DÉBORA CRISTINA ROMERO

Estudo da helicobacteriose em cães e gatos: determinação da frequência de ocorrência na mucosa gástrica de animais necropsiados e comparação entre métodos de diagnóstico

São Paulo

2013

DÉBORA CRISTINA ROMERO

Estudo da helicobacteriose em cães e gatos: determinação da frequência de ocorrência na mucosa gástrica de animais necropsiados e comparação entre métodos de diagnóstico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Lilian Rose Marques de Sá

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2914
FMVZ

Romero, Débora Cristina

Estudo da helicobacteriose em cães e gatos: determinação da frequência de ocorrência na mucosa gástrica de animais necropsiados e comparação entre métodos de diagnóstico / Débora Cristina Romero. -- 2013.
99 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá.

1. *Helicobacter* spp. 2. Cães. 3. Gatos. 4. Métodos de diagnóstico. 5. Comparação. 6. Gastrite.
I. Título.

PARECER DA COMISSÃO BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo da helicobacteriose em amostras gástricas de cães e gatos: avaliação da resposta inflamatória, identificação das espécies e comparação entre os métodos de diagnóstico”, protocolado sob o nº 2348/2011, utilizando 80 (oitenta) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research “Study of helicobacteriose in gastric samples from dogs and cats: evaluation of inflammatory response, species identification and comparison of diagnostic methods”, protocol number 2348/2011, utilizing 80 (eighty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Nome: ROMERO, Débora Cristina

Estudo da helicobacteriose em cães e gatos: determinação da frequência de ocorrência na mucosa gástrica de animais necropsiados e comparação entre métodos de diagnóstico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de qualquer forma me ajudaram e motivaram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

A Prof^a Lilian Rose Marques de Sá, orientadora desta tese, por me ter integrado na sua equipe, pela disponibilidade e confiança que sempre demonstrou todo o apoio e ensinamentos que me transmitiu ao longo destes anos, bem como toda a paciência para me esclarecer e motivar.

Ao Departamento de Patologia pelo apoio e espaço concedido para realização deste projeto, aos funcionários da instituição, aos profissionais do laboratório de histopatologia (Cláudio Arroyo e Luciano A. Bugalho), aos técnicos da necropsia (Olivia, Raimundo N. Maciel e Edson Luiz de Souza), às secretárias da patologia (Cláudia Lima, Adriana S. Margarido e Milena F. de Oliveira).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado para minha manutenção e despesas com a própria teste durante o período.

À PROAP (Programa de Apoio à Pós-Graduação) pela concessão de auxílio técnico à pesquisa que possibilitou a compra do anticorpo anti-*H.pylori* realização deste trabalho.

À todas as bibliotecárias da FMVZ-USP, em especial a senhora Elza Faquim.

Ao aluno de iniciação científica Leandro Haroutune Hassesian Galati e a minha amiga Aline Nardi pela ajuda nas aquisições dos prontuários e tabulações de dados para este teste.

À aluna Sofia pela ajuda nos procedimentos de imuno- histoquímica e confecção de lâminas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Gastroenterologia e Patologia Ambiental pelo convívio, conversas e boas risadas: Thiago, Alex, Maria Eugenia, Dennis, Livia.

Aos meus queridos pais, Luiz Paulo e Maria Conceição, por todo o incentivo carinho.

Ao meu noivo e futuro marido Rafael Bellucci pelo carinho, compreensão, solicitude, incentivo e essencial ajuda com transporte de amostras para confecção das lâminas deste projeto.

RESUMO

ROMERO, D. C. **Estudo da helicobacteriose em cães e gatos:** determinação da frequência de ocorrência na mucosa gástrica de animais necropsiados e comparação entre métodos de diagnóstico. [Study helicobacteriosis in dogs and cats: determining the frequency of occurrence in the gastric mucosa of animals necropsied and comparison of diagnostic methods]. 2014.99 f.Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Helicobacter spp é uma bactéria espiralada gram negativa que pode fazer parte da microbiota gástrica de cães e gatos domésticos, e sua associação com as gastropatias ainda é amplamente discutida na Medicina Veterinária. O objetivo do estudo foi avaliar a frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica em cães e gatos necropsiados no HOVET-USP e comparar quatro métodos de diagnóstico para a identificação do agente. Fragmentos da mucosa gástrica foram destinados ao TRU, citologia, histopatologia por hematoxilina e eosina (HE) com coloração de Warthin Starry (WS) e imuno-histoquímica (IHQ). Para a análise comparativa, de concordância e de desempenho dos testes, entre os métodos de diagnóstico com o padrão ouro (HE), foram utilizados o teorema de Bayes, o índice Kappa e o índice Youden respectivamente. Nos cães a frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica ficou em 57%, com associação entre a infecção e a faixa etária dos animais. Nos gatos esta frequência de ocorrência foi de 87% pelo método padrão ouro (HE) de diagnóstico escolhido sem associação entre infecção, raça, gênero e idade dos animais. A imunohistoquímica obteve maiores índices de Youden e Kappa nos cães. Nos gatos, a coloração específica a base de prata, Warthin Starry, obteve maior índice Youden e Kappa do que os outros diagnósticos. A determinação da frequência de ocorrência do *Helicobacter spp* varia conforme o método de diagnóstico adotado. A escolha do método depende dos recursos financeiros disponíveis, das amostras que se pretende estudar, do tempo necessário, da praticidade do método e da sua performance.

Palavras-chave: *Helicobacter spp*. Cães. Gatos. Métodos de diagnóstico. Comparação. Gastrite.

ABSTRACT

ROMERO, D. C. Study helicobacteriosis in dogs and cats: determining the frequency of occurrence in the gastric mucosa of animals necropsied and comparison of diagnostic methods. [**Estudo da helicobacteriose em cães e gatos:** determinação da frequência de ocorrência na mucosa gástrica de animais necropsiados e comparação entre métodos de diagnóstico]. 2014.99 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Helicobacter spp are gram negative spiral bacterium that can be part of the gastric microbiota of domestic dogs and cats, and its association with gastropathies is still widely discussed in Veterinary Medicine. The aim of the study was to evaluate the frequency of occurrence of gastric helicobacteriose in dogs and cats necropsied at HOVET - USP and compare four diagnostic methods for the identification of the agent. Fragments of gastric mucosa were sent to the rapid urease test (RUT), cytology, histopathology by hematoxylin and eosin (HE) staining with Warthin Starry (WS) and immunohistochemistry (IHC). For comparative analysis, and concordance and performance between diagnostic methods with the gold standard (HE) were used respectively the Bayes' theorem, the Kappa index and Youden index. In dogs the frequency of occurrence of gastric helicobacteriose stood at 57 %, with an association between infection and the age of the animals. In cats this frequency of occurrence was 87 % for the gold standard method (HE) and no association between infection, race, gender and age of the animals was found. Immunohistochemistry showed higher Youden index and Kappa in dogs. In cats, the specific staining based on silver, Warthin Starry, demonstrated the highest Youden and Kappa indexes among the other diagnostic methods. The determination of the frequency of occurrence of *Helicobacter spp* varies according to the diagnostic method adopted. The choice of method depends on the financial resources available, the samples under study, the time required, the practicality of the method and its performance.

Keywords : *Helicobacter spp* . Dogs. Cats. Methods of diagnosis. Comparison. Gastritis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Lista de algumas das espécies de <i>Helicobacter</i> spp identificadas, com seus respectivos hospedeiros e órgão envolvido - São Paulo - 2011-2012.....	18
Quadro 2 -	Lista dos cães estudados segundo a identificação, sexo, idade e raça - São Paulo - 2011-2012.....	31
Quadro 3 -	Lista dos gatos estudados segundo a identificação, sexo, idade e raça. São Paulo, 2011-2012	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição de machos e fêmeas na população canina.....	43
Gráfico 2	Distribuição dos cães com raça e sem raça definida.....	44
Gráfico 3-	Distribuição representativa dos cães machos e fêmeas, com (CRD) e sem raça definida (SRD).....	44
Gráfico 4 -	Distribuição das raças dos cães em relação ao sexo.....	45
Gráfico 5 -	Distribuição dos cães segundo a faixa etária em jovens (de 6 meses a 2 anos), adultos (acima de 2 a 8 anos) e idosos (acima de 8 anos).....	45
Gráfico 6 -	Distribuição dos cães segundo gênero e faixa etária.....	46
Gráfico 7 -	Distribuição dos cães segundo o porte corpóreo.....	46
Gráfico 8 -	Distribuição dos cães segundo machos e fêmeas e o porte dos animais da população estudada.....	47
Gráfico 9 -	Distribuição dos gatos segundo o gênero.....	47
Gráfico 10 -	Distribuição dos gatos segundo a presença de raça definida ou não.....	48
Gráfico 11 -	Distribuição dos gatos em relação ao gênero e presença de raça definida (CRD) ou não (SRD).....	48
Gráfico 12 -	Distribuição das raças dos gatos segundo o gênero.....	49
Gráfico 13 -	Distribuição percentual dos gatos segundo as faixas etárias.....	49
Gráfico 14 -	Distribuição dos gatos segundo gênero e faixa etária.....	50
Gráfico 15 -	Distribuição do percentual dos cães positivos e negativos para <i>Helicobacter spp</i> na mucosa gástrica pela histopatologia corada em HE.....	51
Gráfico 16 -	Distribuição dos cães em relação ao número de machos e fêmeas positivos e negativos para <i>Helicobacter spp</i>	52
Gráfico 17 -	Distribuição da frequência de ocorrência de helicobacteriose nos gatos.	57

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Distribuição da frequência de helicobacteriose segundo o gênero dos cães - São Paulo - 2013.....	51
Tabela 2 -	Distribuição conjunta de raça definida dos cães e presença de <i>Helicobacter</i> - São Paulo - 2013.....	52
Tabela 3 -	Distribuição do gênero, raça definida e presença de <i>Helicobacter spp</i> - São Paulo - 2013.....	53
Tabela 4 -	Distribuição dos resultados segundo a faixa etária dos cães - São Paulo - 2013.....	53
Tabela 5 -	Distribuição do gênero, faixa etária e presença da <i>Helicobacter ssp</i> - São Paulo – 2013.....	54
Tabela 6 -	Distribuição do porte dos cães segundo o resultado da presença de <i>Helicobacter ssp</i> - São Paulo – 2013.....	55
Tabela 7 -	Distribuição segundo o porte dos cães e presença da <i>Helicobacter ssp</i> por gênero - São Paulo – 2013.....	56
Tabela 8 -	Distribuição da presença de <i>Helicobacter ssp</i> segundo o gênero dos gatos - São Paulo – 2013.....	57
Tabela 9 -	Distribuição dos gatos com helicobacteriose segundo a raça - São Paulo – 2013.....	58
Tabela 10 -	Distribuição do gênero dos gatos e raça definida segundo a presença de <i>Helicobacter spp</i> . São Paulo – 2013.....	58
Tabela 11 -	Distribuição da Helicobacterose por faixa etária nos gatos - São Paulo , 2013.....	59
Tabela 12 -	Distribuição do resultado da infecção por <i>Helicobacter spp</i> por faixa etária e gênero dos felinos. São Paulo , 2013.....	60
Tabela 13 -	Estatísticas relativas aos métodos em relação ao método ouro – HE - São Paulo – 2013.....	61
Tabela 14 -	Associação entre o método citológico e método padrão – HE - São Paulo – 2013.....	62
Tabela 15 -	Associação entre o método de urease e método padrão – HE - São Paulo – 2013.....	63

Tabela 16 -	Associação entre os resultados do método WS e o método ouro – HE - São Paulo – 2013.....	63
Tabela 17 -	Associação entre os resultados do método IHQ e o método Ouro – HE. São Paulo - 2013.....	64
Tabela 18 -	Comparação entre os métodos de diagnósticos - São Paulo – 2013.....	64
Tabela 19 -	Estatísticas relativas aos métodos diagnósticos em relação ao método ouro – HE – Felinos - São Paulo – 2013.....	65
Tabela 20 -	Associação entre os resultados do método citológico e o método ouro para os felinos - São Paulo – 2013.....	66
Tabela 21 -	Associação entre os resultados dos métodos urease e método ouro – HE -São Paulo - 2013.....	66
Tabela 22 -	Associação entre os resultados dos métodos WS e método ouro - HE - São Paulo - 2013.....	67
Tabela 23 -	Associação entre os resultados dos métodos IHQ e método ouro - HE - São Paulo - 2013.....	68
Tabela 24 -	Comparação entre os métodos de diagnósticos para os felinos segundo sensibilidade, especificidade, índice Youden, preço de custo e prazo para a realização de cada teste - São Paulo -2013.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo da abertura do estômago pela curvatura maior no sentido cárdia-duodeno durante o exame necroscópico de cães e gatos.....	35
Figura 2 -	Esquema representativo dos locais de colheita de amostras de mucosa gástrica a partir de referências anatômicas (cárdia, incisura angular e antro).....	36
Figura 3 -	A) Exemplo de três testes de urease com resultado de leitura negativo para a presença de <i>Helicobacter spp.</i> B) Exemplo de três testes positivos para a bactéria.....	39
Figura 4 -	A) Fotografia da embalagem do anticorpo <i>anti-H.pylori</i> (cod B0471, Dako®) usado na reação de imuno-histoquímica. B) Fotografia de como o banho de bloqueio das proteínas inespecíficas com o leite em pó foi realizado.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O <i>HELICOBACTER SPP</i> : DO HISTÓRICO A DESCRIÇÃO DE ESPÉCIES E MORFOLOGIA	16
2.1.1	Considerações sobre o <i>Helicobacter spp</i> no Homem, nos Cães e nos Gatos.	20
2.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE A EPIDEMIOLOGIA DO <i>HELICOBACTER SPP</i> EM CÃES E GATOS.....	21
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	23
2.3.1	Histopatologia, histoquímica e imuno-histoquímica.....	23
2.3.2	Citologia	25
2.3.3	Teste Rápido da Urease	25
2.3.4	Cultura microbiológica	26
2.3.5	Sorologia	27
2.3.6	Métodos Moleculares.....	27
3	OBJETIVO GERAL.....	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS.....	31
4.1.1	Critérios de Inclusão.....	34
4.1.2	Critérios de Exclusão	34
4.2	AMOSTRAS GÁSTRICAS.....	35
4.3	MÉTODOS	36
4.3.1	Estudo da ocorrência de helicobacteriose gástrica em cães e gatos	36
4.3.1.1	Método ouro: exame histopatológico da mucosa gástrica	37
4.3.2	Comparação entre os métodos diagnósticos de helicobacteriose.....	37
4.3.2.1	Diagnóstico por exame citológico da mucosa gástrica	38
4.3.2.2	Diagnóstico de helicobacteriose gástrica pelo teste rápido de urease.....	38
4.3.2.3	Diagnóstico da helicobacteriose pelo exame histopatológico da mucosa gástrica: coloração de rotina Hematoxilina e Eosina (HE)	39
4.3.2.4	Diagnóstico de helicobacteriose pela reação imuno-histoquímica	39
4.3.2.4.1	Metodologia para imunomarcção das helicobactérias em material parafinado.....	40
4.3.2.5	Diagnóstico de helicobacteriose pela coloração histoquímica Warthin Starry...	41
4.4	COMPARAÇÕES DE ANÁLISE DOS CUSTOS DOS EXAMES	42
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	CASUÍSTICA	43
5.1.1	Caracterização da População Canina	43
5.1.2	Caracterização da População Felina	47
5.2	DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DA HELICOBACTERIOSE GÁSTRICA EM CÃES E GATOS	

	NECROPSIADOS JUNTO AO SERVIÇO DE PATOLOGIA ANIMAL – HOVET-USP	50
5.2.1	Determinação da frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica em cães	50
5.2.2	Determinação da frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica em gatos.....	56
5.3	RESULTADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE HELICOBACTERIOSE GÁSTRICA.....	60
5.3.1	Comparação entre os métodos para o diagnóstico de helicobacteriose gástrica nos cães	61
5.3.1.1	Comparação entre a citologia e a histopatologia para os cães	62
5.3.1.2	Comparação entre o teste rápido de urease e a histopatologia nos cães	62
5.3.1.3	Comparação entre o método Warthin starry e a histopatologia nos cães.....	63
5.3.1.4	Comparação entre a reação imuno histoquímica e a histopatologia para o diagnóstico em cães	64
5.3.2	Comparação entre os métodos para o diagnóstico de helicobacteriose gástrica nos gatos	65
5.3.2.1	Comparação entre a citologia e a histopatologia para os gatos.....	66
5.3.2.2	Comparação entre o teste rápido de urease e a histopatologia nos gatos.....	66
5.3.2.3	Comparação entre o Warthin Starry e a Histopatologia nos gatos	67
5.3.2.4	Comparação entre a reação imuno-histoquímica e a histopatologia nos gatos...	67
6	DISCUSSÃO.....	69
7	CONCLUSÃO	82
	REFERENCIAS	84
	APÊNDICE A	96
	ANEXO A.....	99

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a área do conhecimento que abrange do diagnóstico ao tratamento clínico e cirúrgico das doenças do sistema digestivo, a gastroenterologia tem crescente importância tanto na medicina humana, como também na veterinária e em especial destaque com relação ao conhecimento das doenças gástricas.

A etiopatogenia das gastropatias como úlceras, gastrites e o câncer gástrico no homem está, muitas vezes associada à presença da *Helicobacter pylori*, bactéria gram-negativa amplamente conhecida e estudada mundialmente. Desde a descoberta da associação entre a *H.pylori* e as gastropatias em humanos, o gênero *Helicobacter spp* tem sido alvo da investigação e dos estudos em relação aos seus efeitos na mucosa gástrica ou entérica de animais domésticos de companhia, de produção e animais selvagens e exóticos.

No entanto, apesar dos numerosos artigos científicos publicados anualmente, até o presente momento, não existe um consenso a respeito dos mecanismos envolvidos sobre a imunopatogenia das lesões causadas pelas espécies de *Helicobacter spp* no homem e nos animais. Em particular com relação aos animais de companhia, os autores não são concordantes sobre os meios de transmissão, patogenia, doença clínica gástrica, infecção e lesões anatomopatológicas.

Estudos dos supostos fatores patogênicos, tais como a indução de mediadores inflamatórios, a evasão da resposta imune e resposta celular, têm sido muito importantes e necessários para compreender a Helicobacteriose e auxiliar nas estratégias de tratamento e prevenção.

Especificamente, o conhecimento da frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica no nosso meio e a utilização de diferentes métodos de diagnóstico se fazem necessários para a investigação clínica e epidemiológica da helicobacteriose na Medicina Veterinária. Devido a essas razões o presente estudo foi realizado com o objetivo geral de contribuir para o estudo da helicobacteriose gástrica em cães e gatos no nosso meio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O *HELICOBACTER SPP*: DO HISTÓRICO A DESCRIÇÃO DE ESPÉCIES E MORFOLOGIA

A história da helicobacteriose gástrica se inicia em 1881 com Dr. Gustave Rappin que foi o pioneiro a descrever a presença de bactérias espiraladas na mucosa gástrica de cães (RAPPIN, 1881¹ *apud* SOLNICK; SCHAUER, 2001, p. 60). Esta observação só foi confirmada posteriormente, em 1893 e 1896, por Dr. Giulio Bizzozero e Dr. Salomon, respectivamente, que relataram microrganismos em formato de espiral associados com vacúolos nas células da mucosa gástrica de cães e outros animais (BIZZOZERO, 1892² *apud* SOLNICK; SCHAUER, 2001, p. 60; SALOMON, 1896³ *apud* SOLNICK; SCHAUER, 2001, p. 60).

A primeira observação de microrganismos no estômago de humanos foi realizada por Dr. Krienitz em pacientes com carcinoma gástrico no início do século XX, que mais tarde, foi confirmada por Dr. Luger e Dr. Neuberger que identificaram esses microrganismos na mucosa gástrica e no suco gástrico de indivíduos com mucosa gástrica saudável (KRIENITZ, 1906; LUGER; NEUBERGUER, 1921). Em 1899, o professor Dr. Walery Jaworski da Universidade Jaguelônica, em Cracóvia, investigando sedimentos de lavagem gástrica humana, foi o primeiro a sugerir o possível papel do *Helicobacter* na patogênese de doenças gástricas em estudo escrito em polonês (KONTUREK, 2003).

Em 1984, Dr. Barry Marshall e Dr. Robin Warren isolaram os microrganismos do estômago de humanos, sendo, inicialmente chamados de organismos *Campylobacter spp*,

¹Rappin, G. 1881. Contribution a l'étude bactéries de la bouche a l'état normal et dans la fièvre typhoid. A. Parent, Paris, France.

²Bizzozero, G. 1892. Sulle ghiandole tubulari del tube gastroenterico e sui rapporti del loro coll'epitelio de rivestimento della mucosa. Atti R. Accad. Sci. Torino **28**:233–251. 31.

