Happonen et al., 1998; Catolli et al., 1999; Mendes et al., 1999; Neiger & Simpson, 2000; Hwang et al., 2002).

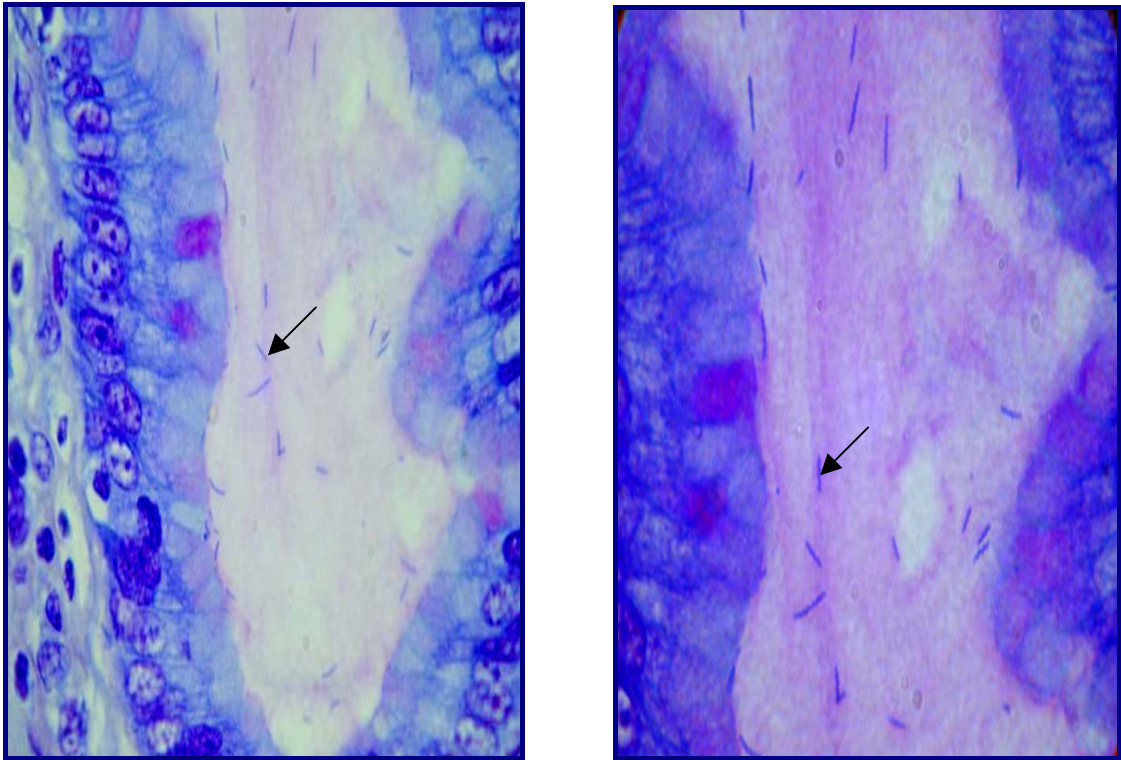


Figura 9. Bactérias alongadas e espiraladas, tipo “saca-rolhas”, nas criptas foveolares (Giemsa – aumento 1000X).

Utilizando o teste sorológico para detecção do *H. pylori*, observou-se que 78,9% da totalidade dos animais apresentavam a bactéria. Assim, pelos resultados apresentados, pode-se inferir que os cães provenientes do Biotério Central e utilizados em pesquisas experimentais seriam naturalmente infectados pelo *H. pylori*. Esses resultados encontrados, portanto, seriam contrários aos relatados na literatura, em que colonização pela espécie *H. pylori* somente pôde ser documentada por indução e nunca visualizados em cães naturalmente colonizados (Radin et al., 1990; Rossi et al., 1999).

