

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Helicobacter pylori em cães com leishmaniose.

Ulisses Perigo Oliveira

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Helicobacter pylori em cães com leishmaniose.

Ulisses Perigo Oliveira
Graduando

Prof. Dr. Almir Pereira de Souza
Orientador

Patos-PB
Outubro de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

O48h Oliveira, Ulisses Perigo
Helicobacter pylori em cães com leishmaniose / Ulisses Perigo Oliveira. – Patos, 2016.
33f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

“Orientação: Prof. Dr. Almir Pereira de Souza”

Referências.

1. Estômago. 2. Canino. 3. Helicobacterias. 4. Zoonose. 5. Microbiologia.
I. Título.

CDU 616:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ULISSES PERIGO OLIVEIRA
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Medico Veterinário.

ENTREGUE EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Pereira de Souza

Nota

Prof. Dr. Antonio Flávio Medeiros Dantas

Nota

M. V. MSc Rodrigo Antonio Torres Matos

Nota

“Todo saber e todo aumento de saber, em vez de
terminar em uma solução, dá antes início a uma nova
dúvida. Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas.
E a cada resposta, uma nova pergunta se segue.”

Dedico este trabalho ao meu pai Geraldo Medeiros Oliveira *in memoriam*, minha mãe Maria do Carmo Perigo Fernandes, minha amiga Volfraniad Dias Pinheiro Sá e a todos os meus familiares e amigos que contribuíram para a minha formação.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 - INTRODUÇÃO.....	12
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 – GÊNERO <i>HELICOBACTER</i>	14
2.1.1 – <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	14
2.1.2 - <i>HELICOBACTER SPP.</i> EM CÃES	15
2.2 - TRANSMISSÃO	16
2.3 – POTENCIAL ZOONÓTICO	17
2.4 – MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	18
2.5 LEISHMANIOSE.....	19
3 – MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 - ANIMAIS	21
3.2 - COLETAS DAS AMOSTRAS GÁSTRICAS	21
3.3- IDENTIFICAÇÃO DE <i>H. PYLORI</i>.....	21
3.3.1. TESTE RÁPIDO DE UREASE.....	21
3.3.2. CULTURA MICROBIOLÓGICA.....	22
3.4. HISTOPATOLOGIA.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 – CONCLUSÃO	27
6 – REFERÊNCIAS	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Amostras positivas ao teste de uréase	20

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico utilizados para diagnosticar *H. pylori* através de métodos invasivos 15

Tabela 2. Resultados dos testes bioquímicos para identificação de *Helicobacter* sp. 21

RESUMO

OLIVEIRA, ULISSES PERIGO. *Helicobacter pylori* em cães com leishmaniose.
UFCG, 2016, 33 p. (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária).

Nos animais de companhia vem sendo estudada cada vez mais a presença de microrganismos com potencial zoonótico à exemplo das Helicobacterias. Objetivou-se com o presente trabalho investigar a presença do gênero *H. pylori* e suas possíveis alterações na mucosa gástrica de cães acometidos de leishmaniose por meio de diferentes técnicas laboratoriais, sem histórico prévio de patologia gástrica. Para tanto foram investigadas seis amostras de estômagos de cães de idades, raças e sexo diferentes diagnosticados com *Leishmania*. Após a eutanásia foram coletadas amostras de conteúdo estomacal através de suabe e fragmentos dos estômagos para a confecção de lâminas para avaliação histopatológica das possíveis alterações causadas pelo agente. Para a identificação do *H. pylori* foram realizados os testes rápidos de uréase, cultura microbiológica seguida de testes bioquímicos de uréase, catalase, oxidase e redução de nitrato. Ao teste rápido da uréase, apenas dois animais foram negativos na região pilórica, na cultura microbiológica, dos seis animais três apresentaram características enzimáticas de *H. pylori*. Na avaliação histopatológica, nas amostras coradas com hematoxilina e eosina as principais alterações observadas foram infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na lâmina própria, variando de leve a moderado, alterações comumente observadas, porém sem causa associada. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que cães portadores de *Leishmania* são susceptíveis à infecção natural por *H. pylori*. Adicionalmente, recomenda-se que animais positivos para *Leishmania* que forem ser submetidos a tratamento o clínico deverá ter atenção a manifestações gástricas causadas por helicobacterias como diagnóstico diferencial a possíveis efeitos colaterais causados pelos fármacos usados no tratamento contra leishmaniose.

Palavras-chave: estômago, canino, helicobactérias, zoonose, microbiologia.

ABSTRACT

OLIVEIRA, ULISSES PERIGO. *Helicobacter pylori* in dogs with Leishmaniasis.

UFCG, 2016, 33 p.

(Work Completion of course in Veterinary Medicine).

The presence of microorganisms with potential zoonotic as example the helicobacter in pets has been increasingly studied. This study aimed to investigate the presence of the gender *H. pylori* and possible changes in the gastric mucosa of dogs with leishmaniasis through different laboratory techniques, without previous history of gastric pathology. Therefore, six stomachs of dogs of different age, race and sex, diagnosed with Leishmania, were investigated through lymph node puncture, bone marrow and ear tip scarification. After euthanasia stomach fragments and swabs with stomach content were collected for histopathologic evaluation of the possible changes caused by the agent. For the identification of *H. pylori* were carried out rapid urease tests, microbiological culture followed by biochemical tests with the urease tests, catalase, oxidase, and nitrate reduction. On the rapid urease test, only two animals were negative form to the test in the pyloric region of microbiological culture, colonies suggestive for *Helicobacter* were subjected to biochemical tests for the characterization of the agent, three animals of the six showed biochemical characteristics of *H. pylori*. In histopathologic evaluation, the major changes in the samples stained with hematoxylin and eosin were inflammatory infiltration (lymphoplasmocytic) in the lamina propria, ranging from mild to moderate, commonly observed changes, but without an associated cause. Based on these results, we can conclude that dogs with Leishmania are susceptible to natural infection by *H. pylori*. Additionally, it is recommended that animals positive for Leishmania which are to undergo treatment should have their stomachs evaluated endoscopically and have samples collected for the diagnosis of *H. pylori* by biochemical methods and/or microbiological culture.