³Salomon, H. 1896. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. Zentbl. Bakteriöl. **19**:433–442.

passando mais tarde, a serem identificados por *Campylobacter pylori* (MARSHALL; WARREN, 1984; MCMAHON, 2003). Porém, somente após estudos bioquímicos e análises do gene 16S do RNA ribossômico, utilizando a reação em cadeia da polimerase, sua classificação foi alterada para o gênero *Helicobacter*, sendo o *Helicobacter pylori*, o primeiro membro do gênero descrito (SOLNICK; SCHAUER, 2001).

Marshall e Warren associaram a infecção do *Helicobacter pylori* com inflamação na mucosa gástrica caracterizada por gastrite superficial crônica, à infiltração de células polimorfonucleares, ulceração duodenal e gástrica (MARSHALL; WARREN, 1984).

Em 1994, o primeiro consenso foi publicado pelo “National Institutes of Health”, recomendando o uso de terapia antimicrobiana em pacientes com úlceras pépticas, infectadas com *H.pylori* denotando a possível associação entre infecção e úlceras (NIH CONSENSUS CONFERENCE, 1994). No mesmo ano, a “International Agency for Cancer Research”, apoiada pela Organização Mundial de Saúde, declarou o *H.pylori* como um agente carcinogênico da classe I (IARC, 1994).

Em 2005, o Prêmio Nobel de Medicina foi atribuído conjuntamente a Dr. Barry J. Marshall e Dr. J. Robin Warren "pela descoberta da bactéria *Helicobacter pylori* e seu papel na gastrite e úlcera péptica no ser humano” (NOBELPRIZE, 2005).

Desde a descrição do *H. pylori*, o número de espécies do gênero *Helicobacter* expandiu rapidamente (WINDSOR, 2000). No início das pesquisas com *H. pylori*, os patologistas, ao examinarem biópsias de mucosa gástrica, relataram a presença de bactérias morfologicamente distintas por seu formato típico longo e espiralado (WINDSOR, 2000). Estes microrganismos, maiores que o *H. pylori* e intensamente espiralados, foram previamente descritos como *Gastrospirillum hominis*, porém com a análise gênica do RNA ribossômico 16S destes organismos, ele foram reclassificados como pertencentes ao gênero *Helicobacter* (WINDSOR, 2000).

O nome '*Helicobacter heilmannii*' foi proposto em homenagem ao patologista alemão Dr. Konrad Heilmann, que realizou o estudo dessas bactérias em seres humanos associando a presença de bactérias e gastropatias como gastrite, úlcera gástrica e linfoma gástrico do tipo MALT (HEILMANN; BORCHARD, 1991). No entanto, após a análise das sequências gênicas do RNA ribossômico 16S derivadas de clones de dois pacientes mostrou que eles

apresentavam apenas 96,6% de similaridade e, subsequentemente, foi subclassificado como *H. heilmannii* do tipo I e *H. heilmannii* do tipo II (O'ROURKE, 2004).

O *H. heilmannii* do tipo I é geneticamente idêntico ao *H. suis* (O'ROURKE, 2004). O *H. heilmannii* do tipo II não representa uma única espécie de helicobactéria, mas sim um grupo de espécies, incluindo três helicobactérias que foram isoladas a partir do estômago de cães e gatos, ou seja, o *H. felis*, *H. bizzozeronii* e *H. salomonis* (O'ROURKE, 2004).

Atualmente, existem mais 40 espécies de *Helicobacter spp* identificadas, com análise filogenética pronta e/ou com nomes aguardando validação para publicação de acordo com o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, da biblioteca nacional do Estados Unidos (NCBI, 2013). Muitas das espécies de *Helicobacter* foram identificadas em diferentes espécies de animais naturalmente infetados ou em experimentação (ZENNER, 1999; HAESEBROUCK et al., 2009) como pode ser mostrado no quadro 1.

Quadro 1 - Lista de algumas das espécies de *Helicobacter spp* identificadas, com seus respectivos hospedeiros e órgão envolvido - São Paulo -2011-2012
(Continua)

Espécies de <i>Helicobacter</i>			
ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	ÓRGÃO	REFERÊNCIA
<i>H. acinonyx</i>	Leopardo	Estômago	EATON et al., 1993.
<i>H. bilis</i>	Rato	Intestino, fígado e, bile	FOX et al., 1995
<i>H. bovis</i>	Bovinos	Abomaso	DE GROOTE et al., 1999b)
<i>H. canis</i>	Cão	Intestino e Fígado	FOX et al., 1996
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	Vesícula biliar	FRANKLIN et al., 1996.
<i>H. cetorum</i>	Baleias e golfinhos	Estômago	HARPER et al., 2002.
<i>H. cinaedi</i>	Hamster e humanos	Intestino	FENNEL et al., 1985.

(Conclusão)

Espécies de <i>Helicobacter</i>			
ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	ÓRGÃO	REFERÊNCIA
<i>H. felis</i>	Cão, gato e homem	Estômago	LEE et al., 1988.
<i>H. fennelliae</i>	Humano	Intestino	TOTTEN et al., 1985.
<i>H. heilmannii</i>	Humano	Estômago	CHONE et al., 1995.
<i>H. hepaticus</i>	Rato	Intestino e fígado	FOX et al., 1993.
<i>H. muridarum</i>	Rato	Intestino e estômago	LEE et al., 1992,
<i>H. mustelae</i>	Furão	Estômago	FOX et al, 1989.
<i>H. nemestrinae</i>	Primata	Estômago	BRONSDON et al, 1991.
<i>H. pametensis</i>	Suíno	Intestino	DEWHIRST et al, 1994.
<i>H. pullorum</i>	Galinhas e humanos	Fígado e intestino	STANLEY, et al 1994.
<i>H. pylori</i>	Humanos	Estômago	MARSHALL e WARREN, 1983.
<i>H. rodentium</i>	Ratos	Intestino	SHEN et al, 1997.
<i>H. trogonum</i>	Ratos	Intestino	MENDEZ et al, 1996.
<i>H. westmeadi</i>	Humanos	Sangue	TRIVETT-MOORE et al, 1997,
<i>H. sp. Bird B</i>	Pássaro	Intestino	DEWHIRST et al , 1994.
<i>F. rappini</i>	Rato	Intestino	SCHAUER et al, 1993.

As helicobactérias revelam estrutura de parede celular tipicamente gram-negativa, com membrana interna e externa separadas por um espaço periplasmático e um citoplasma denso contendo material nuclear e ribossomos (SOLNICK; SCHAUER, 2006). Há grande diversidade morfológica entre as espécies de *Helicobacter spp.* De maneira geral, as bactérias exibem estrutura encurvada ou espiralada, variando em espirais largas e curtas, que se movimentam por flagelos periplasmáticos que podem ser uma estrutura única em uma das extremidades, ou estrutura em tufo com mais de vinte flagelos nas duas extremidades da bactéria (SOLNICK; SCHAUER, 2006).

Uma característica fundamental das bactérias do gênero *Helicobacter* é a capacidade de sobreviver em meio ácido devido à produção da enzima urease o que torna este gênero, único

no seu modo de ação e patogenia (DUARTE, 2009). A urease produzida pelas bactérias promove a hidrólise da uréia, fisiologicamente presente no suco gástrico, com consequente formação de amônia, que por sua vez age como receptor de íons H^+ , aumentando o pH do meio (DUARTE, 2009). Dessa forma, o microrganismo produz uma microbiota capaz de evitar os efeitos deletérios do pH ácido estomacal (DUARTE, 2009).

2.1.1 Considerações sobre o *Helicobacter spp* no Homem, nos Cães e nos Gatos

O *H. pylori* tem sido encontrado no estômago de humanos em todas as partes do mundo, mas raramente é identificado na mucosa gástrica de cães e gatos (NEIGER; SIMPSON, 2000). Estima-se que mais de 50% da população humana mundial seja positiva para o *H. pylori* e a prevalência da bactéria possa variar significativamente em um país e entre países (HUNT et al., 2010). Nos países em desenvolvimento, por exemplo, estima-se que, de 70 a 90% da população humana seja portadora do *H. pylori* e a maioria adquiriu a infecção antes dos 10 anos de idade (DUNN et al., 1997). Por outro lado, nos países desenvolvidos, esta prevalência é menor e, variando de 25 a 50% da população (DUNN et al., 1997). Além disso, inúmeros estudos indicam que o câncer gástrico está fortemente relacionado à infecção crônica progressiva pelo *Helicobacter pylori*, que leva a processo inflamatório com consequente indução da gastrite crônica até gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia maligna (LADEIRA et al., 2003).

Numerosos estudos sugerem que os animais domésticos podem atuar como reservatórios do *H. pylori* e de outras espécies de *Helicobacter spp*, para o ser humano (HANDT et al., 1995; NEIGER; SIMPSON, 2000). Recentemente autores investigaram a presença de *Helicobacter spp* na mucosa gástrica de um paciente humano com úlcera gástrica e na mucosa gástrica do seu cachorro de estimação assintomático (DE BOCK et al., 2006). Os autores utilizaram biologia molecular baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR multiplex) da amostra humana e identificaram a presença da espécie *H. felis*. Da mesma forma, na amostra canina, foram identificadas as espécies *H. felis*, *H. bizzozeronii* e *H. heilmannii* sugerindo assim, uma possível transmissão entre espécies e potencial zoonótico da infecção por *H. felis*.

Estudos com base na identificação do gene *ureaB* pela PCR, sugeriram que *H. bizzozeronii* é a espécie de *Helicobacter* predominante na mucosa gástrica canina (NEIGER et al., 1998; VAN DEN BULCK et al., 2006).

O *H. heilmannii*, geralmente encontrado em animais como cães, gatos, suínos e bovinos, foi relacionado com o desenvolvimento de gastrites e o linfoma gástrico de baixo grau em humanos (DE BOCK et al., 2006; TAKEMURA et al., 2009). Além disso, dois tipos de "*H. heilmannii*" foram identificadas com base na sequência do DNA ribossomal 16S (rDNA) desses organismos. O *H. heilmannii* tipo I que mostrou-se intimamente relacionado com as helicobacterias suínas, chamados "*Helicobacter suis Candidatus*", já o "*H. heilmannii*" tipo II, que está altamente relacionado com três espécies de helicobactérias isoladas de cães e gatos: *H. felis*, *H. bizzozeronii* e *H. salomonis* (DE BOCK et al., 2006).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A EPIDEMIOLOGIA DO *HELICOBACTER SPP* EM CÃES E GATOS

A prevalência de *Helicobacter spp* em mucosas gástricas de cães varia de 67-100% em animais clinicamente saudáveis, de 72-90% de cães com êmese recorrente, e em 100% de cães de laboratório da raça Beagle (GEYER et al., 1993; HERMANNNS et al., 1995; EATON et al., 1996; JALAVA et al., 1998; NEIGER et al., 1998; ANACLETO, 2010; HAESBROUCK et al., 2009). Por outro lado, em gatos a prevalência de *Helicobacter spp* em mucosas gástricas é varia de 41% a 100% em animais clinicamente saudáveis (GEYER et al., 1993; OTTO, 1994; PAPASOULIOTIS, 1997; NEIGER, 1998; YAMASAKI, 1998) e de 57% a 100% em animais com êmese recorrentes (GEYER et al., 1993; HERMANNNS et al., 1995; PAPASOULIOTIS, 1997; YAMASAKI, 1998; TAKEMURA, 2009).

As condições higiênico-sanitárias em que os animais domésticos se encontram e habitam é um fator importante, tal como nos humanos, seno essa teoria suportada pelo fato de maiores prevalências serem registradas em animais provenientes de canis, do que em animais provenientes de lares domésticos particulares (EATON et al., 1996).

Fatores como idade, sexo, porte e raça em estudos com cães e gatos, muitas vezes não são mencionados, e quando estudados, não apresentam associação com a infecção por

Helicobacter spp (GEYER, 1993; OTTO, 1994; HERMANNNS et al., 1995; HAPPONEN, 1996; PAPASOULIOTIS, 1997; NEIGER, 1998; CASTIGLIONI et al., 2011).

Diversas espécies de *Helicobacter spp* têm sido apontadas como causadoras de gastrite em cães e gatos (FOX, 2002; HOHNSON et al., 2008) em muitos casos, a infecção está associada com inflamação, degeneração glandular, e hiperplasia de folículos linfóides, porém sem uniformidade das conclusões (SIMPSON, 2000).

Estudos envolvendo o papel da patogenicidade do *H. felis* demonstraram que a infecção experimental em cães gnotobióticos de 7 dias de idade resultou na hiperplasia linfocitária de toda a mucosa gástrica, bem como discreto infiltrado linfocitário difuso (LEE et al., 1992).

Apesar da associação da doença clínica no homem, há pouca informação sobre a relação do gênero *Helicobacter* e a enfermidade gástrica nos animais domésticos e selvagens, sugerindo que esses microrganismos podem contribuir na patogênese das gastrites, tanto dos animais como do homem (CARVALHO et al., 2008). As bactérias envolvidas são muitas vezes caracterizadas pelo ensaio da urease ou pela rotina histopatológica, uma vez que, os animais podem ser infectados com mais de uma espécie de *Helicobacter* urease positivas e indistinguíveis à microscopia de luz (SOLNICK; SCHAUER, 2001).

Os mecanismos de transmissão do gênero *Helicobacter spp* são poucos compreendidos e nenhuma via de transmissão foi claramente definida (LADEIRA et al., 2003). Supõe-se que as vias oral-oral e fecal-oral parecem constituir as duas principais formas de transmissão deste microrganismo (LADEIRA et al., 2003). Além disso, estudos sugeriram que a água contaminada e a comida constituem importantes fonte de infecção (HOPKINS et al., 1993; HULTEN et al., 1996).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Existem diferentes métodos para o diagnóstico de infecção pelo *Helicobacter spp* em seres humanos que podem ser adaptados e usados para os animais (LECOINDRE, 2000). Vários métodos utilizam a endoscopia gástrica como meio de obtenção de material para exame, no entanto, outros métodos não invasivos também podem ser utilizados para obter as amostras (CHEY; WONG, 2007; CALVET et al., 2010).

O diagnóstico da infecção pelo *Helicobacter spp* pode ser feito por meio de cultivos microbiológicos, análises histopatológicas, teste de respiração, teste da urease, testes sorológicos e por meio de técnicas moleculares utilizando DNA e RNA do agente (MOURA, 2004). A escolha do teste depende de fatores como custo e disponibilidade; além disso, deve-se diferenciar entre os testes utilizados para estabelecer o diagnóstico de infecção e aqueles visando a confirmação da erradicação da infecção após terapia anti-microbiana (HUNT, 2010).

2.3.1 Histopatologia, histoquímica e imuno-histoquímica

O diagnóstico histopatológico de rotina com a coloração de rotina Hematoxilina e eosina (HE) permite a visualização das bactérias helicoidais, muitas vezes localizadas no muco, aderidas à superfície do epitélio e no interior de glândulas gástricas (OWEN, 2010). Este método apresenta sensibilidade de 90 a >95% e especificidade de 95 a 99% ,com custo moderado (OWEN, 2010). Este exame também permite a avaliação das alterações teciduais concomitantes, incluindo a presença de células inflamatórias, localização e identificação do agente (KUTERS et al., 2006). O exame histopatológico da mucosa gástrica é considerado o este outro para rotina de diagnóstico de helicobacteriose gástrica nos animais (KUTERS et al., 2006).

Em geral as helicobactérias observadas possuem 2,5 a 5,0 µm de comprimento, por 0,5 a 1,0 µm de largura e com 5 a 9 voltas helicoidais (SAILASUTA; PRACHASILCHAI, 2012). Na medicina humana tem se recomendado que a coloração utilizada não seja apenas

pela hematoxilina-eosina, que pode apresentar índices significantes de falsos-positivos e falsos-negativos (MINCIS; MINCIS, 2007). Assim, muitas vezes, restos alimentares, muco da superfície luminal do epitélio e outros organismos, como bacilos bacterianos, podem se assemelhar ao *Helicobacter spp* causando confusão e falso positivo. Por isso, autores recomendam a utilização de colorações específicas como o Warthin Starry (WS), que facilita a identificação histológica das bactérias misturas no muco gástrico e no lúmen de glândulas gástricas (EATON et al., 1996; NEIGER, 1998).

Com a coloração de WS as bactérias podem ser visibilizadas na cor marrom- escura sobre um fundo amarelado e muitas vezes estão localizadas nas fossetas gástricas, em as porções superiores das glândulas gástricas com associação íntima à superfície da célula epitelial e no interior do citoplasma das células parietais (SAILASUTA; PRACHASILCHAI, 2012). A coloração de WS permite ainda a avaliação da infecção em um elevado número de lâminas em um período curto de tempo (SAILASUTA; PRACHASILCHAI, 2012). No entanto, embora facilite expressivamente a identificação do *Helicobacter spp*, a técnica de WS possui um procedimento da coloração tecnicamente difícil e dispendiosa, o que leva muitos patologistas e laboratórios a considerarem a coloração de Giemsa como eletiva, devido a boa acurácia, baixo custo e facilidade técnica de procedimento (BRADEN; CASPARY, 2001).

Outras colorações específicas têm sido amplamente utilizadas como Giemsa modificado, o azul de toluidina e a carbolfucsina na identificação das bactérias (GEYER et al., 1993; HERMANNNS et al., 1995; HAPPONEN, 1996; LECOINDRE, 2000; COSTA et al., 2012).

A reação de imunohistoquímica, a qual possui o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico, tem sido utilizada para a identificação de *H.pylori* e *Helicobacter spp* em humanos e animais em contexto de pesquisa ou casos específicos em humanos (PIRARA, 2003; PRACHASILPCHAI, 2007; XIAOHONG, 2010) . Quando a densidade das bactérias é baixa nas amostras, tal como pode ocorrer em biópsias pós-tratamento, ou para demonstrar a erradicação de organismos *H pylori* pós-tratamento com o objetivo de avaliar a eficácia do tratamento ou em casos específicos em que o indivíduo apresenta gastrite crônica sem causa aparente e sem evidência de *Helicobacter spp* a coloração de HE (XIAOHONG, 2010).

2.3.2 Citologia

A citologia do esfregaço gástrico é um método considerado simples e rápido, porém pouco divulgado nas medicinas humana e veterinária (NEIGER; SIMPSON, 2000). O material é obtido pelo escovado da mucosa gástrica utilizando o endoscópio com o qual se faz um esfregaço em lâminas de vidro, que depois são coradas. As colorações frequentemente indicadas para a pesquisa direta do *Helicobacter spp* nas lâminas, incluem o Papanicolaou, métodos de coloração May-Grunwald-Giemsa que levam cerca de 30 minutos. Porém colorações mais rápidas e baratas como Diff-Quik também podem ser utilizadas e permite sua realização logo após o momento da coleta com identificação do agente em poucos minutos em microscopia de luz nos aumentos de 400x e 1000x (HAPPONEN et al., 1998; KAUR, 2004).

Os esfregaços citológicos gástricos permitem a visualização de células epiteliais colunares enfileiradas ou em ninhos, células inflamatórias e bactérias quando presentes (WEBB, 2009). As helicobactérias apresentam morfologia espiralada e são comumente vistas em maior número na citologia, comparando-se com a histopatologia (WEBB, 2009). A razão para esta diferença está no fato de que a bactéria apresenta íntima associação com a camada de muco gástrico que é obtida com as técnicas citológicas, mas frequentemente é perdida pela agitação de fluídos durante a fixação por formalina e o processo de rotina do exame histológico (WEBB, 2009).

A sensibilidade da detecção de *H. pylori* em escova ou citologia de impressão utilizando diferentes colorações tem sido relatada entre 71 e 100%, enquanto que a especificidade tem sido de 90% a 100% (CUSTÓDIO et al., 2005). Em medicina veterinária, são raros os artigos científicos que empregam e comparam esse método com a histopatologia para o diagnóstico de helicobacteriose gástrica em animais domésticos.

2.3.3 Teste Rápido da Urease

Testes de urease são testes simples e rápidos para a detecção de infecção por *Helicobacter spp*, mas apenas indicam a presença ou ausência do agente (FERNANDEZ,

2008). O teste rápido de urease (TRU) é uma prova, presuntiva, muito utilizada na medicina humana e aplicável a medicina veterinária (LOGAN; WALKER, 2001).

