

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Victor Reis Galindo

**EVIDÊNCIA DE HELICOBACTER SPP. EM GATOS DOMÉSTICOS
NECROPSIADOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Santa Maria, RS
2022

Victor Reis Galindo

**EVIDÊNCIA DE HELICOBACTER SPP. EM GATOS DOMÉSTICOS
NECROPSIADOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia e Clínica de Pequenos Animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Galindo, Victor Reis

Evidência de *Helicobacter* spp. em gatos domésticos necropsiados na região central do Rio Grande do Sul / Victor Reis Galindo.- 2022.

47 p.; 30 cm

Orientador: Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2022

1. Gatos 2. *Helicobacter* 3. PCR 4. Histopatologia 5. Urease I. Lemos Pinto Filho, Saulo Tadeu II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.


Declaro, VICTOR REIS GALINDO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Victor Reis Galindo


**EVIDÊNCIA DE HELICOBACTER SPP. EM GATOS DOMÉSTICOS
NECROPSIADOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia e Clínica de Pequenos Animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**

Aprovada em 11 de março de 2022:



Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Anne Santos do Amaral, Dr.^a (UFSM)



Isaac Neto Góes da Silva, Dr. (UECE)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter cuidado de mim e me guiado sempre, principalmente por ter permitido eu viver essa história desafiante e maravilhosa no Rio Grande do Sul.

Agradeço aos meus pais, Alexandre e Nazaré e meus familiares que sempre terem me ajudaram, nunca duvidaram da minha capacidade e sempre me encorajaram a voar cada vez mais longe.

Agradeço às minhas irmãs, Alexandra e Ana Carla, cujo amor fraterno que nutrimos um pelo outro é de parceria e cumplicidade.

Agradeço imensamente à minha esposa Lícia Flávia, quem eu Amo muito, que me apoiou desde o início, incondicionalmente e SEMPRE que pôde. Com você a vida é melhor, meu bem. Agradeço a Deus por ter unido nossos caminhos.

Agradeço à nossa cachorrinha Coca-Cola, por me fazer companhia em todos os momentos dessa pandemia, por manter minha sanidade mental em dia e por ser a coisinha mais linda e maravilhosa do mundo. E não posso deixar de mencionar meus estimados felinos de estimação Mulan e Pivete, que deixaram nosso mundo, porém marcaram os melhores momentos de minha graduação com sua presença e amor.

Agradeço aos amigos de Santa Maria que fizeram parte dessa jornada e fizeram cada dificuldade parecer apenas uma página a ser virada. Vocês eu levo no peito como parte de mim e os amo.

Agradeço a todos professores e colaboradores por me estenderem a mão e me permitirem executar o trabalho nesse momento de pandemia, de tantas incertezas e dificuldades. Sou eternamente grato a TODOS vocês.

Agradeço ao meu orientador pela calma e sabedoria com a qual me conduziu no trabalho. Pela paciência, dedicação e pelos aprendizados que tive para engrandecer meu caminho como Médico Veterinário.

Agradeço a todos animais que participaram desse projeto de pesquisa.

Muito Obrigado!

RESUMO

EVIDÊNCIA DE *HELICOBACTER SPP.* EM GATOS DOMÉSTICOS NECROPSIADOS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL.

AUTOR: VICTOR REIS GALINDO

ORIENTADOR: SAULO TADEU LEMOS PINTO FILHO

Helicobacter spp. são bactérias espiraladas, gram-negativas, microaerofílicas que colonizam o estômago e intestino de humanos e diversos outros animais, como cães e gatos. A espécie mais estudada atualmente é a *Helicobacter pylori* e sua colonização é associada a gastrites, úlceras pépticas e carcinomas gástricos em humanos, porém já foi identificada na bile de felinos. As espécies *H. salomonis*, *H. bizzozeronii*, *H. feliz* e *H. heilmannii*, conhecidas como *Helicobacter ssp. não-Helicobacter pylori* (HNHP) foram as mais isoladas da mucosa gástrica de cães e gatos, mas também foram identificadas em seres humanos. Relatos apontam para a possibilidade de que cães e gatos podem servir como fontes de infecção para humanos, parte disso se deve ao hábito de lambedura destas espécies como demonstração de afeto no convívio ou para o *grooming*. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi de traçar um perfil epidemiológico dessas bactérias e determinar o gênero mais prevalente em gatos da região central do Estado do Rio Grande do Sul, correlacionar a presença das bactérias no estômago, fígado e bile com o teste de urease e as alterações histopatológicas gástricas e hepáticas. Para a realização deste estudo, foram empregados 30 cadáveres de gatos, submetidos à necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Durante este procedimento foram coletadas amostras do corpo gástrico e antro pilórico para o teste rápido de urease (TRU) para verificar a presença ou ausência das bactérias, da histopatologia (estômago e fígado) para observar as alterações teciduais e da PCR (estômago, fígado e bile) para análise filogenética e sequenciamento das *Helicobacter spp.* Desta forma, este trabalho identificou que no TRU 60% (18/30) dos pacientes foram positivos no corpo gástrico e que 50% (15/30) foram positivos no antro pilórico. Destes 15 pacientes, 10 eram machos (70%), sendo o resultado positivo no antro pilórico associado ao sexo masculino. Foram observadas alterações histopatológicas discretas na maioria das amostras gástricas e hepáticas. As amostras gástricas submetidas ao PCR foram positivas em 60,7% (17/28), as amostras hepáticas em 17,8% (5/18) e a amostra de bile em 3,5% (1/28). As amostras exibiram alta identidade de nucleotídeo com as espécies de HNHP.

Palavras-chave: *Helicobacter*, felinos, infecção, grooming, urease, PCR, histopatologia.

ABSTRACT

EVIDENCE OF *HELICOBACTER SPP.* ON NECROPSIED DOMESTIC CATS FROM MID RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: VICTOR REIS GALINDO
ADVISOR: SAULO TADEU LEMOS PINTO FILHO

Helicobacter spp. are spiral-shaped, gram negative, microaerophilic bacteria that colonizes stomach and intestines of humans and various other animals, such as dogs and cats. *Helicobacter pylori* is the most studied species and its colonization is associated to gastritis, peptic ulcers and gastric carcinoma in humans, however it was already identified on bile from cats. *H. salomonis*, *H. bizzozeronii*, *H. felis* and *H. heilmannii* species are known as Non-*H. pylori* *Helicobacter* (NHPH), and they had highest rates of isolation from gastric mucosa from dogs and cats, nevertheless they were found on human beings also. According to case reports dogs and cats may act as a source of infection to humans, part of it is due to licking habit from these animals as affection demonstration and because of grooming. In this context, this study aims to trace an epidemiologic profile and determine the most prevalent gender of these bacteria in cats from central State of Rio Grande do Sul, correlate the presence of bacteria on stomach, liver and bile with urease rapid test and gastric and hepatic histopathologic changes. Therefore, this study used 30 necropsied cats, samples from gastric body and pyloric antrum were submitted to urease rapid test (URT) to verify bacteria presence or absence, histopathology (stomach and liver) to observe tissue alterations, and PCR (stomach, liver and bile) to *Helicobacter spp.* phylogenetic analysis and genome sequencing. It was found that a total of 60% (18/30) of animals were positive on URT from gastric body, and 50% (15/30) were positive on pyloric antrum. Within 15 patients, 10 were male cats (70%), thus positive results were associated to male gender. It was observed mild histopathologic changes on majority of gastric and hepatic samples. Gastric samples subjected to PCR were positive on 60,7% (17/28), hepatic samples on 17,8% (5/18) and bile samples on 3,5% (1/28). The samples exhibited high nucleotide identity with NHPH species.