Os animais utilizados na presente investigação, provenientes do Biotério Central, eram errantes, desconhecendo-se portanto seus hábitos alimentares. É provável que sua alimentação, até a chegada ao Biotério, fosse constituída por alimentos deteriorados na maioria das vezes e de terem convivido em zonas de baixo padrão socioeconômico. Essas condições podem favorecer a seletividade da espécie *H. pylori* nos animais, visto que, em seres humanos, já foi observado que as camadas da população de baixo poder aquisitivo estão relacionadas a uma maior incidência de *Helicobacter pylori* (Souto et al., 1998; Mckeown et al., 1999).

Apesar da colonização espontânea de cães com *H. pylori* nunca ter sido documentada, é referida a possibilidade de transmissão da espécie *pylori* de cães induzidos à infecção para outros animais não induzidos, por meio do contato (Radin et al., 1990; Rossi et al., 1999). Por outro lado, *H. felis* e *H. salomonis* foram propagados da mãe à prole, durante o período de lactação, pelo hábito da higiene oral da mãe com os filhotes ou pela ingestão acidental pelos filhotes de restos alimentares vomitados pela mãe (Hänninen et al., 1998).

A colonização dos animais do Biotério Central poderia ter sido verificada a partir de apenas um animal infectado. É provável que essa hipótese não seja a mais correta, dado o montante de cães utilizado no presente estudo não ter dado entrada ao Biotério no mesmo dia, aliado a reposições periódicas pelo Biotério assim como protocolo para cães adotado pelo Biotério Central, com liberação dos animais para pesquisa situado em aproximadamente trinta e cinco dias de sua chegada ao Biotério.

Os testes sorológicos para detecção do *Helicobacter*, somente fornecem evidências indiretas da infecção, não podendo discriminar entre infecções atuais ou pregressas (Doorn et al., 2000). No entanto, a realização de duas titulações, em períodos diferentes e com resultados diferentes, permite concluir acerca do sucesso de uma terapêutica específica instituída (Figueroa et al., 2000). Assim, o procedimento acima realizado em intervalo de seis meses, em que a segunda titulação mostrou redução em 30% ou mais da titulação inicial, foi compatível com a erradicação da bactéria do sítio primário, com 90,5% de sensibilidade e 100% de especificidade, tanto para anticorpos IgG quanto anticorpos IgA (Kato et al., 1999). Pode, portanto, ocorrer sorologia positiva na ausência de *Helicobacter*, observada por colorações específicas e pelo teste da urease.

Entretanto, os animais deste estudo apresentaram resultados positivos dos testes de urease e da coloração pelo Giemsa em praticamente 100% dos animais, sendo a espécie *H. pylori* diagnosticada em 78,9% dos animais. Assim, é possível admitir que esses animais já estivessem infectados pela espécie *H. pylori* no momento de sua captura, considerando-se o conjunto dos dados.

Os resultados anteriores obtidos levam à conclusão de que os cães provenientes do Biotério Central e utilizados em pesquisas experimentais são colonizados por *Helicobacter sp* em 99,02% da amostragem, tendo a espécie *H. pylori* como o agente em 78,9% , caracterizando uma zoonose.

Por outro lado, a forma espiralada, alongada e em “saca-rolha” da bactéria visualizada, à microscopia, na maioria das amostras, não é compatível com o diagnóstico da espécie *H. pylori* diagnosticada pelo teste sorológico, levando a inferência da possibilidade de espécie diferente apresentando reação cruzada a antígenos que possam ser comuns à espécie *H. pylori* e à outra espécie, ou na hipótese de os cães apresentarem outra forma de espécie *pylori*.

Nesse aspecto, a análise da espécie de *Helicobacter* associada à linfoma MALT em cinco pacientes humanos pelo teste sorológico mostrou tratar-se de *Helicobacter pylori*, mas a análise do RNA confirmou tratar-se de *Helicobacter heilmannii* nesses pacientes (Morgner et al., 2000a). Por outro lado, poderia ainda constituir-se em infecção mista pelas duas espécies. A análise por *Western blot* (que identifica resposta imune aos antígenos especificamente conhecidos do *H. Pylori* como Cag A e antígenos como 50, 33, 25 e 19 kilodalton) foram negativos em todos os pacientes, comprovando tratar-se de linfoma MALT realmente associado ao *H. heilmannii*. Em contra-prova resposta imune antígeno-específica em pacientes infectados por *H. heilmannii* e paciente-controle infectados por *H. pylori* ocorreu com IgA da subunidade B (62 kilodaltons), sendo esta conhecida e presente no *H. heilmannii*.