A grande vantagem deste teste é que ele pode ser realizado no próprio momento de coleta e consiste em colocar um fragmento da mucosa colhida, em um meio com ureia (MÉGRAUD, 1995). Assim, a enzima urease produzida pelas helicobactérias, hidrolisa a ureia disponível em duas moléculas de amônia (NH_4) e uma molécula de dióxido de carbono (CO_2) desta forma o pH do meio, se eleva mudando a cor da solução para a rosa (MÉGRAUD, 1995). A mudança de cor é obtida em média após 30 minutos a 24 horas dependendo do número de bactérias *Helicobacter spp* na amostra e do kit utilizado (RICCI, 2007). Todos os testes comerciais de urease rápidos têm especificidades de 95 a 100%, mas a sensibilidade é ligeiramente inferior chegando a 85 e 95% (HAZELL et al., 1987; ONDERS, 1997). A sensibilidade pode ser afetada principalmente pelo número de bactérias presentes na amostra, pois se calcula que 10^4 organismos são necessários para um resultado positivo (RICCI, 2007). A baixa sensibilidade e especificidade são relatadas no pós-tratamento e em pacientes com sangramento, e por estas razões o seu uso não é recomendado nestas situações (RICCI, 2007). Resultados falso-negativos podem ser obtidos em pacientes com acloridria bem como em pacientes utilizando inibidores da bomba de proton (BASSET et al., 2004).

2.3.4 Cultura microbiológica

O cultivo microbiológico é utilizada para: investigar as necessidades de crescimento e metabolismo bacteriano para fins de diagnóstico, para estabelecer a sensibilidade aos antibióticos, para identificar potenciais fatores de virulência e para investigar interações entre o agente e o hospedeiro (DUNN et al., 1997).

As helicobactérias são sensíveis fora do ambiente gástrico e, por isso, são cultivadas a partir de biópsias gástricas, as quais podem ser mantidas em meio de transporte Stuart durante 24 h a 4°C (HANNINEN et al., 1998). Os *Helicobacter spp* são isolados em ágar Columbia (MacConkey) ou em meio BHI (*brain heart infusion*), geralmente com adição de antibióticos (polimixina, trimetoprim e vancomicina) e albumina (HANNINEN et al., 1998). As placas são incubadas num ambiente microaerófilo durante pelo menos 5 dias a 37° C e as colônias são gram negativas, urease positivas, oxidase positivas e catalase positivas (RICCI, 2007).

Ricci et al. (2007) aponta que a cultura possui especificidade de até 100%, e que a sensibilidade pode ser inferior a isso, devido: ao número insuficiente de biópsias realizadas no procedimento endoscópico, a contaminação nos meios de culturas, e também, ao uso de antibióticos, inibidores da bomba de prótons e antagonistas H_2 pelos pacientes.

Este método tem se mostrado cada vez menos usado devido a: condições especiais para o transporte de amostras, a utilização de meios caros e complicados com condições especiais de conservação, a necessidade de condições especiais de incubação, e ao tempo necessário para se obter um resultado (QUEIROZ, 1987; PEREZ-PEREZ, 2000).

2.3.5 Sorologia

Os testes sorológicos são rápidos, simples, relativamente baratos e consistem na determinação quantitativa de anticorpos circulantes (IgG e IgA), formado pela resposta à helicobactérias gástricas (LOGAN; WALKER, 2001). Existem vários métodos são empregados para medir os anticorpos de *H. pylori*, incluindo a aglutinação em látex, o *Western blotting* e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (VON WULFFEN et al., 1992).

No entanto, o (ELISA), é o método indireto mais usado porque ele é sensível e fácil de executar e, portanto, adequado para os estudos epidemiológicos (VON WULFFEN et al., 1992). Estudos em humanos demonstraram sensibilidade dos testes em 76 a 84% e especificidade de 79 a 90% (CHEY, 1999). Porém, os testes sorológicos impossibilitam a distinção entre a infecção pelo *Helicobacter* atual ou no passado além da possibilidade de reação cruzada entre as espécies (ANACLETO, 2010).

2.3.6 Métodos Moleculares

Embora a reação da cadeia da polimerase (PCR) não é utilizada como método de diagnóstico na rotina para a identificação de *Helicobacter spp* em animais domésticos, porém, a PCR é amplamente utilizada para no contexto de pesquisa e várias espécies de

Helicobacter spp têm sido identificadas em cães, incluindo co-infecção por mais de uma espécie da bactéria (NEIGER et al., 1998).

As técnicas da reação da cadeia da polimerase (PCR) pode ser empregada para identificar o DNA de *Helicobacter spp* em amostras gástricas mesmo quando a densidade é muito baixa para ser detectado por outros métodos (RICCI, 2007). Além disso, pode ser utilizada para identificação do agente em outras amostras, tais como a saliva, fezes, mucosa intestinal, fígado e pâncreas, e com base na sua localização preferencial de colonização e análise filogenética do genes dos 16S e 23S ribossômico, das espécies do gênero *Helicobacter* podem, assim, ser subdivididos em gástricos e entero-hepáticos (EKMAN et al., 2013).

A PCR tem como finalidade amplificar ou reproduzir *in vitro* um número de cópias de uma região específica de DNA, reproduzindo quantidade suficiente de um fragmento para sua avaliação (LI, 1996). A sensibilidade do método de detecção varia de acordo com o *primer* utilizado, mas é consideravelmente alta com índices de sensibilidade de 98% de sensibilidade e de especificidade com 80% (NEIGER et al., 1998; PRACHASILPCHAI, 2007).

Os genes 16s *rRNA*, *ureA* e o *glmM* têm sido utilizados na identificação da bactéria em muitos estudos epidemiológicos ligados à identificação de reservatórios ambientais, e também em trabalhos de determinação do modo de transmissão desta bactéria (SIQUEIRA et al., 2007).

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) tem sido utilizada com sucesso na identificação de *H. pylori* e *Helicobacter spp* em humanos e animais respectivamente, a partir de secções de tecido embebidas em parafina fixadas em formalina (BASCHIR et al., 1994).

Esta técnica combina a identificação molecular da bactéria com a visibilização do agente na mucosa, proporcionando uma vantagem significativa sobre a cultura microbiológica, PCR e métodos histopatológicos de coloração específica (JERGENS et al., 2009). Sondas de ácido nucleico são produzidas através da seleção, a clonagem, e a síntese de sequências genômicas específicas para um determinado grupo de agentes infecciosos, por sua vez, estas sondas podem hibridizar com alvos de DNA ou RNA da amostra (TANG; PERSING, 1999).

A técnica de FISH é considerada mais específica que a coloração de prata (WS), pois esta pode identificar com precisão as bactérias, com nas sequências 16S ou 23S do rRNA, enquanto que a outras técnicas detectam a capacidade das bactérias em impregnar com a coloração de prata (CAN et al., 2005; YILMAZ, 2007).

3 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo determinar a frequência de ocorrência de helicobacteriose gástrica em cães e gatos domésticos necropsiados junto ao Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da FMVZ-USP utilizando diferentes metodologias diagnósticas.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterização da população estudada e determinação de frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica utilizando a histopatologia segundo gênero, faixa etária, raça e porte corporal.
- 2) Determinar a frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica utilizando os exames: citológico, colorimétrico por urease, imuno-histoquímico e histoquímico por WS.
- 3) Comparar com a histopatologia, padrão ouro, os métodos de diagnósticos citológico, colorimétrico por urease, imuno-histoquímico e histoquímico por WS para a identificação de *Helicobacter* spp nas amostras gástricas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado estudo observacional, prospectivo de determinação da frequência de ocorrência de infecção por *Helicobacter* spp, fundamentado no diagnóstico histopatológico de helicobacteriose gástrica e na análise comparativa entre o exame histopatológico e outros quatro métodos de diagnóstico utilizando amostras de mucosas gástricas de cães e gatos que vieram a óbito por morte natural ou eutanásia no HOVET-USP no período de agosto de 2011 a agosto de 2012.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 88 cães e 31 gatos necropsiados junto ao Serviço de Patologia Animal do HOVET-USP. A lista de identificação dos animais está nos quadros 2 e 3.

Quadro 2 – Lista dos cães estudados segundo a identificação, sexo, idade e raça - São Paulo - 2011-2012
(Continua)

IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE*	RAÇA
01	M	64	PASTOR ALEMÃO
02	M	228	SRD
03	F	60	PITT BULL
04	M	60	BORDER COLLIE
05	F	84	POODLE TOY
06	F	4	PASTOR ALEMÃO
07	M	10	GOLDEN RETRIEVER
08	F	132	LHASA APSO
09	F	84	BERNESE MOUNTAIN DOG
10	M	48	PASTOR ALEMÃO
11	F	10	GOLDEN RETRIEVER
12	M	10	GOLDEN RETRIEVER
13	F	108	SRD
14	F	132	SRD
15	M	60	PASTOR ALEMÃO
16	F	180	SRD
17	M	96	BOXER
18	M	84	COCKER
19	F	84	DOG DE BORDEAUX
20	F	72	PITT BULL

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE*	RAÇA
21	M	72	SHITZU
22	M	144	SRD
23	F	84	PITT BULL
24	F	120	SRD
25	F	72	PASTOR ALEMÃO
26	M	96	PASTOR ALEMÃO
27	M	96	PASTOR ALEMÃO
28	F	132	SRD
29	F	120	PASTOR BELGA
30	M	2	BULLDOG INGLÊS
31	M	12	LABRADOR
32	M	72	BOXER
33	M	108	POODLE MÉDIO
34	M	60	SRD
35	F	48	SRD
36	M	132	POODLE MÉDIO
37	M	3	SPITZ ALEMÃO
38	M	144	SCHNAUZER
39	F	96	LABRADOR
40	M	108	POODLE MÉDIO
41	M	36	SRD
42	F	132	POODLE MÉDIO
43	M	132	MALTÊS
44	M	144	SHNAUZER
45	M	156	SRD
46	F	24	PITT BULL
47	M	120	MALTÊS
48	F	120	DASCHAUND PELO LISO
49	F	96	DALMATA
50	M	108	POODLE MÉDIO
51	F	2	SPITZ ALEMÃO
52	F	168	POODLE MÉDIO
53	M	36	BEAGLE
54	F	1,9	DOBERMAN
55	M	192	DASCHAUND
56	M	264	SRD
57	M	180	SRD
58	F	57	LABRADOR
59	M	48	POODLE MÉDIO
60	M	24	DOG DE BORDEUAX
61	M	84	ROTTWEILLER
62	M	60	POODLE TOY
63	M	180	SRD
64	F	132	POODLE MÉDIO
65	F	6	LHASA APSO
66	F	120	PASTOR ALEMÃO
67	M	24	DOG DE BORDEAUX
68	F	168	POODLE TOY
69	M	84	SRD
70	F	36	SRD
71	F	180	YORK SHIRE
72	F	108	COCKER

(Conclusão)

IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE*	RAÇA
73	F	156	SRD
74	M	3	GOLDEN RETRIEVER
75	F	132	SRD
76	F	84	LHASA APSO
77	M	48	PITT BULL
78	M	84	DOGUE ALEMÃO
79	M	32D	MASTIFF
80	M	192	POODLE GIGANTE
81	M	132	BEAGLE
82	M	120	MALTÊS
83	F	120	SHITZU
84	F	48	BERNESE MOUNTAIN DOG
85	M	108	LABRADOR
86	F	12	PASTOR ALEMÃO
87	M	12	ROTTWEILLER
88	M	132	LABRADOR

*Idade demonstrada em meses. Legenda: M = Machos; F = Fêmeas; SRD = Sem raça definida

Quadro 3- Lista dos gatos estudados segundo a identificação, sexo, idade e raça. São Paulo- 2011-2012

IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE*	RAÇA
1	M	7	SRD
2	M	4	SAGRADO DA BIRMANIA
3	F	36	MANIE COON
4	M	60	BRITISH SHORT HAIR
5	M	144	PERSA
6	M	4	SRD
7	F	120	SRD
8	M	156	SRD
9	M	192	ANGORÁ
10	M	24	SRD
11	F	12	SRD
12	F	36	SRD
13	F	120	SRD
14	M	84	SRD
15	F	36	SIAMÊS
16	M	48	PERSA
17	M	36	SRD
18	F	1	SRD
19	F	204	SRD
20	F	144	SRD
21	M	5	SRD
22	M	192	PERSA
23	M	120	SRD
24	M	96	SRD
25	M	60	SRD
26	F	120	SRD
27	F	96	SRD
28	M	24	SRD
29	M	5	SRD
30	M	144	SRD
31	F	168	BENGAL

*A idade está demonstrada em meses. Legenda: M = Machos; F = Fêmeas; SRD = Sem raça definida.

O estudo foi executado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP sob o número 2348/ 2011 que foi aprovado na reunião do dia 17/08/2011.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão dos cães e gatos para a colheita de amostras gástricas foram:

- 1- animais de ambos os sexos, de qualquer raça e idade/ faixa etária.
- 2- animais com registro e histórico no HOVET-USP e que vieram a óbito natural ou que foram submetidos à eutanásia.
- 3- animais cujas carcaças tenham sido mantidas sob refrigeração entre 2° a 8°C e encaminhados com intervalo máximo de até 24 horas entre o óbito e a realização da necropsopia junto ao Serviço de Patologia Animal do HOVET-USP.
- 4- animais que apresentaram pelo menos uma região gástrica viável na histopatologia.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão dos animais para colheita de amostra gástrica foram:

- 1- ausência de informações sobre a idade e raça;
- 2- intervalo entre óbito e necropsopia superior a 24 horas,
- 3- carcaças inadequadas devido ao congelamento e/ou à putrefação.

4.2 AMOSTRAS GÁSTRICAS

Para coleta das amostras gástricas, os animais foram submetidos ao exame macroscópico convencional baseado no exame necroscópico de mamífero não ruminante adotado pelo Serviço de Patologia Animal. O procedimento de coleta envolveu a separação do estômago dos demais órgãos, a abertura gástrica pela curvatura maior no sentido cárdia-duodeno, como apresentado na figura 1. Após a abertura, foi realizada a remoção manual do conteúdo estomacal conforme descrito por Happonen et al. (1996).

A mucosa gástrica, quando necessário, foi lavada cuidadosamente em água corrente e posicionada de forma a permitir a limpeza e a coleta de amostras para exames citológico, histopatológico e para o teste de urease, como exemplificado na figura 2.

Figura 1 - Esquema representativo da abertura do estômago pela curvatura maior no sentido cárdia-duodeno durante o exame necroscópico de cães e gatos

Fonte: Ilustração adaptada por Débora Cristina Romero dos autores Dyce e Wensing, 2004.

Figura 2 - Esquema representativo dos locais de colheita de amostras de mucosa gástrica a partir de referências anatômicas (cárdia, incisura angular e antro)

Fonte: Ilustração adaptada por Débora Cristina Romero dos autores Dyce e Wensing, 2004.

4.3 MÉTODOS

Os métodos utilizados no estudo estão apresentados nas etapas do item 4.3.1 ao 4.3.2.4.1.

4.3.1 Estudo da ocorrência de helicobacteriose gástrica em cães e gatos

Esta etapa envolveu a determinação da frequência de ocorrência de helicobacteriose gástrica em população de cães e de gatos caracterizadas do ponto vista epidemiológico, quanto a sexo, idade/faixa etária, raça e porte.

A frequência de ocorrência de helicobacteriose gástrica foi baseada na utilização da histopatologia da mucosa gástrica corada por hematoxilina e eosina (HE), a qual foi

considerada como o método ouro, ou de referência, para diagnóstico como definidor da infecção.

4.3.1.1 Método ouro: exame histopatológico da mucosa gástrica

Para o exame histopatológico foram colhidos fragmentos de mucosa gástrica total de aproximadamente 2 cm extensão que foram fixados em solução de formalina a 10% por 24 a 48 horas.

Os fragmentos foram processados segundo técnica padrão para exame microscópico de luz com inclusão em parafina, cortes em micrótomo com espessura de 5µm e coloração por hematoxilina e eosina (HE). A avaliação histopatológica foi realizada nos aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x por dois observadores que desconheciam a identificação dos casos (D.C.R. e L.R.M.S.).

A observação de estruturas espiraladas ou helicoidais localizadas no muco do lúmen de fovéolas ou de glândulas gástrica foi considerada positiva para a infecção por *Helicobacter* spp nas lâminas coradas por HE. Assim, foi atribuído o escore 0 (zero) para ausência de infecção e escore 1 para presença.

A frequência de ocorrência foi apresentada na forma percentual para cada espécie segundo sexo, idade/ faixa etária, raça e porte.

4.3.2 Comparação entre os métodos diagnósticos de helicobacteriose

Esta etapa envolveu a comparação entre o método ouro (HE) e os seguintes métodos diagnósticos: exame citológico da mucosa, teste rápido de urease, exame microscópico por Warthin-Starry (histoquímica) e exame imuno-histoquímico. A avaliação dos métodos de diagnósticos foi realizada com base nas medidas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e índice de Youden.

4.3.2.1 Diagnóstico por exame citológico da mucosa gástrica

As amostras das regiões do fundo, corpo e antro/ piloro gástrico para o exame citológico foram obtidas utilizando a técnica de escovado de mucosa e, para tanto, foram empregadas escovas citológicas descartáveis e estéreis. As amostras presentes nas escovas foram, então, passadas por movimentos de rotação e rolamento sobre a lâmina de vidro para a confecção dos esfregaços.

Os esfregaços foram fixados em metanol por 15 segundos, e secos à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas por 30 minutos em solução alcoólica a 0,7% de azul de metileno de Giemsa (código 004/ 11, marca ALLKIMIA®), lavadas em água corrente por alguns segundos e, então, secas à temperatura ambiente para posterior análise microscópica.

A análise citológica procedeu em microscópio de luz nos aumentos de 400x e/ ou 1000x por um ou dois observadores que desconheciam a identificação do caso.

A infecção foi considerada positiva quando pelo menos uma bactéria, reconhecida pela morfologia helicoidal ou espiralada, foi identificada em um campo microscópico.

4.3.2.2 Diagnóstico de helicobacteriose gástrica pelo teste rápido de urease

Para o diagnóstico pelo teste rápido de urease, foi usado um fragmento de aproximadamente 0,5cm² de área de cada região do estômago colhido com auxílio de pinça anatômica e tesoura reta romba-romba. O fragmento foi colocado em um tubo plástico cônico com a solução de teste rápido de urease (Promedical®).

A leitura da reação foi de acordo com as especificações do fabricante, ou seja, incubação à temperatura ambiente e verificação se houve alteração da coloração em até 24 horas. A infecção foi considerada positiva quando ocorreu elevação do pH caracterizada pela mudança do amarelo para o vermelho cereja ou rosa, a qual indicou que a ureia foi convertida em amônia pela urease presente na amostra (Figura 3).

Figura 3 - A) exemplo de três testes de urease com resultado de leitura negativo para a presença de *Helicobacter spp.* B) exemplo de três testes positivos para a bactéria

Fonte: (ROMERO, 2013).

4.3.2.3 Diagnóstico da helicobacteriose pelo exame histopatológico da mucosa gástrica: coloração de rotina Hematoxilina e Eosina (HE)

Para o diagnóstico pelo exame histopatológico dos fragmentos de mucosa gástrica corados em HE seguiu-se o protocolo descrito no item 4.3.1.1.1.

4.3.2.4 Diagnóstico de helicobacteriose pela reação imuno-histoquímica

O método imuno-histoquímico empregado foi o de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). As reações foram realizadas junto ao Laboratório de Gastroenterologia Experimental e Comparada e de Patologia Ambiental do Departamento de Patologia da FMVZ-USP (APÊNDICE A).

Todas as reações tiveram controles positivo e negativo para atestar a veracidade das mesmas. O controle positivo da reação utilizado foi um caso de cão e de um gato com helicobacteriose gástrica diagnosticados pelo HE. O controle negativo foi o mesmo fragmento sem a adição do anticorpo primário na reação.

4.3.2.4.1 Metodologia para imunomarcação das helicobactérias em material parafinado

O processamento dos blocos de parafina incluiu cortes histológicos de 5µm de espessura e adesão dos fragmentos obtidos em lâminas de vidro com adesivo organossilano (código K580, adesivo, StarFrost, Knittel glass, Alemanha) e mantidos em estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes foram, a seguir, desparafinados em dois banhos de xilol a temperatura ambiente durante 20 e 10 minutos, respectivamente. Posteriormente, foram hidratados em sequência decrescente de etanol por 5 minutos, ou seja, etanol absoluto por duas vezes, a 95% e 70%, e lavados em água corrente por 5 minutos. Antes da próxima etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos e em solução tampão de soro fetal bovino (PBS) pH 7,4 por 5 minutos.

O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado em câmara escura por três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, seguido de água destilada por 5 minutos e deixadas em PBS pH 7,4 por no mínimo 5 minutos.