Keywords: PCR, phylogenetic, nucleotide, sequencing, *Helicobacter spp.*, cats, liver, stomach, bile, NHPH.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeo do gene 16s do RNA ribossomal de *Helicobacter spp.* Valores acima de 60% foram exibidos. As sequências obtidas nesse estudo estão marcadas com um círculo preto ; n°E ou n°F, número do animal/amostra de estômago ou amostra de fígado 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Associação entre resultados de PCR no estômago e urease no antro pilórico e no corpo gástrico.....	33
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASA	American Society of Anesthesiologists
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
HNHP	<i>Helicobacter spp. não-Helicobacter pylori</i>
HVU	Hospital Veterinário Universitário
LPV	Laboratório de Patologia Veterinária
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido Ribonucleico
SRD	Sem raça definida
TRU	Teste rápido de urease
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
WSAVA	World Small Animal Veterinary Association

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	ARTIGO.....	16
3	CONCLUSÃO.....	26
4	REFERÊNCIAS.....	27
	APÊNDICE A – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CORPO GÁSTRICO (PARTE 1).....	41
	APÊNDICE B – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CORPO GÁSTRICO (PARTE 2).....	42
	APÊNDICE C – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ANTRO PILÓRICO (PARTE 1).....	43
	APÊNDICE D – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ANTRO PILÓRICO (PARTE 2).....	44
	APÊNDICE E – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA HEPÁTICA	45
	APÊNDICE F – RESULTADOS DO TESTE RÁPIDO DE UREASE	46
	APÊNDICE G – RESULTADOS DA PCR PARA <i>HELICOBACTER SPP.</i>	47

1 INTRODUÇÃO

Helicobacter spp. são bactérias espiraladas, gram-negativas, microaerofílicas que colonizam o estômago e intestino de humanos e diversos outros animais, como cães, gatos, furões, porcos, guepardos e macacos (SOUSA et al., 2019; HONG et al., 2016; ROSSI et al., 2014). A *Helicobacter pylori* é a espécie predominante em seres humanos, cuja colonização está associada a diversas desordens clínicas do trato gastrointestinal superior e do trato hepatobiliar (KUBOTA-AIZAWA, et al., 2017; KUSTERS et al., 2006). Da mesma forma, as bactérias do tipo *Helicobacter spp.* não-*Helicobacter pylori* (HNHP) também foram detectadas em estômagos de seres humanos e outros animais acometidos por essas desordens (KUBOTA-AIZAWA, 2017; TABRIZI et al., 2010). Em ambos os casos sua patogenicidade é atribuída a fatores que induzem a proliferação celular e apoptose (MARCASO et al., 2016).

A primeira espécie do gênero *Helicobacter spp.* identificada e nomeada após ser submetida à cultura bacteriana com sucesso foi a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), obtida de humanos acometidos por úlceras pépticas e que realizaram biópsias gástricas (MARSHALL et al., 1984). Em seguida, foi descoberta a bactéria espiralada *Gastrospirillum hominis*, isolada da mucosa gástrica humana com características distintas da *H. pylori* (DENT et al., 1987; MCNULTY et al., 1989). Anos mais tarde foi renomeada como *Helicobacter heilmannii* (*H. heilmannii*) (SOLNICK et al., 1993).

Posteriormente a análises do gene 16S RNAr para estudos filogenéticos, a espécie *H. heilmannii* passou a ter duas subclassificações, tipo 1 e tipo 2 (HAESEBROUCK et al., 2009). O tipo 1 composto apenas pela *H. suis*, isolada do estômago de suínos (O'ROURKE et al., 2004; DE GROOTE et al., 1999), enquanto que o tipo 2 era composto pelas *H. salomonis*, *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. heilmannii s.s.*, *H. baculiformis* e *H. cynogastricus*, obtidas de isolados da mucosa gástrica de cães e gatos (HAESEBROUCK et al., 2009; O'ROURKE et al., 2004). O grande grupo de bactérias incluídas nas subclassificações das *H. heilmannii* tipos 1 e 2 passou a ser denominado como *Helicobacter heilmannii sensu lato* (*H. heilmannii s.l.*) para se referir às espécies de *Helicobacter spp.* não-*H. pylori* (HAESEBROUCK et al., 2011).

Diferentemente da *H. pylori*, as HNHP desenvolvem gastrite em grau discreto em humanos, podendo evoluir para formas mais severas (TABRIZI et al., 2010). Ademais, *Helicobacter spp.* não são identificadas somente no estômago de felinos, mas também já foram detectadas em amostras de fígado, ducto biliar (GREITER-WILKE et al., 2006), pâncreas, duodeno (SJÖDIN et al., 2011), bile (BOOMKENS et al., 2004) e na cavidade oral (TABRIZI et al., 2010). Sendo assim, o contato direto com a saliva, contendo ou não a bile, representa um

fator de risco para a infecção, desta forma, surge a importância zoonótica dessas bactérias (TABRIZI et al., 2015; KUSTERS et al., 2006).

Em seres humanos, no grupo das HNHP, a *Helicobacter suis* (GOJI et al., 2015) e a *Helicobacter heilmannii* (YOSHIMURA et al., 2002) foram associadas com gastrite crônica ativa, gastrite aguda, úlceras gástricas, adenocarcinoma gástrico e linfoma de baixo grau de tecido linfóide associado às mucosas (SOUSA et al., 2019). Além disso, em um estudo recente, constatou-se que dentre as HNHP a espécie mais prevalente na mucosa gástrica de felinos foi a *Helicobacter heilmannii* (SOUSA et al., 2019). Apesar destes achados, todos animais estavam clinicamente saudáveis, sugerindo que as *Helicobacter spp.* gástricas dos animais domésticos causam pouco ou nenhum mal no seu hospedeiro natural, podendo, entretanto, se tornar oportunista ao translocar para o trato hepatobiliar (MENARD et al., 2019; SOUSA et al., 2019).