Assim, a possibilidade de reação cruzada entre as espécies *H. heilmannii* e *H. pylori* pode ter ocorrido nos animais por nós utilizados neste

estudo, já que o *kit One Step Teste* captura anticorpos do tipo IgA, podendo estes pertencer à subunidade B (62 kilodal.tons), responsável pela reação cruzada.

Sendo o cão o hospedeiro primário da espécie *H. heilmannii* e pelos resultados aqui encontrados, principalmente as características morfológicas da bactéria, é pouco provável tratar-se de outra espécie que não o *H. heilmannii* como agente da colonização gástrica nesses animais. No entanto, esses animais podem constituir-se em fonte de transmissão dessa espécie para o ser humano, por meio de contacto, como já verificado (Mention et al., 1999). E no ser humano a infecção foi associada a quadros clínicos definidos, como gastrite (Svec et al., 2000) e linfoma MALT, sendo que nesta associação, a ocorrência do linfoma foi maior do que a identificada quando da associação *Helicobacter pylori* e linfoma (Morgner et al., 2000b).

Assim, o encontro de alta porcentagem de resultados positivos para *Helicobacter pylori* na casuística pela sorologia positiva desta pesquisa pode ser decorrente de reação cruzada a antígenos de *H. heilmannii* dada as características histológicas desta bactéria. Por outro lado, os cães provenientes do Biotério Central e utilizados em pesquisas experimentais, constituem foco importante dessa *helicobacteriose*, e dada a possibilidade de transmissão ao pesquisador e à equipe em geral, pode-se apontá-la como zoonose.

A necessidade da confirmação precisa da etiologia da *helicobacteriose* identificada no presente estudo remete a um possível aprofundamento da pesquisa para tentar comprovar se há identidade ou não entre a *helicobacteriose* encontrada no seres humanos e nos cães. Nesse sentido, testes específicos e mais acessíveis dos que os atualmente em uso

podem ser desenvolvidos para a verificação da espécie de *H. helicobacter* envolvido tanto em caninos quanto em seres humanos, e ensaios preliminares já se encontram em estudo para essa proposta.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, utilizando a metodologia já descrita, conclui-se:

1º) Cães oriundos do Biotério Central apresentam alta incidência de helicobacteriose.

2º) A helicobacteriose encontrada pode ser apontada como uma zoonose, devendo ter asseguradas medidas de proteção à equipe.

3º) O padrão morfológico em espiral da bactéria é compatível com a espécie *H. heilmannii*.

4º) O *kit* comercial. *H. Pylori One Step teste* utilizado não é específico para detectar a espécie *H. pylori*.

5º) Nos caninos pesquisados, não foram encontrados pela microscopia de imersão, morfologia compatível com a espécie *H. pylori*.

RESUMO

O presente trabalho foi delineado para investigar a frequência de infecção pelo *Helicobacter* em cães oriundos do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu - e a incidência da espécie *Helicobacter pylori*(Hp) nos animais.

Os animais utilizados foram capturados em várias cidades, desconhecendo-se seus hábitos alimentares até a captura, mas é provável que foram pertencentes ou conviveram com pessoas de classe sócio-econômica de baixo poder aquisitivo, onde a incidência de Hp em seres humanos é mais elevada.

Foram utilizados os métodos de teste rápido da urease, teste imunocromatográfico (*kit H. pylori one step teste*) e o método histoquímico de coloração pelo Giemsa.

A coleta de material foi feita em 109 caninos sem raça definida, sendo 49 machos e 60 fêmeas. O sangue foi retirado da veia jugular e as amostras gástricas e duodenais foram obtidas por endoscopia (61/109) e pela técnica aberta (48/109).