Para o bloqueio de proteínas endógenas inespecíficas, as lâminas foram incubadas com leite desnatado 10% (leite Molico, Nestlé®) por 30 minutos. A etapa seguinte foi incubação dos espécimes com anticorpo primário policlonal de coelho anti-*H. pylori* (cod. B0471, Dako®). Esse foi diluído em solução de albumina bovina em pó, fração V, a 1% (cod. A9647, Sigma®). A diluição usada foi 1:400 e seguiu-se da incubação em câmara úmida por 24 horas a 4°C. A figura 4 ilustra a embalagem do anticorpo anti- *Helicobacter pylori* (cod. B0471, Dako®) e como o banho de bloqueio das proteínas inespecíficas com leite em pó foi realizado.

No dia seguinte após três lavagens com tampão PBS por 5 minutos cada, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário marcado com biotina anti-coelho utilizando o sistema de detecção universal LSAB *plus* (cod K0690-1, Dako®). Esta etapa foi realizada em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS duas vezes por 5 minutos. O próximo passo envolveu a incubação com o anticorpo terciário em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. A reação foi finalizada colocando as lâminas em tampão PBS duas vezes por 5 minutos.

A reação imune foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3.3'- diaminobenzidine, cod. D5637, Sigma®) a 0,03% acrescida e ativada com 1,2 ml de água oxigenada 3%. O tempo mínimo de revelação foi 1 minuto com bloqueio em água.

Por fim, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, contracorados com hematoxilina de Harris por 10 minutos ou mais, lavados abundantemente em água corrente, desidratados em etanol, cujas soluções estavam em concentração crescente. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount® (Fischer scientific, cod SP 15-1000).

Figura 4 - A) Fotografia da embalagem do anticorpo *anti-H.pylori* (cod B0471, Dako®) usado na reação de imuno-histoquímica. B) Fotografia de como o banho de bloqueio das proteínas inespecíficas com o leite em pó foi realizado

Fonte: (ROMERO, 2013).

A análise microscópica das lâminas de imuno-histoquímica procedeu em microscópio de luz no aumento de 400x por um ou dois observadores que desconheciam a identificação do caso.

A infecção foi considerada positiva quando da identificação de agrupamentos ou estruturas isoladas de bactérias helicoidais ou espiraladas coradas em marrom presentes no lúmen de fovéolas, no interior de glândulas, entre células e/ou em formatos arredondados no citoplasma de células em pelo menos um campo microscópico.

4.3.2.5 Diagnóstico de helicobacteriose pela coloração histoquímica Warthin Starry

Para o exame histoquímico com o método Warthin Starry (WS) os blocos de parafina foram processados no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP (ANEXO A).

A avaliação histopatológica foi realizada nos aumentos de 400x e 1000x por pelo menos um dos observadores que desconhecia a identificação dos casos (D.C.R. e L.R.M.S.).

A observação de estruturas espiraladas ou helicoidais coradas em preto localizadas no muco do lúmen de foveolas ou de glândulas gástrica e entre as células foi considerada positiva para infecção por *Helicobacter* spp.

4.4 COMPARAÇÕES DE ANÁLISE DOS CUSTOS DOS EXAMES

A análise dos custos dos exames foi realizada de acordo com a pesquisa de preço de mercado e o período de tempo para a divulgação do resultado utilizados por três laboratórios de referência da cidade de São Paulo: LAB & VET, PROVET e Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário, FMVZ - USP. Os valores dos exames foram analisados sem adição do custo da realização do procedimento de anestesia e do exame endoscópico. Os valores para teste o de urease se basearam na tabela de preços da empresa Promedical LTDA.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de associação entre a presença da *Helicobacter* spp e gênero, faixa etária, porte e presença ou não de raça definida para as duas populações foram feitos com base na estatística do teste de Qui-quadrado de Pearson sendo que os seus níveis descritivos foram calculados com correção para continuidade. Para a comparação dos métodos foram utilizados o teorema de Bayes e a confecção de gráficos pelo programa Prisma 5.0 e o pelo programa estatístico, Pacote R, com a avaliação do índice de Youden (YOU DEN, 1950) para estabelecer o nível de desempenho e o índice Kappa para a análise da concordância entre os testes.

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

A caracterização da casuística para cada população foi apresentada nos itens 5.1.1. e 5.1.2.

5.1.1 Caracterização da População Canina

A população foi composta por 56% (49/88) de machos e 44% (39/88) de fêmeas como demonstrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Distribuição de machos e fêmeas na população canina

O gráfico 2 apresenta o percentual de animais com raça definida, que representou 80% (70/88) e sem raça definida (SRD), 20% (18/88). O número de machos com raça definida correspondeu a 82% (40/49), enquanto que os machos sem raça definida foram 18% (9/49) como apresentado no gráfico 3. As fêmeas com raça definida representaram 77% (30/39) dos animais e as fêmeas sem raça definida, 23% (9/39) como apresentado nos gráficos 3 e 4.

Gráfico 2 - Distribuição dos cães com raça e sem raça definida

Gráficos 3 - Distribuição representativa dos cães machos e fêmeas, com (CRD) e sem raça definida (SRD)

Gráfico 4 - Distribuição das raças dos cães em relação ao sexo

Quanto à faixa etária dos animais, 21% (18/88) da população se caracterizou por cães jovens com idade inferior a 6 meses até 2 anos, 35% (31/88) adultos com idade superior a 2 anos até 8 anos e 44% (39/88) de idosos com mais de 8 anos. Estes resultados estão apresentados no gráfico 5.

Gráfico 5 - Distribuição dos cães segundo a faixa etária em jovens (de 6 meses a 2 anos), adultos (acima de 2 a 8 anos) e idosos (acima de 8 anos)

A média de idade dos animais variou de $7,51 \pm 3,12$ anos. O grupo com maior número de indivíduos foi o dos idosos, representando 44% (39/88) da população total como demonstrado no gráfico 5. O número de machos e fêmeas distribuídos em cada faixa etária está representado no gráfico 6, o qual apresenta 55% (10/18) machos e 45% (8/18) fêmeas no grupo juvenil, 68% (21/31) machos e 32% (10/31) fêmeas no grupo dos adultos e 64% (18/28) machos e 36% (10/28) fêmeas no grupo dos idosos. Os resultados referentes a análise da faixa etária dos cães está no gráfico 6.

Gráfico 6 - Distribuição dos cães segundo gênero e faixa etária

Quanto ao porte dos animais, 23% (20/88) foram de porte pequeno, 33% (29/88), porte médio, 35% (31/88), porte grande e 9% (8/88) porte gigante. Este resultado está demonstrado no gráfico 7.

Gráfico 7 - Distribuição dos cães segundo o porte corpóreo

O número de machos e fêmeas em cada categoria de porte foi: 45% (9/20) machos e 55% (11/20) fêmeas nos cães de pequeno porte, 62% (18/29) machos e 37% (11/29) fêmeas

nos de porte médio, 58% (18/31) machos e 42%(13/31) fêmeas nos de porte grande e 50% (4/8) machos e 50%(4/8) fêmeas nos de porte gigante. Estes resultados estão no gráfico 8.

Gráfico 8 - Distribuição dos cães segundo machos e fêmeas e o porte dos animais da população estudada

Assim, na população de cães estudados os machos, adultos a idosos (média de idade $7,51 \pm 3,12$ anos) com raça definida e de porte médio a grande foram os mais frequentes.

5.1.2 Caracterização da População Felina

A população felina foi formada por 61% (19/31) de machos e 39% (12/31) fêmeas. O gráfico 9 apresenta a distribuição dos gatos em relação ao gênero.

Gráfico 9 - Distribuição dos gatos segundo o gênero

Quanto à raça dos gatos, 72% (22/31), foram gatos sem raça definida e 28% (9/31), com raça. O gráfico 10 mostra esta distribuição.

Gráfico 10 - Distribuição dos gatos segundo a presença de raça definida ou não

Dos animais com raça definida, 67% (6/9) foram machos e 33% (3/9), fêmeas. Dos gatos sem raça definida, 60% (13/22) foram machos e 40% (9/22) fêmeas, como apresentado no gráfico 11. No gráfico 12 está apresentada a distribuição dos gatos segundo a raça e gênero.

Gráfico 11 - Distribuição dos gatos em relação ao gênero e presença de raça definida (CRD) ou não (SRD)

Gráfico 12 - Distribuição das raças dos gatos segundo o gênero

A idade média e o desvio padrão foram de $6,50 \pm 4,74$ anos na população dos gatos. Quanto a faixa etária, 26% (8/31) representaram o grupo dos jovens com idade inferior de 6 meses até 2 anos de idade, 35% (11/31) foram os adultos com idade superior a dois anos até 8 anos, e 39% (12/31) representaram o grupos dos idosos com idade superior a 8 anos de idade como demonstrado no gráfico 13.

Gráfico 13 - Distribuição percentual dos gatos segundo as faixas etárias

Na população jovem 75% (6/8) eram machos e 25% (2/8) fêmeas, na adulta, 54% (6/11) machos e 46% (5/11) fêmeas, e, quanto aos idosos, foram 59% (7/12) machos e 41% (5/12) fêmeas. O gráfico 14 apresenta a distribuição dos gatos segundo gênero e faixa etária.

Gráfico 14 - Distribuição dos gatos segundo gênero e faixa etária

Assim, a maioria dos gatos estudados foi indivíduos machos, sem raça definida, adultos a idosos, com idade média de $6,50 \pm 4,74$ anos.

5.2 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DA HELICOBACTERIOSE GÁSTRICA EM CÃES E GATOS NECROPSIADOS JUNTO AO SERVIÇO DE PATOLOGIA ANIMAL – HOVET-USP

Determinação da frequência de ocorrência de helicobacteriose para os cães e gatos foi apresentada no item 5.2.1 e 5.2.2 segundo o teste ouro adotado.

5.2.1 Determinação da frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica em cães

A frequência de ocorrência de helicobacteriose nos cães foi 57% (50/88). O gráfico 15 apresenta a distribuição de cães positivos e negativos para a pesquisa de *Helicobacter spp* na mucosa gástrica.

Gráfico 15 -Distribuição do percentual dos cães positivos e negativos para *Helicobacter spp* na mucosa gástrica pela histopatologia corada em HE

A distribuição dos cães positivos e negativos segundo o gênero está no gráfico 16. Na tabela 1 apresentamos a distribuição conjunta do gênero e os resultados do teste para *Helicobacter spp*.

Tabela 1 – Distribuição da frequência de helicobacteriose segundo o gênero dos cães - São Paulo - 2013

		HE HELICOBACTER		Total
		NÃO	SIM	
SEXO	Macho	n	18	31
		%	36.7%	63.3%
	Fêmea	n	20	19
		%	51.3%	48.7%
Total		n	38	50
		%	43.2%	56.8%

Dentre os machos, 63,3% tiveram resultado positivo para infecção por *Helicobacter spp* (31/49), para as fêmeas esse percentual foi de 48,7% (19/39).

Não foi possível evidenciar associação significativa entre o gênero e a frequência de helicobacteriose. A estatística do teste foi igual a $X^2 = 1.873$ com $p = 0,171$.

Gráfico 16 - Distribuição dos cães em relação ao número de machos e fêmeas positivos e negativos para *Helicobacter spp*

Quanto à raça dos cães e presença de *Helicobacter spp*, apresentamos na tabela 2 a distribuição conjunta dessas variáveis.

Tabela 2 – Distribuição conjunta de raça definida dos cães e presença de *Helicobacter* - São Paulo - 2013

RAÇA DEFINIDA		HE HELICOBACTER		Total
		NÃO	SIM	
	NÃO	n	6	12
		%	33.3%	66.7%
	SIM	n	32	38
		%	45.7%	54.3%
Total		n	38	50
		%	43.2%	56.8%

Dos 70 animais com raça definida, 54,3% (38/70) foram positivos e 45,7% (32/70) negativos; dos cães sem raça definida, 66,7% (12/18) apresentaram infecção por *Helicobacter spp* e 33,3% (6/18) negativos. Não houve associação significativa entre raça definida e infecção por *Helicobacter spp*, ($X^2=0,461$ com $p=0,497$).

A análise segundo o gênero e a raça, está apresentada na tabela 3, a qual, demonstrou que as fêmeas com raça definida e positivas representaram 46,7% (14/30) e as fêmeas positivas e sem raça foram de 55,6% (5/9). As fêmeas negativas e sem raça representaram 44,4% (4/9) e as com raça e negativas, 53,3% (16/30).

Tabela 3 – Distribuição do gênero, raça definida e presença de *Helicobacter spp* - São Paulo - 2013

SEXO				HE HELICOBACTER		Total
				NÃO	SIM	
Macho	RAÇA DEFINIDA	NÃO	n	2	7	9
			%	22,2%	77,8%	100,0%
		SIM	n	16	24	40
			%	40,0%	60,0%	100,0%
	Total		n	18	31	49
			%	36,7%	63,3%	100,0%
Fêmea	RAÇA DEFINIDA	NÃO	n	4	5	9
			%	44,4%	55,6%	100,0%
		SIM	n	16	14	30
			%	53,3%	46,7%	100,0%
	Total		n	20	19	39
			%	51,3%	48,7%	100,0%

Não foram evidenciadas associações significativas entres as variáveis de gênero, raça definida e o resultado para *Helicobacter spp*. Para os machos a estatística do teste foi igual a $X^2=0,381$ com $p=0,537$. Para as fêmeas o resultado do teste de estatística foi igual a $X^2=0,008$ com $p=0,930$.

Os machos com raça definida e positivos para *Helicobacter spp* representaram 60% (24/40), enquanto que os machos positivos e sem raça definida foram de, 77,8% (7/8). Os machos sem raça definida e negativos representaram 22,2% (2/9) e machos com raça definida e negativos foram 40% (16/40).

A distribuição dos resultados para a *Helicobacter spp* segundo a faixa etária dos cães está apresentada na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição dos resultados segundo a faixa etária dos cães - São Paulo - 2013

			HE HELICOBACTER		Total
			NÃO	SIM	
FAIXA ETÁRIA	JOVEM	N	6	12	18
		%	33,3%	66,7%	100,0%
	ADULTO	N	9	22	31
		%	29,0%	71,0%	100,0%
	IDOSO	N	23	16	39
		%	59,0%	41,0%	100,0%
Total		N	38	50	88
		%	43,2%	56,8%	100,0%

Quanto à faixa etária e infecção por *Helicobacter spp*, a ocorrência de frequência foi maior nos adultos com 71% (22/31), seguida pelos jovens 66,7% (12/18) e idosos 41%

(16/39). Foi detectada associação significativa entre a presença de infecção e a faixa etária, a estatística do teste foi igual a $X^2=7,206$ com $p=0,027$. A presença dessa bactéria diminuiu significativamente nos cães idosos.

Estratificando segundo o gênero, temos a distribuição da tabela 5.

A tabela 5 exibe o número de fêmeas segundo a faixa etária e a presença ou não de infecção por *Helicobacter* spp. As fêmeas jovens positivas somaram 75% (6/8) e 25% (2/8) negativas. As fêmeas adultas envolveram 50% (5/10) positivas e 50% (5/10) de negativas e as idosas representaram 38% (8/21) positivas e 62% (13/21) negativas. O teste de associação teve estatística igual a $X^2=3,269$ com $p=0,195$, não havendo significância estatística para as fêmeas.

Tabela 5 – Distribuição do gênero, faixa etária e presença da *Helicobacter* spp - São Paulo - 2013

SEXO				HE HELICOBACTER		Total
				NÃO	SIM	
Macho	FAIXA ETÁRIA	JOVEM	n	4	6	10
			%	40,0%	60,0%	100,0%
		ADULTO	n	4	17	21
			%	19,0%	81,0%	100,0%
		IDOSO	n	10	8	18
			%	55,6%	44,4%	100,0%
	Total	n	18	31	49	
		%	36,7%	63,3%	100,0%	
Fêmea	FAIXA ETÁRIA	JOVEM	n	2	6	8
			%	25,0%	75,0%	100,0%
		ADULTO	n	5	5	10
			%	50,0%	50,0%	100,0%
		IDOSO	n	13	8	21
			%	61,9%	38,1%	100,0%
	Total	n	20	19	39	
		%	51,3%	48,7%	100,0%	

A tabela 5 também exibe a relação entre a faixa etária dos machos com a infecção por *Helicobacter* spp. O grupo dos machos jovens teve 60% (6/10) positivos e 40% (4/10) negativos. O grupo dos machos adultos envolveu 81% (17/21) positivos e 19% (4/21) de negativos e o grupo dos idosos representou 44% (8/18) positivos e 56% (10/18) negativos. Foi detectada associação significativa entre machos, a faixa etária e presença da *Helicobacter* spp, a estatística do teste foi igual a $X^2= 5,797$ com $p=0,05$. Os cães adultos apresentam maior percentual de infecção pelo *Helicobacter* spp relativamente aos idosos.

Na tabela 6 apresentamos a distribuição conjunta do porte dos cães e o resultado para a *Helicobacter ssp*.

Tabela 6 – Distribuição do porte dos cães segundo o resultado da presença de *Helicobacter ssp* - São Paulo - 2013

PORTE		HE HELICOBACTER		Total
		NÃO	SIM	
PEQUENO	N	10	10	20
	%	50,0%	50,0%	100,0%
MÉDIO	N	13	16	29
	%	44,8%	55,2%	100,0%
GRANDE	N	12	19	31
	%	38,7%	61,3%	100,0%
GIGANTE	N	3	5	8
	%	37,5%	62,5%	100,0%
Total	N	38	50	88
	%	43,2%	56,8%	100,0%

Quanto ao porte dos cães e presença de infecção, os animais de pequeno porte foram 50% (10/20) positivos e 50% (10/20) negativos. Os cães de médio porte ficaram com 55,2% (16/29) de animais positivos e, 44,8% (13/29), negativos. Os cães de grande porte exibiram 61,3% (19/31) de positivos, e, 38,7% (12/31) de negativos. Os grupos dos animais gigantes ficaram com 62,5% (5/8) de animais positivos, e, 37,5% (3/8) de animais negativos. A estatística do teste de associação foi igual a $X^2=0,769$ com $p=0,857$. Não foi então evidenciada associação significativa entre o porte dos cães e a presença da *Helicobacter ssp*.

Estratificando pelo gênero, teremos o resultado apresentado na tabela 7, na qual o número de fêmeas positivas e negativas com porte pequeno representou 45% (5/11) e 55% (6/11) respectivamente. O grupo de fêmeas com porte médio obteve 45% (5/11) de positivas e 55% (6/11) de negativas. O grupo de fêmeas com porte grande representou 53% (7/13) positivas e 47% (6/13) de negativas. O grupo de fêmeas com porte gigante representou 50% (2/4) positivas e 50% (2/4) de negativas.

Tabela 7 – Distribuição segundo o porte dos cães e presença da *Helicobacter ssp* por gênero - São Paulo - 2013

SEXO				HE HELICOBACTER		Total
				NÃO	SIM	
Macho	PORTE	PEQUENO	N	4	5	9
			%	44,4%	55,6%	100,0%
		MÉDIO	N	7	11	18
			%	38,9%	61,1%	100,0%
		GRANDE	N	6	12	18
			%	33,3%	66,7%	100,0%
		GIGANTE	N	1	3	4
			%	25,0%	75,0%	100,0%
		Total	N	18	31	49
			%	36,7%	63,3%	100,0%
Fêmea	PORTE	PEQUENO	N	6	5	11
			%	54,5%	45,5%	100,0%
		MÉDIO	N	6	5	11
			%	54,5%	45,5%	100,0%
		GRANDE	N	6	7	13
			%	46,2%	53,8%	100,0%
		GIGANTE	N	2	2	4
			%	50,0%	50,0%	100,0%
		Total	N	20	19	39
			%	51,3%	48,7%	100,0%

A estatística do teste teve valor igual a $X^2=0,233$ com $p=0,972$, indicando não haver diferença significativa entre as fêmeas infectadas ou não e o porte corpóreo.

O número de machos positivos e negativos com porte pequeno representou 56% (5/9) e 44% (4/9) respectivamente. O grupo de machos com porte médio obteve 61% (11/18) de positivos e 39% (7/18) de negativos. O grupo de machos com porte grande representou 67% (12/18) positivos e 33% (6/18) de negativos. O grupo de machos com porte gigante representou 75% (3/4) positivos e 25% (1/4) de negativos. A estatística do teste foi igual a $X^2=0,602$ com $p=0,896$, indicando que não foi identificada diferença significativa entre os cães machos em relação ao porte e presença de helicobacteriose.

5.2.2 Determinação da frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica em gatos

A frequência de ocorrência de helicobacteriose em gatos foi 87% (27/31). O gráfico 17 mostra a distribuição da frequência de ocorrência de helicobacteriose em gatos.