Keywords: stomach, canine, helicobacter, zoonosis, microbiology.

1 - INTRODUÇÃO

A presença de bactérias espiraladas no estômago de animais foi originalmente descrita há mais de cem anos. Esses microrganismos foram primeiramente denominados espiroquetas, depois organismos semelhantes ao *Campylobacter* e atualmente organismos semelhantes ao *Helicobacter*. *Helicobacter* é um gênero de bactérias gram-negativas dotadas de pequenos flagelos com alta capacidade de se multiplicar no estômago devido à produção e importante atividade da enzima uréase, que tem sido encontrada no estômago de mamíferos. Acredita-se que estão associadas à ocorrência de gastrites, úlceras e neoplasias gástricas. A transmissão do gênero *Helicobacter* tem sido sugerida devido à presença de microrganismos gástricos com morfologia similar a este, no estômago de várias espécies animais como cães, gatos, suínos, bovinos, ovinos, aves, furões, macacos, camundongos, ratos, hamsters, marmotas, raposas, guepardos, golfinhos, baleias dentre outros.

A infecção pela espécie *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica é considerado como a mais frequente infecção crônica que ocorre em humanos. Há uma estimativa de que pelo menos metade da população mundial esteja infectada por este microrganismo, tornando-o um dos principais agentes patogênicos da espécie humana e destacando-o como um importante problema de saúde pública. A realização de estudos sobre a patogenicidade dessa bactéria são de extrema importância, visto que os animais domésticos podem servir de reservatórios para a transmissão de *Helicobacter* spp para os humanos. As formas de transmissão dessa infecção são incomuns tanto para animais quanto para seres humanos, podendo a infecção cursar assintomática.

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa crônica frequentemente letal, causada nas Américas pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (*L. (L.) i. chagasi*) e transmitida pelo díptero *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. O cão é o principal reservatório doméstico de *L. (L.) i. chagasi*, sendo o responsável pela manutenção desse agente em áreas endêmicas. A leishmaniose canina pode acometer vários órgãos e, dessa forma, poderá apresentar características clínicas diferentes. Estas podem variar desde um aparente estado sadio até um estado grave, podendo evoluir para a morte. Tem-se como medida preventiva a eutanásia dos animais positivos seguindo os preceitos bioéticos e de bem-estar animal preconizados pela resolução nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, assim estes animais possibilitam a realização

de estudos complementares através de diversos materiais coletados na necropsia. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de *H. pylori* na mucosa gástrica de cães encaminhados para necropsia com diagnóstico positivo de leishmaniose da cidade de Patos e região sem histórico prévio de patologias gástricas a fim de se determinar a ocorrência desse agente e suas características patogênicas.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Gênero *Helicobacter*

A presença de microrganismos com morfologia espiral no estômago de homens foi descrita em 1886 pelo pesquisador clínico polonês Walery Jaworski. Porém, essa descoberta não foi de grande relevância até o fim da década de 70, quando Warren, patologista australiano notou o aparecimento de bactérias com morfologia espiral na mucosa gástrica, principalmente sobre o tecido inflamado. Dois pesquisadores, Warren e Marshall, em 1982, conseguiram pela primeira vez isolar esses microrganismos de 11 pacientes com gastrite (KONTUREK, 2003).

A bactéria pertence ao Reino Prokaryotae, Filo Bacteria (Eubacteria), Classe Proteobacteria, Subdivisão delta e epsilon, Subclasse epsilonproteobacteria, Ordem Campylobacteriales, Família Helicobacteriaceae, Gênero *Helicobacter*, Espécie *pylori*. A princípio essas bactérias foram denominadas de *Campylobacter pylori* em seguida *Helicobacter pylori* devido as suas características estruturais e genéticas que demonstraram que elas deveriam ser classificadas em um novo gênero. No ano de 2005, Marshall e Warren comprovaram o potencial patogênico do *H. pylori* e essa descoberta lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina nesse mesmo ano (OWEN, 1998; KONTUREK, 2003).

O número de espécies do gênero *Helicobacter* vem crescendo constantemente e identificadas em várias espécies animais, muitas delas são patogênicas e só foram identificadas devido às alterações causadas em seus hospedeiros. Enquanto o *H. pylori* é bem reconhecido como um patógeno importante, o gênero como um todo é bem menos reconhecido como causa importante de mortalidade em uma grande variedade de espécies animais (HARBOUR; SUTTON, 2008). Em cães e gatos as principais espécies de *Helicobacter* são: *H. felis*, *H. bizzozeronii*, “*H. happini*”, “*H. heilmanii*”, *H. canis*, *H. cynogastricus* e *H. marmotae*, sendo *H. felis* e “*H. heilmanii*” associados a gastrite e *H. canis* associado a diarreia (FOX et al., 2007; HARBOUR; SUTTON, 2008).