As análises, pelo teste rápido da urease e coloração pelo Giemsa, mostraram que, em 97,96% dos machos (48/49) e em 100% das fêmeas (60/60), foi detectada reação positiva para *Helicobacter*, sendo 99,08% (108/109) na totalidade dos animais. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas entre os dois sexos.

A análise pelo *Kit H. pylori one step teste*, que detecta antígenos específicos do *H. pylori*, foi positivo em 78,89% dos animais, não apresentando

diferença significativa entre os sexos, com uma taxa de 85,71% (42/49) nos machos e de 73,33% (44/60) nas fêmeas.

No entanto, a análise morfológica mostrou tratar-se de bactérias espiraladas, alongadas, em “saca-rolhas”, na maioria das amostras, compatíveis com a espécie *Helicobacter heilmannii*(Hh) e não com a espécie Hp, como o apontado pelo teste imunocromatográfico. A reação cruzada das espécies Hh e Hp é relatada na literatura, o que provavelmente ocorreu com a utilização desse kit.

Assim, pode-se concluir que os cães oriundos do Biotério central e utilizados em pesquisas experimentais apresentam alta prevalência de *Helicobacter*, sendo que o kit *H. pylori one step* teste não se constitui em método fidedigno para afirmar o diagnóstico da espécie *Helicobacter pylori* nos animais. É provável tratar-se da espécie *Helicobacter heilmannii*, como verificado ao exame histológico com coloração pelo Giemsa.

A necessidade de testes mais acessíveis e fidedignos para o real diagnóstico das espécies de *Helicobacter* em caninos e no homem constitui-se um objetivo a ser alcançado.

ABSTRACT

The present work was delineated to investigate the infection frequency for *Helicobacter* in dogs originating from Central Animal House of UNESP - Campus of Botucatu - and the incidence of the species *pylori* in the animals.

The used animals were captured in several towns, being ignored their alimentary habits until the capture, but it is probable that they belonged or they lived together with people of socioeconomic class of low purchasing power, where the incidence of *H. pylori* in humans is higher.

The methods used were of fast urease test, immunocromatograph test (kit *H. pylori* one step test) and histochemical coloration method for Giemsa.

The material collection was made in 109 mongrel dogs, being 49 males and 60 females. The blood was removed of the jugular vein and the gastric and duodenal samples were obtained by endoscopy (61/109) and by the open technique (48/109).

The analyses for the fast test of the urease and coloration for Giemsa showed that, in 97,96% of the males (48/49) and in 100% of the females (60/60), positive reaction was detected for *Helicobacter*, being 99,08% (108/109) in the totality of the animals. No statistically significant alterations significant were observed between the two sexes.

The analysis for the Kit *H. pylori* one step test, that detects specific antigens of the *H. pylori*, was positive in 78,89% of the animals, not presenting

significant difference between the sexes, with a rate of 85,71% (42/49) in the males and of 73,33% (44/60) in the females.

However, the morphologic analysis showed spiraled bacteria, prolonged, in "corkscrew", in most of the samples, compatible with the species *H. heilmannii* and not with the species *H. pylori*, as pointed in the immunocromatograph test. The crossed reaction of the species *heilmannii* and *pylori* is pointed in the literature, what probably happened with the use of that kit.

Like this, we ended that dogs originating from Central Animal House and used in experimental researches present high prevalence of *Helicobacter* and the kit *H. pylori* one step test is not a trustworthy method to affirm the diagnosis of the species *H. pylori* in the animals. Probably it is the species *H. heilmannii*, as verified in the histological exam with Giemsa coloration.

The need of more accessible and trustworthy tests for the real diagnosis of the species *Helicobacter* in dogs and in humans is an objective to be reached.

REFERÊNCIAS *

Agha-Amiri K, Mainz D, Peitz U, Kahl S, Leodolter A, Malfertheiner P. Evaluation of an enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* antigens in human stool samples. *Z Gastroenterol* 1999 37:1145-1149.