Gráfico 17- Distribuição da frequência de ocorrência de helicobacteriose nos gatos

Na tabela 8 apresentamos a distribuição conjunta do gênero dos gatos e presença da *Helicobacter ssp.*

Tabela 8 – Distribuição da presença de *Helicobacter ssp* segundo o gênero dos gatos - São Paulo - 2013

			HE HELICOBACTER		Total
			NÃO	SIM	
Gênero	Fêmea	n	2	10	12
		%	16,7%	83,3%	100,0%
	Macho	n	2	17	19
		%	10,5%	89,5%	100,0%
Total		n	4	27	31
		%	12,9%	87,1%	100,0%

Segundo o gênero e presença de helicobacteriose, 89,5% (17/19) dos machos e 83,3% (10/12) das fêmeas tiveram resultado positivo.

A estatística do teste de associação teve valor igual a $X^2 = 0,001$ com $p = 0,999$ indicando não haver associação significativa entre ocorrência de helicobacteriose e gênero dos gatos

A distribuição da helicobacteriose nos gatos segundo a raça está apresentada na tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição dos gatos com helicobacteriose segundo a raça - São Paulo - 2013

Raça	NÃO	n	HE HELICOBACTER		Total
			NÃO	SIM	
Raça Definida	NÃO	n	3	19	22
		%	13,6%	86,4%	100,0%
	SIM	n	1	8	9
		%	11,1%	88,9%	100,0%
Total		n	4	27	31
		%	12,9%	87,1%	100,0%

Os gatos com raça definida e positivos representaram 88,9% (8/9) e os gatos sem raça e positivos representaram 86,4% (19/22).

O teste de associação teve estatística igual a $X^2=0,001$ com $p=0,999$, não foi detectada associação significativa entre a ocorrência de helicobacteriose nos gatos com ou sem raça.

Na tabela 10 apresentamos a distribuição do gênero e raça dos gatos e a presença de *Helicobacter* spp.

Tabela 10 – Distribuição do gênero dos gatos e raça definida segundo a presença de *Helicobacter* spp - São Paulo - 2013

Gênero				HE HELICOBACTER		Total
				NÃO	SIM	
Fêmeas	Raça Definida	NÃO	N	1	8	9
			%	11,1%	88,9%	100,0%
		SIM	N	1	2	3
			%	33,3%	66,7%	100,0%
	Total		N	2	10	12
			%	16,7%	83,3%	100,0%
Machos	Raça Definida	NÃO	N	2	11	13
			%	15,4%	84,6%	100,0%
		SIM	N	0	6	6
			%	0,0%	100,0%	100,0%
	Total		N	2	17	19
			%	10,5%	89,5%	100,0%

Dentre as fêmeas, com raça definida, 66,7% (2/3) apresentavam *Helicobacter*, para o grupo sem raça definida esse percentual foi de 88,9% (8/9). O teste de associação teve nesse caso estatística igual a $X^2=0,001$ com $p=0,999$ indicando não haver associação entre elas. Devemos observar que o número de observações é bastante reduzido e que um maior número de animais deverá ser avaliado para que seja ratificado esse resultado.

Dentre os machos com raça definida, 100% (6/6) apresentavam a infecção por *Helicobacter* spp, e 84,6% (11/13) para os gatos sem raça definida. A estatística do teste de

associação foi igual a $X^2 = 0,045$ com $p = 0,832$ indicando não haver associação significativa entre os machos com helicobacteriose e raça definida.

Na tabela 11 apresentamos a distribuição conjunta da faixa etária e presença de *Helicobacter* spp segundo o gênero.

Tabela 11 – Distribuição da Helicobacteriose por faixa etária nos gatos - São Paulo - 2013

		HE HELICOBACTER		Total	
		NÃO	SIM		
Faixa etária	Adulto	n	1	10	11
		%	9,1%	90,9%	100,0%
	Idoso	n	1	11	12
		%	8,3%	91,7%	100,0%
	Jovem	n	2	6	8
		%	25,0%	75,0%	100,0%
Total	n	4	27	31	
	%	12,9%	87,1%	100,0%	

A distribuição da helicobacteriose segundo as faixas etárias dos gatos foi: 75% (6/8) nos jovens, 90,9% (9/11) nos adultos e 91,7% (11/12) nos gatos idosos. O teste de associação teve estatística igual a $X^2 = 1,258$ com $p = 0,533$, não evidenciando associação entre as variáveis. Devemos observar que o número de animais é reduzido e que esse resultado deve ser confirmado com base num número maior de observações.

Na tabela 12 apresentamos a distribuição conjunta da faixa etária e presença de *Helicobacter* spp, estratificadas pelo gênero dos gatos.

Tabela 12 – Distribuição do resultado da infecção por *Helicobacter* spp por faixa etária e gênero dos felinos - São Paulo - 2013

Gênero				HE HELICOBACTER		Total
				NÃO	SIM	
Fêmeas	FAIXA ETÁRIA	ADULTA	N	1	4	5
			%	20,0%	80,0%	100,0%
		IDOSA	N	0	5	5
			%	0,0%	100,0%	100,0%
		JOVEM	N	1	1	2
			%	50,0%	50,0%	100,0%
	Total		N	2	10	12
			%	16,7%	83,3%	100,0%
Machos	FAIXA ETÁRIA	ADULTO	N	0	6	6
			%	0,0%	100,0%	100,0%
		IDOSO	N	1	6	7
			%	14,3%	85,7%	100,0%
		JOVEM	N	1	5	6
			%	16,7%	83,3%	100,0%
	Total		N	2	17	19
			%	10,5%	89,5%	100,0%

Devemos observar que as quantidades de animais são pequenas e que, portanto, as porcentagens apresentadas precisam ser ratificadas com base num número maior de animais.

O grupo das fêmeas jovens obteve 50% (1/2) positivas e 50% (1/2) negativas. O grupo das fêmeas adultas envolveu 80% (4/5) positivas e 20% (1/5) de negativas e o grupo dos idosos representou 100 (5/5) positivas, o teste de associação teve estatística igual a $X^2 = 3,037$ com $p = 0,219$, não sendo possível com esse número de dados evidenciar a associação.

A tabela 12 também exhibe a relação entre a faixa etária dos machos com a infecção por *Helicobacter* spp. O grupo dos machos jovens obteve 83,3% (5/6) positivos e 16,7% (1/6) negativos. O grupo dos machos adultos envolveu 100% (6/6) positivos e o grupo dos idosos representou 85,7% (6/7) positivos e 14,3% (1/7) negativos, o teste de associação nesse caso teve estatística igual a $X^2 = 1,638$ com $p = 0,441$, não sendo possível com esse número de dados evidenciar a associação.

5.3 RESULTADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE HELICOBACTERIOSE GÁSTRICA

Os resultados estão apresentados por método de diagnóstico para os cães e gatos em separado e a análise estatística foi baseada nas medidas de sensibilidade, especificidade, valor

preditivo positivo, valor preditivo negativo, taxas de falso positivo e negativo, precisão global e índice de Youden, para a comparação entre métodos diagnósticos.

5.3.1 Comparação entre os métodos para o diagnóstico de helicobacteriose gástrica nos cães

Os resultados comparativos dos métodos aplicados aos cães estão apresentados nos itens 5.3.1.1 a 5.3.1.4.

Na tabela 13 apresentamos os resultados de todas as estatísticas relativas aos quatro métodos objeto de comparação com o método ouro (HE).

Tabela 13 – Estatísticas relativas aos métodos em relação ao método ouro – HE -São Paulo – 2013

	HE*	Citologia	Urease	WS	IHQ
Frequência de Ocorrência	57%	42%	67%	47%	48%
Sensibilidade	-	66% (0,512-0,787)	90% (0,781-0,966)	78% (0,640-0,884)	82% (0,685-0,914)
Especificidade	-	89.5% (0,752--0,970)	63.2% (0,459-0,781)	92.1% (0,782-0,983)	94.7% (0,822-0,993)
Taxa de Falso Negativos	-	34%	10%	22%	18%
Taxa de Falso Positivos	-	10.5%	36.8%	7.9%	5.3%%
	HE*	Citologia	Urease	WS	IHQ
Valor Preditivo Positivo	-	89.2%	76.3%	92.9%	95.3%
Valor Preditivo Negativo	-	66.7%	82.8%	76.1%	80%
Precisão Global	-	76.1%	78.4%	84.1%	87.5%
Índice de Youden	-	55.5%	53.2%	70.1%	76.7%
Índice Kappa	-	0,53	0,55	0,68	0,75

*Teste ouro. HE: Hematoxilina e eosina.; Urease: Teste rápido de urease.; WS: Wartin-Starry.; IHQ: Imunohistoquímica.

O método para detecção da *Helicobacter spp* em cães que apresentou a maior precisão global e maior índice de Youden foi o IHQ.

5.3.1.1 Comparação entre a citologia e a histopatologia para os cães

A frequência de ocorrência pelo método de citologia identificou 42% (37/88) animais positivos para helicobacteriose.

Na tabela 14 apresentamos a distribuição conjunta dos resultados do método padrão – HE e o método citológico.

Tabela 14 – Associação entre o método citológico e método padrão – HE - São Paulo - 2013

			HE		Total
			Negativo	Positivo	
CITOLOGIA	Negativo	n	34	17	51
		%	89,5%	34,0%	58,0%
	Positivo	n	4	33	37
		%	10,5%	66,0%	42,0%
Total		n	38	50	88
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Houve associação estatística significativa entre os testes, $p < 0,0001$. A sensibilidade do método de citologia para o diagnóstico foi 66% e a especificidade 89,5%. O valor preditivo positivo - VPP foi 89,2%, ou seja, 33 cães foram verdadeiros positivos e o valor preditivo negativo 66,7%, sendo 34 cães verdadeiros negativos. A precisão global foi igual a 76,1% e o índice de Youden foi igual a 55,5%. A Tabela 14 mostra estes resultados além de outras medidas.

5.3.1.2 Comparação entre o teste rápido de urease e a histopatologia nos cães

Na tabela 15 apresentamos a distribuição conjunta do método de diagnóstico de urease e o método ouro – HE.

Tabela 15 - Associação entre o método de urease e método padrão – HE - São Paulo - 2013

Associação entre o método de área e método padrão				HE - São Paulo	2019
			HE		Total
			Negativo	Positivo	
TRU	Negativo	n	24	5	29
		%	63,2%	10,0%	33,0%
	Positivo	n	14	45	59
		%	36,8%	90,0%	67,0%
Total	n	38	50	88	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

A frequência de ocorrência pelo método de urease foi 67% (59/88). Houve associação significativa entre os métodos, $p < 0,0001$. A sensibilidade do TRU foi de 90% e a especificidade 63,2%. A precisão global foi igual a 78,4% e o Índice de Youden foi igual a 53,2%. O valor preditivo positivo foi 76,3% e valor preditivo negativo 82,8%. A tabela 15 apresenta estes e outros resultados.

5.3.1.3 Comparação entre o método Warthin starry e a histopatologia nos cães

Na tabela 16 apresentamos a distribuição conjunta dos resultados do método Wartin-Starry e método ouro – HE.

Tabela 16 – Associação entre os resultados do método WS e o método ouro – HE - São Paulo - 2013

		HE			Total
		Negativo	Positivo		
WS	Negativo	n	35	11	46
		%	92,1%	22,0%	52,3%
	Positivo	n	3	39	42
		%	7,9%	78,0%	47,7%
Total	n	38	50	88	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

A frequência de ocorrência de helicobacteriose pelo método WS foi 47% (42/88). Houve associação significativa entre os métodos, $p < 0,0001$. A sensibilidade foi de 78% e a especificidade 92,1%. O valor preditivo positivo foi 92,9% e o valor preditivo negativo, 76,1%. A precisão global foi igual a 84,1% e o índice de Youden foi igual a 70,1%. A tabela 16 apresenta estes e outros resultados.

5.3.1.4 Comparação entre a reação imuno histoquímica e a histopatologia para o diagnóstico em cães

Na tabela 17 apresentamos a distribuição conjunta dos resultados do método IHQ e método ouro – HE.

Tabela 17– Associação entre os resultados do método IHQ e o método Ouro – HE - São Paulo - 2013

			HE		Total
			Negativo	Positivo	
IHQ	Negativo	n	36	9	45
		%	94,7%	18,0%	51,1%
	Positivo	n	2	41	43
		%	5,3%	82,0%	48,9%
Total		n	38	50	88
		%	100,0%	100,0%	100,0%

A frequência de ocorrência pelo método de imuno histoquímica foi 49% (43/88). Houve associação significativa entre os métodos, $p < 0,0001$. A sensibilidade foi de 82% e a especificidade 94,7%. O valor preditivo positivo foi de 95,3% e valor preditivo negativo, 80%. A precisão global do método foi igual a 87,5% e o Índice de Youden foi igual a 76,7%. A tabela 17 apresenta estes e outros resultados.

Na tabela 18 são apresentados os resultados de comparação entre os testes quanto a especificidade, sensibilidade, índice Youden, preço de custo e prazo de realização de teste de diagnóstico.

Tabela 18- Comparação entre os métodos de diagnósticos - São Paulo - 2013.

Testes	Especificidade	Sensibilidade	Youden	Custo	Prazo
Citologia	89%	66%	55,5%	R\$30,00- R\$85,00	Até 3 dias
Teste rápido de urease	63%	90%	53,2%	R\$ 1,00 *	Até 24horas
Warthin starry	92%	78%	70,1%	R\$ 55,00- R\$ 120,00**	Até 15 dias
Imuno-histoquímica	94%	82%	76,7%	R\$300,00- R\$ 380,00	Até 15 dias

*Preço referente a uma unidade do produto. ** Valor com exame histopatológico junto. O valor somente da coloração específica varia de R 5,00 a R\$7,00.

5.3.2 Comparação entre os métodos para o diagnóstico de helicobacteriose gástrica nos gatos

Os resultados comparativos dos métodos aplicados aos gatos estão apresentados nos itens 5.3.2.1 a 5.3.2.4.

Na tabela 19 apresentamos os resultados de todas as estatísticas relativas aos quatro métodos objeto de comparação com o método ouro (HE).

Tabela 19 – Estatísticas relativas aos métodos diagnósticos em relação ao método ouro – HE – Felinos - São Paulo - 2013

	HE*	Citologia	Urease	WS	IHQ
Frequência de Ocorrência	87%	87%	77%	80%	90%
Sensibilidade	-	88.9% (0,708-0,976)	85.9% (0,662-0,958)	92.6%% (0,757-0,990)	92.6%
Especificidade	-	100.0% (0,397-1,0)	75% (0,194-0,993)	100.0% (0,397-1,0)	25%
Taxa de Falso Negativos	-	11.1%	14.8%	7.4%	7.4%
Taxa de Falso Positivos	-	0.0%	25%	0.0%	75%
Valor Preditivo Positivo	-	100.0%	95.8%	100.0%	89.3%
Valor Preditivo Negativo	-	57.1%	42.9%	66.7%	33.3%
Precisão Global	-	90.3%	83.9%	93.5%	83.9%
Índice de Youden	-	88.9%	60.2%	92.6%	17.6%
Índice Kappa	-	0,67	0,46	0,76	0,2

*Teste ouro. HE: Hematoxilina e eosina.; Urease: Teste rápido de urease.; WS: Wartin-Starry.; IHQ: Imunohistoquímica.

Para os felinos o melhor método foi o WS que apresentou maior precisão global e maior Índice de Youden.

5.3.2.1 Comparação entre a citologia e a histopatologia para os gatos

A frequência de ocorrência pelo método de citologia identificou 87% (27/31) de gatos positivos. Houve associação significativa entre os testes, $p < 0,0011$. A sensibilidade do método de citologia para o diagnóstico foi 88,9% e a especificidade 100%. A precisão global desse método foi igual a 90,3% e o Índice de Youden foi igual a 88,9%. A tabela 20 mostra estes e outros resultados.

Tabela 20 – Associação entre os resultados do método citológico e o método ouro para os felinos - São Paulo - 2013

Reinos - São Paulo - 2015					
			HE		Total
			Negativo	Positivo	
Citologia	Negativo	n	4	3	7
		%	100,0%	11,1%	22,6%
	Positivo	n	0	24	24
		%	0,0%	88,9%	77,4%
Total		n	4	27	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%

5.3.2.2 Comparação entre o teste rápido de urease e a histopatologia nos gatos

Na tabela 21 apresentamos a distribuição conjunta dos resultados do método urease e do método ouro – HE para os felinos. São Paulo, 2013.

Tabela 21 – Associação entre os resultados dos métodos urease e método ouro – HE -São Paulo - 2013

			HE		Total
			Negativo	Positivo	
UREASE	Negativo	n	3	4	7
		%	75,0%	14,8%	22,6%
	Positivo	n	1	23	24
		%	25,0%	85,2%	77,4%
Total		n	4	27	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%

A frequência de ocorrência pelo método de urease foi 77% (24/31). Houve associação significativa entre os testes, $p = 0,015$. A sensibilidade foi de 85,2% e a especificidade 75%. A precisão global desse método foi igual a 83,9% e o Índice de Youden foi igual a 60,2%. A tabela 21 apresenta estes e outros resultados.

5.3.2.3 Comparação entre o Warthin Starry e a Histopatologia nos gatos

Na tabela 22 apresentamos a distribuição conjunta dos resultados do método Warthin starry e do método ouro – HE para os felinos.

Tabela 22 – Associação entre os resultados dos métodos WS e método ouro – HE - São Paulo - 2013

		HE		Total
		Negativo	Positivo	
WS	Negativo	n	4	2
		%	100,0%	7,4%
	Positivo	n	0	25
		%	0,0%	92,6%
Total	n	4	27	31
	%	100,0%	100,0%	100,0%

A frequência de ocorrência pelo método de WS foi 80 % (25/31). Houve associação significativa entre os métodos, $p = 0,0005$. A sensibilidade foi de 92,6% e a especificidade 100%. A precisão global foi igual a 93,5% e o índice de Youden foi igual a 92,6%. A tabela 22 apresenta os resultados da comparação entre esse e outros métodos.

5.3.2.4 Comparação entre a reação imuno-histoquímica e a histopatologia nos gatos

Na tabela 23 apresentamos a distribuição conjunta dos resultados do método imuno-histoquímico - IHQ e do método ouro – HE para os felinos.

Tabela 23 – Associação entre os resultados dos métodos IHQ e método ouro – HE - São Paulo - 2013

			HE		Total
			Negativo	Positivo	
IHQ	Negativo	n	1	2	3
		%	25,0%	7,4%	9,7%
	Positivo	n	3	25	28
		%	75,0%	92,6%	90,3%
Total		n	4	27	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%

A frequência de ocorrência pelo método de imuno-histoquímica foi 90% (28/31). Houve associação significativa entre os métodos, $p < 0,0001$. A sensibilidade foi de 92,6% e a especificidade 25%. A precisão global do método foi igual a 83,9% e o Índice de Youden foi igual a 17,6%. A tabela 23 apresenta estes e outros resultados.

Na tabela 24 estão apresentados os resultados para comparação entre os métodos de diagnósticos para os felinos segundo sensibilidade, especificidade, índice Youden, preço de custo e prazo para a realização de cada teste.

Tabela 24- Comparação entre os métodos de diagnósticos para os felinos segundo sensibilidade, especificidade, índice Youden, preço de custo e prazo para a realização de cada teste - São Paulo - 2013

Testes	Especificidade	Sensibilidade	Youden	Custo	Prazo
Citologia	100%	88%	88,9%	R\$30,00- R\$85,00	Até 3 dias
Teste Rápido de Urease	75%	85%	60,2%	R\$ 1,00 *	Até 24horas
Warthin starry	100%	92%	92,6%	R\$ 55,00-R\$ 120,00**	Até 15 dias
Imuno-histoquímica	25%	92%	17,6%	R\$300,00-R\$ 380,00	Até 15 dias

*Preço referente a uma unidade do produto. ** Valor com exame histopatológico junto. O valor somente da coloração específica varia de R 5,00 a R\$7,00.

Para os gatos, o teste de diagnóstico de menor preço, custo e prazo, para a realização aliado a melhor sensibilidade, especificidade e índice de Youden é a histoquímica com WS, seguido do exame citológico nas condições em que foram realizadas as comparações.

O teste de urease mostrou-se o mais barato e mais rápido com resultados obtidos em até 24 horas. O segundo teste mais barato incluiu a citologia com prazo de até 3 dias úteis. O WS e a IHQ em conjunto com a histopatologia, foram os mais caros e com maior prazo para a emissão de resultados.

6 DISCUSSÃO

A discussão foi subdividida em helicobacteriose em cães e em gatos segundo os objetivos do estudo.

Estudo da Helicobacteriose em Cães: frequência de ocorrência e dados epidemiológicos

A frequência de ocorrência da helicobacteriose gástrica em cães varia na dependência da população estudada, da origem da amostra e do método de diagnóstico escolhido.