As espécies de *Helicobacter spp.* que colonizam o trato intestinal e o sistema hepatobiliar são conhecidas como enterohepáticas (TAKEMURA et al., 2019). Em humanos, doenças inflamatórias e neoplásicas do sistema hepatobiliar foram associadas às infecções por *Helicobacter spp.* (TAKEMURA et al., 2019; KARAGIN et al., 2010; XUAN et al., 2006). Em murinos, a infecção por *H. hepaticus* inclui doença inflamatória e neoplasia hepática primária, contribuindo para o desenvolvimento de colelitíase (TAKEMURA et al., 2019; MAURER et al., 2005; ROGERS et al., 2004) Um estudo detectou a presença de DNA de *Helicobacter spp.* em tecidos hepáticos de cães acometidos por cirrose e carcinoma hepatocelular (MARCASSO et al., 2016).

Infecções bacterianas causadas pelas espécies de *Helicobacter* enterohepáticas estão envolvidas na colangiohepatite aguda, podendo-se observar além disso, pancreatite, doença inflamatória intestinal e colestase ocorrendo simultaneamente em gatos acometidos por colangite supurativa e não-supurativa (GREITER-WILKE et al., 2006). Associando isso ao fato de que nos gatos os ductos pancreático e biliar se unem antes de entrar no duodeno a colonização bacteriana ascendente pelo trato digestivo pode ser facilitada (SJÖDIN et al., 2011). Além disso, em um estudo foram detectados fragmentos de DNA específicos de *H. pylori* por PCR na bile de gatos diagnosticados com colangite linfocítica e saudáveis (BOOMKENS et al., 2004).

Nos felinos o complexo colangite colangiohepatite é uma das desordens inflamatórias mais comuns que acometem o trato hepatobiliar, sendo classificada de acordo com a Associação Mundial de Veterinários de Pequenos Animais (WSAVA) em supurativa ou neutrofílica e não supurativa ou linfocítica, refletindo a proporção celular de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos;

o grau de hiperplasia de ducto biliar; e fibrose (GREITER-WILKE et al., 2006; WATSON et al., 2014).

Atualmente o diagnóstico padrão ouro para infecção por *H. pylori* é a biópsia via endoscopia do tecido gástrico para o teste rápido de uréase, histologia e cultura. No entanto, estes processos invasivos envolvem riscos anestésicos e desconforto ao paciente (HONG et al., 2016; HOSHINA et al., 1990). Por outro lado, a análise histopatológica tem sido empregada por diversos autores em animais submetidos à necropsia para detectar a presença de *Helicobacter spp.* e observar as alterações de tecido hepático e gástrico (TAKEMURA et al., 2019; SOUSA et al., 2019; KUBOTA-AIZAWA et al., 2017; MARCASSO et al., 2016; SASANI et al., 2014; ARAUJO et al., 2010; GREITER-WILKE et al., 2006; HWANG et al., 2002). Além disso, a PCR é um método específico para distinguir entre as espécies de *Helicobacter spp.* Também é sensível para o diagnóstico de *H. pylori* em humanos e gatos (HONG et al., 2016; KIM et al., 2012; MAPSTONE et al., 1993).

Determinados animais domésticos apresentam-se assintomáticos para a infecção com *Helicobacter spp.*, entretanto, a sintomatologia pode incluir vômitos crônicos (contendo muco, fluídos gástricos ou bile), perda de peso, diarreia, anorexia e em alguns casos emaciação severa e anemia (FOX et al., 2012; KUSTERS et al., 2006).

Embora a *H. pylori* seja sensível a uma ampla variedade de antibióticos in vitro, estes medicamentos falham quando realizada a monoterapia in vivo (KUSTERS et al., 2006; MEGRAUD et al., 1995). A terapia dupla combinando inibidores da bomba de prótons e amoxicilina ainda é utilizada em alguns países, porém atualmente essas terapias foram substituídas pela terapia tripla. Esta combina dois antibióticos, principalmente metronidazol e alguns macrolídeos, com compostos de bismuto ou inibidores da bomba de prótons (KUSTERS et al., 2006; LAMBERT et al., 1997; ARMSTRONG et al., 1987).

A patogenia da *Helicobacter spp.* é um assunto extensamente estudado porque além de causar doença gastrointestinal e enterohepática tanto em grau leve quanto mais grave em seres humanos, também é responsável por desenvolver quadros semelhantes em diversas espécies de animais.

Os diversos relatos sobre as infecções por HNHP em humanos apontam para a possibilidade de que animais, especialmente cães e gatos, podem servir como uma fonte para a infecção em humanos (HWANG et al., 2002; RECORDATI et al., 2007; STOLTE et al., 1994; THOMSON et al., 1994). Além disso, segundo o Instituto Pet Brasil, desde o ano de 2013 até 2018 a estimativa total de animais de estimação subiu de 132,4 milhões para 139,3 milhões. E

o destaque vai para o crescimento de casas que escolhem o gato como animal de estimação, acumulando crescimento de 8,1% desde 2013 (INSTITUTO PET BRASIL, 2019).

Ademais, a lambedura de ambas espécies nos seres humanos é uma forma de interação social, seja para demonstração de afeto ou para o *grooming* (RODAN et al., 2012). Por outro lado, a presença de *Helicobacter spp.* já foi demonstrada na saliva de cães e gatos (TABRIZI et al., 2010; RECORDATI et al., 2007). Portanto, o cenário se torna progressivamente suscetível para que o aspecto zoonótico da doença se desenvolva.

Sendo assim, faz-se necessário ampliar o conhecimento atual de como esta doença se desenvolve, em quais regiões do corpo são mais acometidas, quais alterações identificadas nos órgãos estudados, quais espécies de *Helicobacter spp.* são observadas e quais cepas são mais prevalentes nos felinos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a presença das *Helicobacter spp.* através de testes rápidos de urease, análises moleculares e identificar os principais grupos filogenéticos encontrados em gatos domésticos submetidos à necropsia na região central do Estado do Rio Grande do Sul.

2 ARTIGO

**Evidência de *Helicobacter spp.* em gatos domésticos necropsiados na região central do
Rio Grande do Sul.**

Victor Reis Galindo, Rafael Almeida Figuera, Juliana Felipetto Cargnelutti, Angela Isabel dos Santos Dullius, Lícia Flávia Silva Herculano, Renata Dalcol Mazaro, Douglas Miotto Lorensetti, Carollina Mariga, Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho.