Aprilli F, Carril CF, Guimarães AS, Ferreira AL. Estudo comparativo da segurança de três tipos de anastomoses intestinais. Trabalho experimental no intestino delgado do canino. *Rev Assoc Med Bras* 1975; 21:307-8.

Asaka M, Kimura T, Kudo M, Takeda H, Mitani S, Miyazaki T et al. Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology* 1992;102:760-6.

Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Sage PB, Balabaud C et al. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Am Cancer Soc* 2000;89:1431-9.

Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990;161:626-33.

Cales V, Pariente A, Benazzouz P, Berthelemy P, Etcharry F. *Helicobacter heilmannii* ulceronecrotic acute gastritis: five cases reports. *Ann Pathol* 2000; 20:612-5.

Calvet X, Feu F, Forne M, Montserrat A, Elizalde JI, Viver JM et al. The evaluation of a new immunoenzyme analysis for the detection of *Helicobacter pylori* infection in stool samples. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22:270-2.

* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *Ann Inter Méd* 1997;126:36-47. BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996.468p.

Campana AO, Padovani CR, Timo-Iaria C, Freitas CBD, Paiva SAR, Hossne WS. *Investigação científica na área médica*. São Paulo: Manole;2001.

Castellote J, Guardiola J, Porta F, Falco A. Rapid uréase test: Effect of preimmersion of biopsy forceps in formalin. *Gastrointest Endosc* 2001;53:744-6.

Castro LP, Coelho LGV, Barbosa AJA, Viera WLS. *Helicobacter pylori* e afecções associadas. *J bras gastroenterol* 2003;3:19-30.

Cattoli G., Zaroni R, Della Sal.da L, Serraino A, Sanguinetti V. Isolation of *Helicobacter felis* from dogs in Italy. In: Newell DG,(ed.) *Campylobacters, Helicobacters and related organisms*. New York: Plenum Press; 1996.p341-2.

Cattoli G, Van Vugt R, Zaroni RG, Sanguinetti V, Chiocchetti R, Gualtieri M. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. *Vet Microbiol* 1999;70:239-50.

Chey WD, Murthy FACGU Toskes P, Carpenter S, Laine L. The ¹³C-Urea blood test accurately detects active *Helicobacter pylori* infection: a United States, Multicenter Trial. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1522-24.

Coelho LGV, Passos MCF, Chausson Y, Castro FJ, Vieira WLS, Franco JMM, et al. Factors involved in reinfection by *H. pylori* in Brazil. *Gut* 1995; 37(suppl 1):71.

Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. *ASM News* 1995;61:21-5.

Danesh J, Youngman L, Clark S, Parish S, Peto R, Collins R. *Helicobacter pylori* infection and early onset myocardial infarctin: case-control and sibling pairs study. *Br Med J* 1999;30:1157-62.

Dooley CP. Background and historical considerations of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22:1-4.

Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, Vreede R, Hernink P, Ponjee G et al. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes. *J Clin Microbiol* 2000; 38:13-7.

Eaton KA, Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman BE, Paola J. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *J Clin Microbiol* 1996;34:3165-70.

Elizalde JI, Gómez J, Gines A. Biopsy forceps disinfection technique does not influence *Helicobacter pylori* culture. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1450-2.

Faria PAJ. Sutura gastrointestinal em plano único extra-mucoso e em dois planos, um total e um seromuscular invaginante: estudo experimental no canino. [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1972.

Faria PAJ, Pasqualucci, MEA, Medeiros RR, Mantovani M, Vieira RW. Estudo comparative de materiais de sutura em estômago de cães com técnica de síntese extramucosa. *Rev Assoc Med Bras* 1969;15:3-10.

Figuroa G, Troncoso M, Toledo MS, Acuna R. Application of serology to confirm the eradication of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer patients. *Rev Med Chil* 2000;128:1119-26.

Foschini MP, Pierri F, Cerasoli S, Accardo P, Formica G, Biasiucci A et al. *Helicobacter heilmannii*: anatomo-clinical study of 14 new cases. *Pathologica* 1999;91:18-24.

