

Prevalência de *Helicobacter* em cães oriundos do biotério central da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)-Botucatu¹

Prevalence of *Helicobacter* in canines from animal colony of the State University of Sao Paulo (UNESP)-Botucatu

Maria Lúcia de Souza², Shoiti Kobayasi³, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues⁴, Rogério Saad-Hossne⁵, Luiz Eduardo Naresse⁶

- 1.Trabalho desenvolvido na disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica da Faculdade de Medicina – Universidade Estadual de São Paulo (FM-UNESP), Botucatu.
- 2.Pós-graduanda do Curso de Pós-Graduação, Bases Gerais da Cirurgia.
- 3.Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FM-UNESP, Botucatu.
- 4.Professora Adjunta do Departamento de Patologia da FM-UNESP, Botucatu.
- 5.Professor Doutor do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FM-UNESP, Botucatu.
- 6.Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FM-UNESP, Botucatu.

RESUMO

OBJETIVO: Investigar a incidência de *Helicobacter sp* em cães oriundos do biotério central da UNESP.

MÉTODOS: Utilizamos 109 cães oriundos do Biotério Central da UNESP Campus de Botucatu verificando a presença do *Helicobacter sp* através do exame de histopatologia corado pelo método Giemsa, pelo teste rápido de urease (TRU) e a prevalência de *Helicobacter pylori* pelo teste sorológico imunocromatográfico.

RESULTADOS: O resultado para a presença de *Helicobacter* foi de 99% pela histopatologia e pelo TRU e 78,8% de prevalência para a espécie *H. pylori* pelo teste sorológico.

CONCLUSÃO: As formas encontradas pela microscopia de imersão foram contrárias ao resultado do teste sorológico, sendo visibilizado formas compatíveis com a espécie *H. heilmannii* na maioria das amostras, e uma segunda forma de *Helicobacter* com características morfológicas distintas do *H. pylori* encontrado em humanos.

DESCRIPTORIOS: *Helicobacter*. Gastrite. Cães.

ABSTRACT

PURPOSE: To investigate the incidence of *Helicobacter sp* in dogs from the animal colony of UNESP.

METHODS: One hundred and nine dogs from the animal colony of UNESP- Botucatu, SP were studied to verify the presence of *Helicobacter sp*. The methods used were: histopathology stained by Giemsa, rapid urease test (RUT) and the prevalence of *Helicobacter pylori* was tested by serologic immunocromatography.

RESULTS: The presence of *Helicobacter* was found in 99% of the cases when using the histopathology and RUT methods. The prevalence of *H. pylori* tested by immunocromatography was of 78.8%.

CONCLUSIONS: The forms found under microscopy oimmersion were contrary to the serologic test, where forms compatible to the *H. heilmannii* were found in the majority of the samples. A second form of *Helicobacter* with different morphologic characteristics from the human *H. pylori* was also found.

KEY WORDS: *Helicobacter*. Gastritis. Dogs.

Introdução

Vários estudos no ser humano têm demonstrado a correlação do *Helicobacter pylori* (Hp) na patogenia da gastrite, da úlcera gástrica e duodenal e mais recentemente como agente indutor do carcinoma gástrico no ser humano¹. A associação com outras doenças, como trombocitopenia auto-imune, nefropatia membranosa, polineuropatias imunes agudas, doença cardíaca isquêmica, carcinoma hepático, colangite esclerosante primária e cirrose biliar primária e também em doença coronariana está sendo investigada (REF.)

É estimado que metade da população mundial esteja colonizada por este patógeno e que a maioria dela foi colonizada ainda na idade escolar², porém muitos indivíduos colonizados permanecem assintomáticos.

A infecção pela bactéria tem correlação inversa com o padrão socioeconômico e nos países em desenvolvimento como o Brasil, a colonização do estômago humano pelo Hp é disseminada³.

O estômago constitui reservatório habitual da bactéria, e suas características permitem que ela habite o muco que recobre o epitélio gástrico, levando danos à mucosa gástrica, conseguindo desta maneira sobreviver nesse ambiente por décadas.

A forma exata pela qual ocorre a transmissão desta *Helicobacteriose* é desconhecida, o isolamento de Hp em saliva, placa dentária e nas fezes reforça a hipótese de transmissão oro-oral ou oro-fecal.