(Artigo submetido para a revista Ciência Rural)

ISSN Eletrônico: 1678-4596

1 **Evidence of *Helicobacter spp.* on necropsied domestic cats from central region of**
2 **Rio Grande do Sul**

3 **Evidência de *Helicobacter spp.* em gatos domésticos necropsiados na região central**
4 **do Rio Grande do Sul**

5 **Victor Reis Galindo¹, Rafael Almeida Fighera², Juliana Felipetto Cargnelutti³,**
6 **Angela Isabel dos Santos Dullius⁴, Lícia Flávia Silva Herculano¹, Renata Dalcol**
7 **Mazaro², Douglas Miotto Lorensetti², Carollina Mariga¹, Saulo Tadeu Lemos**
8 **Pinto Filho⁵**

9 **ABSTRACT**

10 This study investigated the evidence of *Helicobacter spp.* in necropsied cats from central
11 region of Rio Grande do Sul. Therefore, it was used 30 necropsied cats, which samples
12 from stomach, liver and bile were submitted to urease rapid test (URT) (only gastric body
13 and piloric antrum), histopathologic analysis (gastric body and pyloric antrum), PCR and
14 nucleotide sequencing (gastric body and pyloric antrum pool samples; hepatic and bile)
15 to demonstrate presence of genetic material and identify the main phylogenetic group of
16 *Helicobacter spp.* It was found a total of 60% (18/30) of animals were positive on URT
17 from gastric body, and 50% (15/30) were positive on pyloric antrum. Within 15 patients,
18 10 were male cats (70%), thus positive results were associated to male gender. It was
19 observed mild histopathologic changes on majority of gastric and hepatic samples.
20 Gastric samples subjected to PCR were positive on 60,7% (17/28), hepatic samples

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Hospital Veterinário Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: victorgalindo91@hotmail.com Autor para correspondência.

² Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Patologia, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Universidade Federal de Santa Maria, Professora Associada do Departamento de Estatística, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

⁵ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento da Clínica de Pequenos Animais, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

1 on 17,8% (5/18) and bile samples on 3,5% (1/28). The samples exhibited high nucleotide
2 identity with NHPH species. This study demonstrated similar results found by several
3 researchers and provides epidemiological data that can be used as reference to this State.

4 **Key words:** PCR, phylogenetic, nucleotide, sequencing, *Helicobacter spp.*, cats, liver,
5 stomach, bile, NHPH.

6 **RESUMO**

7 Este estudo investigou a evidência de *Helicobacter spp.* em gatos domésticos
8 necropsiados na região central do Rio Grande do Sul. Para tanto, foram utilizados 30
9 gatos necropsiados, cujas amostras de estômago, fígado e bile foram submetidas ao teste
10 rápido de urease (TRU) (apenas corpo gástrico e antro pilórico), análise histopatológica
11 (gástrica do corpo e antro e hepática), PCR e sequenciamento de nucleotídeos (pool das
12 amostras do corpo gástrico e antro pilórico; hepático e da bile) para demonstrar a presença
13 de material genético e identificar o principal grupo filogenético de *Helicobacter spp.*
14 Encontramos que no TRU 60% (18/30) dos pacientes foram positivos no corpo gástrico
15 e que 50% (15/30) foram positivos no antro pilórico. Destes 15 pacientes, 10 eram machos
16 (70%), sendo o resultado positivo no antro pilórico associado ao sexo masculino. Foram
17 observadas alterações histopatológicas discretas na maioria das amostras gástricas e
18 hepáticas. As amostras gástricas submetidas ao PCR foram positivas em 60,7% (17/28),
19 as amostras hepáticas em 17,8% (5/18) e a amostra de bile em 3,5% (1/28). As amostras
20 exibiram alta identidade de nucleotídeo com as espécies de HNHP. Esse estudo
21 apresentou resultados similares aos encontrados por diversos pesquisadores e fornece
22 dados epidemiológicos de referência para este Estado.

23 **Palavras-chave:** PCR, filogenética, nucleotídeos, sequenciamento, *Helicobacter spp.*,
24 gatos, fígado, estômago, bile, HNHP.

25 **INTRODUÇÃO**

1 As *Helicobacter spp.* são bactérias espiraladas, gram-negativas e microaerofílicas
2 responsáveis pela colonização do estômago e intestino delgado de diversas espécies, tais
3 como cães, gatos, furões, porcos, guepardos e macacos (SOUSA et al., 2019; HONG et
4 al., 2016; ROSSI et al., 2014). A *Helicobacter pylori* é a bactéria predominante em seres
5 humanos sendo responsáveis pela manifestação de distúrbios do trato intestinal superior
6 e do trato hepatobiliar (KUBOTA-AIZAWA, et al., 2017; KUSTERS et al., 2006). A *H.*
7 *pylori* foi a primeira espécie identificada e nomeada após cultura bacteriana obtida através
8 de biópsias de humanos acometidos de úlceras pépticas submetidos à endoscopia
9 (MARSHALL, et al., 1984). Em seguida a bactéria *Gastrospirillum hominis* foi
10 descoberta apresentando características diferentes da *H. pylori* (DENT et al., 1987;
11 MCNULTY et al., 1989) sendo renomeada posteriormente como *Helicobacter heilmannii*
12 (SOLNICK et al., 1993).

13 Após estudos de sequenciamento do gene 16s do RNA ribossomal (RNAr)
14 verificou-se que a *Helicobacter heilmannii* pertencem a uma ampla variedade de bactérias
15 isoladas de animais domésticos e silvestres, tais como *H. salomonis*, *H. bizzozeronii*, *H.*
16 *felis*, *H. heilmannii s.s. (strictu sensu)*, *H. baculiformis* e *H. cynogastricus*
17 (HAESEBROUCK et al., 2009; O'ROURKE et al., 2004). Estas bactérias foram
18 posteriormente referidas como *Helicobacter não-Helicobacter pylori* ou HNHP
19 (HAESEBROUCK et al., 2009).

20 As HNHPs, por sua vez, são responsáveis por causar gastrite moderada em seres
21 humanos que pode evoluir para formas mais severas, como úlceras gástricas,
22 adenocarcinomas gástricos e linfoma de baixo grau de tecido linfóide associado às
23 mucosas (SOUSA et al., 2019; TABRIZI et al., 2010). Já em felinos, a *Helicobacter*
24 *heilmannii* é a bactéria mais prevalente, causa pouco ou nenhum mal ao hospedeiro
25 (MÉNARD et al., 2019; SOUSA et al., 2019) e já foi identificada em amostras de

1 estômago, fígado, ducto biliar (GREITER-WILKE et al., 2006), pâncreas, duodeno
2 (SJÖDIN et al., 2011), fezes (HONG et al., 2016), cavidade oral (TABRIZI et al., 2010)
3 e até mesmo na bile (BOOMKENS et al., 2004).

4 De acordo com o Instituto Pet Brasil, desde o ano de 2013 até 2018 os felinos
5 apresentaram destaque como os animais domésticos mais escolhidos para ter numa
6 residência quando comparado com outras espécies (INSTITUTO PET BRASIL, 2019).
7 Além disso, a lambedura de gatos em humanos é uma forma de interação social, seja para
8 demonstração de afeto ou para o *grooming* (RODAN et al., 2012) Em contrapartida, a
9 presença de *Helicobacter spp.* já foi demonstrada, inclusive, na saliva de cães e gatos
10 (TABRIZI et al., 2010; RECORDATI et al., 2007) e é sabido que o contato direto com a
11 saliva contendo ou não a bile representa um fator de risco para infecção (TABRIZI et al.,
12 2015; KUSTERS et al., 2006). Portanto, essa sucessão de fatores torna o cenário
13 progressivamente favorável para que o aspecto zoonótico desta doença se manifeste.

