



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE HELICOBACTER PYLORI Y ORGANISMOS
“HELICOBACTER HEILMANNII – LIKE” EN MUCOSA
GÁSTRICA DE PERROS, A TRAVÉS DE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

MACARENA ASTUDILLO VERGARA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas
Animales

PROFESOR GUÍA: ALICIA VALDÉS OLGUÍN
PROYECTO FINANCIADO FIV N° 4602019

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE HELICOBACTER PYLORI Y ORGANISMOS “HELICOBACTER HEILMANNII – LIKE” EN MUCOSA GÁSTRICA DE PERROS, A TRAVÉS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

MACARENA ASTUDILLO VERGARA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas
Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ALICIA VALDÉS OLGUÍN
PROFESOR CONSEJERO: SERGIO BUCAREY
PROFESOR CONSEJERO: MARIA ANTONIETA JARA

SANTIAGO, CHILE
2009

Dedicatoria

A mi familia.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi profesora guía, Dra. Alicia Valdés, en primer lugar por todos los conocimientos esenciales entregados para la realización de esta memoria de título, además por todo el incondicional apoyo y confianza que me entregó durante este proyecto, agradezco su paciencia y su disposición para ayudarme y también para escucharme cada vez que lo necesité.

Quiero agradecer también a la Dra. Maria Antonieta Jara, por su apoyo académico y gran disposición al comienzo de este proyecto y posteriormente orientarme en la corrección de mi tesis, otorgándome los conocimientos para una mejor presentación de esta memoria.

Al Dr. Sergio Bucarey, por su excelente disposición y paciencia en todo lo relacionado a la parte experimental de esta memoria y posteriormente como corrector de mi tesis.

Agradezco al Centro Biotecnológico Veterinario (Biovetec) por permitir el desarrollo de esta memoria de título, también a todo el personal que trabaja en él y al proyecto FIV 4602019 por otorgar el financiamiento.

A las personas más importantes de mi vida, mi familia, quienes han estado siempre dándome su apoyo, gracias por tener confianza en mí en cada proyecto que emprendo. A mis tías que las quiero mucho, a mis primas por acompañarme siempre y por supuesto a mi mamá, ya que siempre ha estado a mi lado pendiente de mis logros obtenidos, incentivándome y motivándome, sin ella y sus consejos no habría sido capaz de todo lo que he conseguido en mi vida. Quiero agradecerle por todo el sacrificio y esfuerzo que ha hecho por mí y que permitieron que pudiera estudiar.

A la familia Caballero Henríquez, a mi tío Lorenzo y mi tía Nani, ya que siempre estuvieron pendientes de todos los avances de este proyecto, ayudándome con sus consejos y experiencia cada vez que los necesité, siempre con una gran disposición y cariño. Y por supuesto a Pablo, mi incondicional compañero, que siempre me escuchó, me acompañó y me dio palabras de aliento y mucha fuerza para no rendirme y terminar esta memoria.

Y a todos mis amigos y amigas, gracias por estar siempre...

Índice

Resumen	6
Summary	7
Introducción	8
Revisión Bibliográfica	9
Objetivos general y específicos	31
Materiales y Métodos	32
Resultados	36
Discusión	40
Conclusiones	47
Recomendaciones	48
Bibliografía	49

RESUMEN

Con el fin de detectar, por primera vez en Chile, la presencia de *Helicobacter pylori* y organismos *Helicobacter heilmannii*-like en el estómago de perros, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a biopsias gástricas de 10 perros que fueron positivos a la prueba de ureasa.

Para la detección de *H. pylori* se utilizó una secuencia génica de la citotoxina vacuolizante (*vac A*) y para la detección de *H. heilmannii*-like se utilizó una secuencia génica de 112 pares de bases (pb) de ARN 16S, específico para este grupo de bacterias.

Se obtuvo positividad en 5/10 perros para *H. pylori* y positividad en 6/10 perros para *H. heilmannii*-like. Dos individuos fueron positivos a ambas bacterias y un individuo negativo para ambas bacterias.

A partir de estos resultados y con el fin de diagnosticar bacterias *H. pylori* y/o bacterias *H. heilmannii*-like en biopsias gástricas endoscópicas de perros, se recomienda la utilización de PCR, idealmente antecedido por la prueba rápida de ureasa.

SUMMARY

In order to detect for first time in Chile *Helicobacter pylori* and *Helicobacter heilmannii*-like organisms in canine gastric mucosa biopsies, a polymerase chain reaction (PCR) technique was applied to 10 urease positive endoscopic gastric biopsies.

A vacuolating cytotoxin (*vacA*) gene was chosen for detecting *H. pylori* and a 112 base pair (bp) fragment of 16S rRNA gene was utilized for detecting *H. heilmannii*-like organisms.

As a result, five of ten dogs were positive to *H. pylori* and six of ten dogs were positive to *H. heilmannii*-like organisms. Two animals were positive for both bacteria and one dog was negative for both bacteria.

From these results and in order to diagnosing *H. pylori* and/or *H. heilmannii*-like bacterias from endoscopic gastric biopsies of dogs, a PCR technique is recommended to use, ideally it preceded by rapid urease test.

INTRODUCCIÓN

La mucosa gástrica es conocida por ser el hábitat de varias especies de bacterias *Helicobacter* y, entre ellas, cabe destacar a *H. pylori*, que es reconocida por ser la bacteria más importante como agente etiológico de enfermedades gástricas de humanos y animales.

Entre las especies de *Helicobacter spp* se encuentran otras bacterias pertenecientes al grupo “*H. heilmannii* - like”, las que fueron descritas inicialmente como *Gastrospirillum hominis*. Las infecciones causadas por este grupo de bacterias se encuentran en un amplio rango de hospederos, entre los que se incluyen gatos, perros y cerdos; con prevalencias informadas de 78 a 100 %. Debido a esto, se ha planteado la posibilidad que tanto perros como gatos portadores de *Helicobacter*, jueguen un rol de reservorios y eventuales transmisores de esta bacteria a sus propietarios.

En la última década, a nivel internacional, diversos grupos de científicos han llevado a cabo estudios para determinar las vías de transmisión entre humanos y animales, y los factores asociados a la presentación de cuadros clínicos y subclínicos.

A nivel nacional, se han realizado estudios epidemiológicos en humanos, obteniendo amplios rangos de infección. Sin embargo, hasta la fecha en medicina veterinaria no existen estudios epidemiológicos, salvo algunas experiencias realizadas en el sur de Chile, en donde se pudo detectar la presencia de bacterias del género *Helicobacter* en perros y gatos.

Por lo tanto, debido a la escasa información que existe a nivel nacional sobre la presencia de *Helicobacter* gástricos en caninos en Chile, el presente trabajo pretende emplear pruebas diagnósticas más sensibles y específicas para detectar por primera vez en el país bacterias *H. pylori* y *H. heilmannii*-like en mucosa gástrica de perros.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Género *Helicobacter*

A fines del siglo XIX, se detectó por primera vez la presencia de bacterias espirales en el estómago de animales domésticos, anulando la teoría que éste era un órgano estéril. Rappin en 1881, describió organismos espirales gástricos en perros (Simpson *et al.*, 2000), y sus observaciones fueron confirmadas y complementadas tanto en perros como en otros mamíferos por Bizzozero en 1893 (Strauss-Ayali y Simpson, 1999). Estos estudios morfológicos aún asombran por la precisión y sofisticación de sus hallazgos, tomando en cuenta las limitaciones tecnológicas de la época (Fox, 1997).

En 1906, Krientz describió organismos espirales en los contenidos gástricos (incluyendo vómitos) de un paciente con carcinoma gástrico (Mc Nulty *et al.*, 1989). En 1939, Doengens fue el primero en describir organismos espirales en la mucosa gástrica humana, llegando a estar presentes en el 43% de biopsias post mortem (Dubois, 1995).

En 1970, Lockard y Boler sugirieron que tres bacterias morfológicamente distintas podían ser observadas en la mucosa gástrica canina, aunque se creyó que esas bacterias representaban distintos estados de movimiento del mismo organismo (Jalava *et al.*, 1997).

En los años 70 y 80 se realizaron muchas investigaciones acerca de la clasificación histopatológica de las gastritis, pero a pesar de esto, muy pocos trabajos mencionaron a las bacterias helicoidales (Mc Nulty *et al.*, 1989).

En 1975 se informó de la presencia de bacterias espirales Gram negativas en el 80% de los pacientes humanos con úlcera gástrica, pero sólo en 1983 se asoció la presencia de estos microorganismos al desarrollo de ellas (Smoot, 1996).

En Septiembre de 1983, en el “Second Internacional Workshop on *Campylobacter Infections*” en Bruselas, Marshall y Warren describieron la fuerte asociación de estos “*Campylobacter* –like organism” (CLO) con gastritis y úlceras pépticas. Su trabajo fue recibido con gran interés y rápidamente se iniciaron diversas investigaciones a nivel mundial (Dubois, 1995). Marshall y Warren encontraron estas bacterias en el 100% de los pacientes con úlceras duodenales, 80% de los pacientes con úlceras gástricas y 96% de los pacientes con gastritis crónica activa, en contraste de sólo 2/31 de los individuos controles (Dunn *et al.*, 1997).

El trabajo realizado por Marshall y Warren aumentó el interés en el gato como un posible modelo animal para el estudio del rol de la microflora gástrica en la inducción de la gastritis (Lee *et al.*, 1992).

La primera especie de *Helicobacter* canina gástrica aislada *in vitro* fue *Helicobacter felis*, un organismo espiral de gran tamaño envuelto con fibras alrededor de su cuerpo (Jalava *et al.*, 1997)

Actualmente, *H. pylori* sería la bacteria más diseminada en el hombre, estimándose incluso que la mitad de la población humana estaría infectada con este patógeno. La mayoría de las infecciones se adquirirían durante la infancia y persistirían por décadas (Dunn *et al.*, 1997).

Taxonomía del Género *Helicobacter*

La clasificación de las bacterias del género *Helicobacter* ha sufrido modificaciones a través del tiempo. Inicialmente fueron nombradas como *Spirillum rappini* en honor al primer científico en describirlas (Dubois, 1995; Smoot, 1996). La sexta edición del manual de Sistemática Bacteriana de Bergey incluía 3 especies de *Spirillum* gástricas pertenecientes al género VI *Spirillum* de la Familia *Pseudomonacea*; sin embargo, no reaparecieron en la siguiente edición del libro (Dunn *et al.*, 1997).

Salomón en 1986, fue el primero en describir 3 bacterias espirales morfológicamente distintas, presentes en la mucosa gástrica de perros y gatos. Sugirió que estas bacterias estarían relacionadas al Orden *Spirochaete* en base a su morfología, con semejanza a *Treponema microdentium* y *Borrelia vincentii* (Fox, 1997; Jenkins y Basset, 1997).

En 1987, Dent *et al.* describieron organismos con forma de sacacorchos en la mucosa gástrica de humanos y propusieron el nombre “*Gastrospirillum hominis*” (Andersen *et al.*, 1999).

En Australia, en 1988, se reportó por primera vez el aislamiento de bacterias helicoidales microaerófilas, en perros y gatos (Fox, 1997; Jenkins y Basset, 1997). Posteriormente, estas bacterias fueron clasificadas como miembros del género *Helicobacter* y designadas como *H. felis* (Paster *et al.*, 1991).

Desde la publicación de la secuencia completa del genoma de *H. pylori* (cepa 26695) realizada por Tomb *et al.*, (1997), una gran cantidad de información de la microbiología de este organismo se ha podido comprobar y, en base a esta secuencia, se han identificado otras especies de este género.

La especie más estudiada es *H. pylori*, y se le considera el prototipo de las bacterias con ubicación gástrica exclusiva (Dubois, 1995). Hasta el año 2003, se habían descrito más de 30 organismos con características del Género *Helicobacter*. La mayoría de éstos, encontrados en perros y gatos, tienen forma espiral, tamaños entre los 0,5 a 10 µm, de difícil distinción por microscopía óptica simple (Neiger, 2003).

Los *Helicobacter spp* gástricos se pueden clasificar en 2 grandes grupos basados en diferencias morfológicas, rango de hospederos y patrón de colonización dentro del estómago. Estos dos grupos son: “*H. pylori-like*” y “*H. heilmannii-like*” (Eaton *et al.*, 1996).