Outras espécies de *Helicobacter* foram identificadas no ser humano, sendo que o *Helicobacter heilmannii* (Hh) foi associado à gastrite⁴ e ao linfoma MALT gástrico primário¹. Nessa associação, a erradicação da bactéria resultou no desaparecimento do linfoma gástrico¹; a infecção por Hh em seres humanos é bem menos freqüente do que a verificada com o Hp, sendo possível a concomitância de infecção por ambas as espécies de bactérias⁴.

A avaliação histológica do estômago na espécie canina também mostrou a presença de bactérias espiraladas, mas com ocorrência predominante no corpo e fundo gástricos. A bactéria foi diagnosticada no muco, nas criptas

gástricas, nas glândulas gástricas e nas células parietais, sendo que o diagnóstico de gastrite leve à moderada é achado freqüente em cães, tanto sadios quanto naqueles com sintomas de doença gástrica, independentemente do grau de colonização por estas bactérias^{5,6,7}. Do mesmo modo, também não se observou alteração na função secretora gástrica entre cães colonizados ou não pelo *Helicobacter*¹¹.

Desse modo, na espécie canina, ainda não se conseguiu evidências na correlação entre a presença da bactéria na mucosa gástrica e os sintomas digestivos apresentados por esses animais, à despeito de alta incidência de colonização pelo *Helicobacter*, sendo relatadas taxas entre 72% a 100%^{5,6,7,8,9,10}. Estes estudos sugerem que o *Helicobacter* possa a ser um dos componentes normais da flora gástrica do cão.

As pesquisas relativas à incidência de *Helicobacter* em caninos foram realizados em animais sadios ou com doenças gástricas pertencentes à proprietários definidos ou de criadores de animais para laboratório, sendo que cães naturalmente infectados pelo *Helicobacter pylori* nunca foram documentados.

A presente investigação teve como objetivo o estudo da prevalência de *Helicobacter* em cães oriundos do Biotério Central da UNESP e, dada a origem desses, a probabilidade da seleção da espécie *pylori* nesses animais.

Métodos

Foram utilizados 109 caninos sem raça definida, 49 machos e 60 fêmeas, com peso variando entre 6 e 27 Kg. Os animais foram capturados em várias cidades do Estado de São Paulo, e encaminhados ao Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, sendo submetidos ao protocolo de quarentena antes do estudo. Este estudo foi aprovado pelo CEEA.

Foram utilizados três testes para investigar a presença de *Helicobacter* sp, sendo um deles específico para espécie *Helicobacter pylori*: teste imunocromotográfico; teste rápido de urease e análise histológica pela coloração de Giemsa

Todos os animais foram anestesiados antes do procedimento com solução de pentobarbital sódico 3% na dosagem de 30mg/kg/IV, com dose

suplementar do anestésico, quando necessário.

Foram retirados 10ml de sangue venoso de cada animal, colocados em tubo de vidro sem anticoagulante, com a finalidade de analisar quantitativamente os anticorpos anti-*Helicobacter pylori*, por meio do teste sorológico *H. pylori*-One Step Teste®.

As amostras gástricas foram coletadas por endoscopia em 61 animais e por meio da técnica aberta em 48 animais, sendo duas amostras do antro gástrico, duas do fundo gástrico, duas do corpo gástrico e duas do duodeno; após a coleta as biópsias foram imersas em solução tamponada de formaldeído a 10%, para posterior coloração pelo corante de Giemsa modificado.

Uma terceira amostra retirada no fundo gástrico era imediatamente colocada em solução-padrão de uréia a 10% e vermelho fenol para realização do teste rápido de urease. Todo procedimento foi realizado com EPI por todos os membros da equipe.

A cada realização do procedimento, em ambas as técnicas, todo o material ficava imerso em solução de glutaraldeído a 10% por 30 minutos após limpeza mecânica dos mesmos.

Resultados

Na Tabela 1, estão relacionados os animais distribuídos pelo sexo com positividade para *Helicobacter* pelo teste da urease, assim como a porcentagem relativa a cada sexo e em relação ao total de animais utilizados.

Na Tabela 2 encontra-se a frequência de positividade para *Helicobacter* pela coloração de Giemsa, quando analisada as 4 regiões de obtenção das amostras simultaneamente. A Tabela 3 mostra a frequência de amostras positivas para *Helicobacter* por esta técnica em cada uma das regiões examinadas e a Figura 1 ilustra o aspecto das bactérias à microscopia de imersão.