14 Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a presença das *Helicobacter*
15 *spp.* através de testes rápidos de urease, análise histopatológica, análises moleculares e
16 identificar os principais grupos filogenéticos encontrados em gatos domésticos
17 submetidos à necropsia na região central do Estado do Rio Grande do Sul.

18 MATERIAL E MÉTODOS

19 *Animais*

20 Foram utilizados neste estudo 30 gatos, sendo 16 machos e 14 fêmeas, 2 da raça
21 persa e 28 SRD e de diferentes idades oriundos da cidade de Santa Maria. Os animais
22 foram encaminhados sob solicitação do médico veterinário responsável ou diretamente
23 pelos tutores para a realização da necropsia no Laboratório de Patologia do Hospital
24 Veterinário Universitário (LPV/UFSM), de modo que nem sempre o histórico e exames
25 auxiliares estavam disponíveis.

1 *Teste rápido para urease (TRU)*

2 Para o TRU foi utilizado o kit Uretest® (RenyLab, Barbacena, Brasil). Após
3 coletadas duas amostras gástricas (uma amostra do corpo e uma amostra do antro pilórico,
4 ambas de aproximadamente 5x5x5mm e incluindo desde a camada serosa até a mucosa),
5 estas foram depositadas no interior de um tubo do teste, de forma asséptica e avaliado o
6 tempo de viragem (mudança de coloração) do indicador. Conforme a orientação do
7 fabricante, quando a coloração amarela do kit tornasse rosa em qualquer tonalidade dentro
8 de 60 minutos, as amostras eram consideradas positivas.

9 *Análises histopatológicas*

10 Imediatamente após a coleta, os fragmentos gástricos (corpo gástrico e antro
11 pilórico com cerca de 5x5x5mm incluindo todo o órgão) e hepáticos (próximo de
12 5x5x5m) foram acondicionados em seringas de 5ml com solução de formol 10%,
13 encaminhados para análise histopatológica e seu processamento foi executado conforme
14 as técnicas de Prachasilpchai et al. (2007) e Robić et al. (2007).

15 Para a avaliação da intensidade inflamatória da mucosa gástrica das lâminas de
16 cada amostra, foram atribuídos escores inerentes ao grau de comprometimento estrutural
17 e infiltração inflamatória do epitélio e lâmina própria da mucosa gástrica das regiões do
18 corpo e antro pilórico, conforme o consenso elaborado por Day et al., (2008).

19 De forma semelhante, foram estabelecidos escores das alterações estruturais
20 hepáticas considerando o tipo e o grau do infiltrado portal, grau de proliferação de ductos
21 biliares e o grau de fibrose, ambas foram baseadas nos estudos de Gagne et al. (1996).

22 *Extração de DNA e PCR*

23 As amostras gástricas das regiões de corpo, antro pilórico e hepáticas
24 (selecionadas igualmente às avaliações anteriores) e bile foram e armazenadas a
25 temperatura de -28°C em tubos de eppendorf de 3ml preenchidos com solução fisiológica

1 0,9% imediatamente após a coleta. O material de DNA foi extraído de cada amostra
2 conforme a metodologia de Germani et al. (1997), com a utilização do DNeasy Blood and
3 Tissue Kit (Qiagen, Alemanha) e submetido ao teste de PCR que, por sua vez, utilizou os
4 seguintes primers de oligonucleotídeos (F-5'- AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG
5 CTA-3'; R-5'- GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T-3'), os quais amplificaram
6 um fragmento de 399 pares de base do gene 16s rRNA da *Helicobacter spp.*

7 Em todas amplificações o controle positivo foi obtido das amostras gástricas e
8 hepáticas e bile de um gato sabidamente positivo para *Helicobacter sp.* e os controles
9 negativos eram água ultrapura.

10 *Sequenciamento e análise filogenética*

11 Os produtos da amplificação da PCR foram submetidos em duplicatas para o
12 sequenciamento de nucleotídeos através do método Sanger fazendo uso do equipamento
13 Prism 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, California, USA). A ordem consenso
14 do programa Staden Package foi utilizada para iniciar a sequência de nucleotídeos
15 (STADEN et al., 1996). As análises filogenéticas utilizaram a ordem consenso para cada
16 uma das amostras amplificadas e das sequências de nucleotídeos de *Helicobacter sp.*
17 obtidas do banco de dados GenBank. As sequências foram editadas e alinhadas utilizando
18 o software BioEdit Alignment Editor suíte, versão 7.0.5.3 (HALL et al., 1999). A árvore
19 filogenética foi construída através do software MEGA X (KUMAR et al., 2018).

20 *Análise estatística*

21 Foram realizados os cálculos das frequências absolutas e relativas para as
22 variáveis qualitativas (urease, histopatologia e PCR) e para a análise de associação o teste
23 exato de Fischer. O nível de significância foi de 5% e o software utilizado foi o SPSS
24 v.18.0.

25 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

1 Dos 30 gatos avaliados foram três (10%) filhotes até um ano, 10 gatos jovens de
2 um até cinco anos (33,3%), 6 adultos de 5 até 7 anos (20%) e 11 idosos a partir de 7 anos
3 (36,7%). Os animais que tiveram resultado positivo no TRU para amostras de corpo
4 representaram 66% (2/3) dos filhotes, 70% (7/10) dos gatos jovens, 50% (3/6) dos adultos
5 e 54,5% (6/11) dos idosos. Por outro lado, os animais positivos para urease nas amostras
6 de antro pilórico foram diferentes apenas nos gatos jovens 40% (4/10) e nos adultos 50%
7 (3/6).

8 Os pacientes que foram positivos para urease no corpo gástrico representaram
9 60% (18/30) dos casos. Por outro lado, na análise histopatológica do corpo gástrico
10 destes, 50% (9/18) não apresentaram lesão em epitélio superficial; 61,1% (11/18)
11 exibiram normalidade na fossa gástrica; 83,3% (15/18) não apresentaram linfócitos
12 intraepiteliais e linfócitos e plasmócitos da lâmina própria. Além disso, apesar de
13 positivos para urease nenhum paciente exibiu atrofia da mucosa, eosinófilos e neutrófilos
14 na lâmina própria e hiperplasia linfóide folicular. A não observação dessas populações
15 celulares se deve supostamente à ausência do epitélio superficial pela autólise identificada
16 em 63,3% (19/30) de ambas amostras gástricas do estudo.