El primer grupo incluye a las especies: *H. pylori*, *H. acinonyx*, *H. nemestrinae* y *H. mustelae*. Estos organismos se caracterizan morfológicamente por ser de tamaño pequeño (aproximadamente 5 µm de longitud), tener uno o dos espirales y comúnmente, un flagelo unipolar. Colonizan el mucus gástrico y la superficie epitelial, pero no penetran profundamente dentro de las glándulas gástricas (Fox y Lee, 1997).

El segundo grupo está representado por *H. felis*, *H. heilmannii* y *H. bizzozeronii*. Estas bacterias son de mayor longitud que *H. pylori* (aproximadamente 10 µm) con más hélices, más firmemente enrolladas y a veces con fibrillas periplásmicas que envuelven al organismo en una membrana externa. Estas bacterias “*H. heilmannii*-like”, a diferencia de los organismos “*H. pylori*-like”, son capaces de colonizar profundamente las glándulas gástricas y a veces se les ubica dentro de las células parietales, así como también en el mucus gástrico (Eaton, 1999).

H. felis; *H. bizzozeronii*; *H. salomonis*; *H. bilis*; *Flexispira rappini* y *H. heilmannii* han sido descritos en estómagos de perros. *H. felis*, *H. pametensis*, *H. pylori*; *H. bizzozeronii*; *H. salomonis* y *H. heilmannii* se han descrito en el estómago de gatos (Gitnick, 1997).

H. felis, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* son tres especies del género *Helicobacter* encontradas comúnmente en perros y gatos (Baele *et al.*, 2004).

Las bacterias “*H. heilmannii*-like” tienen un rango más amplio de hospederos. A modo de ejemplo, *H. felis* coloniza especies tan dispares como gatos, ratones y hurones (Fox *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992).

En la naturaleza, gatos, perros, cerdos, carnívoros salvajes y muchas especies de primates están casi universalmente colonizados por bacterias gástricas del género *Helicobacter* (Hermanns *et al.*, 1995). Debido a la alta prevalencia de la infección natural, la evaluación del rol patógeno de estas bacterias es difícil. Estudios en enfermedades gástricas de perros y gatos, implicando bacterias del grupo “*H. heilmannii*-like”, han

adolescido de grupos controles (individuos no infectados), alterando con ello la interpretación de la asociación de estas bacterias con la enfermedad (Eaton *et al.*, 1996; Hermanns *et al.*, 1995).

Microbiología del Género *Helicobacter*

H. pylori es una bacteria de pequeño tamaño (aproximadamente 5 µm de longitud) que puede tener uno o dos espirales y, comúnmente, un flagelo unipolar. *H. pylori* sólo se encuentra en humanos, pero bajo condiciones experimentales, algunas cepas de *H. pylori* han logrado colonizar algunas especies animales. La ocurrencia natural de infecciones por *H. pylori* en individuos no humanos es esporádica y usualmente involucra animales de laboratorio en estrecho contacto con trabajadores humanos, y a menudo sin la participación de especies endógenas normales de *Helicobacter* (Valdés, 2007).

H. heilmannii es el nombre propuesto para una bacteria mótil de 4 a 10 µm de largo, de forma espiral con 3 a 8 hélices o giros, poseedora de hasta 14 flagelos uni o bipolares, sin filamentos periplasmáticos, y se ha encontrado con una prevalencia entre el 0,2 a 4% asociada a la mucosa gástrica de estómagos de pacientes humanos con gastritis (Andersen *et al.*, 1999). Estas bacterias fueron descritas inicialmente como *Gastrospirillum hominis*, y fueron reclasificadas después de una secuenciación de ADN (ADNr) 16S, determinándose que pertenecían al género *Helicobacter*, proponiéndose el nombre *H. heilmannii* (Solnick *et al.*, 1994). Al igual que *H. pylori*, *H. heilmannii* también se asocia a la gastritis y a la ulceración duodenal en pacientes humanos (Monno *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2007), e incluso con adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico asociado a tejido linfoide de mucosa (De Groote *et al.*, 2005). Un estudio reciente indicó que el linfoma asociado a tejido linfoide de mucosa es más prevalente en pacientes infectados con *H. heilmannii* que en pacientes con *H. pylori* (Andersen *et al.*, 1999). El nombre '*H. heilmannii*' fue propuesto en honor al patólogo alemán Konrad Heilmann, quien publicó un importante estudio describiendo estas bacterias en pacientes humanos. Sin embargo, el análisis de las secuencias genéticas de ARNr 16S derivaron desde clones de cada paciente, mostraron que no fueron idénticas (96,6% de similaridad) y debido a esto pasaron a llamarse '*H. heilmannii*'

tipo uno (clon G1A1 desde el paciente 1) y el tipo dos (clon G2A9 del paciente 2) (Heilmann y Borchard, 1991).

Las bacterias del género *Helicobacter* de ubicación gástrica exclusiva son organismos microaerófilos, de forma espiral, Gram negativos y que producen ureasa (Fox y Lee, 1997).

Los *Helicobacter* gástricos se desarrollan mejor en un ambiente neutro o levemente alcalino (pH 7 a 8) y a temperaturas entre 33° y 40° C. Sin embargo, se han detectado bacterias *Helicobacter* al interior de las células parietales (productoras de ácido clorhídrico), lo que sugiere alta resistencia a pH ácido (Gitnick, 1997).

La característica bioquímica fundamental de *H. pylori* es la producción de ureasa, enzima citosólica de peso molecular cercano a los 500 kDa. Ureasa hidroliza la urea en el medio ácido gástrico, originando un medio alcalino que protege al microorganismo hasta su localización entre la superficie epitelial y el mucus que la recubre (Fox *et al.*, 1995). Las especies bacterianas de ubicación hepática e intestinal no sobreviven en el medioambiente gástrico por su incapacidad de sintetizar ureasa (Dubois, 1995; Monath *et al.*, 1998). Existen genes que codifican las subunidades A y B de la ureasa. La ureasa es también un factor de virulencia de las bacterias *Helicobacter* gástricas; la secuencia de genes *ureAB* es conocida para *H. pylori*, *H. heilmannii*, *H. mustelae*, *H. hepaticus* y *H. felis*, y son parcialmente conocidas para *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* y muestran más variabilidad entre esas especies que la secuencia génica de sus rRNA (Baele *et al.*, 2004).

Los *Helicobacter* gástricos también producen enzimas del tipo proteasas y lipasas, lo que les permite obtener nutrientes, reducir la viscosidad del mucus gástrico, y facilitar su movimiento flagelar (Smoot, 1996).

La capacidad de *H. pylori* para diseminarse, a través del mucus viscoso que cubre la mucosa gástrica, se debe a la presencia de 5 a 6 flagelos unipolares. Estas unidades son esenciales para la colonización, y sus filamentos están compuestos por 2 proteínas

diferentes: proteína FlaA y proteína FlaB. Además, los filamentos flagelares están recubiertos de una doble capa de fosfolípidos, que los protegerían de la acidez gástrica, evitando su depolimerización (Corti *et al.*, 2002).

Solnick *et al.*, (2003) en sus estudios en la mucosa gástrica de animales revelaron que ellos eran colonizados por microorganismos distintos a *H. pylori*.

Un estudio filogenético de dos de estas bacterias helicoidales aisladas en pacientes humanos determinó que ellas estaban más cercanamente relacionadas con *H. felis* (Solnick *et al.*, 1994).

Patogénesis

La patogénesis de *H. pylori* puede describirse en 3 etapas (McGee y Mobley, 1999):

- a) entrada y colonización en la mucosa gástrica
- b) evasión del sistema inmune específico y no específicos
- c) multiplicación, generación de daño tisular y transmisión a un nuevo hospedero susceptible o diseminación a un tejido vecino.

Si bien, *H. pylori* es ácido-sensible, puede sobrevivir en el ambiente ácido del estómago si existe urea, debido a que produce ureasa, la cual hidroliza la urea en amoníaco. El amoníaco proporciona un ambiente adecuado para que *Helicobacter* atraviese la capa de mucus y colonice la superficie epitelial (McGee y Mobley, 1999). La ureasa también es un importante factor de virulencia de las especies *Helicobacter* gástricas (Baele *et al.*, 2004)

El tejido gástrico se daña directamente por el amoníaco generado por la bacteria, y en forma indirecta, por la estimulación de la respuesta inflamatoria inducida por la propia ureasa, incluido el reclutamiento de neutrófilos (Corti *et al.*, 2002). Joo *et al.*, (2007) describieron en un estudio que los pacientes que presentaban infección con *H. heilmannii* mostraban gastritis crónicas de forma similar a la gastritis asociada a *H. pylori*. Sin embargo, la infiltración de células neutrofílicas y mononucleares fue significativamente

menor en los casos de las gastritis asociadas a *H. heilmannii*, en comparación a las gastritis asociadas a *H. pylori*.

Se reconoce la participación de una citotoxina vacuolizante (codificada por el gen *vacA*) semejante a la citotoxina de *Neisseria gonorrhoeae*, que induce la vacuolización en células epiteliales gástricas primarias (Montecucco y Rappuoli, 2001).

En la actualidad, se acepta que la gastritis crónica atrófica tipo B y la úlcera duodenal de los humanos, es causada en el 90% de los casos por *H. pylori*. También, se ha descrito una estrecha asociación entre este microorganismo y el linfoma del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (Corti *et al.*, 2002). En otros procesos patógenos como el adenocarcinoma gástrico, el nexo de causalidad está menos establecido; se calcula que el riesgo atribuible al *H. pylori* para el desarrollo de cáncer gástrico se encuentra entre el 35 a 60%, de tal forma que la Organización Mundial de la Salud ha clasificado a esta bacteria dentro de la categoría I, que se considera un factor carcinogénico probado (Dubois, 1995; Corti *et al.*, 2002).

Otro de los posibles mecanismos de carcinogénesis observado en sujetos infectados por *H. pylori*, es el aumento del grado de proliferación celular condicionado por un incremento en la producción de factor de crecimiento epidérmico, con relación a factores liberados por el germen y a la situación de hipergastrinemia secundaria, que remite tras la erradicación bacteriana. El aumento en la velocidad de replicación celular podría aumentar la posibilidad de mutaciones "espontáneas", algunas de las cuales podrían incorporarse de forma permanente al ciclo celular (Montecucco y Rappuoli, 2001).

Fritz *et al.*, (2006) estudiando un grupo humano en Sudáfrica vieron que la coinfección con otra especie del género *Helicobacter* no influencia significativamente para que *H. pylori* colonice el ambiente gástrico.

Generalmente, la infección por *H. heilmannii* se asocia a gastritis leve, sin embargo, se han reportado casos de úlceras duodenales, lesiones agudas de la mucosa gástrica y carcinoma gástrico. Además, se ha asociado la infección de *H. heilmannii* a

linfoma de la mucosa gástrica asociado a tejido linfoide (MALT) de carácter leve a moderado, en pacientes humanos y animales (Corti *et al.*, 2002). La infección con *H. heilmannii* en estómagos humanos, usualmente es acompañada de una gastritis crónica activa la cuál generalmente es menos severa que la infección con *H. pylori* en esos tejidos (Baele *et al.*, 2004).

Epidemiología

El ser humano sería el hospedero natural para *H. pylori* y se postula que esta bacteria se ha adaptado en forma activa al nicho ecológico del estómago humano. Debido al aislamiento de *Helicobacter* desde heces de pacientes humanos y animales, se ha sugerido una vía de transmisión fecal-oral (Twedt, 1996).

El fracaso en aislar *H. pylori* de reservorios animales no humanos, sugiere que el contacto directo persona a persona sería el modo de transmisión más probable para este microorganismo (Fox *et al.*, 1996; Twedt, 1996).

La prevalencia de *Helicobacter* en pacientes humanos, difiere marcadamente entre grupos étnicos y clases socioeconómicas en los distintos países. Aproximadamente, el 50% de los individuos adultos de los países desarrollados y más del 90% de los adultos de países en vías de desarrollo estarían infectados con esta bacteria (Smoot, 1996). En muchas personas la infección por *H. pylori* se tolera bien por períodos prolongados con poca o ninguna sintomatología (Moncayo *et al.*, 2006).

En los países en vías de desarrollo, el inicio de la infección ocurriría entre los 2 a 8 años de edad, mientras que en los países desarrollados, *Helicobacter* es poco común en niños, y afecta al 20% de la población menor de 40 años, y alrededor del 50% de los adultos mayores de 60 años de edad (Gitnick, 1997; Monath *et al.*, 1998).