Na Tabela 4 estão distribuídos os animais por sexo com a porcentagem correspondente de positividade para a ocorrência de *Helicobacter pylori* pela técnica imunocromatográfica, utilizando-se o Kit One Step Teste. As Figuras 2 e 3 ilustram, respectivamente, o teste positivo e negativo para diagnóstico de *H. pylori* por esta técnica.

TABELA 1 - Distribuição dos animais pelo sexo, com positividade para *Helicobacter* pelo teste rápido da urease e porcentagem correspondente.

Sexo	nº animais utilizados	Nº animais positivos	Porcentagem
Macho	49	48	97,96
Fêmea	60	60	100,00
Total geral	109	108	99,08

TABELA 2 - Frequência relativa da ocorrência de *Helicobacter* à coloração pelo Giemsa, quando analisada as 4 regiões simultaneamente.

nº região positiva	nº animais	Frequência relativa
0	1	0,92
0 1	3	2,75
0 2	6	5,51
0 3	20	18,35
0 4	79	72,47
Total	109	100

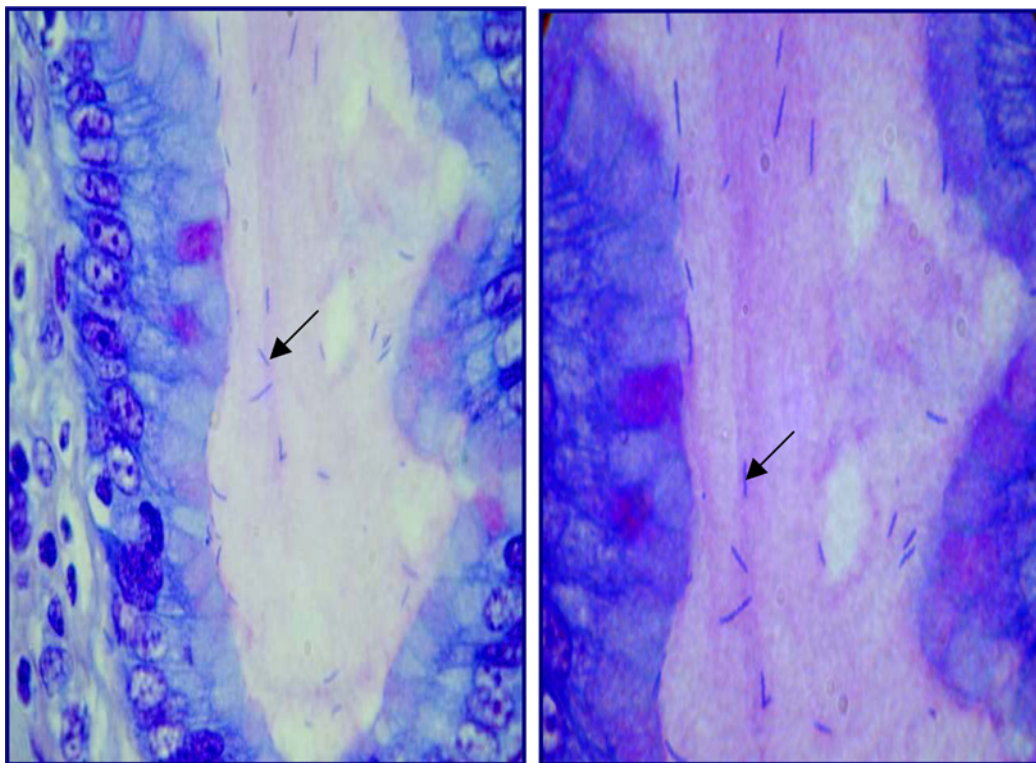
® Inlab diagnostica

TABELA 3 - Frequência de amostras com coloração positiva para *Helicobacter* em cada uma das regiões examinadas.

	Região			
	Antro	Fundo	Corpo	Duodeno
Amostras positivas	94	105	104	88
Porcentagem	86,23	96,33	95,41	80,73
Limites	79,77 - Pos- 92,71	92,80 - Pos - 99,86	91,49 - Pos -99,34	73,33 - Pos - 88,14
Total das amostras	109	109	109	109

TABELA 4 - Distribuição dos animais pelo sexo com positividade para *Helicobacter pylori* pelo teste imunocromatográfico e porcentagem correspondente.