2.1.1 – *Helicobacter pylori*

Sobre a etiologia do agente, o nome *Helicobacter* vem de helix (espiral), bacter (bastonete) e pylorus (parte inferior do estômago). O *H. pylori* é uma bactéria Gram-

negativa, isto é, as membranas interna e externa são separadas por um espaço periplasmático e um citoplasma denso contendo material nuclear e ribossomos, de forma espiralada, móvel, não esporulada, microaerófila, que mede aproximadamente 0,5 µm de comprimento e 0,3 µm de largura e são catalase, oxidase e uréase positivas. Quanto a morfologia são móveis e possuem uma superfície lisa com quatro a oito flagelos unipolares, embainhados e com bulbos terminais nas extremidades distais, tornando-o extremamente adaptável a mucosa gástrica (MARSHALL, 2002).

Quanto às características bioquímicas as mais destacáveis são prova de catalase e oxidase e abundante presença da enzima uréase que a permite sobreviver no meio ácido do estômago devido a sua capacidade de gerar amônia e bicarbonato através da ureia, originando uma camada alcalina ao redor da bactéria (THIBAUT et al., 2007).

Reconhecida a associação do *H. pylori* com o desenvolvimento de câncer gástrico, inúmeros estudos vêm sendo feitos em relação ao seu potencial patogênico (HARBOU; SUTTON, 2008). Em 1994 a *International Agency for Research on Cancer* (IACR) concluiu que há evidências para classificar o *H. pylori* como carcinogênico humano grupo um (grupo dos agentes que envolvem risco carcinogênico para seres humanos) (KONTUREK et al., 2009).

2.1.2 - *Helicobacter spp.* em cães

Em cães e gatos tem sido estudada a ocorrência de organismos semelhantes ao *Helicobacter* tanto em animais clinicamente saudáveis, como em animais com sintomas gastrointestinais (GEYER et al., 1993; HAPPONEN et al., 1996). Em um estudo realizado com Beagles a infecção experimental com *H. felis* causou gastrite nesses animais (JALAVA et al., 1998). Diferentes espécies de primatas não humanos desenvolveram gastrite quando infectados por *H. pylori* de forma natural ou experimental (HANDT et al., 1995). Um estudo inoculando *H. pylori* em suínos e cães induziu gastrite crônica similar à gastrite associada com *H. pylori* em crianças (LEE et al., 1992).

Demonstrando taxa de infecção de 100% em cães da raça Beagle, a infecção por Helicobacterias em cães e gatos parece ser muito frequente (SIMPSON; BURROWS, 1997). Em um estudo realizado no estado da Paraíba que objetivou verificar a presença do Gênero *Helicobacter spp* na mucosa gástrica de cães recolhidos na Gerência de Vigilância Ambiental e Zoonoses bem como identificar os fatores de risco associados a presença da

bactéria, 88% dos animais foram positivos para *Helicobacter spp.* no teste da uréase, demonstrando sua alta prevalência nos cães da região (FARIAS, 2014).

Semelhantes ao *Helicobacter*, vários organismos tem sido encontrados em todas as regiões gástricas de cães e gatos (HAPPONEN, 1996), sendo mais frequentes nas regiões cárdica, fúndica e pilórica (LEE et al., 1992; HERMANNNS et al., 1995).

Diferentemente do que acontece com a infecção por *H. pylori* no homem, o significado da infecção em cães ainda não está bem esclarecido, tornando necessários mais estudos afim de determinar se as patologias gástricas dos cães podem ser atribuídas a essa bactéria, apesar da alta frequência de infecção (SIMPSOM; BURROWS, 1997; JALAVA et al., 1998).

2.2 - Transmissão

O *H. pylori* já foi isolado de superfícies externas, intestinos e excretas de moscas (*Musca doméstica*), sugerindo que tais insetos podem atuar como vetores na transmissão do agente, contaminando alimentos consumidos por seres humanos (GRUBEL et al., 1997).

A primeira forma de transmissão sugerida foi a fecal-oral devido ao sucesso no isolamento do microrganismo através da cultura de fezes (STRAUSS-AYALI; SIMPSON, 1999). Um estudo relatou a capacidade de sobrevivência da bactéria no leite por vários dias, sugerindo que o leite contaminado por fezes contendo *H. pylori* pode ser potencialmente infeccioso (FOX, 1995; DORE et al., 1999). Segundo Lecoindre et al. (1997) a infecção por helicobactérias em cães pode chegar a 100% em animais que vivem em coletividade (canil, abrigos) e em animais de companhia essa infecção pode variar de 45 a 80%.

Após o isolamento na saliva de pessoas infectadas por *H. pylori* e em saliva e líquido gástrico de carnívoros domésticos foi sugerida a via oral-oral (STRAUSS-AYALI; SIMPSON, 1999). O habito de lambar sua pelagem, a ocorrência frequente de vômitos e o íntimo contato com seus proprietários e/ou outros animais da mesma espécie aumentam a incidência da transmissão por esta via (LECOINDRE et al., 1997).

A cavidade oral tem sido proposta como reservatório da infecção e reinfecção por *H. pylori*, podendo a regurgitação de suco gástrico contaminar a boca predispondo a colonização por esse microrganismo por tempo indeterminado (KODAIRA et al., 2002).

Além disto, estudos relataram más condições de saneamento básico como fator determinante para a infecção por helicobactérias nos homens e nos animais (FOX, 1995; LECOINDRE et al., 1997; VELÁZQUEZ; FEITARG, 1999; KODAIRA et al., 2002).

2.3 – Potencial Zoonótico

Correlações entre o isolamento do *H. pylori* em animais, principalmente os que vivem em ambiente doméstico, e enfermidades em seres humanos comprovam e caracterizam a infecção por esse agente como uma zoonose (MACH, 2001). Devido à elevada prevalência de anticorpos anti-*H. pylori* em indivíduos que mantinham uma relação mais próxima com animais, como funcionários de frigoríficos (abatedouros), açougueiros e veterinários, sugeriram que esse agente pode ser transmitido dos animais ao homem (DORE et al., 1999).