En un estudio realizado por Tindberg *et al.*, 2001, en Suiza, concluyeron que la niñez sería el periodo de infección con *H. pylori*, y está estrechamente asociado al origen y nivel socioeconómico de la madre, más que del padre.

En 1992, se publicó por primera vez el aislamiento de *H. pylori* desde deposiciones humanas (Thomas *et al.*, 1992). A pesar de la evidencia del pasaje de *H. pylori* a través del tracto digestivo, la bacteria no estaría bien adaptada a este tránsito. Varios investigadores han informado de los efectos letales de la bilis sobre la bacteria, por lo que se cree que la sobrevivencia de *H. pylori* después de transitar por intestino es poco probable (Fox y Lee, 1997).

Otra vía de transmisión propuesta es la oral-oral, basada en la detección de *Helicobacter* en placa dental y contenidos gástricos de pacientes humanos; además de ser posible su cultivo desde saliva (Smoot, 1996). Existiría una vía iatrogénica explicada por una inadecuada desinfección de equipos de endoscopia (Smoot, 1996; Gitnick, 1997).

H. pylori fue identificada en aguas superficiales usando técnicas inmunológicas (Strauss-Ayali y Simpson, 1999) y mediante PCR en agua potable en Suecia (Hulten *et al.*, 1998). De acuerdo a los resultados de este último estudio, la bacteria sobreviviría por 48 horas en agua potable.

Los animales podrían actuar como reservorios de *H. pylori*, sin embargo numerosos trabajos no lo han logrado comprobar (Mitchell, 1999; Neiger y Simpson, 2000, Neiger, 2003). De hecho, se ha sugerido que las mascotas domésticas podrían ser potenciales reservorios de *H. pylori*, especialmente en el caso de los gatos (Handt *et al.*, 1994). Sin embargo, a través de la técnica de secuenciación de ADNr 16S se demostraron diferencias entre bacterias espirales caninas y *H. pylori*, las que actualmente se denominan *H. felis* y *H. heilmannii* (Heilmann y Borchard, 1991; Handt *et al.*, 1995).

En animales, se han propuesto rutas de transmisión similares a humanos; además de considerarse a perros y gatos eventuales reservorios de estas bacterias (Fox, 1997; Neiger, 2003).

Helicobacter ha sido aislada en animales sanos tan jóvenes como perros de 2 meses de edad y en animales viejos de hasta 11 años (Yamasaki *et al.*, 1998). Experimentalmente, se ha comprobado que existiría transmisión de *Helicobacter* gástricos de las madres a cachorros, durante el periodo de lactancia, a través de contacto oral-oral y fecal-oral (Twedt, 1996; Hänninen *et al.*, 1998).

H. pylori ha sido cultivado a partir de mucosa gástrica de gatos naturalmente infectados; y las lesiones encontradas son semejantes a las descritas en humanos (Fox *et al.*, 1995). Estos autores inocularon experimentalmente 4 gatos libres de patógenos con *H. pylori*, para posteriormente monitorear la infección por 7 meses a través de cultivos gástricos, PCR y biopsias gástricas seriadas. Finalmente, la necropsia de los individuos determinó que todos los gatos desarrollaron gastritis multifocal, con infiltración linfocitaria y múltiples nodulaciones linfoides, especialmente en el área del antro gástrico. Las bacterias se ubicaron en toda la mucosa gástrica, especialmente a nivel de las criptas glandulares del antro.

En humanos las prevalencias de la infección con bacterias pertenecientes al grupo *H. heilmannii*-like reportadas a nivel mundial están dentro de los siguientes niveles: 0.1% en Italia, 0.25% en Alemania, 0.25% en Bélgica, 3, 2% en el sur de China, y 6.2% en Tailandia. El 80% de estos cuadros sería provocado por *H. heilmannii* tipo 1, el cual se piensa sería adquirido desde perros, gatos y cerdos (Corti *et al.*, 2002).

Un estudio de biopsias gástricas humanas positivas a *H. heilmannii* mostró que el 78% de los pacientes estaba infectado con *H. heilmannii* tipo 1 y un 2,4% de los pacientes con *H. heilmannii* tipo 2 (Trebesius *et al.*, 2001).

Mientras la infección con organismos “*H. heilmannii* – like” es rara en pacientes humanos, es común en animales domésticos; y el contacto con gatos, perros y cerdos ha sido correlacionado con un mayor riesgo de infección con *H. heilmannii* en las personas. En 1997, Stolte *et al.*, encontraron un 70% de pacientes infectados que tenían contacto con 1 o más animales, en comparación con un 37% en la población sana (Baele *et al.*, 2004).

Dieterich *et al.*, 1998, comunican que en dos gatos, en estrecho contacto con un hombre con gastritis por *H. heilmannii*, se detectó la presencia de bacterias con morfología semejante. A través de técnicas de PCR, estos autores demostraron que en esta persona existían tres cepas distintas de *H. heilmannii*, que todas a su vez presentaban concordancia con las cepas detectadas en los gatos analizados. El estudio concluyó que existiría la posibilidad de transmisión de esta bacteria, entre personas y sus mascotas.

G. hominis ha sido descrita en cortes histológicos por varios investigadores, encontrando una prevalencia de 0,2 – 0,6% en Europa y sobre un 4% en China en pacientes con dispepsia y ocasionalmente en pacientes con úlceras peptídicas (Andersen *et al.*, 1999).

Aunque la incidencia de la infección con *H. felis* en humanos es baja, un estudio reciente en Europa usando PCR múltiple encontró que un poco más de 8,9% de la población fueron positivos a *H. felis* (Fritz *et al.*, 2006).

En perros, *Helicobacter* gástricos son altamente prevalentes, publicándose informes que varían entre 61 a 82% de infección en perros que consultan por vómitos (Hermanns *et al.*, 1995; Simpson, 1999); 67% a 86% en perros mascotas sanos y 100% en perros experimentales de la raza Beagle o de sociedades protectoras de animales (Eaton *et al.*, 1996; Simpson, 1999).

Infecciones con *H. heilmannii* se han encontrado en varios animales, incluyendo gatos, perros y cerdos con prevalencias reportadas de 80-100% (Dieterich *et al.*, 1998).

En las biopsias gástricas de perros, frecuentemente se observan especies del género *Helicobacter*, distintos de *H. pylori* (Fox y Lee, 1997; Yamasaki *et al.*, 1998). Las caracterizaciones fenotípicas y genotípicas han sido limitadas y, generalmente las investigaciones se orientan a correlacionar la presencia de anomalías gástricas con la presencia de una población de organismos espirales, denominada como organismos “*Helicobacter-like*” (HLO’s) o “*Gastrospirillum-like*” (GLO’s) (Neiger, 2003).

Los estudios han sido poco concluyentes (Hermanns *et al.*, 1995 y Eaton *et al.*, 1996) o de resultados conflictivos (Yamasaki *et al.*, 1998). Las investigaciones más recientes indican que en los estómagos caninos se encontrarían presentes 3 especies: *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* (Paster *et al.*, 1991; Hänninen *et al.*, 1996; Jalava *et al.*, 1997). Las tres especies han sido fácilmente cultivables.

En 1999, Cattoli *et al.*, intentaron determinar cual de estas especies era más prevalente en la mucosa gástrica de perros. Al biopsiar endoscópicamente o *post mortem*, estómagos de 25 perros con signos de gastritis (10) y sanos (15), determinaron que 23/25 individuos (92%) fueron positivos a bacterias *Helicobacter*, mediante microscopía óptica. Sólo en 5/23 individuos positivos, se tuvo éxito al cultivo bacteriano (2 de individuos con signos de gastritis y 3 individuos sanos). Estos aislados bacterianos fueron posteriormente analizados a través de microscopía electrónica, pruebas bioquímicas, PCR y secuenciación del ADNr 16S. *H. felis* fue identificada en 4 muestras y *H. bizzozeronii* en una muestra (paciente con signos de gastritis). Sólo el análisis con PCR y microscopía electrónica fue capaz de diferenciar las 2 especies.

Distintos grupos de investigadores norteamericanos han detectado infección en un rango de 41-60% en gatos clínicamente sanos y 57– 76% en gatos con vómitos crónicos. En perros sanos, los valores alcanzan 67– 86% de perros sanos, 74 a 80% en perros con vómitos y el 100% de perros de laboratorio de raza Beagle (Neiger, 2003).

Yamasaki *et al.* (1998) informan que de 77 perros sanos, 60% y 80% de perros menores de 1 año y mayores de 5 años, respectivamente, resultaron infectados con

Helicobacter. En 43 gatos, este mismo estudio determinó una prevalencia cercana al 60% en gatos menores a un año de edad, sin observar incremento en este porcentaje a edades superiores.

Diagnóstico de la infección por bacterias *Helicobacter spp.*

Desde el primer cultivo exitoso de *H. pylori* en 1984, variadas pruebas diagnósticas se han desarrollado para determinar la infección en los pacientes sospechosos (Westblom y Bhatt, 1999).

Un gran número de pruebas diagnósticas invasivas y no invasivas pueden ser utilizadas para confirmar la presencia de bacterias *Helicobacter* gástrico en humanos (Gitnick, 1997).

Pruebas invasivas son aquellas que requieren de la técnica endoscópica e incluyen la extracción de muestras de mucosa gástrica, las cuales pueden ser sometidas a prueba rápida de ureasa y/o examen histopatológico para la detección bacteriana y de las lesiones asociadas (Sutton, 1998).

Dentro de las pruebas no invasivas destacan la prueba del aliento urémico y la detección serológica de anticuerpos (Sutton, 1998).

Inicialmente, todos los procedimientos fueron invasivos (endoscopías y biopsias de mucosa). A pesar que la combinación de histología, cultivo y/o test rápido de ureasa pueden considerarse las pruebas definitivas (“Gold Standard”), ellas son laboriosas y caras (Westblom y Bhatt, 1999).

Las pruebas no invasivas ofrecen conveniencia y bajos costos, pero tienen la desventaja de medir indirectamente la presencia de *H. pylori*. Esto puede ser una limitante

en su utilización, especialmente en el caso de la serología, que pierde su especificidad en el periodo que sigue al tratamiento antibiótico (Westblom y Bhatt, 1999).

El análisis histopatológico de biopsias gástricas aún se considera como la prueba definitiva para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Además de la visualización del microorganismo, la histopatología puede entregar importante información acerca de los tejidos que rodean y el grado de inflamación existente (Heilmann y Borchard, 1991).

La sensibilidad del examen histopatológico se reduce por el consumo de medicamentos antisecretorios en forma similar a la prueba de ureasa en la biopsia (Moncayo *et al.*, 2006).

La tinción de Warthin-Starry o tinción plata, fue recomendada inicialmente por Warren y Marshall en 1983 (Dunn *et al.*, 1997). Es excelente en la visualización de la bacteria, pero consume mucho tiempo y su costo es elevado.

Las tinciones no argénticas más comúnmente utilizadas son la tinción Giemsa, Gram y la tinción Hematoxilina-eosina (Corti *et al.*, 2002). La presencia de la bacteria se evidencia en cortes de mucosa gástrica y en general estas tinciones presentan alta sensibilidad y especificidad (Hermanns *et al.*, 1995; Happonenn *et al.*, 1996; Corti *et al.*, 2002).

A pesar de la gran variedad de tinciones utilizadas a lo largo de estos años, la tinción Giemsa aún permanece como la de elección para el diagnóstico de rutina, por su simplicidad y bajo costo (Westblom y Bhatt, 1999).

La microscopía directa con tinción de Gram modificada es una técnica diagnóstica rápida y simple para biopsias gástricas. La sensibilidad de este método varía entre 88 a 95% con una especificidad cercana al 100%, comparado con el estudio histológico empleando tinción plata (Malferheiner, 1994).

El examen histopatológico, tiene la desventaja de requerir una técnica diagnóstica costosa e invasiva como es la endoscopia. Sin embargo, tiene la ventaja de permitir realizar simultáneamente el diagnóstico bacteriano y además informar de la severidad de la gastritis y de la presencia de metaplasia intestinal y atrofia. Es importante recordar que el examen histopatológico es altamente dependiente de la experiencia y acuciosidad del patólogo (Westblom y Bhatt, 1999).

El diagnóstico de *Helicobacter* en animales se realiza a través de la detección de la bacteria en la mucosa gástrica. Sin embargo, la diferenciación entre *H. heilmanni*, *H. pylori* y *H. felis*, sólo es posible a través de microscopía electrónica u otras pruebas como PCR (Happonenn *et al.*, 1996, Strauss-Ayali y Simpson, 1999).