A população de cães definida neste estudo se caracterizou pelo predomínio de cães machos, adultos a idosos, com raça definida que foram necropsiados juntos ao Serviço de Patologia Animal. O perfil dos cães estudados é similar ao perfil dos cães domiciliados na região de São Paulo quanto ao gênero e faixa etária, porém difere quanto à raça, uma vez que os cães domiciliados em São Paulo são em sua maioria sem raça definida (MAGNABOSCO et al., 2006; GARCIA, 2009).

Neste trabalho, assim como em outros estudos, o critério definidor de infecção nas amostras gástricas dos cães foi a observação de uma ou mais bactérias helicoidas e espiraladas no muco gástrico presente na superfície do epitélio foveolar e no interior das glândulas gástricas utilizando a coloração de HE (SOUZA et al., 2004; ANACLETO, 2010; VIEIRA et al., 2012; CHUNG et al., 2013; EKMAN et al., 2013).

A frequência de ocorrência de infecção por *Helicobacter* spp nos cães necropsiados estudados foi 57% (50/88). Essa frequência foi abaixo da obtida em outros estudos, que utilizaram tanto amostras endoscópicas, como provenientes de animais necropsiados logo após a eutanásia. Os autores referem frequência de ocorrência que varia de 67 a 100% em animais clinicamente saudáveis e de 72 a 90% em cães com êmese recorrentes, e em 100% de cães da raça Beagle provenientes de biotérios (HERMANN et al., 1995; EATON et al., 1996; JALAVA, 1998; NEIGER, 1998; DIKER, 2002; HAESEBROUCK et al., 2009; ANACLETO, 2010).

Eaton et al. (1996) em seu estudo sobre a ocorrência de *Helicobacter spp* em cães provenientes de abrigos, laboratórios e serviço de patologia, demonstraram que a infecção por *Helicobacter spp* é amplamente distribuída na espécie canina. Destaca-se que nos grupos de cães estudados por esses autores, com fragmentos colhidos por endoscopia e necropsiados até uma hora, apresentaram 100% de positividade, enquanto os cães necropsiados até 24 horas apresentaram 67%. Nenhum destes cães apresentavam histórico de gastropatia, as idades foram variadas e a distribuição de machos e fêmeas não foi equilibrada. Embora os autores não tenham discutido a variação entre as frequências de ocorrência nas amostras analisadas, acreditamos que o tempo entre a coleta das amostras (endoscopia, 1 hora e 24 horas após o óbito) e a análise possa também ter interferido nestes resultados a semelhança do que ocorreu na nossa pesquisa.

A frequência de ocorrência abaixo de 60% também foi relatada por outros pesquisadores como por Prachasilpchai et al. (2007), que ao compararem a presença de helicobacteriose utilizando diferentes métodos como o HE, o WS, a IHQ e o PCR, em 75 cães provenientes de necropsia, obtiveram apenas 17,3% de positividade (13/75) das amostras para as bactérias pelo HE.

Estudos demonstraram que o gênero *Helicobacter* possui a capacidade de mudar sua morfologia para cocos, intra ou extracelular, alterar o metabolismo e padrões de crescimento quando submetidos a condições inadequadas para sua manutenção no ambiente gástrico, como a redução do substrato nutricional, aumento da tensão de oxigênio, alcalinização do pH gástrico, aumento da temperatura e a exposição a diferentes antibióticos (CATRENICH; MAKIN, 1991; AZEVEDO et al., 2007). A mudança na morfologia para a estrutura de cocos no conteúdo gástrico após o óbito pode ter dificultado a identificação das bactérias, acrescenta-se que a proliferação de outras bactérias após o óbito também pode ter impossibilitado a caracterização precisa da bactéria para o gênero *Helicobacter* pela histopatologia de rotina, levando a falsos negativos e baixa frequência de ocorrência nas amostras provenientes de necrópsia.

A população de cães estudada incluiu animais que vieram a óbito por diferentes causas de morte e que poderiam estar sob tratamento medicamentoso durante o período de doença. A administração de medicamentos como antibióticos de amplo espectro, bloqueadores de receptor de histamina (H_2) e inibidores da bomba de prótons pode influenciar no diagnóstico histopatológico da bactéria (GALATI et al., 2013). O estudo realizado por Anacleto (2010),

demonstrou que 100% dos animais não apresentaram infecção por *Helicobacter spp* pela histopatologia por HE e pelo teste de urease após terapia de sete dias com administração de claritromicina, amoxicilina e lansoprazol. Já Costa et al. (2009) utilizaram terapia tríplice com amoxicilina, metronidazol e omeprazol no tratamento de 21 cães infectados por *Helicobacter spp.* e erradicaram o agente utilizando como métodos diagnósticos a histopatologia por HE e o teste de urease.

A infecção por *Helicobacter spp* nos cães não apresentou associação significativa com o gênero, raça e porte corpóreo dos animais quando analisados individualmente. A ausência de associação entre gênero e infecção já foi anteriormente apontada por outros autores (SOUZA, 2004; LANZONI et al., 2011; VIEIRA, 2012). Vários estudos utilizaram animais de diferentes raças, porte e idades e não analisaram a associação destes com a infecção (HERMANNNS et al., 1995; CASTIGLIONI et al., 2011). Em adição, com relação à raça e ao porte dos cães, os artigos utilizaram muitas vezes na casuística cães de canil/ biotérios – como os Beagles, ou cães sem raça definida e nestes artigos também não foram relatadas a associação ou predisposição racial à infecção (GEYER et al., 1993; OTTO, 1994; HERRMANNNS, 1995; HAPPONEN et al., 1996; PAPASOULIOTIS, 1997; NEIGER, 1998).

Woodward et al. (2000) estimaram a prevalência de *Helicobacter pylori* na população de Glasgow na Escócia e mostraram maior prevalência em homens do que em mulheres. Porém, outros estudos em humanos não encontraram associação entre o gênero e a infecção pelo *H.pylori* (BEGUE et al., 1998; KAWASAKI, 1998). Assim, helicobacteriose gástrica em cães não apresenta associação com gênero, raça e porte dos animais estudados independente da origem das amostras analisadas e dos métodos de diagnóstico utilizados. A literatura relacionada ao estudo de cães com helicobacteriose não é clara em apontar os resultados das análises de associação entre as características epidemiológicas da população e ocorrência de infecção por helicobacteriose.

Nosso estudo mostrou associação significativa entre a presença de infecção por *Helicobacter spp* e faixa etária dos cães, no qual há redução da infecção nos cães idosos. Houve associação significativa para os cães machos e apenas tendência para as fêmeas.

Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por outros estudos na medicina veterinária que, afirmam que a infecção por *Helicobacter spp* ocorre na fase jovem com persistência na fase adulta e diminuição da fase senil (HANNINEN et al., 1998;

SOLNICK; SCHAUER, 2001; CASTIGLIONI et al., 2011). A diminuição da infecção na idade senil pode ser explicada pelo desenvolvimento da resposta imune eficiente nesta idade (MOYAERT, 2009).

Em humanos, a curva de prevalência da infecção pelo *H. pylori* com relação à idade, em geral, demonstra que, na infância, ocorre rápido aumento da taxa de infecção nos cinco primeiros anos de vida e em idosos a cima de 60 anos, a curva atinge um patamar ou entra em leve declínio (OTTO, 1994). Esse declínio pode ser explicado pela gastrite atrófica, na qual há perda do nicho ecológico tornando o microambiente inadequado ao *H. pylori* (LOGAN; WALKER, 2001).

Nos cães jovens, adultos ou idosos não há estudos que comprovem a presença de gastrite atrófica associada à infecção por *Helicobacter spp* que justifique a redução da ocorrência em relação aos animais senis, o diagnóstico das alterações gástricas caninas continua um desafio clínico e anatomopatológico (NEIGER; SIMPSON, 2000; GODMAN et al., 2010).

Diagnóstico da infecção por Helicobacter spp nos cães: comparação dos métodos de diagnóstico

O critério para escolher a histopatologia corada pelo HE como método de diagnóstico de eleição (padrão ouro) no estudo, tanto dos cães como dos gatos, foi baseado na ampla utilização deste método na rotina de medicina veterinária diagnóstica, que possibilita a identificação das bactérias helicoidais e espiraladas, como também da avaliação da resposta tecidual e o diagnóstico de gastrite e/ou neoplasmas concomitantes à infecção. Salientamos que a utilização de amostras gástricas provenientes de necropsia possibilitou o estudo aprofundado das lesões gástricas, amostragem de fragmentos em tamanho suficiente para testar todos os métodos propostos, verificar a concordância entre os métodos e com outros estudos, de forma a se propor ao final a indicação de cada método. As frequências de ocorrência de infecção por *Helicobacter spp* em cães pelos métodos estudados foram em ordem crescente: 42% dos cães foram positivos pela citologia, 47%, pela histoquímica a base de prata (WS), 48%, pela imunohistoquímica, e 67%, pelo TRU. Todos os testes apresentaram associação significativa a histopatologia e com concordância estatística dos acertos variando de moderada a boa entre os resultados de frequência.

A citologia em comparação a histopatologia mostrou associação estatística significativa entre os testes, sensibilidade de 66%, especificidade 89,5% e concordância moderada entre os testes (índice Kappa = 0,53). As sensibilidade e especificidade da citologia como método diagnóstico para *H. pylori* podem variar entre os laboratórios diagnósticos, mas são semelhantes a histopatologia, a apresentam sensibilidade de 90% e especificidade, 95% (OWEN, 2010). Akhter et al. (2007) avaliaram 75 amostras gástricas endoscópicas humanas e obtiveram 81,8% de sensibilidade e 85% de especificidade na citologia quando comparada com o exame histopatológico. Custódio et al. (2005) mostraram que a citologia como método diagnóstico para helicobacteriose gástrica humana apresentou 85,3% de sensibilidade e 50,9% de especificidade. A hipótese para justificar a baixa sensibilidade encontrada (66%) no nosso estudo pode estar no fato do *Helicobacter spp* estar distribuído irregularmente e em densidade variável no muco gástrico, na superfície epitelial, no interior das fovéolas o que dificultaria na amostragem proposta (uma lâmina de cada região gástrica) a identificação do agente. Pondera-se também a possibilidade do agente ter alterado a morfologia para forma de cocos, o que facilmente seria confundido com outras bactérias cocoides presentes no muco gástrico e reduziria a chance de identificação. Este fato pode, por outro lado, explicar que a especificidade foi acima da esperada (89,5%), uma vez que a visibilização da forma espiralada ou helicoidal é característica deste gênero e não permite a confusão com outras bactérias.

Não foram encontrados artigos que avaliaram o nível de concordância entre citologia e histopatologia utilizando o índice Kappa, a determinação da precisão global e do índice Youden para comparar com os resultados obtidos. O cálculo da precisão global e do índice Youden é pouco empregado na medicina veterinária (PAWESKA et al., 2003; GYÖRKE et al., 2011; BOKKEN et al., 2012; MIRCEAN et al., 2012; MC GOWAN et al., 2013). Contudo a avaliação do desempenho do teste com o cálculo do índice Youden mostrou que a citologia teve desempenho moderado (J=55,5%) como método diagnóstico para helicobacteriose. A citologia ficou em terceiro em comparação aos demais testes analisados.

A citologia é considerada um método rápido e barato e ampla aplicação em medicina veterinária (JERGENS et al., 1998). O emprego deste método no diagnóstico de doenças gástricas e de infecção por *Helicobacter spp.* é pouco difundido (JERGENS et al., 1998; WEBB, 2009). Em comparação aos demais métodos analisados, a citologia também requer a endoscopia para coleta das amostras, porém necessita de um citopatologista treinado para o diagnóstico. O custo final da realização deste exame é mais alto do que o TRU.

Assim, com base nos resultados analisados, a citologia gástrica para o diagnóstico de helicobacteriose nas condições do estudo realizado se mostrou um método de precisão moderada, e, portanto, de indicação relativa para o diagnóstico de rotina em amostras provenientes de necropsopia. No caso de amostras endoscópicas, por outro lado, a citologia gástrica poderia também auxiliar no diagnóstico de gastropatias, como apontado por Jergens et al. (1998).

A comparação entre a histopatologia e o TRU mostrou associação estatística significativa entre os testes, sensibilidade de 90% e especificidade de 63,2%. Os resultados obtidos corroboram com o estudo de Happonen e colaboradores (1996) que compararam diferentes testes para detecção de *Helicobacter* spp. no estômago de cães imediatamente após eutanásia. O TRU, avaliado aos 30 e 60 minutos, apresentou sensibilidade de 85,7% e 87,5%, respectivamente nos cães. A especificidade do método foi de 100% independente do intervalo de tempo para a leitura. Em humanos, a sensibilidade do TRU pode variar entre 70 a 100 % (VAIRA, 2000; OWEN, 2010; SEO et al., 2013). Em relação a especificidade, os nossos resultados (63,2%) foram inferiores aos encontrados na literatura (HAPPONEN et al., 1996; VAIRA, 2000; OWEN, 2010). De acordo com Leodolter e colaboradores (2001) resultados falsos positivos podem ocorrer devido a contaminação das amostras gástricas por outras bactérias produtoras de urease quando lidas em um período superior a 24 horas. Neste contexto, o resultado positivo é devido a outras bactérias gástricas produtoras de urease, como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus* sp. (HAPPONEN et al., 1996; NEIGER; SIMPSON, 2000). Além disso, resultados falso negativos no TRU podem ocorrer por baixo número de bactérias (baixa densidade de colonização gástrica) ou por raras espécies de *Helicobacter* spp não produtoras de urease (HAPPONEN et al., 1996; NEIGER; SIMPSON, 2000).

A avaliação da concordância entre o TRU e a histopatologia mostrou moderado acerto entre os testes ($k=0,55$). Quanto a avaliação da performance do teste, a precisão global foi igual a 78,4% e o índice de Youden foi igual a 53,2%. Não foram encontrados artigos para comparar estes resultados.

Em relação ao prazo para a obtenção do diagnóstico e o preço do TRU, os dados obtidos corroboram com os citados por Laine et al. (1996) e Owen (2010), nos quais o TRU tem muita aceitação devido a sua facilidade de preparo e realização, baixo custo e rapidez, comparados com o exame histológico. Apesar dessa facilidade e baixo custo poucos

veterinários fazem o uso desta técnica durante o procedimento endoscópico, talvez pelo desconhecimento das características do método.

O TRU apesar de apresentar o pior índice Youden ($J= 53,2\%$), concordância com histopatologia moderada ($K=0,55$) e apresentar maior positividade para infecção (69% dos cães) apresenta indicação como teste de triagem para avaliação de helicobacteriose nas condições do nosso estudo. Em situação de endoscopia de cães gastropatas ou não, indica-se o emprego deste teste em associação com histopatologia e não como teste único.

A histoquímica com WS apresentou associação significativa com a histopatologia e boa concordância ($K=0,68$) entre os testes. A sensibilidade do teste foi 78% e a especificidade 92,1% mostrando resultados similares com os encontrados por Hartman e Owens (2012) que ao comparar o HE, o Giemsa, o WS e a IHQ, encontraram valores de 62% para a sensibilidade e de 98% de especificidade para o teste de WS em amostras gástricas humanas. Em comparação com o HE, as técnicas de coloração histoquímica, como a WS, demandam mais tempo para ficarem prontas, apresentam um custo médio e necessitam de técnicas laboratoriais específicas que podem variar com o laboratório, e portanto, não está disponível em todos os laboratórios de histologia presentes no mercado (ROTIMI et al., 2000; HARTMAN; OWENS, 2012). A avaliação da lâmina corada por WS requer cuidado e treinamento pelo patologista, uma vez que é frequente ocorrer precipitação da prata que dificulta a identificação dos agentes bacterianos além de por vezes precisar que se refaça a coloração por não haver homogeneidade no padrão da coloração. Assim, pode gerar resultados falsos positivos ou falsos negativos. Consideramos estas características do WS limitante para sua indicação. Esta histoquímica é também utilizada para avaliar a densidade de colonização pela bactéria (MOUTINHO, 2004). Apesar de não termos realizado outra coloração histoquímica, ponderamos que há autores que utilizam o Giemsa modificado e o Carbol-fucsina como métodos de identificação e contagem de bactérias (ROTIMI et al., 2000; COSTA et al., 2012).

A avaliação do desempenho do teste mostrou que a WS ficou em segundo lugar e apresenta alto índice Youden ($J=70,1\%$) e alta precisão global (84,1%). Não foram encontrados artigos que utilizam esta forma de avaliação do método para comparação com os resultados obtidos.

Quanto ao prazo e a análise de custo, o método de histoquímico por WS apresenta moderado prazo para o diagnóstico (até 15 dias) e baixo custo. Apesar de todas as características positivas e negativas da utilização do WS como método diagnóstico para helicobacteriose gástrica, a indicação deste método se restringe quanto a aplicabilidade técnica, a necessidade de patologista treinado e a disponibilidade de laboratórios capacitados. Mesmo assim, a indicação de associação da histopatologia a histoquímica deve ser sempre incentivada quando do objetivo de avaliar a densidade de colonização, após o tratamento específico antimicrobiano e antiácido.

A IHQ apresentou associação significativa com a histopatologia e houve boa concordância ($K=0,75$) entre os testes. A sensibilidade foi 82% e a especificidade, 94,7%. Os nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por outros autores (PRACHAISILPCHAI et al., 2007), no qual compararam a IHQ com a histoquímica por WS, e constataram que a IHQ foi mais sensível e específica para a detecção da infecção por *Helicobacter spp* do que o WS. Porém, os autores ponderaram que a IHQ é um método caro e não é usado para testes de rotina, mas pode ser útil nos casos em que as colorações de rotina são difíceis de avaliar ou confirmar a infecção por *Helicobacter spp* (PRACHAISILPCHAI et al., 2007).

A IHQ apresentou melhor desempenho ($J=76,7\%$) e melhor precisão global, e por essa razão foi considerado o melhor teste. Não foram encontrados artigos que utilizaram o índice Youden para avaliar a performance do método para comparar com os resultados obtidos.

O método de IHQ apresenta elevado custo e prazo longo para o diagnóstico, assim, sua utilização como método diagnóstico requer a padronização da técnica para as amostras e nas condições de cada laboratório, além de ser um método caro e que requer disponibilização de tempo para sua realização e interpretação. Por outro lado, este método possibilita a visualização das bactérias no citoplasma, na forma cocoide e em situações de baixa densidade. Acreditamos que não é um método para diagnóstico de rotina, mas sim para o emprego em contexto de pesquisa.

A utilização e análise do índice Youden para a escolha do melhor método de diagnóstico quanto a performance foi pela primeira vez empregado na comparação de métodos diagnósticos para helicobacteriose gástrica. Klein et al. (1987) afirmam que o índice tem como um dos objetivos identificar o método de diagnóstico com menor soma das

proporções de erros de classificação, ou seja, aquele que obteve o maior valor do índice de Youden (com o valor ideal igual a 1) consequentemente com menor número de diagnósticos incorretos, falsos negativos e falsos positivos. Analisando desta forma em ordem decrescente de índice de Youden temos: IHQ (76,7%), WS (70,1%), citologia (55,5%) e o TRU (53,2%).

O método avaliado com maior índice Youden, ou seja, com menor número de diagnósticos incorretos em comparação com a histopatologia foi a IHQ para os cães. Apesar das características positivas e negativas do método, a IHQ é considerada útil para a identificação do *Helicobacter spp*, porém é um método pouco utilizado e difundido na veterinária (SCANZIANI et al., 2001).

Estudo da Helicobacteriose em Gatos: determinação da frequência de ocorrência e dados epidemiológicos

A população de gatos estudada se caracterizou pelo predomínio de gatos machos, adultos a idosos, sem raça definida que foram necropsiados juntos ao Serviço de Patologia Animal. O perfil epidemiológico dos gatos não foi representativo em relação aos parâmetros analisados para a população de gatos domiciliados no município São Paulo. A população felina do município de São Paulo se caracteriza pela predominância de fêmeas, jovens a adultas sem raça definida (MAGNABOSCO et al., 2006; GARCIA, 2009).

Assim como nos cães, o critério de positividade para infecção por *Helicobacter spp* nos gatos foi a observação de bactérias helicoidais espiraladas isoladas ou agrupadas no muco gástrico presente na superfície do epitélio foveolar e no interior das glândulas gástricas (GHIL et al., 2009; TAKEMURA et al., 2009; ARAUJO et al., 2010; TABRIZI et al., 2010; MACEDO, 2012).

A frequência de ocorrência de *Helicobacter spp* em amostras gástricas, de biópsias endoscópicas ou necropsia, de gatos varia de 41 a 100% em animais clinicamente saudáveis (GEYER et al., 1993; OTTO, 1994; PAPASOULIOTIS et al., 1997; NEIGER et al., 1998; YAMASAKI, 1998) e de 57 a 100% em animais com êmese recorrentes (GEYER et al., 1993; HERMANNS et al., 1995; PAPASOULIOTIS, 1997; YAMASAKI, 1998; TAKEMURA, 2009). A frequência de ocorrência obtida nas amostras gástricas de gatos

necropsidos foi 87% (27/31) e nosso resultado está de acordo com os autores citados anteriormente.