17 No que diz respeito às análises das amostras de antro pilórico, 50% dos pacientes
18 (15/30) positivaram para o teste de urease e destes, 60% (9/15) não exibiram lesão em
19 epitélio do antro pilórico; em 87% (13/15) não foram detectados linfócitos intraepiteliais;
20 80% (12/15) não demonstraram linfócitos e plasmócitos na lâmina própria; e 87% (13/15)
21 não apresentaram hiperplasia linfóide folicular. Não foram observados eosinófilos e
22 neutrófilos na lâmina própria. Entretanto, dos 15 animais positivos 10 eram machos
23 (70%), sendo assim, o resultado positivo no antro está associado ao sexo masculino
24 ($p=0,033$).

1 Não foi possível observar algumas alterações das populações celulares nas
2 amostras do corpo gástrico e do antro pilórico por conta autólise identificada nas amostras
3 deste estudo, pois é sabido que essa região é bastante sensível e é uma das primeiras a
4 sofrer com a autólise, comprometendo assim, a avaliação das subpopulações leucocitárias
5 que fazem parte da região superficial da mucosa gástrica (DAY et al., 2008). Em um
6 ambiente controlado, se estas amostras fossem coletadas *in vivo* provavelmente seriam
7 visualizadas mais alterações histopatológicas.

8 Com relação às análises hepáticas, 73,3% (11/15) dos pacientes positivos no teste
9 de urease no antro pilórico apresentaram 5-10 células inflamatórias no espaço porta
10 (alteração discreta), avaliação referente à quantificação da severidade dos infiltrados
11 inflamatórios em áreas portais; 60% (9/15) apresentaram 2 ductulos por espaço-porta
12 (alteração discreta) na avaliação da proliferação de ducto biliares; e 53% (8/15) não
13 exibiram fibrose portal. No que diz respeito aos que positivaram para urease no corpo
14 gástrico, 66,6% (12/18) apresentaram 5-10 células inflamatórias no espaço porta
15 (alteração discreta) 55,56% (10/18) apresentaram 2 ductulos por espaço-porta (alteração
16 discreta); e 50% (9/18) demonstraram ausência de fibrose portal.

17 Além disso, o tipo de infiltrado com a maior prevalência foi o linfoplasmocítico
18 com 76,6% (n=23), esta prevalência foi semelhante aos achados de Gagne et al. (1996),
19 em que dos 45 gatos avaliados com doenças hepáticas inflamatórias, 27 apresentaram o
20 infiltrado linfoplasmocítico. Ainda sobre esse autor, as alterações inflamatórias se
21 restringiram ao espaço porta, achado semelhante ao nosso estudo. Entretanto, a diferença
22 foi observada na proliferação de ducto biliar que foi evidente e severa em 96,2% (26/27)
23 dos gatos e em 85,1% (23/27) dos pacientes que exibiram fibrose portal.

24 Considerando que se uma amostra de corpo gástrico e ou do antro pilórico reagisse
25 no teste de urease bastaria para o animal ser positivo, obtivemos um total de 66,6%

1 (20/30) dos pacientes. Este resultado foi inferior ao encontrado em felinos da Suíça que
2 exibiram 78% (45/58) dos casos positivos (NEIGER et al., 1998); ao felinos dos Estados
3 Unidos que demonstraram 86% de positivos (47/55) (OTTO et al., 1994); aos felinos de
4 Niterói-RJ que exibiram positividade nos testes de urease em 78,5% (44/56) dos casos
5 (ARAUJO et al., 2010); e aos cães do Rio Grande do Sul (GUERRA SEGUNDO et al.,
6 2021) em que 88,5% (31/35) dos cães estudados apresentaram amostras gástricas
7 positivas no teste de urease.

8 As amostras de gástricas submetidas às análises de PCR replicaram material de
9 *Helicobacter spp.* em 60,7% (17/28) dos casos. Estes achados estão de acordo com a
10 prevalência encontradas em estudos variando entre 40-100% dos gatos
11 (PAPASOULIOTIS et al., 1997). Entretanto, esse resultado foi inferior ao encontrado em
12 amostras gástricas de cães de Londrina-PR com 90,9% (30/33) das amostras
13 (TAKEMURA et al., 2019). Um estudo com 8 pacientes humanos não acometidos por
14 gastrite, 100% destes demonstraram resultados positivos para PCR (MAPSTONE et al.,
15 1993). Em nosso estudo, 14,2% (4/28) dos casos positivos gástricos também foi
16 identificado material genético em tecido hepático.

17 Por outro lado, neste estudo 17,8% (5/28) dos casos apresentaram positividade na
18 PCR para as amostras hepáticas. Esse resultado foi inferior ao observado em amostras
19 hepáticas coletadas de um grupo de seres humanos acometidos por carcinoma
20 hepatocelular, e outro grupo acometido outras doenças hepáticas, carcinoma colônico e
21 mioma uterino; cada grupo exibiu um 60.7% e 72% dos casos, respectivamente (XUAN
22 et al., 2006).

23 Em 3,5% (1/28) foi encontrado material genético na amostra de bile e nesse
24 mesmo paciente a amostra gástrica também positivou, porém, teve resultado negativo de
25 PCR na amostra hepática. Este fato exemplifica a teoria de infecção via ascendente do

1 duodeno para o ducto biliar e posteriormente à bile (MÉNARD et al., 2019). Além disso,
2 a banda de material genético dessa amostra de bile teve uma marcação fraca na PCR,
3 tornando inviável o sequenciamento genético. Em contraste com os cães avaliados em
4 Londrina-PR, este achado foi diferente do estudo em que nenhuma amostra de bile
5 replicou (TAKEMURA et al., 2019).

6 Verificou-se associação significativa das variáveis qualitativas entre o teste do
7 PCR e da urease no antro pilórico de 0,001, com significância de 5% (Tabela 1). De forma
8 semelhante, foi demonstrada associação significativa entre o teste do PCR e da urease no
9 corpo gástrico de 0,014 (Tabela 2).

10 A identidade de nucleotídeos entre as sequências obtidas variou de 97,89% a
11 100%. Da mesma forma, a identidade foi alta quando comparada com as sequências de
12 *H. heilmannii* (HE984298.2; 98,97% a 99,23%), *H. bizzozeronii* (FR871757.1; 98,39% a
13 99,73%), *H. felis* (AY686607.1; 98,71% a 99,47%) e *H. salomonis* (NR_026065.1;
14 99,47% a 99,73%). A identidade dos nucleotídeos variou de 91,9% a 93,48% quando
15 comparados com a sequência das amostras de *H. pylori* (AY155586) (Figura 1).

16 A análise filogenética não determinou as espécies de *Helicobacter* detectadas nas
17 amostras individualmente. No entanto, baseado na proximidade das amostras deste estudo
18 com as cepas de *Helicobacter*, foi possível determinar nossas amostras como pertencentes
19 ao grupo filogenético Grupo Gástrico 1: Subgrupo 1B. Portanto, não apresentam relação
20 direta ao grupo da *Helicobacter pylori*, apenas proximidade evolucionária e similaridades
21 genômicas.