Morfológicamente, no es difícil diferenciar *H. heilmannii* de otros organismos gástricos no espirales, incluyendo *H. pylori*. Sin embargo, una gran variedad de organismos gástricos espirales tal como *H. felis*, *H. salomonis* y *H. bizzozeroni*, aunque muy rara vez identificados en estómago humano, son indistinguibles de *H. heilmannii* tanto por microscopía óptica como por hibridación fluorescente *in situ* de ADNr 16S, por lo que se requieren pruebas más específicas para la identificación definitiva (Joo *et al.*, 2007).

La detección de *H. heilmannii* a través de microscopía electrónica tendría una sensibilidad menor que la prueba de ureasa o la histología tradicional con tinción plata o Giemsa. Esto podría deberse a que el área de superficie investigada por microscopía electrónica es muy pequeña; que *H. heilmannii* es menos prolífica en biopsias humanas o, que está distribuida más espaciadamente en la mucosa gástrica en comparación a *H. pylori* (Happonen *et al.*, 1996, Strauss-Ayali y Simpson, 1999).

En 1995, un grupo de investigadores alemanes sometió a análisis histopatológico muestras de mucosa gástrica de 122 perros sanos y 127 gatos sanos. El 82% de los perros y el 76% de los gatos presentaron bacterias *Helicobacter* en las biopsias analizadas (Hermanns *et al.*, 1995).

Cultivo

El cultivo de *Helicobacter in vitro* es muy exigente y necesita de condiciones especiales de cultivo para ser exitoso. Dentro de estas condiciones se incluyen: atmósfera microaerófila (oxígeno al 5-7%) con alto nivel de humedad, temperatura de incubación de 37°C y un medio de cultivo rico en nutrientes. También se requiere adicionar hidrógeno atmosférico y algunos estimulantes del crecimiento para ciertas especies de *Helicobacter* (Westblom y Bhatt, 1999).

A pesar que el cultivo de *H. pylori* no es la forma más sensible de diagnóstico (90% de sensibilidad comparado con el examen histopatológico), es altamente específico y es esencial para seleccionar la terapia, basada en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Malferheiner, 1994). La sensibilidad del cultivo va desde un 70% a un 95% cuando se trata de material gástrico obtenido mediante biopsia (Moncayo *et al.*, 2006)

El cultivo de *H. heilmannii* no se ha realizado hasta la fecha y su diagnóstico usualmente se basa en su morfología espiral (comparada con *H. pylori*) en biopsias teñidas con tinción plata (Priestnal *et al.*, 2004). Los organismos “*H. heilmannii*”-like aislados de tejido humano, no son posibles de cultivar y el diagnóstico es básicamente basado en histología, aunque la citología también está descrita. Recientemente, otro método basado en microscopía e hibridación fluorescente *in situ*, se describió que detectaba todos los tipos de *H. heilmannii* y varias nuevas formas directas desde biopsias gástricas embebidas en parafina (Chisholm y Owen, 2003).

Estudios histológicos han demostrado que los organismos *H. heilmannii*-like están presentes en mucosa gástrica de casi todos los perros adultos, pero la minoría aparenta ser cultivable bajo condiciones estándar (Buczolits *et al.*, 2003). Sin embargo, una variedad de organismos espirales como *H. felis*, *H. salomonis* y *H. bizzozeronii* son indistinguibles de *H. heilmannii* a la microscopía óptica, sin contar que *H. pylori* en cultivo *in vitro* puede adoptar una morfología idéntica a *H. heilmannii*. Por todo esto, las técnicas moleculares como PCR, análisis de secuencias de productos de PCR clonados o no clonados y la

hibridización fluorescente *in situ* (FISH) con sondas específicas, se requerirían para realizar una identificación definitiva (Trebesius *et al.*, 2001).

Debido a que los organismos “*H. heilmannii*” son muy difíciles de cultivar *in vitro*, se han utilizado técnicas de PCR, específicamente basadas en la secuenciación de ADN ribosomal 16S, identificándose 2 tipos de “*H. heilmannii*” (Baele *et al.*, 2004). El tipo 1 estaría relacionado a los organismos “*Helicobacter* –like” porcinos, llamados “*Candidatus Helicobacter suis*”, los cuales hasta la fecha no han sido cultivables. Los organismos “*H. heilmannii* tipo 2” estarían altamente relacionados con las 3 especies de *Helicobacter* aisladas de perros y gatos: *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*. Este grupo “*H. heilmannii* tipo 2” fue aislado por primera vez de mucosa gástrica humana en 1999 por Andersen *et al.*

En el aislamiento de *Helicobacter* gástricos se han utilizado varios medios de cultivo, de tipo selectivo y no selectivo. Los más usados son agar *Brucella* cerebro-corazón y agar tripsicasa soya, ambos suplementados con 5% a 10% de sangre (Westblom y Bhatt, 1999). Independientemente del medio utilizado, es recomendable el uso de un medio selectivo y otro no selectivo (Strauss-Ayali y Simpson, 1999).

H. pylori es una bacteria de crecimiento lento en todos los medios de cultivo, demorando entre 2 a 7 días para dar un cultivo positivo. La identificación se realiza a través de la tipificación morfológica en tinciones Gram; así como sus reacciones bioquímicas específicas (Breed *et al.*, 1948).

El cultivo de *Helicobacter*, a partir de muestras frescas de mucosa gástrica, no es una técnica recomendada como prueba diagnóstica rutinaria. El cultivo se evalúa a los 3 días y si no existe desarrollo se recomienda evaluar las placas hasta 14 días después de su siembra, antes de dar como negativa una muestra (Monath, 1998).

Jalava *et al.*, 1998, cultivaron biopsias de mucosa gástrica de 95 perros y 22 gatos. Resultaron positivos el 51% de los perros y 13,65% de los gatos. Las principales

dificultades detectadas por ellos fueron el aislamiento primario, y la identificación de especies. A pesar de contar con un gran panel de pruebas bioquímicas y pruebas de tolerancia no pudieron diferenciar entre especies muy relacionadas como *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis*. Sin embargo, *H. felis* podría crecer como pequeñas colonias translúcidas, y esas colonias eran usualmente más pequeñas que las formadas por *H. pylori* y *G. hominis* (Andersen *et al.*, 1999).

Yamasaki *et al.*, 1998, no tuvieron resultados positivos al cultivar muestras de biopsia gástricas (fondo y píloro) de perros y gatos positivos histológicamente a la infección por *Helicobacter*.

H. heilmannii es una de las bacterias más frecuentemente detectadas mediante PCR en estómago de perros y gatos. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible su cultivo en medios artificiales. *H. felis* es cultivable, pero difícil de aislar debido, probablemente al escaso número de bacterias que logra colonizar la mucosa gástrica de perros y gatos (Simpson, 1998). *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* son cultivables, en contraste con *H. heilmannii* (Dieterich *et al.*, 1998).

Prueba rápida de ureasa

Debido a que los *Helicobacter* gástricos producen abundante cantidad de ureasa, se desarrollaron pruebas rápidas para detectar la enzima directamente en muestras de biopsia (Gitnick, 1997).

Estas pruebas contienen rojo fenol como indicador de pH y urea como sustrato. En la medida que la enzima bacteriana hidroliza la urea, el pH aumenta y ocurre un cambio de coloración. Se considera como resultado positivo todo cambio de color que ocurra dentro de algunos minutos o varias horas, incluso 24 horas (Corti *et al.*, 2002).

La prueba de ureasa tiene una sensibilidad de 90 a 95% en biopsia, 90 a 95% en aire exhalado y 90 a 96% en orina. Cualquier actividad enzimática de la ureasa en biopsias de la

mucosa gástrica se considera positiva para *H. pylori*. La sensibilidad de esta prueba se puede reducir bajo ciertas circunstancias y un resultado negativo no necesariamente significa ausencia de infección. La prueba puede dar resultados falsos negativos en individuos con sangrado reciente o activo del tracto gastrointestinal superior y en enfermos que antes hayan tomado inhibidores de la bomba de protones, antagonistas del receptor H₂, antibióticos o compuestos que contengan bismuto (Moncayo *et al.*, 2006).

Se describen resultados falsos positivos por la existencia de otros microorganismos productores de ureasa (estreptococos y estafilococos). Los resultados falsos negativos se deberían a un bajo número de *Helicobacter*, o cuando se realiza una sola toma de muestra (Corti *et al.*, 2002).

Varias pruebas comerciales (“kits”) están disponibles actualmente, y todas requieren de una biopsia de mucosa gástrica, un sustrato de urea y un marcador sensible al pH. En general, presentan una sensibilidad entre 88-92% y una especificidad entre 99 a 100%, comparadas con la determinación de la bacteria a través de histopatología (Dunn *et al.*, 1997; Gitnick, 1997; Sutton, 1998).

En un estudio desarrollado por investigadores japoneses, el 100% de los caninos y felinos infectados por *Helicobacter* (diagnóstico histológico de mucosa gástrica), obtuvo resultados positivos en la prueba de ureasa (Yamasaki *et al.*, 1998).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En los últimos años, se han aplicado métodos basados en PCR para la detección de *H. pylori* en muestras de biopsia y jugo gástrico, saliva, placa dental y heces. (Moncayo *et al.*, 2006). Este es un poderoso método para la detección de un bajo número de bacterias desde material clínico y no requiere que la bacteria esté viable. La precisión de esta técnica varía ampliamente debido a: la elección de partidores (“primers”) y ADN blanco, preparación de la muestra, densidad bacteriana y factores relacionados al procedimiento mismo del PCR (Dunn *et al.*, 1997).

La ventaja del PCR es su capacidad de diagnosticar *H. pylori* de forma no invasiva, ya que puede detectar el ADN de la bacteria desde fluidos no gástricos, como saliva. En un estudio, la sensibilidad para detectar *H. pylori* en la saliva de pacientes humanos fue de un 84% en comparación con el examen histopatológico de las biopsias gástricas en los cuales no se detectó la bacteria. Para explicar la observación de individuos positivos al PCR de saliva, en ausencia de la bacteria en estómago, estos autores postulan que la cavidad oral sería el lugar de entrada de la infección bacteriana, y que la colonización del estómago no sería una consecuencia necesaria de la infección oral (Dunn *et al.*, 1997).

A pesar de lo anterior, métodos de PCR bien diseñados son superiores a otros métodos en términos de sensibilidad y menor invasividad, cuando se detectan *Helicobacter* desde saliva, placa dental, secreciones gástricas y deposiciones (Westblom y Bhatt, 1999).

En Inglaterra, Chisholm y Owen (2003) describieron un método por PCR para ser aplicado a pacientes humanos y que detecta todas las especies que componen el grupo “*H. heilmannii*- like” y a *H. pylori*, a través de la identificación de una secuencia ADNr 16S y del gen *vac A*, respectivamente.

Situación nacional

De acuerdo a estudios nacionales publicados entre 1985 y 1995, la infección por *Helicobacter pylori* es muy frecuente en pacientes con una amplia gama de condiciones gastrointestinales, incluyendo adultos (43 – 92%) y niños (6 – 100%). Los niveles de anticuerpos del tipo IgG específicos alcanzan valores de 100% en pacientes con úlceras duodenales, 86% en pacientes con gastritis y 75% en pacientes asintomáticos (Figuroa *et al.*, 1997).

En medicina veterinaria, se han realizado 3 estudios descriptivos de la presencia de bacterias del género *Helicobacter* en mucosa gástrica de caninos y felinos sanos, con y sin signos de patología digestiva. Sin embargo, ninguno de estos trabajos pudo determinar la o

las especies de *Helicobacter* presentes en el estómago de los individuos evaluados (Paz, 2002; Jara, 2003; Valdés, 2007).

Hoy en día, aún no existen suficientes evidencias que permitan aclarar el rol de *H. heilmannii*-like en casos clínicos de gastritis crónicas, el tratamiento médico ideal; si es una enfermedad zoonótica y que papel tiene en otras enfermedades como cáncer gástrico o enfermedad intestinal inflamatoria crónica (Leib, 2003; Neiger, 2003).