Gasbarrini A, Franceschi F. Autoimmune diseases and *Helicobacter pylori* infection. *Biomed Pharmacother* 1999;53:223-6.

Graham DY, Adam E, Reddy GT, Agarwal JP, Agarwal R, Evans DJ Jr, et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries *Dig Dis Sci* 1991;36:1084-8.

Guimarães AS. Estudo comparativo da rede vascular sanguínea e da cicatrização em anastomoses intestinais em 1 e 2 planos de sutura: trabalho experimental no intestino delgado do canino. [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;1972.

Hänninen ML, Happonen I, Jalava K. Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. *Vet Microbiol* 1998;62:47-58.

Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hanninen ML, Westermarck E. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organism in dogs and cats. *J Comp Pathol* 1996a;115:117-27.

Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hanninen ML, Westermarck E. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. *J Vet Med Ser A* 1996b;43:305-15.

Happonen I, Linden J, Saari S, Karjalainen M, Häanninen ML, Jalava K. Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213:1767-74.

Happonen I, Linden J, Westermarck E. Effect of triple therapy on eradication of canine gastric *Helicobacters* and gastric disease. *J Small Anim Pract* 2000;41:1-6.

Haziroglu R, Diker KS, Guvenc T, Kul O. Canine gastritis associated with *Helicobacter felis*. *Dtsch Turaerztl Wochenschr* 1995; 102:474-6.

Henry GA, Long PH, Burns JL, Charbonneau DL. Gastric spirillosis in beagles. *Am J Vet. Res* 1987;48:831-6.

Hermanns W, Kregel K, Breuer W, Lenchner J. Helicobacter-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J Comp Pathol* 1995;112:307-18.

Honsova E, Kralova Z, Julisova I, Trukova M, Julis I, Truka V . Helicobacter heilmannii, a spiral bacterium, in gastric mucosa biopsies. *Cesk Patol* 1999; 35:140-3.

Hwang CY, Han HR, Youn HY. Prevalence and clinical characterization of gastric helicobacter species infection of dogs and cats in Korea. *J Vet Sci* 2002;3:123-34.

Jalava K, Kaartinen M, Utriainen M, Happonen I, Hänninen ML. Helicobacter salomonis sp.nov., a canine gastric helicobacter sp. related to Helicobacter felis and Helicobacter bizzozeronii. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:975-82.

Jalava K, Stephen I, On W, , Vandamme PAR, Happonen I, Sukura A, Hänninen ML. Isolation and Identification of Helicobacter spp. from canine and feline gastric mucosa. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3998-4006.

Jalava K, On SL, Harrington CS, Andersen LP, Hänninen ML, Vandamme P. A cultured strain of “ Helicobacter heilmannii “ a human gastric pathogen, identified as H. bizzozeronii: Evidence for zoonotic potential. of Helicobacter. *Emerg Infect Dis* 2001;7:1036-8.

Kato S, Furuyama N, Ozawa K, Ohnuma K, Linuma K. Long-term follow-up study of serum immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies after Helicoabcter pylori eradicaton. *Pediatrics* 1999;104: 22.

Langenberg W, Rauws EA, Oudbier JH, Tytgat GNT. Patient-to-patient transmission of Campylobacter pylori infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. *J Infect Dis* 1990;161:507-11.

Ladeira MSP, Rodrigues MAM, Savadori DMF, Padulla NP, Achilles P, Lerço MM, et al.. Relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* for induction of DNA damage. 2002.

Lastória, S. Modelo experimental de trombose arterial no canino; ação da botropase, dipiridamol, heparina e dextran como tratamento coadjuvante na prevenção da retrombose, após trombectomia. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista ;1978.

Lechago J. Classificación de lãs gastritis crônicas:después de Houston 94. In: Anais do 23^o Congresso Brasileiro de Patologia;1999 Jun 02-06;Curitiba.

Lecoindre P, Chevallier M, Peyrol S, Boude M, Montclos H. Contribution à l'étude des hélicobactéries de l'estomac du chien et de leur role pathogène. Rev Méd Vet 1995;146:671-80.