Através de um estudo das espécies de *Helicobacter* realizado com estômagos de suínos, Choi et al. (2001) relataram a presença *H. pylori* e *H. heilmanni* como patógenos zoonóticos e que suínos podem ser uma fonte potencial para a infecção humana, o que do ponto de vista de saúde pública tem elevada importância. Um estudo realizado com 112 vacas clinicamente saudáveis abatidas em matadouro identificaram 101 amostras de abomaso com a identificação de microrganismos semelhantes ao *H. pylori* (BRAUN et al., 1997).

Estima-se que aproximadamente 40% da população mundial possui animais de companhia em casa (MCISAAC; LEUNG, 1999) assim como o contato direto com outros tipos de animais, como os de produção em áreas rurais (DORE et al., 1999), alertando para a possibilidade de transmissão de espécies de *Helicobacter* para os seres humanos. Apresentando pequeno, mas real potencial zoonótico, outras helicobactérias podem infectar o estômago de animais (NEIGER; SIMPSON, 2000). Relatos mostram que o risco de transmissão por *H. heilmanni* entre animais e o homem é muito baixo quando comparado ao *H. pylori* (encontrado em 30 a 100% das gastroscopias) apesar da frequente ocorrência daqueles organismos em cães e gatos, do crescente número de animais de companhia e do contato íntimo com humanos (EATON et al., 1996; STRAUSS-AYALI; SIMPSON, 1999).

2.4 – Métodos de diagnóstico

Os testes para o diagnóstico da infecção por *Helicobacter* spp. podem ser estabelecidos de forma invasiva ou não invasiva. Através de endoscopia, os testes invasivos tem como desvantagem o alto custo, o desconforto ao paciente e a exposição ao risco de infecção cruzada (CAMPUZANO-MAYA, 2007) e incluem o teste rápido de urease, citologia, histopatologia, cultura e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os métodos não invasivos detectam a presença de *Helicobacter* de forma indireta, sendo eles o teste respiratório com ureia marcada e sorologia, sendo os métodos invasivos os mais utilizados na Medicina Veterinária (STRAUSS-AYALI; SIMPSON, 1999; VELÁZQUEZ & FEITARG, 1999; HAHN et al., 2000).

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para diagnosticar *H. pylori* através de métodos invasivos.

Métodos de diagnóstico		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Métodos invasivos	Cultura	70–90	100
	Histologia	80–98	90–98
	Teste rápido da urease	90–95	90–95
	PCR	90–95	90–95

Fonte: Fischbach et al., 2009.

O teste da urease é simples, barato e rápido e baseia-se na produção de urease pelas bactérias. Kits comerciais são encontrados facilmente, estes contém uma combinação de ureia e um indicador de pH. O teste também pode ser preparado em tubos com uréia a 10% em água destilada e vermelho de fenol como indicador de pH. A mudança para a cor rosa indica positividade do resultado e o tempo decorrido até a mudança de cor está diretamente ligado a concentração de bactérias presentes na amostra (FOX et al., 1995; SIMPSON & BURROWS, 1997). O teste da urease para a detecção de helicobactérias apresenta sensibilidade de 80 a 90% (HAHN et al., 2000), a presença de micro-organismos semelhantes produtores de urease (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) geram

resultados falsos positivo assim como falsos negativo devido ao pequeno numero de *Helicobacter*, fazendo com que o exame histológico por meio de biopsias gástricas seja o recomendado para diagnóstico definitivo (HAPPONEN et al., 1996; HAHN et al., 2000).

Devido a distribuição irregular das bactérias no estômago devem ser obtidos múltiplas biopsias de diferentes áreas do estômago. A histopatologia traz a vantagem de avaliar alterações teciduais e a presença de células inflamatórias através da coloração com HE (Hematoxilina e Eosina) e a localização das bactérias na mucosa gástrica através da coloração Carbol – Fucsina (DOOLEY, 1993; STRAUSS-AYALI; SIMPSON 1999).

Métodos de coloração especial se fazem necessários para a identificação das helicobactérias como coloração pela prata (Warthin Starry e Steiner Modificado) ou Carbol-Fucsina (Fucsina fenicada) (STRAUSS-AYALI; SIMPSON, 1999).

Sendo organismos bastante exigentes, a cultura de *Helicobacter* spp. torna-se difícil e de baixa sensibilidade (15,41 – 51%) quando comparado a outros métodos de diagnóstico (HAPPONEN et al., 1996; STRAUSS-AYALI; SIMPSON, 1999). Embora não seja realizada rotineiramente, a cultura do *H. pylori* é considerada o padrão-ouro para o seu diagnóstico (VINETTE et al., 2004) tendo uma sensibilidade de 70-90% e uma especificidade de 100% (FISCHBACH et al., 2009).

A reação em cadeia polimerase (PCR) tem se mostrado valioso método diagnóstico para a detecção de vários micro-organismos incluindo o *Helicobacter* spp. São utilizáveis nos ensaios de PCR, amostras gástricas, saliva, placa dental e fezes (VINETTE et al., 2004).