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de *H. pylori* y organismos “*H. heilmannii* – like”, en la mucosa gástrica de perros, a través de técnicas moleculares.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Detectar la presencia de organismos “*H. heilmannii* – like” en mucosa gástrica de perros mediante PCR convencional.
- 2.- Detectar la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica de perros mediante PCR convencional.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Individuos en estudio:

Para los propósitos de este estudio, se seleccionaron 10 individuos positivos a la prueba rápida de ureasa de sus biopsias gástricas, obtenidas a través de endoscopia flexible. Los individuos no debían haber recibido antibióticos en los últimos 30 días previos a la toma de muestras.

La fase experimental relacionada con la recolección de las biopsias gástricas caninas se llevó a cabo en las dependencias de la Clínica de Animales Pequeños de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

2. Obtención de las biopsias gástricas

Técnica Endoscópica

Previo al examen endoscópico los animales en estudio fueron sometidos a un ayuno de 16 horas. Este examen se realizó bajo anestesia general para evitar incomodidad y dolor en el paciente. El protocolo anestésico incluyó atropina (0,05 mg/kg), diazepam (0,5 mg/kg) y ketamina (5 mg/kg), administrados vía endovenosa y vehiculizados en suero salino fisiológico estéril (NaCl 0,9%).

Durante el examen endoscópico, a todos los pacientes se les extrajeron muestras de mucosa gástrica, con una pinza de biopsia endoscópica. Las biopsias gástricas de los perros fueron obtenidas del cuerpo gástrico, y se tomaron en promedio 6 muestras por cada paciente. El tamaño de cada muestra varió entre 2-4 mm de diámetro. Una de las muestras fue sometida a una prueba rápida de ureasa He-Py Test® (BiosChile) para determinar la presencia de bacterias ureasa positivas. Los resultados de esta prueba se leyeron en un tiempo máximo de 24 horas. Las otras 5 muestras de estómago fueron depositadas en un tubo Eppendorf de 1.6 ml, rotuladas y posteriormente congeladas a -20°C, en espera de los resultados de la prueba de ureasa. Los 10 primeros perros positivos a la prueba de ureasa,

ingresaron a este estudio y sus muestras de mucosa gástrica fueron analizadas mediante PCR, para identificar tanto *H. pylori* como organismos *H. heilmannii* – like

3. Identificación de organismos *H. heilmannii*-like y *H. pylori*

La identificación se realizó por PCR y se llevó a cabo en las dependencias del Centro Biotecnológico Veterinario (Biovetec) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

- Extracción de ADN para PCR:

Al momento de hacer la extracción de ADN bacteriano, se tomaron las muestras de los tubos sin descongelar y se homogenizaron con ayuda de agua destilada y un mortero hasta lograr una pasta líquida. Para extraer el ADN de las biopsias se utilizó la técnica previamente descrita por Moncayo *et al.*, (2006). A las muestras homogenizadas se les agregó 400 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,2; EDTA 1 mM con SDS al 1% y 100 mg de proteinasa K/ml). Se incubaron a 60°C por 3 horas y posteriormente se extrajo el ADN por la técnica de extracción fenólica, que consistió en agregar a la muestra 400 µL de cloroformo, agitar durante 1 minuto y centrifugar a 10.000 *rpm* por 1 minuto. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.6 ml, para continuar con nueva extracción fenólica (400 µL), repitiendo los últimos pasos citados anteriormente. La fase acuosa se colocó en otro recipiente, el ADN se precipitó con 40 µL de acetato de sodio 3M y 1000 µL de isopropanol. Se mezcló nuevamente y se dejó a – 20°C por al menos 6 horas. Posteriormente, se centrifugaron los tubos por 20 minutos a 4°C y 13.000 *rpm*. Luego de eso, se sacó el sobrenadante con ayuda de una pipeta y secó con ayuda de una estufa el resto de sobrenadante. El ADN precipitado fue posteriormente lavado con etanol 70% y secado a temperatura ambiente. El precipitado fue suspendido en 50 µL de agua.

- PCR para la detección de organismos *H. heilmannii* – like:

Todas las biopsias fueron sometidas a PCR para la identificación de organismos *H. heilmannii* – like, en base a la técnica descrita por Chisholm y Owen, 2003. Los partidores que se utilizaron para amplificar la secuencia de ADNr 16S (112 pb) fueron:

- HeilF: 5'-AAG TCG AAC GAT GAA GCC TA 3'
- HeilR: 5' –ATT TGC TAT TAA TCA CCA TTT C 3'

Para todas las muestras a amplificar, se preparó un volumen final de reacción de 50 µl, conteniendo 5 µl del ADN extraído de la biopsia, una concentración de 0,4 µM para cada partidor, una concentración de 200 µM para cada desoxinucleótido trifosfatado, y 1 U de taq polimerasa en 20 mM Tris – HCl, pH 8,4, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,2% (v/v) glicerol.

Las condiciones del PCR fueron:

El ADN blanco fue denaturado a 95°C por 5 minutos y luego amplificado por 35 ciclos de 1 minuto cada uno a 95°C, el alineamiento fue a una temperatura de 53°C y la elongación fue a 72°C. La extensión final se realizó a 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, los productos del PCR se sometieron a electroforesis (100V/h) en geles de agarosa al 1% en buffer TBE (90mM Tris-HCl, 90mM ácido bórico, 2,0 mM de EDTA) y teñidos con bromuro de etidio (0,5 ug/ml). Tras la electroforesis, el gel se analizó con luz ultravioleta, para visualizar las bandas amplificadas.

- PCR para la detección de *H. pylori*

Se realizó un PCR específico de *H. pylori*, para la detección del gen de la citotoxina vacuolante *vacA*.

Se utilizaron los partidores descritos por Chisholm y Owen, 2003

- VAC3624F: 5'-GAG CGA GCT ATG GTT ATG AC-3'
- VAC4041R: 5'-CAT TCC TAA ATT GGA AGC GAA-3'

El Procedimiento del PCR fue semejante al descrito para *H. heilmannii* por Chisholm y Owen, 2003. Las condiciones del PCR fueron:

El ADN templado fue denaturado a 95°C por 5 minutos y luego amplificado por 35 ciclos como sigue: 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, y 72°C por 45 segundos cada uno. La extensión final se realizó a 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, los productos del PCR se sometieron a electroforesis (100V/hr) en geles de agarosa al 1% en buffer TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM ácido bórico, 2,0 mM de EDTA) y teñidos con bromuro de etidio (0,5 ug/ml). Tras la electroforesis, se ubicó el gel sobre el transiluminador para analizarlo con luz ultravioleta y así poder visualizar las bandas amplificadas. Para determinar el tamaño molecular de los productos de PCR se usó un marcador de DNA de 100 pb. Los tamaños de las bandas amplificadas para *H. pylori* y *H. heilmannii*-like fueron 417 pb y 112 pb, respectivamente. Finalmente el gel fue fotografiado con una cámara Sony Cyber-shot modelo DSC-P1. Los geles teñidos con bromuro de etidio fueron desechados bajo normas aprobadas por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se usó como control positivo para *H. pylori* ADN genómico de una cepa aislada (26695)* y como control negativo agua destilada. Debido a que *H. heilmannii* no es cultivable no se contó con controles positivos.

* Donación Sr. Hector Toledo Araya. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina Universidad de Chile.

RESULTADOS

Se obtuvo positividad a *H. pylori* en 5/10 individuos y positividad a *H. heilmannii-like* en 6/10 individuos (cuadro 1; figura 1, 2 y 3)

Cuadro N° 1: Detección de *H. pylori* y *Helicobacter heilmannii-like* a través de PCR, en biopsias gástricas de 10 perros.

Perro	<i>H. pylori</i> (vacA)	<i>H. heilmannii-like</i> (heil)
1	-	-
2	+	+
3	+	+
4	-	+
5	+	-
6	+	-
7	-	+
8	-	+
9	+	-
10	-	+

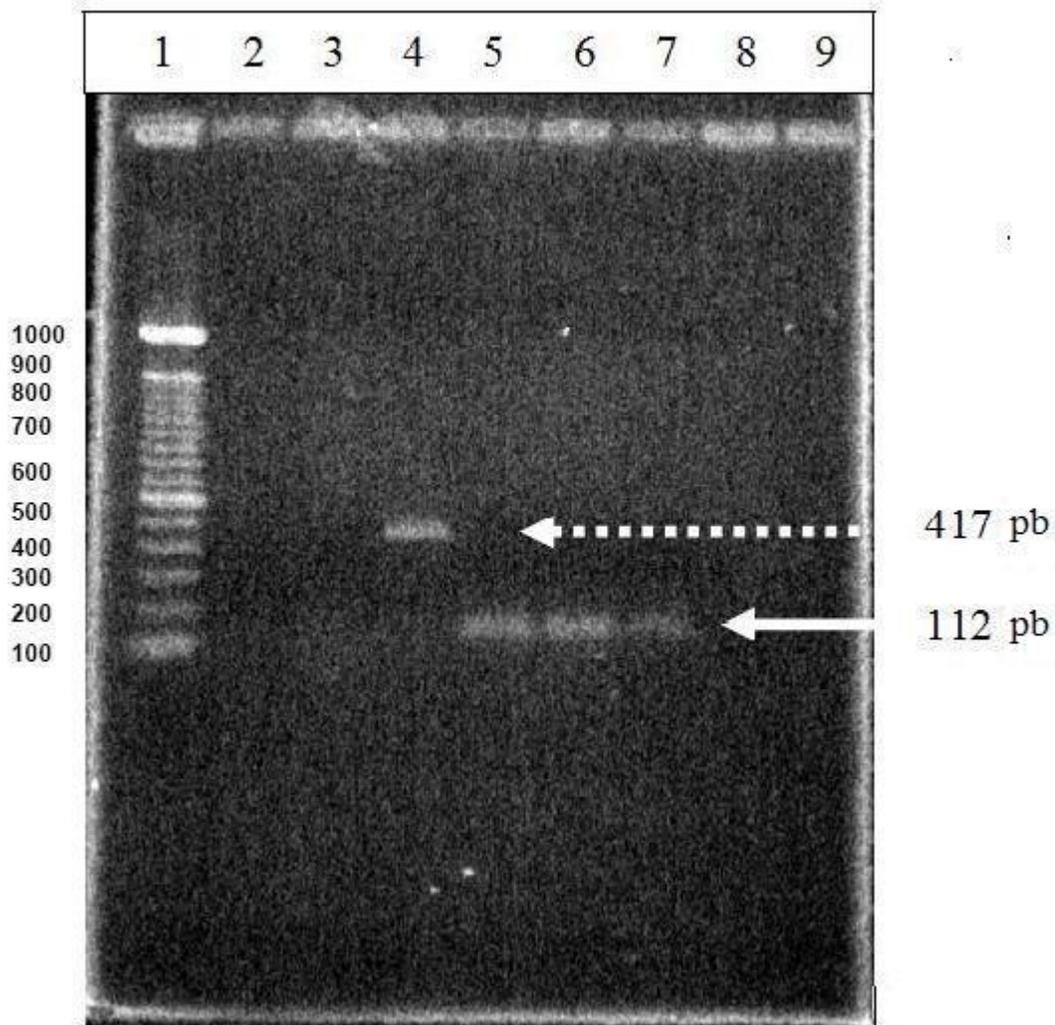


Figura 1: PCR en biopsias gástricas de perros para la detección de *H. pylori* (417 pb) y *H. heilmanni-like* (112 pb).