Sexo	nº animais utilizados	Nº animais positivos	Porcentagem
Macho	49	42	85,71
Fêmea	60	44	73,33
Total geral	109	86	78,89

**FIGURA 1** - Microscopia de imersão. Bactérias alongadas e espiraladas, tipo “saca-rolhas” nas criptas alveolares visibilizadas pela coloração Giemsa (setas) (aumento 1000X).

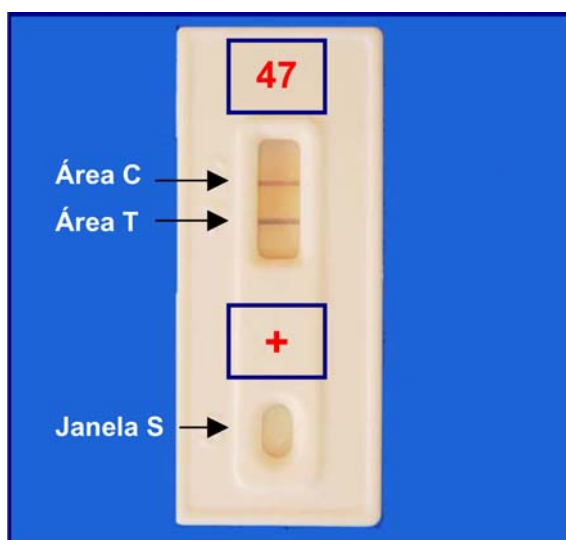


FIGURA 2 - Dispositivo imunocromatográfico com reação positiva para *H. pylori* no cão 47. A positividade é observada pela faixa rósea na área T (teste) do dispositivo.

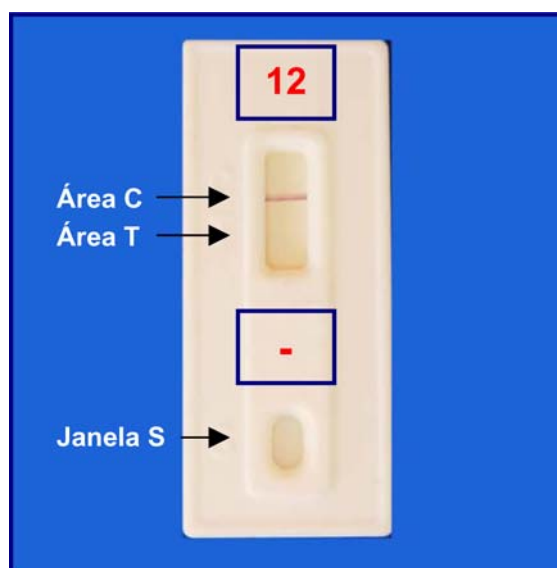


FIGURA 3 - Dispositivo imunocromatográfico com reação negativa para *Helicobacter pylori* no cão 12. A negatividade é observada pela ausência de coloração na área T (teste) do dispositivo.

Discussão

A pesquisa do *Helicobacter* pode ser realizada por diversos métodos, sendo que pelo menos dois deles devem ser utilizados para avaliar o resultado positivo. Dentre estes métodos, existem os realizados por técnicas invasivas e não invasivas.

Dentre as técnicas invasivas, destaca-se a endoscopia para a obtenção de biópsias gástricas e coleta de sangue para a detecção de antígenos circulantes¹². Na biópsia gástrica, obtida de pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta, vários métodos diagnósticos podem ser utilizados, destacando-se o teste rápido de urease, a cultura, o exame histológico e a reação em cadeia da polimerase (PCR)⁷.

O diagnóstico histológico constitui-se em um método eficaz para diagnóstico do *Helicobacter*, inclusive com possibilidade em se identificar a espécie envolvida. Como era desconhecida a densidade de bactérias nas amostras gástricas, foi utilizado o método histoquímico de Giemsa modificado que permite a identificação de bactérias quando a densidade de colonização é baixa¹³.

Pelos resultados obtidos, observamos que apenas 1 animal não apresentou a bactéria em nenhuma das 4 regiões examinadas (Tabela 2), sendo que a positividade em pelo menos uma das regiões examinadas estava em 99,08%,

correspondendo à 108/109 animais utilizados (Tabela 1). Destaca-se que o acometimento simultâneo das 4 regiões ocorreu em 79 animais, correspondendo à 72,47% das amostras (Tabela 2). Acrescenta-se aos dados acima que a maior ocorrência de detecção de *Helicobacter* ocorreu do fundo gástrico, seguido pela ocorrência no corpo gástrico.