22 **CONCLUSÃO**

23 Os resultados deste estudo demonstram uma alta ocorrência de *Helicobacter spp.*
24 no TRU e PCR nas amostras gástricas analisadas. Concluímos que o resultado positivo
25 no TRU do antro pilórico está associado ao sexo masculino. Foram observadas alterações

1 histopatológicas discretas na maioria das amostras gástricas e hepáticas e foi possível
2 definir qualitativamente as alterações mais comuns. As amostras hepáticas e biliares
3 positivas no teste de PCR foram inferiores às observadas em diversos estudos, porém
4 ocorrem. A análise filogenética determinou alta proximidade com as HNHP pertencentes
5 ao Grupo Gástrico: Subgrupo 1B, que são espécies que possuem uma relação de
6 proximidade evolucionária e similaridades genômicas com a *H. pylori*.

7 **AGRADECIMENTOS**

8 Este estudo foi financiado pelas agências federais brasileiras “Coordenação de
9 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) – código financeiro 001, e pelo
10 “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq).

11 **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE**

12 Os autores declaram que não houve conflitos de interesse.

13 **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

14 Todos os autores contribuíram igualmente.

15 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

16 ARAUJO, I. C. et al. Helicobacter species detection and histopathological changes in
17 stray cats from Niterói, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, jun. 2010. v.
18 12, n. 6, p. 509–511. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2010.01.008>>.

19 BOOMKENS, S. Detection of Helicobacter pylori in bile of cats. **FEMS Immunology**
20 **and Medical Microbiology**, nov. 2004. v. 42, n. 3, p. 307–311. Disponível em:
21 <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1016/j.femsim.2004.06.002>>.

22 DAY, M. J. et al. Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal
23 Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the
24 World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group.

- 1 **Journal of Comparative Pathology**, fev. 2008. v. 138, n. SUPPL. 1, p. S1–S43.
2 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997508000066>>.
- 3 DENT, J. C. et al. Spiral organisms in the gastric antrum. **The Lancet**, v.2, p. 96, 1987.
4 Disponível em: <DOI: 10.1016/s0140-6736(87)92754-1>.
- 5 GAGNE, J. M.; WEISS, D. J.; ARMSTRONG, P. J. Histopathologic Evaluation of Feline
6 Inflammatory Liver Disease. **Veterinary Pathology**, 26 set. 1996. v. 33, n. 5, p. 521–
7 526. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/030098589603300506>>.
- 8 GERMANI, Y. et al. Strategy for the detection of Helicobacter species by amplification
9 of 16S rRNA genes and identification of H. felis in a human gastric biopsy. **Research in**
10 **Microbiology**. v. 148, p. 315–326, 1997. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0923-
11 2508(97)81587-2>.
- 12 GREITER-WILKE, A. et al. Association of Helicobacter with cholangiohepatitis in cats.
13 **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2006. v. 20, n. 4, p. 822–827. Disponível em:
14 <DOI: 10.1892/0891-6640(2006)20[822:aohwci]2.0.co;2>.
- 15 GUERRA SEGUNDO, D. D. et al. Evidence of Helicobacter spp. in Saliva and Gastric
16 Mucosa of Domestic Dogs in the Central Region of Rio Grande do Sul, Brazil.
17 **Veterinary Medicine International**, 28 jan. 2021. v. 2021, p. 1–11. Disponível em:
18 <<https://www.hindawi.com/journals/vmi/2021/8857231/>>.
- 19 HAESEBROUCK, F. et al. Gastric Helicobacters in Domestic Animals and Nonhuman
20 Primates and Their Significance for Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, abr.
21 2009. v. 22, n. 2, p. 202–223. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/22/2/202>>.

- 1 HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
2 analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 1999, v. 41,
3 p. 95–99. Disponível em: <10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29>.
- 4 HONG, S. et al. Detection of *Helicobacter felis* in a cat with gastric disease in laboratory
5 animal facility. **Laboratory Animal Research**, 2016. v. 32, n. 2, p. 122. Disponível em:
6 <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5625/lar.2016.32.2.122>>.
- 7 INSTITUTO Pet Brasil: banco de dados. Disponível em:
8 [http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-](http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/)
9 [estimacao-no-brasil/](http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/)>. Acesso em: 17 Agosto 2020.
- 10 KUBOTA-AIZAWA, S. et al. Epidemiological study on feline gastric *Helicobacter* spp.
11 in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, 2017. v. 79, n. 5, p. 876–880.
12 Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/79/5/79_16-0567/_article>.
- 13 KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across
14 Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 1 jun. 2018. v. 35, n. 6, p.
15 1547–1549. Disponível em:
16 <<https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887>>.
- 17 KUSTERS, J. G.; VLIET, A. H. M. VAN; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter*
18 *pylori* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, jul. 2006. v. 19, n. 3, p. 449–490.
19 Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/19/3/449>>.
- 20 MAPSTONE, N. P. et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and
21 stomachs of patients with gastritis using PCR. **Journal of Clinical Pathology**, 1 jun.
22 1993. v. 46, n. 6, p. 540–543. Disponível em:
23 <<http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.46.6.540>>.

- 1 MARSHALL, B.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients
2 with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, jun. 1984. v. 323, n. 8390, p. 1311–
3 1315. Disponível em:
4 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673684918166>>.
- 5 McNULTY, C. A. et al. New spiral bacterium in the gastric mucosa. **Journal of Clinical**
6 **Pathology**, 2 fev. 1989. v. 42, n. 6, p.585–592. Disponível em:
7 <<http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.43.3.262-b>>.
- 8 MÉNARD, A.; SMET, A. Review: Other Helicobacter species. **Helicobacter**, 4 set.
9 2019. v. 24, n. S1, p. 1–8. Disponível em:
10 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/hel.12645>>.
- 11 NEIGER, R. et al. Detection and prevalence of Helicobacter infection in pet cats. **Journal**
12 **of clinical microbiology**, mar. 1998. v. 36, n. 3, p. 634–7. Disponível em:
13 <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.36.3.634-637.1998>>.
- 14 O'ROURKE, J. L. et al. Description of 'Candidatus Helicobacter heilmannii' based on
15 DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. **International Journal of**
16 **Systematic and Evolutionary Microbiology**, 1 nov. 2004. v. 54, n. 6, p. 2203–2211.
17 Disponível em:
18 <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijjs.0.63117-0>>.
- 19 OTTO, G. et al. Animal and public health implications of gastric colonization of cats by
20 Helicobacter-like organisms. **Journal of clinical microbiology**, abr. 1994. v. 32, n. 4, p.
21 1043–9. Disponível em: <[https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.32.4.1043-](https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.32.4.1043-1049.1994)
22 1049.1994>.