Carril 1: Estándar de peso molecular de 100 pb

Carril 2: Perro 8, (-) a *H. pylori*

Carril 3: Perro 4, (-) a *H. pylori*

Carril 4: Control positivo a *H. pylori* (cepa 26695)

Carril 5: Perro 8, (+) a *H. heilmannii*

Carril 6: Perro 4, (+) a *H. heilmanni*

Carril 7: Perro 7, (+) a *H. heilmannii*

Carril 8: Perro 7, (-) a *H. pylori*

Carril 9: Control negativo (agua bidestilada)

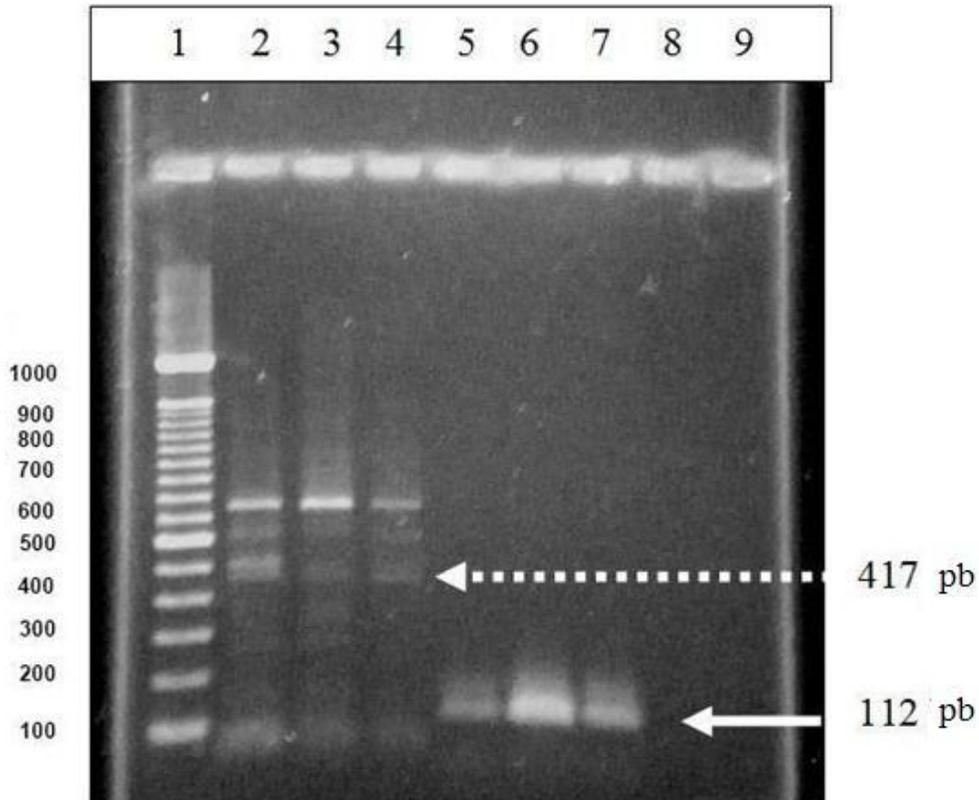


Figura 2: PCR en biopsias gástricas de perros para la detección de *H. pylori* (417 bp) y *H. heilmannii-like* (112 bp).

Carril 1: Estandar de peso molecular de 100 pb

Carril 2: Perro 3 (+) a *H. pylori*

Carril 3: Perro 2 (+) a *H. pylori*

Carril 4: Perro 5 (+) a *H. pylori*

Carril 5: Perro 3 (+) a *H. heilmannii*

Carril 6: Perro 2 (+) a *H. heilmannii*

Carril 7: Perro 10 (+) a *H. heilmannii*

Carril 8: Perro 5 (-) a *H. heilmannii*

Carril 9: Perro 10 (-) a *H. Pylori*

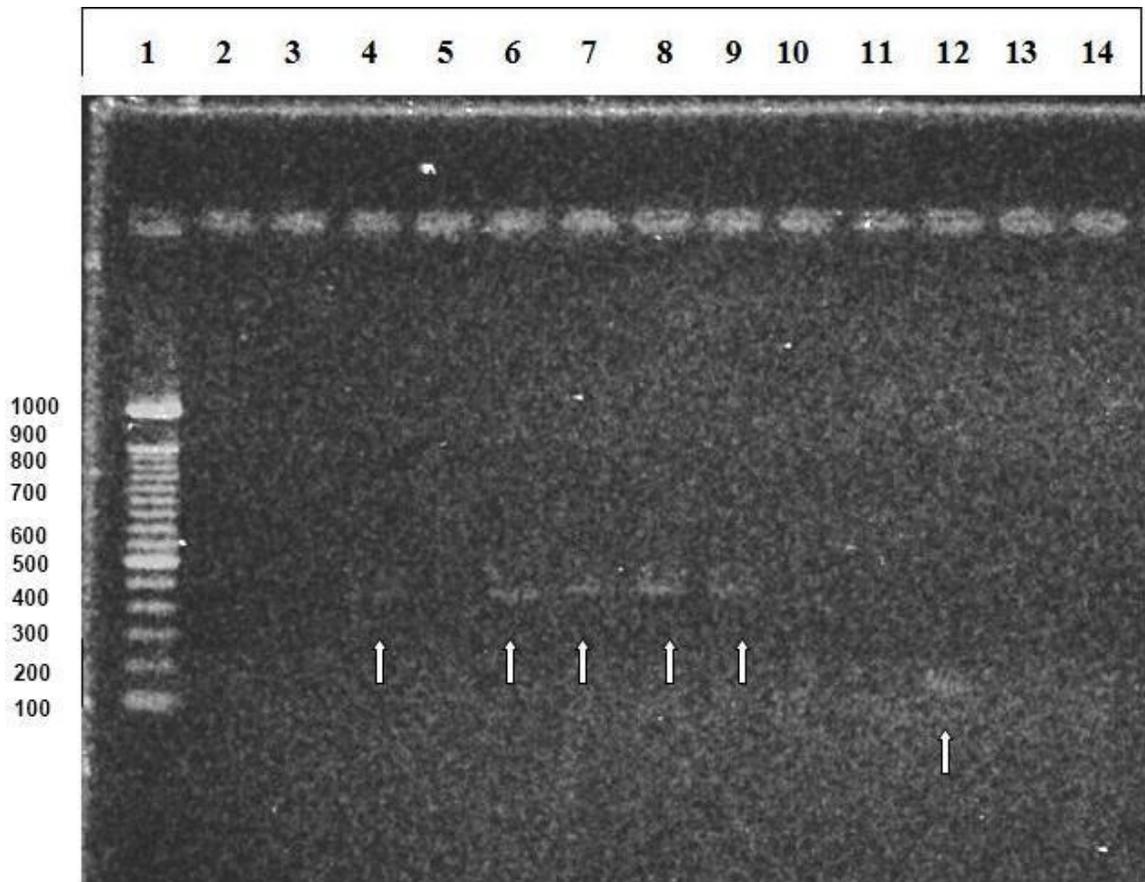


Figura 3: PCR en biopsias gástricas de perros para la detección de *H. pylori* (417 bp) y *H. heilmanni-like* (112 bp).

Carril 1: Estandar de peso molecular de 100 pb

Carril 2: Perro 1 (-) a *H. pylori*

Carril 3: Perro 10 (-) a *H. pylori*

Carril 4: Perro 3 (+) a *H. pylori*

Carril 5: Perro 7 (-) a *H. pylori*

Carril 6: Perro 9 (+) a *H. pylori*

Carril 7: Perro 6 (+) a *H. pylori*

Carril 8: Perro 5 (+) a *H. pylori*

Carril 9: Control positivo a *H. pylori* (cepa 26695)

Carril 10: Perro 1 (-) a *H. heilmannii*

Carril 11: Perro 9 (-) a *H. heilmannii*

Carril 12: Perro 10 (+) a *H. heilmannii*

Carril 13: Perro 6 (-) a *H. heilmannii*

DISCUSIÓN

Estudios recientes realizados en distintos países han podido comprobar que en el estómago de seres humanos y animales existen bacterias que son capaces de producir distintas patologías gástricas en grados variables (Okiyama *et al.*, 2005). Estas bacterias espirales gram negativas se han clasificado dentro del género *Helicobacter* y se han dividido en dos grandes grupos: *H. pylori*-like y *H. heilmannii*-like (Eaton *et al.*, 1996; Baele *et al.*, 2004). Este segundo grupo a su vez ha sido clasificado en 2 subgrupos distintos (*H. heilmannii* tipo 1 y *H. heilmannii* tipo 2) por análisis filogenético de sus secuencias génicas ADNr 16S (O' Rourke *et al.*, 2001; Priestnall *et al.*, 2004). Análisis comparativos posteriores sugirieron que este segundo grupo de bacterias también se encontraría presentes en perros, gatos y cerdos.

Un análisis basado en PCR ha sido desarrollado para amplificar distintos fragmentos de los genomas de organismos *H. heilmannii*-like y *H. pylori* directamente desde biopsias gástricas y esta técnica ha sido comparada como una alternativa al PCR de los genes *ureB* (Chisholm y Owen, 2003).

Individuos en estudio

Los animales que ingresaron al presente estudio fueron cuidadosamente seleccionados para cumplir los criterios que se establecieron como requisitos de entrada, es decir que hayan obtenido resultados positivos a la prueba rápida de ureasa de sus biopsias gástricas y que además no hayan recibido antibióticos en los 30 días previos a la toma de biopsias gástricas. Para los propósitos de este estudio, se seleccionaron 10 animales de los cuales 7 fueron perros mascotas y 3 fueron canes de criadero.

Especialmente, en lo referido a la administración de antibióticos, este período de un mes sin terapia antibiótica previo a la realización de los exámenes endoscópicos y toma de biopsias, fue propuesto de acuerdo a antecedentes bibliográficos internacionales (Happonen *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 1998) y tuvo como objetivo asegurar que esta terapia no

afectara la población bacteriana gástrica y su posterior detección a través de la prueba de ureasa y PCR.

A pesar que el número de individuos podría a *priori* considerarse pequeño, concuerda con el número de individuos utilizados en estudios similares (Paz, 2002; Jara, 2003) y es coherente con el objetivo central de este estudio.

Es interesante destacar el estudio de Yamasaki *et al.*, (1998), en el cuál describieron que *Helicobacter* se ha aislado de animales sanos tan jóvenes como perros de 2 meses de edad y en animales viejos de hasta 11 años. En el presente estudio hubo tres animales que se presentaron sanos al examen clínico (perro 1, perro 4 y perro 8) y sus edades se encontraban dentro de este rango de edad (8 años, 8 años y 7 años respectivamente). Con esto se puede deducir que la ausencia de signos clínicos no excluye la posibilidad de presentar bacterias del género *Helicobacter* y en el presente estudio ocurrió que de 3 pacientes sanos (perro 1, perro 4 y perro 8), posterior a la prueba de ureasa, 2 resultaron ser positivos (perro 8 y perro 4) a *H. heilmannii*-like por medio de PCR. En relación a esto, es ejemplificador el resultado obtenido por Radin *et al.*, (1990), quienes a pesar de haber infectado experimentalmente con bacterias del género *Helicobacter* a 7 cachorros (libres de estas bacterias), ninguno de ellos presentó signos clínicos de gastritis.

Se reconoce que la presencia de especies del género *Helicobacter* en el estómago de animales es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades gástricas (Trebesius *et al.*, 2001). Sin embargo, en el presente estudio, los 7 pacientes “no sanos”, correspondieron a pacientes que presentaron sintomatología clínica de: diarrea de intestino grueso, vómitos y fluctuaciones en el apetito. Al examen endoscópico macroscópico no hubo hallazgos de anormalidad en la mucosa gástrica. En este estudio, sin embargo, no se consideró la realización de estudios histopatológicos para confirmar o descartar la presencia de gastritis asociada a la presencia de estas bacterias, por no estar en los objetivos del estudio.

Prueba de ureasa

El requisito de entrada de los individuos en estudio fue la positividad a esta prueba.

En el presente estudio, el perro 1 resultó ser falso positivo a la prueba de ureasa, debido a que fue negativo a los PCR para ambas bacterias. Esto puede atribuirse a la presencia de otras bacterias, que pudieron haber contaminado la muestra y que también pueden producir ureasa como *Proteus mirabilis* o *Pseudomonas aeruginosa* (Happonen *et al.*, 1998; Corti *et al.*, 2002). Otra posibilidad es que la biopsia no haya sido representativa, debido a que las infecciones gástricas, en animales domésticos, por bacterias del género *Helicobacter* se presentarían en parches o zonas muy focalizadas (Jalava *et al.*, 1998).

Se debe poner en perspectiva que la prueba de ureasa tiene una sensibilidad 88-92% y una especificidad entre 99 a 100%, comparada con el diagnóstico a través de estudios histopatológicos (Nieger y Simpson 2000, Montecucco y Rappuoli, 2001), los que por razones de financiamiento no fueron posibles de incluir en el presente estudio y que de acuerdo a Simpson *et al.*, (1999) la técnica de PCR sería más sensible y específica que las pruebas histológicas, cultivo bacteriano y mapeo de ureasa en la detección de *H. felis* en perros.