A visibilização dessas bactérias ocorreu nas criptas foveolares, distribuídas em grupos, sem invasão das células e com aspecto alongado e espiralado, tipo “saca-rolha” (Figura 1).

Do mesmo modo, a positividade para *Helicobacter* pelo teste da urease ocorreu em 99,08% dos animais. A opção pelo teste deveu-se principalmente ao reduzido tempo de obtenção do resultado (1-12 horas), o baixo custo operacional e a alta sensibilidade do método⁷. Entretanto, resulta-se a impossibilidade em identificar a espécie, já que todas as espécies de *Helicobacter* que habitam o estômago produzem urease, apresentando portanto, a capacidade de degradar a uréia em amônia, com conseqüente mudança do pH da solução e mudança da tonalidade do meio de inoculação.

Os resultados obtidos são coincidentes com os relatados na literatura, em que a colonização pelo *Helicobacter* é elevada, podendo atingir cifras

de 100%^{5,6,7,8,9,10}. No entanto, não foi documentada a colonização natural pelo *Helicobacter pylori*.

A análise pelo teste sorológico mostrou que a detecção do *H. pylori* ocorreu em 78,9% da totalidade dos animais utilizados (Tabela 4), o que consistiria em seleção desta espécie no animal de experimentação oriundo do Biotério Central, fato até então observado em animais experimentalmente infectados pela espécie *pylori*¹⁴.

Este resultado encontrado pode ter como causa a alimentação prévia dos animais antes de sua chegada ao Biotério Central, constituídas por alimentos deteriorados, além da possibilidade de convívio com pessoas de baixo padrão sócio-econômico. As condições anteriores poderiam favorecer a seletividade da espécie *H. pylori* nos animais, visto que em seres humanos já foi documentado que as camadas da população de baixo poder aquisitivo estão relacionadas à uma maior incidência de *H. pylori*³.

Por outro lado, a forma da bactéria à microscopia de imersão, constituída por forma alongada e espiralada, não é compatível com a espécie *pylori* diagnosticada pela sorologia, e sim compatível com a morfologia do *H. helmanni*. Esse cruzamento de reação entre as 2 espécies poderia ocorrer se ambas apresentassem antígenos que pudessem ser comuns às 2 espécies ou na eventualidade da raça canina apresentar uma forma diferente de *H. pylori* daquela encontrada em humanos. Em alguns animais identificamos uma segunda forma de *Helicobacter*, contudo de morfologia também diferente do *H. pylori*.

A análise pelo teste sorológico da espécie de *Helicobacter* associada à linfoma MALT em humanos mostrou tratar-se de *Helicobacter pylori*, mas a análise do RNA confirmou tratar-se de *Helicobacter heilmannii* nesses pacientes¹. A análise por *Western blot* foram negativos em todos os pacientes, comprovando tratar-se de linfoma MALT realmente associado ao *H. heilmannii*. Em contra-prova, a resposta imune antígeno-específica em pacientes infectados por *H. heilmannii* e pacientes-controle infectados por *H. pylori* ocorreu com IgA da subunidade B (62 kilodaltons), sendo esta conhecida e presente no *H. heilmannii*.

Assim, a possibilidade de reação cruzada entre as espécies *H. helmanni* e *H. pylori* pode ter

ocorrido nesses animais por nós utilizados, já que o kit *H. pylori* One Step Teste captura anticorpos anti-*Helicobacter pylori* de todos os isotipos (IgG, IgM, IgA). E sendo a subunidade B de IgA presente e conhecida no *H. helmanni* poderia explicar a positividade elevada para *H. pylori* em nossos animais. O dispositivo imunocromatográfico contém antígenos imobilizados e um corante que quando capta anticorpos desencadeia a formação de um complexo antígeno-anticorpo-corante, detectado pelo aparecimento de uma faixa rósea na área T do dispositivo imunocromatográfico. A faixa rósea na área C do dispositivo indica a validade deste e independe de anticorpos circulante, ocorrendo por uma reação imunoquímica (Figura 2 e 3).

Sendo o cão o hospedeiro primário da espécie *H. helmanni*, em associação ao aspecto histológico das bactérias encontradas, é pouco provável tratar-se de *H. pylori* em nossos animais, à despeito da alta positividade apresentada pelo teste sorológico. No entanto, estes animais podem compor uma importante fonte de disseminação desta espécie para a equipe de pesquisadores, já que a infecção do homem por *H. helmanni* também leva à quadros clínicos definidos como a gastrite⁴ e linfoma MALT³. Ressalta-se que devido à pequena ocorrência de *H. helmanni* em humanos em relação ao *H. pylori*, a probabilidade de ocorrência do linfoma MALT é maior quando a infecção se faz pelo *H. helmanni*¹.