Lee A, Krawowka S, Fox JG, Otto G, Eaton KA, Murphy JC. Role of *helicobacter felis* in chronic canine gastritis. Vet Pathol 1992;29:487-94.

Li C, Ha T, Ferguson Jr DA, Chi DS, Zhao R, Patel NR et al. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. Dig Dis Sci 1996;41:2142-9.

Macedo AR. Arteriografia seletiva do tronco celíaco e esplenoportografia no traumatismo hepático: estudo experimental no canino. [tese]. Botucatu: Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, Universidade Estadual Paulista;1972.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli of gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;1:1273-5.

McKeown I, Orr P, Macdonald S, Kabani A, Brown R, Cochlan G et al. Helicobacter pylori in the Canadian arctic: seroprevalence and detection in community water samples. Am J Gastroenterol 1999;94:1823-9.

Megraud F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Gastroenterol Clin North Am 1993;22:73-88.

Meining A, Kroher G, Stolte M. Animal reservoirs in the transmission of Helicobacter heilmannii. Results of a questionnaire-based study. Scand J Gastroenterol 1998;33:795-808.

Mendes EF. Trauma pancreático – Arteriografia seletiva do tronco celíaco e da mesentérica cranial. Arteriografia pós-morte e estudo experimental no canino. [tese]. Botucatu:Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, Universidade Estadual Paulista;1973.

Mendes EN, Collares GB, Gonçalves HL, Queiroz DMM, Rocha GA, Mesquita Filho PR. Pesquisa de Helicobacter na mucosa gástrica de animais domésticos. In:Resumos do 20º congresso Brasileiro de Microbiologia;1999, Salvador.

Mendonça ALC, Meneses ACO, Chapadeiro E. Sensibilidade e especificidade de alterações histológicas da mucosa gástrica antral para o diagnóstico do helicobacter pylori. J Bras Patol 1999;35:125-32.

Mention K, Laurent M, Guimber D, De Lasalle EM, Vincent P, Turck D et al. Characteristics and prevalence of helicobacter heilmannii infection in children undergoing upper gastrointestinal endoscopy. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999;29:533-53.

Misra SP, Misra V, Dwivedi M, Premala AS, Gupta SC. Diagnosing Helicobacter pylori by imprint cytology: can the same biopsy specimen be used for histology? Diagn Cytopathol 1997;18:330-2.

Morais M, Macedo EP, Silva Jr MR, Rohr MR, Ferraz ML, Castro RR. Comparison between invasive tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *Arq Gastroenterol* 1997;34:207-11.

Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K et al. *Helicobacter heilmannii*- associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 2000a;118:821-8.

Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M. Malignant tumors of the stomach. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000b; 29:593-607.

Naresse LE. Estudo comparativo da cicatrização de anastomoses em plano único e em dois planos, no intestino delgado do canino. [dissertação]. Botucatu:Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1985.

Neiger R, Seiler G, Schmassamnn A. Use of a urea breath test to evaluate short-term treatments for cats naturally infected with *Helicobacter heilmannii*. *Am J Vet Res* 1999;60:880-3.

Neiger R, Simpson KW. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *J Vet Intern. Med* 2000;14:125-33.

Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadström T. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial. DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:1072-6.

Peyrol S, Lecoindre P, Berger I, Deleforge J, Chevallier M. Differential pathogenic effect of two *Helicobacter*-like organisms in dog gastric mucosa. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1998;30:425-33.

Portorreal. A, Kawakami E. Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes. *Arq Gastroenterol* 2002;39:198-203.

Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira AMR, Oliveira CA, Magalhães PP et al. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer* 1998;78:135-9.

Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G et al. *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect Immun* 1990;58:2606-12.

Rappin J. Contribution à L'étude des bactéries de la bouche à l'étude des bactéries de la bouche à l'état normal. In: Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP, editors. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 6th ed. p 217. Baltimore:Willians and Wilkins;1881 apud Hermanns W, Kregel K, Breuer W, Lenchner J. *Helicobacter*-like organisms: Histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J Comp Pathol* 1995;112:307-18.