La confirmación de presencia de material genético de las bacterias *H. pylori* y organismos *H. heilmannii*-like en las biopsias gástricas estudiadas, también apoyaría el uso de la prueba rápida de ureasa, como una prueba tamiz o *screening* para perros, al igual como se utiliza actualmente en pacientes humanos (Moncayo *et al.*, 2006). Esta prueba sería más conveniente, en términos económicos, en tiempo de procesamiento y en requerimientos de personal calificado, en comparación a los estudios histopatológicos; estos últimos actualmente considerados el *gold standard* para el diagnóstico de bacterias del género *Helicobacter* en mucosa gástrica de perros y gatos (Corti *et al.*, 2002).

Happonen *et al.*, (1998) informaron que al utilizar la prueba de ureasa en 10 perros sanos experimentalmente infectados, el 100% de las muestras de cuerpo gástrico fueron

positivas, de fondo gástrico el 95% fue positivo, y de antro gástrico el 62% de las muestras fueron positivas, sin determinarse diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Además estos investigadores, indicaron que los resultados falsos negativos a la prueba de ureasa de algunas muestras podrían deberse al pequeño número de *Helicobacter* presentes.

Hazell *et al.*, 1987 señalaron que el número de resultados positivos, con la prueba de ureasa, aumentó en la medida que también lo hizo el período de lectura, especialmente cuando el conteo de *Helicobacter* fue bajo. Sin embargo, en el presente estudio se respetó el tiempo máximo de lectura (24 horas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Durante la última década, la aplicación de técnicas microbiológicas convencionales, que requieren el crecimiento de los microorganismos para su posterior análisis fenotípico y bioquímico, ha pasado a ser complementada con la aplicación de métodos moleculares de diagnóstico. Entre tales metodologías la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más sensible y la que se aplica más satisfactoriamente en microbiología clínica, en particular en el caso de organismos que son difíciles de cultivar *in vitro* o que presentan crecimiento lento (Mendez – Álvarez y Perez - Roth, 2004).

Hasta ahora, los organismos *H. heilmannii*-like no se han podido cultivar *in vitro* (Baele *et al.*, 2004). Además, los métodos para la detección de estas bacterias basados en microscopía son relativamente poco sensibles cuando el número de bacterias es bajo (Chilsholm y Owen, 2003). Es por esta razón que se han necesitado de técnicas diagnósticas más sensibles y específicas como PCR para la detección de estas bacterias en las muestras de mucosa gástrica. Los estudios basados en PCR han podido identificar organismos *H. heilmannii*-like en las biopsias gástricas de humanos y animales por amplificación de fragmentos génicos específicos ADNr 16S (Chisholm y Owen, 2003).

Se observó que las especies *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* tienen secuencias génicas 16S rRNA muy similares, de manera que se necesitan otros genes para poder discriminar entre ellas (Baele *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, se realizaron múltiples ensayos de PCR para la detección de bacterias *H. pylori* y organismos *H. heilmannii*-like en la mucosa gástrica de 10 perros. Además, se probaron distintas diluciones de las preparaciones de ADN obtenidos, para evitar interferencias génicas y así obtener mejores resultados.

En la extracción de ADN bacteriano desde las biopsias gástricas, la muestra obtenida fue suficiente y de calidad adecuada para poder ser amplificado mediante PCR. Sin embargo, existió el inconveniente que la cantidad usada en cada PCR no pudo ser estandarizada. Esto se pudo apreciar en los geles, ya que, las bandas obtenidas fueron de distinta intensidad debido a la diferencia que existió en la cantidad de ADN amplificado. A pesar de esto, no hubo problemas en el posterior análisis de los geles e identificación de los distintos productos de PCR, con lo que se puede deducir, que una muestra de biopsia gástrica fue una cantidad suficiente desde la cual se pudo extraer material genético para su posterior análisis. Este problema podría aminorarse tratando de estandarizar la cantidad y el tamaño mínimo de las distintas muestras de biopsias gástricas que se van a utilizar para la extracción de ADN.

Para evitar resultados falsos positivos se tuvo especial cuidado en todo lo relacionado al resguardo y manipulación de las muestras. Los resultados falsos positivos pueden generarse por contaminación de las muestras a partir de una única molécula de ADN proveniente de otra muestra, con lo que esta molécula sería amplificada por PCR y aparecería como una banda errónea en la electroforesis por gel (Satz, 1993). Frente a esto, se realizaron controles negativos múltiples (reacciones de amplificación con todos los reactivos, excepto el ADN molde). Además, del uso de técnicas de esterilidad, se procuró un buen uso y limpieza de micropipetas que evitarían la generación de aerosoles como precaución para prevenir la contaminación de las muestras.

Usando los partidores HeilF: 5'-AAG TCG AAC GAT GAA GCC TA 3' y HeilR: 5' -ATT TGC TAT TAA TCA CCA TTT C 3'. se encontraron 6 perros positivos a *H.heilmannii*-like. Lo que concuerda con Chisholm y Owen (2003). Chilsholm y Owen (2003), usaron una técnica de PCR (HHLO-16) con los siguientes partidores: HeilF: 5'-AAG TCG AAC GAT GAA GCC TA 3' y HeilR: 5' -ATT TGC TAT TAA TCA CCA TTT C 3'. Estos partidores amplificaban la secuencia ADNr 16S (112 pb) de las bacterias pertenecientes al grupo *H. heilmannii*-like. Estos investigadores además publicaron que estos partidores no amplificaban las secuencias génicas de *H. pylori* y teóricamente esta técnica podría detectar miembros del subgrupo *H. heilmannii* tipo 2, como son: *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* (Chilsholm y Owen, 2003). Este análisis además resultó ser altamente sensible, ya que estos investigadores describieron que en 13/15 biopsias gástricas felinas este análisis pudo detectar productos específicos, donde sólo 2 de estas biopsias gástricas habían sido confirmadas de contener organismos espirales por tinción Gram.

Inicialmente, se había asumido que las infecciones mixtas de distintas especies del género *Helicobacter* eran raras, por que había exclusión competitiva (De Groote *et al.*, 2005). Sin embargo, en el presente estudio la presencia simultánea de productos de *H. heilmannii* y *H. pylori* detectados a través de PCR fue observada en 2 de los 10 pacientes (perro 2 y perro 3). Con estos resultados se puede concluir que la presencia de una especie de *Helicobacter* gástrico no excluye coinfección con otra especie en la mucosa gástrica de los individuos infectados.

Solnick *et al.*, (2003) en sus estudios de la mucosa gástrica de animales revelaron que ellos eran colonizados por microorganismos distintos a *H. pylori*, además describieron que la bacteria más comúnmente encontrada era una especie distinta a *H. pylori*. En el presente estudio se observó que 6/10 de los perros (perro 2, perro 3, perro 4, perro 7, perro 8 y perro 10) fueron colonizados por bacterias distintas a *H. pylori* que pertenecían al grupo de organismos *H. heilmannii*-like y dos de estos perros presentaron ambas especies conjuntamente (perro 2 y perro 3).

Baele *et al.*, 2004, describieron que las especies más comúnmente encontradas en perros y gatos fueron *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*. Estas tres especies corresponden a organismos *H. heilmannii*-like. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con Baele *et al.*, (2004), ya que 6 de los 10 perros fueron positivos a organismos *H. heilmannii*-like a través de PCR.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede deducir que el desarrollo y evaluación de la técnica de PCR en las biopsias gástricas endoscópicas para la detección de *H. pylori* y organismos *H. heilmannii*-like sería una herramienta de gran utilidad para determinar el rol de estas bacterias en la generación de gastritis. El uso rutinario de esta técnica podría permitir una evaluación exacta de la prevalencia de *H. pylori* y organismos *H. heilmannii*-like en animales y podría facilitar estudios para mejorar la comprensión de la significancia clínica y también para poder analizar y comprender mejor de que forma los animales domésticos actúan como un reservorio de la infección.

CONCLUSIONES

- A través de la técnica de PCR fue posible detectar, por primera vez en Chile, bacterias *H. pylori* y organismos *H. heilmannii*-like en mucosa gástrica de perros.
- La utilización de la prueba rápida de ureasa como prueba tamiz al PCR, sería de utilidad y altamente recomendable.

RECOMENDACIONES

El presente estudio es el primero en reportar la presencia de bacterias del género *Helicobacter* en la mucosa gástrica de perros por medio de PCR y pudo identificar y diferenciar si los organismos presentes en los 10 perros correspondían a bacterias *H. pylori* o a organismos *H. heilmannii*-like. Se recomienda para estudios posteriores que estos sean complementados con otras técnicas como la hibridación fluorescente in situ (FISH). Además, también sería necesario usar partidores específicos para esas bacterias, para poder identificar las especies que componen cada uno de los subtipos de *H. heilmannii*-like.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSEN, L.; BOYE, K.; HOLCK, S.; NORGAARD, A.; ELSBORG, L. 1999. Characterization of a culturable “*Gastrospirillum hominis*” (*Helicobacter heilmannii*) strain isolated from human gastric mucosa. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1069 – 1076.

BAELE, M.; VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; VANDAMME, P.; HÄNNINEN, M-L.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. 2004. Multiple PCR Assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(3): 1115 – 1122.

BREED, R., MURRAY, E.; HITCHENS, A. 1948. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 6th Edition. The Williams & Wilkins Company, 330 p.

BUCZOLITS, S ; HIRT, R ; ROSENGARTEN, R ; BUSSE, H. 2003. PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa. *Veterinary Microbiology* 95. P. 259-270.

CATTOLI, G.; VAN VUGT, R.; ZANONI, R.; SANGUINETTI, V.; CHIOCCHETTI, R.; GUALTIERI, M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; GAASTRA, W.; KUSTERS, J. 1999. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter spp.* in naturally infected dogs. *Vet. Microbiol.* 70(3-4):239-250.

CHISHOLM, S.; OWEN, R. 2003. Development and application of a novel screening pcr assay for direct detection of “*Helicobacter heilmannii*”-like organisms in human gastric biopsies in Southeast England. *Diagnostic microbiology and infectious diseases* 46: 1-7.

CORTI, R.; AMÉNDOLA, R.; DOWECK, J.; SCHENONE, L. CÁMARA, M. 2002. *Helicobacter pylori*: puesta al día. In: *Temas de Infectología clínica*. Stamboulian, D. Mc Graw-Hill Interamericana. P. 41 – 62.

DE GROOTE, D.; VAN DOORN, L.; VAN DEN BULCK; K.; VANDAMME, P.; VIETH, M.; STOLTE, M.; DEBONGNIE, J.; BURETTE, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. 2005. Detection of Non-Pylori *Helicobacter* Species In “*Helicobacter Heilmannii*” –Infected Humans. *Helicobacter* 10(5): 398 – 406.

DIETERICH, C.; WIESEL, P.; NEIGER, R.; BLUN, A.; CORTHESEY-THEULAZ, I. 1998. Presence of multiple “*Helicobacter heilmanni*” strains in an individual suffering from ulcers and in his two cats. *J. Clin. Microbiol.* 36(5): 1366-1370.

DUBOIS, A. 1995. Spiral bacteria in human stomach: The gastric *Helicobacters*. *Emer. Infec. Dis.* (1)3: 79-83.

DUNN, B.; COHEN, H.; BLASER, M. 1997. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol. Rev. 10(4) 720-741.

EATON, K. 1999. Animal models of *Helicobacter* gastritis. In: Currents Topics in Microbiology and Immunology. N° 241” Gastroduodenal Disease and *Helicobacter pylori*: Pathophysiology, diagnosis and treatment. Eds. Westblom, Czinn, Nedrud. Springer. R.W Compans, Atlanta/Georgia. P. 123-154.

EATON, K.; DEWHIRST, F.; PASTER, B.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B.; PAOLA, J.; SHERDING, R. 1996. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: Animal and Public Health Implications. J. Clin. Microbiol. 34(12): 3165 - 3170.

FIGUEROA, G.; ACUÑA, R.; TRONCOSO, M.; PORTELL, D.; TOLEDO, M.; VALENZUELA, J. 1997. *Helicobacter pylori* infection in Chile. Clin. Infect. Dis. 25(5): 983 –989.

FOX, J. 1997. *Helicobacter*-associated gastric disease in ferrets, dogs and cats. In: Kirk R. (ed): Current Veterinary Therapy XII.Philadelphia. WB Saunders. P. 720-723.

FOX, J.; LEE, A.; OTTO, G.; TAYLOR, N. MURPHY, J. 1991. *Helicobacter felis* gastritis in Gnotobiotic Rats: an Animal Model of *Helicobacter pylori* gastritis. Infect. Immun. 59(3): 785-791.