2.5 Leishmaniose

A leishmaniose visceral é uma patologia infecciosa crônica frequentemente letal causada nas Américas pelo gênero *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* (*L. (L.) i. chagasi*) e transmitida pelo díptero *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (MISSAWA; LIMA, 2006). O cão é o principal reservatório doméstico do parasita, sendo o responsável pela manutenção desse agente em áreas endêmicas (ASHFORD, 1996). A doença pode acometer diversos órgãos, variando sua apresentação clínica, podendo assim apresentar características clínicas diferentes, variando desde um aparente estado sadio até um estado muito grave, podendo evoluir para a morte (MOURA et al., 2002). Várias órgãos são afetados pela *Leishmania* sendo eles fígado, baço, rins, linfonodos e pele (IKEDA et al., 2005). A disseminação do parasito para órgãos não pertencentes ao sistema mononuclear

fagocitário, a exemplo do coração, tem sido descritos na literatura (MENDES et al., 2014). Tem-se como medida preventiva a eutanásia dos animais com diagnóstico positivos seguindo os preceitos bioéticos e de bem-estar animal, preconizados pela resolução nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária,

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados seis cães atendidos no Hospital Veterinário da UFCG previamente diagnosticados com *Leishmania* pelo teste parasitológico (esfregaço sanguíneo), citologia por punção de linfonodos, medula óssea e escarificação da ponta da orelha, sendo duas fêmeas e quatro machos, com idades entre um e oito anos, sem histórico prévio de patologia gástrica que em seguida foram encaminhados para eutanásia e posterior necropsia no setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UFCG.

3.2 - Coletas das amostras gástricas

Todos os estômagos foram avaliados frescos. Após o corte na curvatura maior iniciando pelo duodeno, foram coletados com suabe amostras das regiões cárdica, fúndica e pilórica e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da UFCG, campus de Patos-PB, para realização dos testes para identificação de *H. pylori*. Foram coletados fragmentos das mesmas regiões e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UFCG, campus de Patos-PB, para confecção de lâminas e avaliação histopatológica.

3.3- Identificação de *H. pylori*

3.3.1. Teste rápido de Urease

As amostras gástricas foram coletadas através de suabe com conteúdo estomacal das regiões cárdica, fúndica e pilórica e colocadas em tubos tipo falcon 15ml esterilizados, contendo três ml de caldo ureia diluída a 10% em água destilada estéril e indicador de pH vermelho de fenol. O material permaneceu vedado e armazenado em estufa na temperatura de 37°C no período de 24 horas, com avaliações na mudança de cor do meio a cada hora para indicação do resultado do teste. A mudança de cor do amarelo para vermelho róseo foi considerada positiva para microrganismos produtores de urease.

3.3.2. Cultura microbiológica

As amostras coletadas foram colocadas diretamente em caldo de transporte Thioglicolato e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande para cultura em Agar específico (Vancomicina + Anfotericina B + 5% de sangue de carneiro desfibrinado) em placas de petri, armazenados em jarra anaeróbica com kit gerador de microaerofilia (Probac®) em estufa à temperatura de 37°C com realização de leitura a cada 48 horas. As amostras em que houve crescimento microbiano foram submetidas a coloração de Gram para verificar as características morfotintoriais em objetiva 100x. As colônias sugestivas para *Helicobacter* foram submetidas as provas bioquímicas para caracterização do agente, sendo estas redução do nitrato, catalase e uréase e oxidase.

3.4. Histopatologia

As amostras de tecidos das regiões cárdica, fúndica e pilórica foram fixadas em formol tamponado a 10%, processadas e incluídas em parafina. Sessões histológicas de 3 a 5 µm de espessura foram coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) e em seguida analisadas por meio de microscopia óptica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos seis estômagos avaliados, não houve correlação entre sexo, idade ou raça. Todos os cães eram domiciliados e cinco deles apresentavam conteúdo alimentar. Em dois estômagos foi possível visualizar a presença de pelos misturados ao conteúdo alimentar. Apenas um estômago apresentou áreas hiperêmicas com aspecto hemorrágico na região fúndica, porém na avaliação clínica não foi identificado nenhum sinal de patologia gástrica. Nenhum animal apresentou hiperemia na região de piloro característica de gastrite. Estudos mostram que a presença do microrganismo não está diretamente ligada a patologias gástricas, podendo o portador ser assintomático, assim como alterações macroscópicas, em muitos trabalhos, estão diretamente ligadas à presença e potencial patogênico do *H. pylori* no desenvolvimento de gastrite crônica e na formação de úlceras gástricas. As Helicobacterias, nos últimos tempos, vem sendo alvo de importantes estudos sendo reconhecida a importância de *H. pylori* como um agente ulcerogênico e potencialmente carcinogênico no homem (KUSTERS et al., 2006). A resposta inflamatória que o *H. pylori* provoca no hospedeiro pode, se prolongada no tempo, provocar uma atrofia de mucosa, seguida por uma hipertrofia compensatória (DE BOCK et al., 2006), essa hipertrofia junto a liberação de citocinas e outros compostos, devido a resposta inflamatória vão causando danos ao DNA celular contribuindo para o desenvolvimento de malignidade (BALKWILL; MANTOVANI, 2001) alterações estas que não foram identificadas nos estômagos estudados.