Rodrigues MAM, Câmara ACB, Figueiredo AAO, Frederique JU. Gastrite crônica associada a infecção pelo "*Gastrospirillum hominis*". *Gastroenterol Endoscop Dig* 1996;15:141-3.

Rossi G, Rossi M, Vitali CG, Fortuna D, Burroni D, Pancotto L et al. A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1999;67:3112-20.

Saad R. Isquemia experimental do pancreas no canino – Avaliação. Métodos da fluoresceína "in vivo" – angiográfico pós-morte, alterações bioquímicas, histopatológicas e ultraestruturais. [tese] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista ;1977.

Salomon H. Ueber das *Spirillum* des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskrankh* 1896;19:433-

42 apud Happonen I , Linden J, Saari S, Karjalainen M, Hanninen ML, Jalava K. Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213:1767-74.

Souto FJD, Fontes CJF, Rocha GA, Oliveira AMR., Mendes EN, Queiroz DMMQ. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in a rural area of the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:171-4.

Simpson KW , Strauss-Ayali D, McDonough PL, Chang YF, Valentine BA. Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. Infection. *J Vet Intern Med* 1999a; 13:507-15.

Simpson KW, McDounough PL, Strauss-Ayali, Chang YF, Harpending P, Valentine BA. *Helicobacter felis* infection in dogs: Effect on gastric structure and function. *Vet Pathol* 1999b;36:237-48.

Simpson KW, Neiger R, DeNovo R, Sherding R. The relationship of *Helicobacter* spp. Infection to gastric disease in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2000;14:223-7.

Strauss-Ayali D, Simpson KW., Schein AH, McDonough PL, Jacobson RH, Valentine BA, et al. Serological. discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* spp. And uninfected dogs. *J Clin Microbiol* 1999;37:1280-7.

Strauss-Ayali D, Scanziani E, Deng D, Simpson KW. *Helicobacter* spp. infection in cats: evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric *Helicobacter* spp. *Vet Microbiol* 2001;79:253-65.

Svec A, Kordas P, Pavlis Z, Novotny J. High prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated gastritis in a sma.l predominantly rural área: further evidence in support of a zoonosis? *Scand J Gastroenterol* 2000;35:925-8.

Trevisani L, Sartori S, Galvani F, Rossi MR, Ruina M, Chiamenti C et al. Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in feces: a prospective pilot study. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1830-3.

Trouillet AVP, Santos AE, Gondin FS, Losso RR. *Helicobacter* sp e seus métodos diagnósticos em gatos. In: Anais do 2º. Congresso Internacional. de Medicina Felina; 2001 Jun 14-17;Rio de Janeiro.2002. p13-4.

Vaira U, Gatta L, Ricci C, D'Anna L, Iglioli MM. *Helicobacter pylori*: diseases, tests and treatment. *Dig Liver Dis* 2001;33:788-94.

Valle C, Bizinelli SL. Prevalência do *Helicobacter pylori* em pacientes submetidos a endoscopia digestiva alta. *Rev Med Paraná* 1993;50:17-20.

Van der Ende A, van der Hulst RW, Dankert J, Tytgat GN. Reinfection versus recrudescence in *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:55-61.

Weber AF, Sasa AF, Sautter JH. Some observations concerning the presence of spirilla in the fundic glands of dogs and cats. *Am J Vet Res* 1958;19:677-80.

Weir SC, Gibert CL, Gordin FM, Fischer SH, Gill VJ. An uncommon *Helicobacter* isolate from blood: evidence of a group of *Helicobacter* spp. pathogenic in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1999;37: 2729-33.

Williams CL. *Helicobacter pylori* and endoscopy. *J Hosp Infect* 1999;41:263-8.

Yamamoto T, Matsumoto J, Shiota K, Kitajima S, Goto M, Imaizumi M et al. *Helicobacter heilmannii* associated erosive gastritis. *Intern Med* 1999;38:240-3.