FOX, J.; BATCHELDER, M.; MARINI, R.; YAN, L.; HANDT, L.; LI, X.; SHAMES, B.; HAYWARD, A.; CAMPBELL, J.; MURPHY, J. 1995. *Helicobacter pylori* – induced gastritis in the domestic cat. Infect. Immun. 63(7): 2674 –2681.

FOX, J.; PERKINS, S.; YAN, L.; SHEN, Z.; ATTARDO, L.; PAPPO, J. 1996. Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *Helicobacter pylori* in saliva, gastric fluid, and feces. Immun. 88(3): 400-406.

FOX, J.; LEE, A. 1997. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. Lab. Anim. Sci. 47(3): 222-255.

FRITZ, E.L; SLAVIK, T.; DELPORT, W.; OLIVIER, B.; VAN DER MERWE, S.W. 2006. Incidence of *Helicobacter felis* and the Effect of Coinfection with *Helicobacter pylori* on the Gastric Mucosa in the African Population. Journal of Clinical Microbiology. 44(5): 1692-1696.

GITNICK, G. 1997. Diagnosis and management of peptic ulcer disease. Second edition. Professional Communications Inc. Fullfilment Center. Caddo, OK. USA. 63 p.

HANDT, L.; FOX, J.; DEWHIRST, F.; FRASER, G.; PASTER, B.; YAN, L.; ROZMIAREK, H.; RUFO, R.; STALIS, I. 1994. *Helicobacter pylori* isolated from a domestic cat: Public Health Implications. Infect. Immun. 62(6): 2367-2374.

HANDT, L.; FOX, J.; STALIS, I.; RUFO, R.; LEE, G.; LINN, J; LI, X. KLEANTHOS, H. 1995. Characterization of feline *Helicobacter pylori* Strains and Associated Gastritis in a Colony of Domestic Cats. J. Clin. Microbiol. 33: 2280 – 2289.

HÄNNINEN, M-L.; HAPPONEN, I.; JALAVA, K. 1996. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter sp.* Inter. J. Sys. Bact. 46(1): 160-166.

HÄNNINEN, M-L.; HAPPONEN, I. JALAVA, K. 1998. Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. Veterinary Microbiology 62: 47-58.

HAPPONEN, I.; SAARI, S.; CASTREN, L.; TYNI, O.; HANNINEN, M-L.; WESTERMARCK, E. 1996. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *Helicobacter*-like organisms in dogs and cats. J. Comp. Path. 115(2): 117-127.

HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; SAARI, S.; KARJALAINEN, M.; HANNINEN, M-L.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E. 1998. Detection and effects of *Helicobacters* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213 (12): 1767-1774.

HAZELL, S; BORODI, T; GAL, A; LEE, A. 1987. *Campylobacter pyloridis* gastritis I: Detection of urease as a marker of bacterial colonization and gastritis. Am. J. Gastroenterol. 82(4): 292-296.

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

HERMANN, S.; KREGEL, K.; BREUER, W.; LECHNER, J. 1995. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. J. Comp. Pathol. 112(3): 307 – 318.

HULTEN, K.; ENROTH, H.; NYSTROM, T.; ENGSTRAND, L. 1998. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. J. Appl. Microbiol. 85(3): 282-286.

JARA, M. 2003. Determinación histológica de la presencia de bacterias curvo-espiriladas tipo *Helicobacter spp.* en estómago, intestinos, hígado y vesícula biliar de perros (*Canis familiaris*) de la ciudad de Valdivia, Chile”. Memoria de título para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Patología Animal. 48 p.

JALAVA, K.; KAARTINEN, M.; UTRIAINEN, M.; HAPPONEN, I.; HANNINEN, M-L. 1997. *Helicobacter salomonis sp. nov.* A canine gastric *Helicobacter sp.* related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. Inter. J. Sys. Bacteriol. 47(4): 975-982.

JALAVA, K.; ON, S.; VANDAMME, P.; HAPPONEN, I.; SUKURA, A.; HANNINEN, M-L. 1998. Isolation and identification of *Helicobacter spp.* from canine and feline gastric mucosa. *Appl. Env. Microbiol* 64(10): 3998-4006.

JENKINS, C.; BASSET, J. 1997. *Helicobacter* infection. *Comp.* 19(3): 267 - 279.

JOO, M.; KWAK, J.; CHANG, S.; KIM, H.; CHI, J.; KIM, K.; YANG, J.; LEE J.; MOON, Y.; KIM, K. 2007. *Helicobacter heilmannii*- associated Gastritis: Clinicopathologic findings and comparison with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Journal of Korean Medicine and Science.* 22: 63-69.

LEE, A.; KRAKOWKA, S.; FOX, J.; OTTO, G.; EATON, K.; MURPHY, J. 1992. Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. *Vet. Pathol.* 29(6): 487-494.

LEIB M. 2003. Chronic Vomiting in Dogs and Cats: A practical diagnostic approach and the potential role of *Helicobacter*. In: Proceedings of the Atlantic Coast Veterinary Conference. 304 – 306.

MALFERHEINER, P. 1994. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. In: *Helicobacter pylori: its role in gastrointestinal disease.* Edited by ATR Axon. The Centre for Digestive Diseases. Leeds, UK. Science Press Ltd, 70 p.

MCGEE, D.; MOBLEY, H. 1999. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. In: Currents Topics in Microbiology and Immunology. N° 241” Gastroduodenal Disease and *Helicobacter pylori*: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment”. Eds. Westblom, Czinn, Nedrud. Springer. R.W Company, Atlanta/Georgia. P. 155-180.

MC NULTY, C.; DENT, J.; CURRY, A.; UFF, J.; FORD, G.; GEAR, M.; WILKINSON, S. 1989. New spiral bacterium in the gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.* 42: 585-591.

MENDEZ-ALVAREZ, S; PEREZ-ROTH, E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(3):183-92.

MITCHELL, H. 1999. The Epidemiology of *Helicobacter pylori*. In: Currents Topics in Microbiology and Immunology. N° 241 “Gastroduodenal Disease and *Helicobacter pylori*: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment”. Eds. Westblom, Czinn, Nedrud. Springer. R.W Company, Atlanta/Georgia. P. 11-30.

MONATH, T.; LEE, C.; ERMAK, T.; MYERS, G.; WELTZIN, R.; GIANNASCA, P.; THOMAS, W.; SOMAN, G.; BHAGAT, H.; ACKERMAN, S. Y KLEANTHOS, H. 1998. The search for vaccines against *Helicobacter pylori*. *Infect. Med.* 15(8): 534 –546.

MONCAYO, J; SANTACRUZ, J; ALVAREZ, A; FRANCO, B; LOPEZ, M; ANGEL, A; GALLEGO, M; SERRANO, H. 2006. Comparación de métodos

diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. Colomb Med 37(3): 203-212.

MONNO, R.; MARGIOTTA, M.; IERARDI, E.; DE GIGLIO, I.; FUMAROLA, L.; BURATTINI, O.; DI LEO, A.; PISANI, A.; PANELLA, C.; FRANCAVILLA, A. 2006. *Helicobacter heilmannii* infection of the antrum and duodenal bulb. Case report. Clinical Microbiology Newsletter 28 (5): 37-40.

MONTECUCCO, C. Y RAPPUOLI, R. 2001. Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. Nature Reviews. Molec. Cel. Biol. 2: 457 – 466.

NEIGER, R. 2003. *Helicobacter* infection in dogs and cats. Waltham Focus. 13(1) p 10 – 14.

NEIGER, R.; SIMPSON, K. 2000. *Helicobacter* Infection in dogs and cats: facts and fiction. J. Vet. Intern. Med. 14: 125-133.

O'ROURKE, J.L., GREHAN, M., & LEE, A. 2001. Non-pylori *Helicobacter* species in humans. *Gut*, 49, 601-606.

OKIYAMA, Y; MATSUZAWA, K; HIDAKA, E; SANO, K; AKAMATSU, T; OTA, H. 2005. *Helicobacter heilmanni* infection: Clinical, endoscopic and histopathological features in Japanese patients. Pathology international 55. P: 398-404.

PASTER, B.; LEE, A.; FOX, J.; DEWHIRST, F.; TORDOFF, L.; FRASER, J.; O'ROURKE, J.; TAYLOR, N.; FERRERO, R. 1991. Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov.; *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. Inter J. Syst. Bacteriol.41(1): 31-38.

PAZ, V. 2002. Determinación de la presencia de *Helicobacter sp.* en perros (*Canis familiaris*) de Valdivia, a través de biopsia gástrica obtenida por endoscopia. Memoria de título. Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias. 38 p.

PRIESTNALL, S.; WINBERG, B.; SPOHR, A.; NEUHAUS, B.; KUFFER, M.; WIEDMANN, M.; SIMPSON, K. 2004. Evaluation of *Helicobacter heilmannii* subtypes in the gastric mucosae of cats and dogs. Journal of Clinical Microbiology 42(5): 2144 – 2151.

RADIN, M; EATON, K; KRAKOWKA, S; MORGAN D; LEE, A; OTTO, G; FOX, J. 1990. *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic Beagle dogs. Infec. Immun. 58(8): 2606-2612.

SATZ, M; KORNBLIHTT, A. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa, el método y sus aplicaciones. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. Vol. Volumen 4.

SIMPSON, K. 1998. *Helicobacter* Infection in dogs and cats – Is it a Disease? In: Proceedings XXIII Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Buenos Aires, Argentina. P. 399 – 401.

SIMPSON, K. 1999. *Helicobacter spp.* in dogs and cats. In: The North American Veterinary Conference. Proceedings. Orlando – USA. P. 218-219.

SIMPSON, K.; NEIGER, R.; SHERDING, R. 2000. The Relationship of *Helicobacter spp.* infection to gastric disease in dogs and cats. J. Vet. Intern. Med. 14: 223-227.

SMOOT, D. 1996. Microbiology and Epidemiology of *H. pylori* Infection. Drug Benefit Trends 8(B): 10-15.

SOLNICK, J. 2003. Clinical significance of *Helicobacter* species other than *H. pylori*. Clin Infect Dis 36:349-354.

SOLNICK, J; O'ROURKE, J; LEE, A; TOMPKINS, L. 1994. Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. Infect. Immun. 62;1631-1638.

STRAUSS-AYALI, D.; SIMPSON, K. 1999. Gastric *Helicobacter* infection in Dogs. Vet. Clin. North Am. 29(2): 397-414.

SUTTON, F. 1998. Diagnosis of *H. pylori* Infection. Infect. Med. 15(5): 331-336.

THOMAS, J.; GIBSON, G.; DARBOE, M.; DALE, A.; WEAVER, L. 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet. 340: 1194-1195.

TINDBERG Y, BENGTSSON C, GRANATH F, BLENNOW M, NYREN O, GRANSTROM M. 2001. *Helicobacter pylori* infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. Gastroenterol. 121(2):310-316.

TOMB, J.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A.; CLAYTON, R.; SUTTON, G.; FLEICHMANN, R.; KETCHUM, K.; KLENK, H.; GILL, S.; DOUGHERTY, B.; NELSON, K.; QUACKENBUSH, J.; ZHOU, L.; KIRKNESS, E.; PETERSON, S.; LOFTUS, B.; RICHARDSON, D.; DODSON, R.; KHALAK, H.; GLODEK, A.; MCKENNEY, K.; FIZEGERALD, L.; LEE, N.; ADAMS, M.; VENTER, J. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *H. pylori*. Nature. 388: 539-547.

TREBESIUS, K.; ADLER, K.; VIETH, M.; STOLTE M.; HAAS, R. 2001. Specific Detection and Prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent in situ hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing. Journal of Clinical Microbiology 39(4): 1510 – 1516.

TWEDT, D. 1996. *Helicobacter* associated gastritis. In: The North American Veterinary Conference. Proceedings. Orlando – USA. P. 207-208.

VALDÉS, A. 2007. Detección de *Helicobacter spp.* y Descripción de las lesiones gástricas asociadas en caninos. Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, Mención Patología Animal. Universidad de Chile. 107 p.

WESTBLOM, T. Y BHATT, B. 1999. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. In: Currents Topics in Microbiology and Immunology. N° 241” Gastrointestinal Disease and *Helicobacter pylori*: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. Eds. Westblom, Czinn, Nedrud. Springer. R.W Compans, Atlanta/Georgia. P. 215-236.

YAMASAKI, K.; SUEMATSU, H.; TAKAHASHI, T. 1998. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. J. Am. Vet. Med. Assoc. 212: 529 – 533.