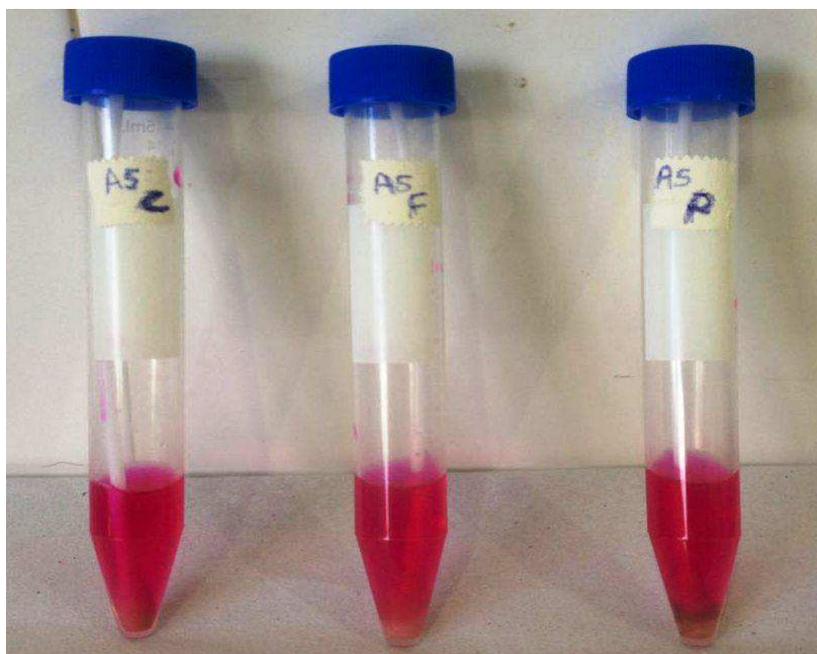
Nos cães e gatos ainda não foi demonstrado, sem duvidas, uma clara correlação entre a presença de *Helicobacter* spp. e doença gástrica, existindo estudos que demonstram essa relação (TAKEMURA et al., 2007) enquanto outros não a evidenciam (MOUTINHO et al., 2007) assim como no presente estudo.

Quanto ao teste de uréase, todos os animais foram positivos em no mínimo duas regiões (dois animais foram negativos na região pilórica) tendo este teste uma sensibilidade e especificidade de 90 a 95% (FISCHBACH et al., 2009)

Quanto a reatividade do teste, apenas uma amostra demorou mais de 20 horas para reagir positivamente considerando o fato de poder ocorrer resultados falso positivos principalmente se a leitura for ocorrer após 24 horas. Há correlação direta entre o tempo de reação com a quantidade de microrganismos produtores de uréase. A pesquisa da atividade da uréase pode ser considerada como prova da presença de *Helicobacter* spp.. A resistência

ao ácido clorídrico é o que confere vitalidade e patogenicidade ao *H. pylori*, sem essa característica biológica, a bactéria não teria condições de colonizar a mucosa gástrica. A enzima uréase, proteína de alto peso molecular (500 a 600 KDa), promove a hidrólise da ureia presente no suco gástrico em condições fisiológicas e leva a produção de amônia. Esta atua como receptor de íons H⁺, gerando um pH neutro no interior da bactéria, conferindo ao *H. pylori* resistência à acidez gástrica (LADEIRA et al., 2003).

Figura 1- Teste da uréase – tubos com conteúdo vermelho rósea indicando mudança de pH e produção de uréase (resultado positivo).



Fonte: Arquivo pessoal.

Das seis amostras coletadas e cultivadas, três apresentaram colônias com características morfológicas do gênero. Em relação à cultura microbiológica, sendo o resultado positivo não há dúvidas em relação à presença da bactéria (MCCLAIN et al., 2000). A cultura é o teste diagnóstico mais específico e importante para determinar a caracterização deste tipo de bactéria, fornecendo suas características microbiológicas e bioquímicas possibilitando testes de susceptibilidade a antibióticos. Sua limitação é o custo oneroso em relação ao teste de uréase, sendo mais usado para fins de pesquisa como no presente trabalho. As colônias de *H. pylori* crescem após um mínimo de três dias e são pequenas, redondas e lisas. A identificação das colônias envolve exame microscópico e

detecção de enzimas, como uréase, catalase e oxidase (MÉGRAUD, 1999). Na tabela 2 demonstra-se os testes bioquímicos aos quais as amostras foram submetidas e seus respectivos resultados caracterizando o *H. pylori*.

Tabela 2. Resultados das amostras de seis estômagos de cães portadores de *Leishmania* submetidos a testes bioquímicos para identificação de *Helicobacter* sp.

<i>H. pylori</i>	Catalase	Redução de Nitrato	Urease	Oxidase
A 1	+	+	-	-
A 2	+	-	+	+
A 3	-	+	-	-
A 4	+	-	+	+
A 5	+	-	+	+
A 6	-	+	-	-

Devido às exigências do microrganismo, problemas como contaminação durante a cultura e a necessidade de repique para o isolamento da bactéria, têm como consequência não se poder afirmar de qual a região do estômago a bactéria foi isolada assim como em diversos trabalhos.

Na avaliação histopatológica todas as amostras apresentaram alterações do tipo infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na lamina própria variando de discreto à moderado na região fúndica (dois) e nas regiões cárdica e fúndica (quatro), alterações estas que não indicam patologia gástrica, mas que é frequentemente observada na rotina, porém sem causa associada. Outros estudos descrevem a presença de infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa de animais infectados por *H. pylori*. Em alguns trabalhos identificaram uma resposta inflamatória exuberante, predominantemente constituída por plasmócitos e linfócitos, com alguns histiócitos e neutrófilos superficialmente e uma infiltração linfocítica mais intensa por vezes folicular e mais profundamente na mucosa, diferente das encontradas na presente pesquisa. Diferindo dos resultados encontrados, a presença de infiltrado inflamatório em uma concentração celular alta pode estar correlacionado com a presença de *Helicobacter* spp. que é reconhecido como fator indutor de infiltrado de células mononucleares, erosões e úlceras (REINDEL et al., 1999). Assim

como os resultados encontrados nesse estudo é possível que lesões anteriormente descritas como lesões espontâneas, sem causa bem definida fossem causadas por *Helicobacter* spp..