Em nossa pesquisa, não houve significância estatística entre a infecção por *Helicobacter spp*, o gênero, idade e raça do gatos, assim como demonstrado por Akhtardanesh et al. (2006), que realizaram o estudo em gatos domiciliados e não domiciliados, com machos e fêmeas de diferentes idades. Adicionalmente, outros autores não encontraram associação entre a infecção e estes parâmetros analisados (NEIGER et al., 1998; PAPASOULIOTIS et al., 1997; LECOINDRE et al., 2000).

Diagnóstico do Helicobacter spp nos gatos: Comparação dos métodos de diagnóstico

A frequência de ocorrência determinada segundo cada método utilizado em ordem crescente foi: 77% dos gatos foram positivos para o TRU, 80%, pela histoquímica a base de prata (WS), 87%, pela citologia e 90%, pela IHQ. Todos os testes apresentaram associação significativa ao HE e o nível de concordância variou de ruim a boa entre estes métodos, assim como quanto a performance do teste.

A comparação entre a histopatologia e o TRU mostrou associação estatística significativa entre os testes e nível de concordância moderada ($K=0,46$). A sensibilidade obtida foi de 85,2% enquanto que a especificidade ficou em 75%. Estes resultados corroboram com outros autores que afirmam que a sensibilidade varia 70 a 100 % para o TRU (HAPONNEN et al., 1996.; VAIRA, 2000.; OWEN, 2010.; SEO et al., 2013). Happonen e colaboradores (1996) compararam vários testes para detecção de *Helicobacter spp*. no estômago de cães e gatos imediatamente após eutanásia, mostraram que o TRU , aos 30 e 60 minutos, apresentou sensibilidade de 94% e 100%, respectivamente nos gatos e a especificidade do método foi 100%. Em relação à especificidade, os resultados obtidos foram inferiores aos encontrados na literatura (HAPPONEN et al., 1996; VAIRA, 2000; OWEN, 2010). De acordo com Leodolter et al. (2001) resultados falsos positivos podem ocorrer devido a contaminação das amostras gástricas por outras bactérias produtoras de urease quando lidas em um período superior a 24 horas. Neste contexto, o resultado positivo pode ser decorrente as mesmas razões apontadas no estudo nos cães em que outras bactérias, como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Proteus* spp. podem produzir urease (HAPPONEN et al., 1996; NEIGER; SIMPSON, 2000). As mesmas razões consideradas no estudo para os cães podem ser aqui também ponderadas para os possíveis resultados falso negativos no TRU (HAPPONEN et al., 1996; NEIGER; SIMPSON, 2000).

A avaliação da concordância entre o TRU e a histopatologia mostrou moderado acerto entre os testes ($k=0,46$). Quanto a avaliação da performance do teste, a precisão global foi igual a 83,9% e o índice de Youden foi igual a 60,2%. A semelhança dos cães, não foram encontrados artigos para comparar estes resultados.

A avaliação do custo, prazo para obtenção dos resultados e a indicação do TRU para o diagnóstico de helicobacteriose gástrica em gatos apresentam as mesmas características do emprego deste método nos cães como foi discutido anteriormente.

A histoquímica pelo WS apresentou associação significativa com a histopatologia e nível de concordância bom ($K=0,76$). A sensibilidade foi 92,6% e especificidade 100% corroborando com outros autores (OWEN et al., 2010). Takemura et al. (2009) avaliaram amostras gástricas de gatos e utilizaram WS mostrando que este método apresenta indicação na avaliação da densidade de colonização bacteriana.

A utilização de histoquímica na análise das amostras gástricas dos gatos se restringiu na avaliação da densidade da colonização (HAPPONEN et al., 1996; TAKEMURA et al., 2009). Não foram encontrados autores que avaliaram as características, nível de concordância e a performance do teste para comparar com os nossos resultados.

A histoquímica por WS apresentou índice de precisão global de 93,5% e índice Youden de 92,6%. Devido a essas características da WS ficou em primeiro como método diagnóstico para helicobacteriose gástrica nos gatos. Quanto à indicação da WS, ponderamos da mesma forma que para os cães e apresenta as mesmas limitações já apontadas por nós anteriormente.

A citologia apresentou associação estatisticamente significativa com histopatologia e houve boa concordância ($K= 0,67$) entre os métodos. A sensibilidade do método foi 88,9% e a especificidade 100% que são resultados similares com os obtidos por Tzeng e colaboradores (2005), que identificaram 93,8% de sensibilidade e 97,8 % de especificidade para as amostras citológicas de biópsia endoscópicas provenientes de pacientes humanos. O estudo realizado por Araújo et al. (2010) demonstrou que a histopatologia associada à coloração de WS, como

a citologia foram igualmente adequadas e semelhantes para a detecção do *Helicobacter spp* em amostras gástricas de gatos provenientes do Centro de Zoonoses da cidade de Niterói-RJ. Estudos comparativos entre os métodos de diagnóstico envolvendo a citologia e a histopatologia são escassos tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária dificultando as comparações com este estudo. A citologia tem se mostrado um método de diagnóstico confiável, rápido e barato quando comparado ao exame histopatológico para a detecção do *Helicobacter spp* e do *H.pylori*, porém nem sempre permite a visualização conjunta com lesões gástricas associadas (JERGENS et al., 1998; CUSTÓDIO et al., 2005; MELLO et al., 2010).

A citologia apresentou índice de precisão global de 90,3% e índice Youden de 88,9%, colocando este método em segundo lugar em termos de desempenho para o diagnóstico de helicobacteriose gástrica nos gatos. Não foram encontrados outros estudos que avaliaram a concordância e o desempenho dos métodos diagnósticos de gatos com helicobacteriose gástrica.

Quanto à avaliação do custo e prazo, bem como da indicação da citologia como método diagnóstico, nós consideramos as mesmas características positivas e negativas que realizamos para os cães. Assim, a indicação desta técnica depende do objetivo proposto e do treinamento do patologista. No caso de amostras necroscópicas de gatos, a citologia se mostrou um método bom e que pode ser empregado. Mas, no caso de amostras endoscópicas, nós acreditamos que a histopatologia permitirá associar a identificação do agente com as lesões teciduais.

A IHQ mostrou associação significativa com a histopatologia e nível de concordância ruim ($K= 0,2$). A sensibilidade foi 92,6% e a especificidade, 25% concordando com os resultados de sensibilidade do teste com Scanziani et al., (2001), os quais testaram dois anticorpos primários (PAB Hp e MAb 371/254.55) que foram altamente sensível e produziram resultados positivos em todas as 25 amostras gástricas felinas estudadas. No entanto, a IHQ não foi específica quando comparada ao exame histopatológico diferindo de outros autores que comparam métodos diagnósticos na medicina humana e demonstram especificidade da técnica com o diagnóstico para o *H.pylori* de até 90% (JONKERS et al., 1997; ROTIMI et al., 2000). A hipótese que justifica a baixa especificidade em diagnosticar o número de animais que obtiveram resposta negativa no teste entre aqueles que não foram infectados pelo *Helicobacter spp* em nosso teste, pode estar associada ao período de após a

morte do animal mesmo sendo inferior a 24 horas e as próprias características populacionais dos animais estudados particularizando o resultado.

Considerando o índice Youden em ordem decrescente de desempenho em apresentar menor número de diagnósticos incorretos temos: WS (92,6%), citologia (88,9%) e TRU (60,2%) e a IHQ (17,6%). Assim, o método com menor número de diagnósticos incorretos em comparação com a histopatologia para os gatos foi a histoquímica pelo WS. Quanto a análise do custo, de forma geral, O TRU foi o exame de diagnóstico mais barato e rápido seguido pela citologia, histoquímica com coloração específica por WS e, por último, a IHQ. Estes dados estão de acordo com os propostos por Hunt et al. (2010) que afirmam que a escolha de um teste depende também de fatores como custo e disponibilidade. Outros fatores importantes são: situação clínica, prevalência da infecção na população, probabilidade de infecção pré-teste, diferenças na realização do teste e fatores que possam influenciar os resultados dos testes, como o uso de tratamento contra a secreção e antibióticos (HUNT et al., 2010).

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto podemos concluir que:

- 1- A ocorrência de helicobacteriose gástrica foi 57% e mostrou associação com a faixa etária na população de cães, que se caracterizou por ser a maioria de machos, adultos com idade média de $7,51 \pm 3,12$ anos, de porte médio a grande e com raça definida. A frequência de ocorrência de helicobacteriose foi considerada similar a outros estudos que utilizaram amostras oriundas de necropsias e a avaliação da associação com os parâmetros epidemiológicos representa uma particularidade da população estudada.
- 2- A ocorrência de helicobacteriose gástrica nos gatos foi 87% sem associação com gênero, faixa etária e raça. Os gatos estudados foram na maioria machos, adultos com idade média de $6,5 \pm 4,74$ anos e sem raça definida. Assim, a frequência de ocorrência determinada foi elevada e concordante com outros estudos que utilizaram amostras oriundas de necropsias ou endoscópicas independente das características da população de estudo.
- 3- A frequência de ocorrência das bactérias variou de acordo com o teste utilizado e espécie, sendo que a frequência em ordem decrescente foi HE> IHQ> TRU> WS> Citologia para os cães e, HE> IHQ> Citologia> WS> TRU para os gatos. Assim, para a determinação da frequência de ocorrência de helicobacteriose gástrica é possível a escolha e a utilização de mais de um método diagnóstico na dependência da espécie animal, do objetivo e/ou situação a que se quer investigar, da forma de coleta e origem das amostras, dos recursos financeiros disponíveis e do histórico clínico do animal.
- 4- Nos cães, a IHQ e a histoquímica por WS apresentaram concordância boa e a citologia e o TRU, moderada em relação ao HE. Mostrando que a IHQ e o WS nas condições que foram realizados exibem menor risco do acaso interferir nos resultados alcançados e assim, são métodos que podem ser empregados no diagnóstico de helicobacteriose gástrica.
- 5- Em relação à comparação do desempenho entre o HE e os demais métodos diagnósticos, a IHQ apresentou maior índice Youden revelando que este método exibe

melhor desempenho no diagnóstico de helicobacteriose gástrica para os cães nas condições do nosso estudo. Porém, a IHQ apresenta restrição de uso em pesquisa devido ao elevado custo.

6- Nos gatos, a histoquímica por WS e a citologia apresentaram concordância boa e o TRU, moderada e a IHQ, ruim em relação ao HE. Mostrando que o WS e a citologia nas condições que foram realizados exibem menor risco do acaso interferir nos resultados alcançados e assim, são métodos que podem ser empregados no diagnóstico de helicobacteriose gástrica.

7- Em relação à comparação do desempenho entre o HE e os demais métodos diagnósticos, a histoquímica por WS apresentou maior índice Youden revelando que este método exibe melhor desempenho no diagnóstico de helicobacteriose gástrica para os gatos nas condições do nosso estudo. Porém, a técnica apresenta limitações de disponibilidade de execução na maioria dos laboratórios de histologia e, assim, a aplicação deste método é restrita na rotina diagnóstica.

REFERÊNCIAS

- AKHTARDANESH, B.; JAMSHIDI, S.; SASANI, F.; MOHAMMADI, M.; BOKAEE, S.; SALEHI, T.Z. *Helicobacter spp.* infection and gastric lesions in domestic and stray cats. **Veterinarski Arhiv**, v. 6, n. 76, p. 479-488, 2006.
- AKHTER, J.; SHRESTHA, H. G. Rapid detection of helicobacter pylori by endoscopic brush cytology and comparison with histopathology. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 5, n. 3, p. 387-390, 2007.
- ANACLETO, T. P. **Estudo da recorrência do Helicobacter spp na mucosa gástrica de cães após terapia tríplice**. 2010. 89 p. Tese (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, São Paulo, 2010.
- ARAUJO, I. C.; MOTA, S. B.; DE AQUINO, M. H. C.; FERREIRA, A. M. R. Helicobacter species detection and histopathological changes in stray cats from Niterói, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 509- 511, 2010.
- AZEVEDO, N. F.; ALMEIDA, C.; CERQUEIRA, L.; DIAS, S.; KEEVIL, C. W.; VIEIRA, M. J. Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. **Applied and environmental microbiology**, v. 10, p. 73, p. 3423–3427, 2007.
- BASSET, C.; HOLTON, J.; GATTA, L.; RICCI, C.; BERNABUCCI, V.; LIUZZI, G.; VAIRA, D. Helicobacter pylori infection: anything new should we know? Pesquisa **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, p. 31-41, 2004. Supplement.
- BEGUE, R. E.; GONZALES, J. L.; CORREA-GRACIAN, H.; TANG, S. C. Dietary risk factors associated with the transmission of Helicobacter pylori in Lima, Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 4, n. 59, p. 637–640, 1998.
- BOKKEN, G. C.; BERGWERFF, A. A.; VAN KNAPEN, F. A novel bead-based assay to detect specific antibody responses against Toxoplasma gondii and Trichinella spiralis simultaneously in sera of experimentally infected swine. **BMC Veterinary Research**, v. 36, p. 1-8, 2012.
- BRADEN, B.; CASPARY, W. F. Detection of Helicobacter pylori infection when to perform which test. **Annals of Medicine**, v. 2, n. 33, p. 91-97-2001.
- BRONSDON, M. A.; GOODWIN, C. S.; SLY, L. I.; CHILVERS, T.; SCHOENKNETCHT F.D. Helicobacter nemestrinae sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (Macaca nemestrinae). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, p. 148-153, 1991.

CALVET, X.; LEHOURS, P.; MÉGRAUD, F. L. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, n. 1, p. 7-13, 2010.

CAN, F.; YILMAZ, Z.; DEMIRBILEK, M.; BILEZIKCI, B.; KUNEFECI, G.; ATAC, F. B.; SELCUK, H.; ARSLAN, H.; BOYACIOGLU, S.; SAHIN, F. I. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 569–573, 2005.

CARVALHO, G. D.; PINTO, P. S. A.; VILORIA, M. I. V.; NERO, L. A. Aspectos zoonóticos de *Helicobacter* spp. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 121-130, 2008.

CASTIGLIONI, V.; VAILATI FACCHINI, R.; MATTIELLO, S.; LUINI, M.; GUALDI, V.; SCANZIANI, E.; RECORDATI, C. Enterohepatic *Helicobacter* spp. in colonic biopsies of dogs: molecular, histopathological and immunohistochemical investigations. **Veterinary Microbiology**, v. 1-2, n. 159, p. 107-114, 2011.

CATRENICH, C. E.; MAKIN, K. M. Characterization of the morphologic conversion of *H. pylori* form bacillary to coccoid forms. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, sup. 181, p. 58-64, 1991.

CHEY, W. D.; WONG, B. C.Y. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, p.1808-18025, 2007.

CHONE, L.; FLEJOU, J. F.; GRIGNON, Y.; BIGARD, M. A. *Helicobacter heilmannii*: new spiral shaped bacterium that may be responsible for ulcerated gastritis. **Gastroenterology Clinical Biology**, v. 19, p. 447-448, 1995.

CHUNG, T.; KIM, H. D.; LEE, Y.; HWANG, C. Determination of the Prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms type 2 (HHLO-2) Infection in Humans and Dogs Using Non-invasive genus/Species-specific PCR in Korea. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 5, n. 10, p. 1-18, 2013.

COSTA, M. C.; COSTA, P.R.P.S.; SILVA, J. C. P.; MAIA, R. E. N.; MOREIRA, J. C. Detecção de *Helicobacter* spp. em amostras de mucosa gástrica de cães assintomáticos e alterações histológicas associadas. **Brazil Journal of Veterinary**, v. 49, n. 4, p. 285-292, 2012.

COSTA, M. C.; COSTA, P. R. P. S.; SILVA, J. C. P.; MAIA, R. E. N.; MOREIRA, J. C.; CARVALHO, R. M. Utilização do óleo de alho e da amoxicilina, metronidazol e omeprazol no controle de *Helicobacter* spp. em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 362-368, 2009.

CUSTÓDIO, R. O.; DAHER, R. R.; XIMENES, Y. R.; SILVÉRIO, A. O.; CUSTÓDIO, N. R. O. Identificação do *Helicobacter pylori* pela citologia do escovado gástrico: comparação com o método histológico. **Revista Brasileira Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 322-325, 2005.

DE BOCK, M.; DECOSTERE, A.; HELLEMANS, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii* induce gastric parietal cell loss in Mongolian gerbils. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 503-510, 2006.

DE GROOTE, D.; VAN DOORN, L. J.; DUCATELLE, R.; VERSCHUUREN, A.; TILMANT, K.; QUINT, W. G.; HAESEBROUCK, F.; VANDAMME, P. "Phylogenetic characterization of 'Candidatus *Helicobacter bovis*', a new gastric helicobacter in cattle." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 1707-1715, 1999.

DEWHIRST, F. E.; SEYMOUR, G.; FRASER, B. J.; FOX, J. G. Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 553-560, 1994.

DUARTE, A. R. R. **Pesquisa de *Helicobacter* spp em felinos**. 2009. 167 f. Tese (Mestrado e Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 720-741, 1997.

EATON, K. A.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B. E.; PAOLA, J.; SHERDING, R. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: Animal and public health implications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3165-3170, 1996.

EATON, K. A.; DEWHIRST, F. E.; RADIN, M. J.; FOX, J. G.; PASTER, B. J.; KRAKOWA, S.; MORGAN, D. R. *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from Cheetahs with gastritis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 99-106, 1993.

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

FENNELL, C. L.; TOTTEN, P. A.; QUINN, T. C.; PATTON, D. L.; HOLMES, K. K.; STAMM, W. E. Characterization of campylobacter-like organism isolated from homosexual men. **Journal Infection Disease**, v. 149, p. 58-66, 1985.

FERNANDEZ, H. **Gênero *Helicobacter***. In: TRABULSI, L.R.; ALTERHUM, F. Microbiologia. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap.48, p. 363-368.

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. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, p. 445-454, 1995.

- FOX, J. G.; BLANCO, M.; MURPHY, J. C.; TAYLOR, N. S.; LEE, A.; KABOK, Z.; PAPPO, J. Local and systemic immune responses in murine *Helicobacter felis* active chronic gastritis. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 6, p. 2309–2315, 1993.
- FOX, J. G.; CHILVERS, T.; GOODWIN, C. S.; TAYLOR, N. S.; EDMONDS, P.; SLY, L. I.; BRENNER, D. J. *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 301-303, 1989.
- FOX, J. G.; DROLET, R.; HIGGINS, R.; MESSIER, S.; YAN, L.; COLEMAN, B. E.; PASTER, B. J.; EDEWHIRST, F. *Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2479–2482, 1996.
- FRANKLIN, C. L.; BECKWITH, C. S.; LIVINGSTON, R. S.; RILEY, L. K.; GIBSON, S. V.; BESCH-WILLIFORD, C. L.; HOOK, R. R. Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of syrian hamsters with cholangiobrosis and centrolobular pancreatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2952-2958, 1996.
- GALATI, L.H. H.; ROMERO, D. C.; SAA, L. R. M. Ocorrência da helicobacteriose gástrica em cães submetidos à terapia antimicrobiana. In: CONGRESSO PAULISTA DAS ESPECIALIDADES, 2013, São Paulo: ANCLIVEPA, SP, 2013.
- GARCIA, R. C. M. **Estudo da dinâmica populacional canina e felina e avaliação de ações para o equilíbrio dessas populações em área da cidade de São Paulo, SP, Brasil**. 2009. 265 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- GEYER, C.; COLBATZKY, F.; LECHNER, J.; HERMANN, W. Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. **Veterinary Record**, v. 133, p. 133-218, 1993.
- GHIL, H.; YOO, J.; JUNG, W.; CHUNG, T.; YOUN, W.; HWANG, C. Survey of *Helicobacter* infection in domestic and feral cats in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 1, n. 10, p. 67-72, 2009.
- GYÖRKE, A.; OPSTEEGH, M.; MIRCEAN, V.; IOVU, A.; COZMA, V. *Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 4, n. 102, p. 321-328, 2011.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHOUE, B.; CHIERS, K.; BAELE, M.; MEYNS, T.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n.2, p. 202-223, 2009.

HANDT, L. K.; FOX, J. G.; STALIS, I. H.; RUFO, R.; LEE, G.; LINN, L.; LI, X.; KLEANTHOUS, H. Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 33, p. 2280–2289, 1995.

HANNINEN, M. L.; ULTRIAINEN, M.; TANSKANEN, R. Mycoplasma contamination of canine gastric biopsy samples and cultures of gastric *Helicobacter* spp. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 335–339, 1998.

HAPPONEN, I.; SAARI, S.; CASTREN, L. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, p. 305–315, 1996.

HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; SAARI, S.; KARJALAINEN, M.; HANNINEN, M. L.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E. Detection and effects of *Helicobacter* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 12, n. 213, p. 1767–1774, 1998.

HARPER, C. G.; FENG, Y.; XU, S.; TAYLOR, N. S.; KINSEL, M.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; GREENWELL, M.; LEVINE, G.; ROGERS, A.; FOX, J. G. *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4536–4543, 2002.

HARTMAN, D. J.; OWENS, S. R. Are Routine Ancillary Stains Required to Diagnose *Helicobacter* Infection in Gastric Biopsy Specimens? **American Journal of Clinical Pathology**, v. 137, p. 255–260, 2012.

HAZELL, S. L.; BORODY, T. J.; GAL, A.; LEE, A. *Campylobacter pyloridis* gastritis, I: detection of urease as a marker of bacterial colonization and gastritis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 82, p. 292–296, 1987.

HEILMANN, K. L.; BORCHARD, F. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. **Gut**, v. 32, p. 137–140, 1991.

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

HOPKINS, R. J.; VIAL, P. A.; FERRECCIO, C.; OVALLE, J.; PRADO, P.; SOTOMAYOR V.; RUSSELL, R. G.; WASSERMAN, S. S.; MORRIS, J. G. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 1, p. 222–226, 1993.

HULTEN, K.; HAN, S.W.; ENROTH, H.; KLEIN, P. D.; OPEKUN, A. R.; GILMAN, R. H.; EVANS, D. G.; ENGSTRAND, L.; GRAHAM, D. Y.; EL-ZAATARI, F.A. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. **Gastroenterology**, v.110, n.4, p.1031-1035, 1996.

HUNT, R.H.; XIAO, S.D.; MEGRAUD, F.; LEON-BARUA, R.; BAZZOLI, F.;VAN DER MERWE, S.; VAZ COELHO, L.G.; FOCK, M.; FEDAIL, S.; COHEN, H. MALFERTHEINER, P.; VAKIL, N.; HAMID. S.; GOH, K. L.; WONG, B. C. Y.; KRABSHUIS, J.; LE MAIR, A. *Helicobacter pylori* nos países em desenvolvimento. **World Gastroenterology Organization**, v.3. , p. 2-14, 2010.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. World Health Organization. Infection with *Helicobacter pylori*. In:_____. **Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori**. Lyon: IARC, 1994. p. 177-241.

JALAVA, K.; ON, S. W.; VANDAMME, P. A. R.; HAPPONEN, I.; SUKURA, A.; HANNINEN, M. Isolation and Identification of *Helicobacter* spp. From Canine and Feline Gastric Mucosa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3998–4006, 1998.

JERGENS, A. E.; ANDREASE, C. B.; HAGEMOSER, W. A.; RIDGWAY, J.; CAMPBELL, K. L. Cytology Examination of Exfoliative Specimens during endoscopy for diagnosis of gastrointestinal tract disease in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 12, p. 1755-1759, 1998.

JERGENS, A. E.; PRESSEL, M.; CRANDELL, J.; MORRISON, J. A .; SORDEN, S. D.; HAYNES, J.; CRAVEN, M.; BAUMGART, M.; SIMPSON, K.W. Fluorescence In Situ Hybridization Confirms Clearance of Visible *Helicobacter* spp. Associated with Gastritis in Dogs and Cats. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 16–23, 2009.

JONKERS, D.; STOBBERINGH, E.; DE BRUINE A.; ARENDS, J. W.; STOCKBRÜGGER, R. Evaluation of immunohistochemistry for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosal biopsies. **Journal of Infection**, v. 2, n. 35, p.149-154, 1997.

KAUR, G.; MADHAVAN, M.; BASRI, A. H.;SAIN, A. H. M; HUSSAIN, M. S. B.; YATIBAN, M. K.; NAING, N. N. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric imprint smears , Southeast Asian, **Journal of Tropical Medicine Public Health**, v. 35, n. 3, p. 676-680, 2004.

STANLEY, J.; LINTON, D.; BURNENS, A. P.; DEWHIRST, F. E.; ON, S. L.; PORTER, A.; OWEN, R. J.; COSTAS, M. *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. **Microbiology**, v. 140, p. 3441- 3449, 1994.

KLEIN, C. H.; COSTA, E. A. Os erros de classificação e os resultados de estudos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p .236-249, 1987.

KONTUREK, J. W. Discovery by Jaworski of *Helicobacter Pylori* and its Pathogenetic Role in Peptic Ulcer, Gastritis and Gastric Cancer. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, p. 23-41, 2003. Supplement, 3.

KRIENITZ, W. Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 32, p.872 -890, 1906.

KUSTERS, J. G.; VLIET, A. H. M. V.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 449–490, 2006.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADOR, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 335-342, 2003.

LAINE, L.; ESTRADA, R.; LEWIN, D. N.; COHEN, H. The influence of warning on rapid urease test results: a prospective evaluation. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 44, p. 429, 1996.

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

LECOINDRE, P.; CHEVALLIER, M.; PEYROL, S.; BOUDE, M.; FERRERO, R. L.; LABIGNE, A. Gastric helicobacters in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, p.19-27, 2000.

LEE, A.; HAZELL, S.L.; O'ROURKE, J. KOUPRACH, S. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. **Infection Immunology**, v.56, p. 2843-2850, 1988.

LEE, A.; PHILLIPS, M. W.; O'ROURKE, J. L.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; FRASER, G. J.; FOX, J. G.; SLY, L. I.; ROMANIUK, P. J.; KOUPRACH, S. *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 27-36, 1992.

LEODOLTER, A.; PEITZ, U.; MALFERTHEINER, P. Healing peptic ulcer disease with therapy of *Helicobacter pylori* infection--an overview. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v.151, n. 13, p. 300-308, 2001.

LUGER, A.; NEUBERGER, H. Über Spirochätenbefunde im Magensaft und deren diagnostische Bedeutung für das Carcinoma ventriculi. **Zeit. f. Klin. Med**, v. 54, n. 92, p.20-35, 1921.

MACÊDO, J. S.; MENDONÇA, F. S.; DA SILVA, K. R. L.; DE BARROS, M. E. G.; EVÊNCIO-NETO, J. Incidência e aspectos histopatológicos da infecção por *Helicobacter* spp

em gatos da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 519-524, 2012.

MAGNABOSCO, C. **População domiciliada de cães e gatos em São Paulo: perfil obtido através de um inquérito domiciliar multicêntrico**. 2006. 98 p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 321, p. 1273-1275, 1983.

MCMAHON, B.; HENNESSY, T. W.; BENSLER, J. M.; BRUDEN, D. L.; PARKINSON, A. J.; MORRIS, J. M.; REASONOVER, A. L.; HURLBURT, D. A.; BRUCE, M. G.; SACCO, F.; BUTLER, J. C. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 6, p. 463-469, 2003.

MC GOWAN, T. W.; PINCHBECK, G. P.; MC GOWAN, C. M. Evaluation of basal plasma α -melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone concentrations for the diagnosis of pituitary pars intermedia dysfunction from a population of aged horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 1, n. 45, p. 66-73, 2013.

MÉGRAUD, F. Diagnosis of *helicobacter pylori*. **Bailiere's Clinical Gastroenterology**, v. 9, n. 3, p. 507-518, 1995.

MELLO, M. F. V.; PISSINATTI, A.; FERREIRA, A. M. R. Distribution of collagen types I, III, and IV in gastric tissue of marmosets (*Callithrix* spp., Callitrichidae: Primates). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 30, p. 317-320, 2010.

MENDEZ, E. N.; QUEIROZ, D. M.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; MOURA, S. B.; FOX, J. G. *Helicobacter trogonum* sp. nov., isolated from the rat intestine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, p. 916-921, 1996.

MINCIS, M.; MINCIS, R. *Helicobacter pylori* (Hp): a bactéria de maior prevalência em todo o mundo – atualização diagnóstica e terapêutica. **Prática Hospitalar**, v. 8, n. 49, p. 75-78, 2007.

MIRCEAN, V.; GYÖRKE, A.; COZMA, V. Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from Romania. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 325-329, 2012.

MOUTINHO, F. Q. **Prevalência de lesões gástricas em cães e suas correlações com as concentrações séricas de gastrina e a presença de helicobactérias**. 2004. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

MOURA, S. A. B.; GERBI, M.; MEDEIROS, A. M. C.; SOUTO, M. F.; EMILIANO, G. B. G.; SOUZA, J. M. A. Identificação de *Helicobacter pylori* na saliva e biofilme dental. **International Journal of dentistry**, v. 2, n. 3, p. 349-352, 2004.

MOYAERT, H.; HAESEBROUCK, F.; DEWULF, J.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. *Helicobacter equorum* is highly prevalent in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 190–192, 2009.

NCBI. **Taxonomy Browser**. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=209>>. Acesso em : 24 out. 2013.

NEIGER, R.; DIETERICH, C.; BURNENS, A. P.; WALDVOGEL, A.; CORTHÉSY-THELAZ, I.; HALTER, F.; LAUTERBURG, B.; SCHMASSMANN, A. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 634–637, 1998.

NEIGER, R.; SIMPSON, K. W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal Veterinary Medicine**, v. 14, p. 125-133, 2000.

NIH. Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, v. 272, p. 65-69, 1994.

NOBELPRIZE. **The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine to Barry J. Marshall and J. Robin Warren**. Disponível em:

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html. Acesso em 20 de set. 2013.

ONDERS, R. P. Detection methods of *Helicobacter pylori*: accuracy and costs. **American Surgery**, v. 63, p. 665-668, 1997.

ROTIMI, O.; CAIRNS, A.; GRAY, S.; MOAYYEDI, P.; DIXON, M. F. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. **Journal Clinical Pathology**, v. 53, p. 756-759, 2000.

O'ROURKE, J. L.; SOLNICK, J. V.; NEILAN, B. A.; SEIDEL, K.; HAYTER, R.; HANSEN L. M.; LEE, A. Description of 'Candidatus *Helicobacter heilmannii*' based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2203-2211, 2004.

OTTO, G.; HAZELL, S. L.; FOX, J. G. Animal and public health implications of gastric colonization of cats by *Helicobacter*-like organisms. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 1043–1049, 1994.

OWEN, R. J. **Helicobacter**. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infection: Leslie Collier, 2010. p.1-22.

PAPASOULIOTIS, K.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; WERRETT, G.; BROWN, P. G.; PEARSON, G. R.; Occurrence of 'gastric *Helicobacter*-like organisms' in cats. **Veterinary Record**, v. 14, n. 140, p. 369-370, 1997.

PAWESKA, J. T.; SMITH, S. J.; WRIGHT, I. M.; WILLIAMS, R.; COHEN, A. S.; VAN DIJK A. A.; GROBBELAAR, A. A.; CROFT, J. E.; SWANEPOEL, R.; GERDES, G. H. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against Rift Valley fever virus in domestic and wild ruminant sera. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 1, n. 70, p. 49-64, 2003.

PEREZ-PEREZ, G. I. Accurate diagnosis of helicobacter pylori. **Culture, includins transport. Gastroenterology Clinical North America**, v. 29, n. 4, p. 879-884, 2000.

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

PRIESTNALL, S. L.; WIINBEG, B.; SPOHR, A.; NEUHAUS, B.; KUFFER, M.; WIEDMANN, M.; SIMPSON, K. W. Evaluation of “*Helicobacter heilmannii*” Subtypes in the Gastric Mucosas of Cats and Dogs. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5 p. 2144-2151, 2004.

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

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

LOGAN, R. P.; WALKER, M. M. ABC of the upper gastrointestinal tract Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection. **BMJ**, v. 7318, n. 323, p. 920-922, 2001.

ROTIMI, O.; CAIRNS, A.; GRAY, S.; MOAYYEDI, P.; DIXON, M. F. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. **Journal Clinical Pathology**, v. 53, p.756-759, 2000.

SAILASUTA, A.; PRACHASILCHAI, W. Infection in domestic animals. medicine gastroenterology. In: SAILASUTA, A.; PRACHASILCHAI, W. **The role of Helicobacter spp.** Thailand: Gyula Mozsik, 2012. cap. 2, p. [1-20].

SCANZIANI, E.; SIMPSON, K. W.; MONESTIROLI, S.; SOLDATI, S.; STRAUSS-AYALI, D.; DEL PIERO, F. Histological and immunohistochemical detection of different *Helicobacter* species in the gastric mucosa of cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 3-12, 2001.

SCHAUER, D. B.; GHORI, N.; FALKOW, S. Isolation and characterization of `Flexispira rappini' from laboratory mice. **Journal Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2709-2714, 1993.

SEO, JI-HYUN; YOUN, HEE-SHANG; PARK, JUNG-JE; YEOM, J. S.; PARK, J. S.; JUN, J.; LIM, J.; PARK, CHAN-HOO; WOO, HYANG-OK; KO, GYUNG-HYUCK; BAIK, SEUNG-CHUL; LEE, WOO-KON; CHO, M; RHEE, KWANG-HO. Influencing factors to results of the urease test: age, sampling site, histopathologic findings, and density of *Helicobacter Pylori*. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v. 16, p. 34-40, 2013.

SHEN, Z.; FOX, J. G.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; FOLTZ, C. J.; YAN, L.; SHAMES, B.; PERRY, L. *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, p. 627-634, 1997.

SIMPSON, K.; NEIGER, R.; SHERDING, R. The Relationship of *Helicobacter spp.* infection to gastric disease in dogs and cats. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 223-227, 2000.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S. S.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. General aspects of *Helicobacter pylori* infections – Review. **Revista Brasileira Adolescência e Conflitualidade**, v. 39, n.1, p. 9-13, 2007.

SOLNICK, J. V.; SCHAUER, D. B. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n. 1, p. 59-97, 2001.

SOLNICK, J. V.; FONG, J.; PARSONNET, J. Acquisition of *Helicobacter pylori* Infection in Rhesus Macaques Is Most Consistent with Oral-Oral Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 44, p. 3799-3803, 2006.

SOUZA, M. L.; KOBAYASI, S.; RODRIGUES, M. A. M.; SAAD-HOSSNE, R.; NARESSE, L. E. Prevalência de *Helicobacter* em cães oriundos do biotério central da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)-Botucatu. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 5, n. 19, p. 571-579, 2004.

TABRIZI, A. S.; JAMSHIDI, S. H.; OGHALAEI, A.; ZAHRAEI SALEHI, T.; BAYATI ESHKAFTAKI, A.; MOHAMMADI, M. Identification of *Helicobacter* spp. in oral secretions vs. gastric mucosa of stray cats. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 142-146, 2010.

TAKEMURA, L. S.; CAMARGO, P. L.; AALFIEREI A. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. *Helicobacter* spp. in Cats: Association between Infecting Species and Epithelial Proliferation within the Gastric Lamina Propria . **Journal of Comparative Pathology**, v.141, n. 2-3, p. 127-134, 2009.

TOTTEN, P. A.; FENNELL, C. L.; TENOVER, F. C.; WEZENBERG, J. M.; PERINE, P. L.; STAM, W. E.; HOMELS, K. K. *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new campylobacter species associated with enteric disease in homosexual men. **Journal Infection Disease**, v. 151, p. 131-139, 1985.

TRIVETT-MOORE, N. L.; RAWLINSON, W. D.; YUEN, M.; GILBERT, G. L. *Helicobacter westmeadii* sp. nov., a new species isolated from blood cultures of two AIDS patients.

Journal Clinical Microbiolog, v. 35, p. 1144-1150, 1997.

TZENG, JEH-EN; LIN, YING-LUNG; CHUNG, SUE-MEI; CHU, YI-TSUI. Comparison of Four Diagnostic Methods for *Helicobacter pylori*. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 17, n. 5, p. 339-343, 2005.

VAIRA, D.; HOLTON, J.; MENEGATTI, M.; RICCI, C.; GATTA, L.; GEMINIANI, A.; MIGLIOLI, M. Review article: invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. , **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, n. 3, p. 13-22, 2000.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; VANDAMME, P.; MAST, J.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUK. F. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1559–1564, 2006.

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

VON WULFFEN, H. An assessment of serological tests for detection of *Helicobacter pylori*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 11, p. 577-582, 1991.

WEBB, J. L.; RAKICH, P. M.; LATIMER, K. S. O trato gastrointestinal. In: DENICOLA, D.B.; COWELL, R.L.; MEINKOTH, J. H.; TYLER, R.D. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3. ed. São Paulo: Med Vet, 2009. cap. 18, p. 288-289.

WINDSOR, H. M.; OROURKE, J. Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 633-647, 2000.

YAMASAKI, K.; SUEMATSU, H.; TAKAHASHI, T. Comparison of gastric lesion on dogs and cats with and without gastric spiral organism. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 212, p. 529-533, 1998.

YOU DEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. Washington: National Bureau of Standards, 1950. p. 32-35.

ZENNER, L. Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection. Comparative Immunology. **Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, p. 41-61, 1999.

APÊNDICE A

(Continua)

PASSOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA USANDO O KIT LSAB e ANTI-H.PYLORI		
1º DIA DE REAÇÃO		
1	Xilol – 20’	
2	Xilol – 10’	
3	Álcool –ABS – 10’	
4	Álcool – 95% - 5’	
5	Álcool -70%- 5’	
6	H ₂ O corrente – 5’	
7	H ₂ O destilada – 5’	
8	PBS – 5’	
9	H ₂ O ₂ 10V – 10’ CAMARA ESCURA	
10	H ₂ O ₂ 10V – 10’ CAMARA ESCURA	
11	H ₂ O ₂ 10V – 10’ CAMARA ESCURA	
12	H ₂ O corrente – 5’	
13	H ₂ O destilada – 5’	
14	PBS – 5’	
15	Leite Desnatado Molico em pó– 20’ (5g de leite para 50ml de água destilada)	
16	Limpar as lâminas rentes aos cortes e adicionar os anticorpos desejados. <i>Diluir o anticorpo na albumina. Tomar nota da diluição do anticorpo. Deixar “overnight” (min 12h e máx 24 h) na geladeira com algodão úmido.</i>	

APENDICE A

(Continuação)

PASSOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA USANDO O KIT LSAB e ANTI-H.PYLORI – 2º DIA DE REAÇÃO		
17	PBS – 5'	
18	PBS – 5'	
19	Anticorpo secundário (vidro amarelo) KIT LSAB 30' a 37°C na estufa.	
20	PBS – 5'	
21	PBS – 5'	
22	Anticorpo terciário (vidro vermelho) KIT LSAB 30' a 37°C na estufa. <i>Neste momento, começar a preparar o DAB colocar na cuba de vidro vertical.</i>	
23	PBS – 5'	
24	PBS – 5' (filtrar Hematoxilina neste momento)	
25	Revelar com DAB + 1,2ml de H ₂ O ₂	
26	Interromper com H ₂ O corrente.	
27	Lavar as lâminas – 10'	
28	Hematoxilina – em média 20'	
29	H ₂ O corrente – 10 a 20'	
30	Álcool 70% - 5'	
31	Álcool 95% - 5'	
32	Álcool ABS - 5'	

APENDICE A**(Conclusão)**

PASSOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA USANDO O KIT LSAB e ANTI-H.PYLORI		
–		
2º DIA DE REAÇÃO		
33	Álcool ABS - 5'	
34	Xilol – 5'	
35	MONTAR	

ANEXO A

Starry – *Helicobacter pylori*

Preparo das Soluções:

Água Acidulada – Solução A

- 1,30 ml de ácido cítrico
- 1000 ml de água destilada

Água acidulada + Nitrato de Prata 10gr – Solução B

- 10gr de nitrato de prata
- 1000 ml de água acidulada

Água acidulada + Nitrato de Prata 20gr – Solução C

- 20gr de nitrato de prata
- 1000ml de água acidulada

Água acidulada + hidroquinona – Solução D

- 1,50 gr de hidroquinona
- 1000 ml de água acidulada

Realização da Coloração

Misturar

- 2ml de água acidulada + 12 ml da solução C em um frasco de vidro
- 2 colheres de chá de gelatina incolor + 30ml da solução A
- 2ml de água acidulada + 16 ml da solução D

Colocar todos os 3 fracos na estufa na temperatura de 50°C, e as lâminas após a sua desparafinização de ser incubadas na estufa com a mesma temperatura em contato com a solução B

Após notar que a gelatina esta derretida, retirar da estufa deixar descansar na temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. Após este período misturar as soluções dos 3 fracos, e por em contato com as lâminas, após descartar a solução B.

Levar as lâminas novamente para estufa e deixar por aproximadamente 10 min. Importante é sempre ficar observando durante este período a mudança de coloração da solução, quando esta solução atingir a tonalidade marrom (cor de canela), parar a reação colocando as lâminas em água de torneira por 30 segundos.

Desidratar e montar as lâminas.