A necessidade da confirmação precisa da etiologia da *Helicobacteriose* identificada no presente estudo remete a um possível aprofundamento da pesquisa a fim de comprovar se há identidade ou não entre a *Helicobacteriose* encontrada no seres humanos e caninos. Nesse sentido, testes específicos e mais acessíveis dos que os atualmente em uso podem ser desenvolvidos para a verificação da espécie de *Helicobacter* envolvido tanto em caninos como em seres humanos.

Conclusão

Frente à metodologia empregada no presente estudo, podemos concluir à respeito dos cães oriundos do Biotério Central da UNESP e utilizados em pesquisas experimentais que:

1) Estes animais apresentam taxa de colonização por *Helicobacter* em 99,02% da amostragem;

2) O aspecto histológico é compatível com a espécie *helmanni*;

3) A sorologia utilizando o kit *H. pylori* One Step Teste não é específica para a detecção do *H. pylori*;

4) Estes animais não são naturalmente infectados pelo *H. pylori*.

Referências

- 1- Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, Neubauer B, Neubauer A, Stlte M, Bayerdörfer E. *Helicobacter heilmannii*- associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 2000;118:821-8.
- 2- Megraud F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22:73-88.
- 3- Souto FJD, Fontes CJF, Rocha GA, Oliveira AMR., Mendes EN, Queiroz DMMQ. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in a rural area of the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:171-4.
- 4- Rodrigues MAM, Câmara ACB, Figueiredo AAO, Frederique JU. Gastrite crônica associada a infecção pelo “*Gastrosprillum hominis*”. *Gastroenterol Endoscop Dig* 1996;15:141-3.
- 5- Hermanns W, Kregel K, Breuer W, Lenchner J. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J Comp Pathol* 1995;112:307-18.
- 6- Lecoindre P, Chevallier M, Peyrol S, Boude M, Montclos H. Contribution à l'étude des hélicobactéries de l'estomac du chien et de leur rôle pathogène. *Rev Méd Vet* 1995;146:671-80.
- 7- Eaton KA, Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman BE, Paola J. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *J Clin Microbiol* 1996;34:3165-70.
- 8- Happonen I, Linden J, Saari S, Karjalainen M, Hänninen ML, Jalava K. Detection and effects of *Helicobacters* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213:1767-74.
- 9- Mendes EN, Collares GB, Gonçalves HL, Queiroz DMM, Rocha GA, Mesquita Filho PR. Pesquisa de *Helicobacter* na mucosa gástrica de animais domésticos. In: Resumos do 20o congresso Brasileiro de Microbiologia;1999, Salvador.
- 10- Hwang CY, Han HR, Youn HY. Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. *J Vet Sci* 2002;3:123-34.
- 11- Simpson KW, Strauss-Ayali D, McDonough PL, Chang YF, Valentine BA. Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. *Infection. J Vet Intern Med* 1999a; 13:507-15.
- 12- Ladeira MSP. Estudos dos danos do DNA de células da mucosa gástrica de pacientes com gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico, infectados ou não por *H. pylori*. [Tese - Doutorado]. Universidade Estadual Paulista-Botucatu; 2001
- 13- Lechago J. Classificación de las gastritis crônicas: después de Houston 94. In: Anais do 23o Congresso Brasileiro de Patologia;1999 Jun 02-06;Curitiba.
- 14- Rossi G, Rossi M, Vitali CG, Fortuna D, Burrioni D, Pancotto L et al. A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1999;67:3112-20.

Correspondência:

Rogério Saad-Hossne

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP

Departamento de Cirurgia e Ortopedia

18618-970 Botucatu - SP

saad@fmb.unesp.br

Recebimento: 26/06/2004

Revisão: 18/07/2004

Aprovação: 01/09/2004

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Souza ML, Kobayasi S, Rodrigues MAM, Saad-Hossne R, Naresse LE. Prevalência de *Helicobacter* em cães oriundos do biotério central da UNESP-Botucatu. *Acta Cir Bras* [serial online] 2004 Set-Out;19(5). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb> [também em CD-ROM].

*Figuras coloridas disponíveis em www.scielo.br/acb