Durante muito tempo acreditava-se que o ser humano era o único reservatório do *H. pylori*, porém estudos como esse demonstram a colonização da bactéria em cães domésticos, assintomáticos de doenças gástricas sugerindo que os mesmos possam servir como reservatórios e vetores do agente. O *H. pylori* coloniza o estômago de cães portadores de Leishmaniose sem correlação com patologia gastroentérica. Atribuir o potencial zoonótico para a infecção por *H. pylori* junto a uma potente zoonose como a leishmaniose deve ser levado em consideração devido ao contato íntimo do ser humano com os cães. O espaço dos animais de companhia na vida da sociedade moderna deve ser percebido e trabalhado através de Políticas Públicas, a atribuição de valores sentimentais e consideração como membro da família, fato este que deve ser aliado a noções básicas de higiene, educação e guarda responsável de cães e gatos para minimizar o potencial zoonótico de diversas afecções.

Frente à possibilidade de tratamento para leishmaniose em cães, em substituição à eutanásia, o clínico deverá ter atenção a manifestações gástricas causadas por helicobacterias como diagnóstico diferencial a possíveis efeitos colaterais causados pelos fármacos usados no tratamento da *Leishmania*.

5 – CONCLUSÃO

Cães portadores de *Leishmania* são susceptíveis à infecção natural e assintomática por *Helicobacter pylori*. Os métodos utilizados no presente trabalho devem ser utilizados em conjunto para a identificação da bactéria. Adicionalmente, recomenda-se que animais positivos para *Leishmania* que forem ser submetidos a tratamento devem ter seus estômagos avaliados através de endoscopia e terem amostras coletadas para diagnóstico de *H. pylori* pelos métodos bioquímicos e/ou cultura microbiológica.

6 – REFERÊNCIAS

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermat.**, v.14, p.523- 532, 1996.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. **Inflammation and cancer: back to Virchow** *Lancet*, 357(9255), 539-545, 2001.

BRAUN, U.; ANLIKER, H.; CORBOZ, L.; OSSENT, P. The occurrence of spiral-shaped bacteria in the abomasum of cattle. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 139, n. 11, p. 507-516, 1997.

CAMPUZANO-MAYA G. Na optimized (13) C-urea Breath Test for Diagnosis of H. pylori infection. **World. J Gastroenterol.** Nov 7;13(41); 5454-64, 2007.

COOKE, C.L.; NA, J.H.; CANFIELD, D.R.; TORRES, J.; LEBRILLA, C.B.; SOLNILK, J.V. Modification of Mucin Oligosaccharide Expression in Rhesus Macaques After With *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 137:1061-1071, 2009.

CHOI, Y. K.; HAN, J. H.; JOO, H. S. Identification of novel *Helicobacter* species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. **Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3311–3315, 2001.

DE BOCK, M. et al. *Helicobacter Felis* and *Helicobacter Bizzozeronii* induce gastric parietal cell loss in Mongolian Gerbils. 2005. Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan, Merelbeke, BELGIQUE. *Journal Microbes and Infection*, 2006. Vol. 8, nº 2, p. 503-510. Disponível em: www.cat.inist.fr. Acesso em: setembro de 2016.

DOOLEY, C. P. Background and historical considerations of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**, v22, n.1, p. 1-2, 1993.

DORE, M. P.; BILOTTA, M.; VAIRA, D.; MANCA, A.; MASSARELI, G.; LEANDRO, G.; ATZEI, A.; PISANU, G.; GRAHAM, D. Y.; REALDI, G. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Shepherds. *Digestive Diseases and Sciences*, v.44, n.6, p. 1161-1164, 1999.

DUN, B. E.; COHEN, H.; Blaser, M. J.: *Helicobacter pylori*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 10:720-741. 1997.

EATON, K. A.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B. E.; PAOLA, J.; SHERDING, R. Prevalence and variaties 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.

FARIAS, Leonardo Alves de. **Pesquisa de helicobacter ssp na mucosa gástrica de cães no estado da Paraíba** / Leonardo Alves de Farias. – Patos, 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.

FISCHBACH, W.; MALFERTHEINER, P.; HOFFMAN, J. C.; BOLTEN, W.; KIST, M.; KOLETZKO, S. *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Ulcer Disease. **Deutsches Arzeblatt International**, 106(49): 801-8, 2009.

FOX, J. G. Non-Human reservoirs of *Helicobacter pylori*. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v.9 (suppl. 2), p.93-103, 1995.

FOX, J. G.; BOUTIN, S. R.; HANDT, L. K.; TAYLOR, N. S.; XU, S.; RICKMAN, B.; MARINI, R. P.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; MOTZE, S. L.; KLEIN, H. J. **Isolation and Characterization of a novel Helicobacter Species, “Helicobacter macacae,” from Rhesus Monkeys with and without Chronic Idiopathic Colitis.** *J. Clin Microbiol.*, December; 45(12): 4061-4063, 2007.

GEYER, C.; COLBATZKY, F.; LECHNER, J.; HERMANS, W. Ocorrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. **The Veterinary Record**, v. 133, p. 18-19, 1993.

GRUBEL, P.; HOFFMAN, C.; CAVE, D. R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter Pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.6, p. 1300-1303, 1997.

HAHN, M.; FENNERTY, M. B.; CORLESS, C. L.; MARGARET, N.; LIEBERMAN, D. A.; FAIGEL, D. O. Noninvasive teste as a substitute for histology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 52, n. 1, p. 20-26, 2000.

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

HAPPONEN, I.; SAARI, S.; CASTREN, L.; TYNI, O.; HANNINEN, M. L.; WESTERMARCK, E. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organism in dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v.115, n.2, p.117-127, 1996 a.

HAPPONEN, I.; SAARI, S.; CASTREN, L.; TYNI, O.; HANNINEN, M. L.; WESTERMARCK, E. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter* – like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v. 43, n. 5, p. 305-315, 1996 b.

HARBOUR, S.; SUTTON, P. Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, n. 3-4, p.191-203. 2008.

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

IKEDA, F.A.; FEITOSA, M.M.; CIARLINI, P.C. *et al.* Criptococose e toxoplasmose associadas à leishmaniose visceral canina – relato de casos. **Rev. Clin. Vet.**, v.3, p.28-32, 2005.

JALAVA, K.; ON, S. L. W.; VANDAMME, P. A. R.; HAPPONEN, I.; SUKURA, A.; HANNINEN, M. Isolation and identification of *Helicobacter sp.* from canine and feline gastric mucosa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3998-4006, 1998.

KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A. M. U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 356-369, 2002.

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, S3, 23-41, 2003.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSK, I. T. *Helicobacter pylori* Infection in Gastric Cancerogenesis. . **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 3, 3-21, 2009.

KUSTERS, J. G., VAN VLIET, A. H. M. & Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 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*. 39 (4):335-342, 2003.

LEE, A; KRAKOWKA, S.; FOX, J. G.; OTTO, G.; EATON, K. A.; MURPHY, J. C. Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. *Veterinary Pathology*, v. 29, n. 6, p. 487-494, 1992.

LEICONDRÉ, P.; CHEVALIER, M.; PEYROL, S.; BOUDE, M.; LABIGNE, A.; LAMOULIATTE, H.; PILET, C. Helicobactérioses de l'homme et des carnivores domestiques: quelques données comparatives. *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, v. 181, n. 13, p. 407-454, 1997.

MCCLAIN, M.S.; SCHRAW, W.; RICCI, V.; BOQUET, P.; COVER, T.L. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol Microbiol*, v. 37, p. 433-42, 2000.

McISAAC, W. J.; LEUNG, G. M.; Peptic ulcer disease and exposure to domestic pets. *American Journal of Public Health*, v. 89, n. 1, p. 81-84, 1999.

MACH, T. Is *Helicobacter pylori* infection a zoonosis *Przegląd Lekarski*, v. 58, n. 1, p. 31-33, 2001.

MARSHALL, B. J. **Helicobacter pioneers**: firsthand accounts from the scientist who discovered helicobacters, 1892-1982. Victoria: Blackwell, 2002

MÉGRAUD, F. Diagnostic modalities for the detection of *Helicobacter Pylori*. *Drugs of Today*, v. 35, n. 6, p. 419-427, 1999.

MENDES, R. S.; T.A. GURJÃO, L.M. OLIVEIRA, V.L. SANTANA, W.L. TAFURI, J.R.S. SANTOS, A.F.M. DANTAS, A.P. SOUZA. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.1, p.79-84, 2014.

MISSAWA, N.A.; LIMA, G.B.M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, p.337-340, 2006.

MOURA, R.O.D.; PAULA, V.V.; SOARES, M.J.V.; SILVA, S.M.M.S. Alterações renais em cães (*canis familiaris*) soropositivos para leishmaniose: aspectos clínicos, laboratoriais e histopatológicos. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.24, p.61-64, 2002.

MOUTINHO, F. Q.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M. J.; SUZANO, S.M.C.; SEQUEIRA, J.L. Prevalência de helicobacterias e alterações na mucosa gástrica de cães saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 2007; 59(4):1080-1083.

NEIGER, R.; SIMPSON, K. W. Helicobacter infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 14 (suppl. 2), p. 125-123, 2000.

OWEN, R. J. *Helicobacter- species Classification and Identification*. **Bristsh Medical Buletin**. V. 54, n. 1, p. 17-30, 1998.

REINDEL, J. F.; FITZGERALD, A. L.; BREIDER, M. A.; GOUGH, A. W.; YAN, C.; MYSORE, J. V. DUBOIS, A. An Epizootic of Lymphoplasmacytic Gastritis Attributed to *Helicobacter pylori* Infection in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). **Vet Pathol**, v. 36(1): 1-13. 1999.

SIMPSON, K. W.; BURROWS, C. F. Gastrites, ulceras y helicobacterias em humanos, perros y gatos. **Waltham Focus**, v. 7, n. 3, p. 2-6, 1997.

STRAUSS-AYALLI-AYALLI, D.; SIMPSON, K. W. Gastric *Helicobacter* infection in dogs. **Veterinary Clinics Of North América: Small Animal Practice**. V. 29, N. 2, P. 397-414, 1999.

TAKEMURA, L. S. *Helicobacter spp gástrico em cães e gatos: relação entre espécies infectantes, alterações histológicas e proliferação celular*. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Londrina, 2007. Disponível em: bibliotecadigital.uel.br. Acesso em: setembro de 2016.

THIBAUT, J. et al. Determinación de la Presencia de *Helicobacter spp.* en Perros, Mediante Biopsia Gástrica Obtenida Por Endoscopia. **Revista Científica de la Facultad**

de Ciencias Veterinarias. v.7, n.3, p.217-225, 2007. Disponível em: revistas.luz.edu.ve. Acesso em setembro de 2016.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH Regulation of the Urea Channel of *Helicobacter pylori*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 6, p. 1249-89, 2001.

VINETTE, K. M. B.; GIBNEY, K. M.; PROUJANSKY, R.; FAWCETT, P. T. Comparison of PCR and Clinical Laboratory Tests for Diagnosing *H. pylori* Infection in Pediatric Patients. **BMC Microbiol.**, v. 27; 4:5, 2004.

VELÁZQUEZ, M.; FEIRTAG, J. M. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating food and water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 95- 104, 1999.