- 1 PAPASOULIOTIS, K. et al. Short Communications Occurrence of ‘gastric Helicobacter-
2 like organisms’ in cats. **Veterinary Record**, 1997. n. 1958, p. 1993–1995. Disponível
3 em: <doi: 10.1136/vr.140.14.369>.
- 4 PRACHASILPCHAI, W. et al. Diagnosis of Helicobacter spp. infection in canine
5 stomach. **Journal of Veterinary Science**, 2007. v. 8, n. 2, p. 139. Disponível em:
6 <<https://vetsci.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2007.8.2.139>>.
- 7 RECORDATI, C. et al. Detection of Helicobacter spp. DNA in the oral cavity of dogs.
8 **Veterinary Microbiology**, 2007. v. 119, n. 2–4, p. 346–351. Disponível em:
9 <DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.08.029>.
- 10 ROBIĆ, M. et al. Histopathological changes in stomachs of dogs with naturally acquired
11 Helicobacter infection. **Veterinarski Arhiv**, 2007. v. 77, n. 2, p. 103–111. Disponível
12 em: <<http://wwi.vef.hr/vetarhiv/papers/2007-77-2-2.pdf>>.
- 13 RODAN, I. Understanding the Cat and Feline-Friendly Handling. In: LITTLE, S.E. **The**
14 **cat: clinical medicine and management**. 1st. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012.
15 Chap. 1, p. 2-19.
- 16 ROSSI, G. et al. Severe Gastritis with Double Helicobacter spp. Infection Associated with
17 Barrett’s Esophagus in a Cheetah. **Helicobacter**, dez. 2014. v. 19, n. 6, p. 462–464.
18 Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/hel.12151>>.
- 19 SJÖDIN, S.; TROWALD-WIGH, G.; FREDRIKSSON, M. Identification of Helicobacter
20 DNA in feline pancreas, liver, stomach, and duodenum: Comparison between findings in
21 fresh and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. **Research in Veterinary**
22 **Science**, dez. 2011. v. 91, n. 3, p. e28–e30. Disponível em:
23 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528811000464>>.
- 24 SOLNICK, J. V. et al. An Uncultured Gastric Spiral Organism Is a Newly Identified
25 Helicobacter in Humans. **Journal of Infectious Diseases**, 1 ago. 1993. v. 168, n. 2, p.

1 379–385. Disponível em: <[https://academic.oup.com/jid/article-](https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/168.2.379)
2 [lookup/doi/10.1093/infdis/168.2.379](https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/168.2.379)>.

3 SOUSA, D. A. De et al. Epidermal growth factor receptor 2 immunoexpression in gastric
4 cells of domestic cats with *H. heilmannii* infection. **Acta Histochemica**, 2019. v. 121, n.
5 4, p. 413–418. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.03.004>>.

6 SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS
7 Inc.

8 STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular biotechnology**, jun.
9 1996. v. 5, n. 3, p. 233–41. Disponível em:
10 <<http://link.springer.com/10.1007/BF02900361>>.

11 TABRIZI, A. S. et al. Identification of *Helicobacter* spp. in oral secretions vs. gastric
12 mucosa of stray cats. **Veterinary microbiology**, 6 jan. 2010. v. 140, n. 1–2, p. 142–6.
13 Disponível em: <[doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.019](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.019)>.

14 TABRIZI, A. S. et al. Identification of *Helicobacter* spp. in gastrointestinal tract, pancreas
15 and hepatobiliary system of stray cats. **Iranian Journal of Veterinary Research**, 2015.
16 v. 16, n. 4, p. 374–376. Disponível em:
17 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782678/>>.

18 TAKEMURA, L. S. et al. *Helicobacter* infection in the hepatobiliary system and hepatic
19 lesions: a possible association in dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, 5 jan. 2019.
20 v. 50, n. 1, p. 297–305. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/s42770-018-](http://link.springer.com/10.1007/s42770-018-0003-8)
21 [0003-8](http://link.springer.com/10.1007/s42770-018-0003-8)>.

22 XUAN, S.-Y. *Helicobacter* infection in hepatocellular carcinoma tissue. **World Journal**
23 **of Gastroenterology**, 2006. v. 12, n. 15, p. 2335. Disponível em:
24 <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v12/i15/2335.htm>>.

1 Tabela 1- Associação entre resultados de PCR no estômago e urease no antro pilórico* e
 2 corpo gástrico.**

PCR	Urease			Antro		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	13 (76,5%)	4 (23,5%)	17 (100%)	13 (76,5%)	4 (23,5%)	17 (100%)
Negativo	1 (9,1%)	10 (90,9%)	11 (100%)	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11 (100%)
Total	14 (50%)	14 (50%)	28 (100%)	16 (57,1%)	12 (42,9%)	28 (100%)

3

4 *Valor do teste exato de Fischer $p=0,001$ (significância de 5%). Sentido de leitura
 5 horizontal.

6 **Valor do teste exato de Fischer $p=0,014$ (significância de 5%). Sentido de leitura
 7 horizontal.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18



1

2 Figura 1 – Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeo do gene 16S do RNA
 3 ribossomal de *Helicobacter spp.* Valores acima de 60% foram exibidos. As sequências
 4 obtidas nesse estudo estão marcadas com um círculo preto; n°E ou n°F, número do
 5 animal/amostra de estômago ou amostra de fígado.

3. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram uma alta ocorrência de *Helicobacter spp.* no TRU e PCR nas amostras gástricas analisadas. Concluimos que o resultado positivo no TRU do antro pilórico está associado ao sexo masculino. Foram observadas alterações histopatológicas discretas na maioria das amostras gástricas e hepáticas e foi possível definir qualitativamente as alterações mais comuns. As amostras hepáticas e biliares positivas no teste de PCR foram inferiores às observadas em diversos estudos, porém ocorrem. A análise filogenética determinou alta proximidade com as HNHP, que são espécies que possuem uma relação de proximidade evolucionária e similaridades genômicas com a *H. pylori*.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, I. C. et al. Helicobacter species detection and histopathological changes in stray cats from Niterói, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, jun. 2010. v. 12, n. 6, p. 509–511. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2010.01.008>>.
- ARMSTRONG, J. A. et al. Response of Campylobacter pyloridis to antibiotics, bismuth and an acid-reducing agent in vitro--an ultrastructural study. **Journal of Medical Microbiology**, 1 dez. 1987. v. 24, n. 4, p. 343–350. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-24-4-343>>.
- BOOMKENS, S. Detection of Helicobacter pylori in bile of cats. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, nov. 2004. v. 42, n. 3, p. 307–311. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1016/j.femsim.2004.06.002>>.
- DAY, M. J. et al. Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. **Journal of Comparative Pathology**, fev. 2008. v. 138, n. SUPPL. 1, p. S1–S43. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997508000066>>.
- DENT, J. C. et al. Spiral organisms in the gastric antrum. **The Lancet**, v.2, p. 96, 1987. Disponível em: <DOI: 10.1016/s0140-6736(87)92754-1>.
- ESTEVEZ, M. I. et al. Animal model: Helicobacter pylori gastritis in cats with long-term natural infection as a model of human disease. **American Journal of Pathology**, 2000. v. 156, n. 2, p. 709–721. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64774-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64774-8)>.
- FOX, J. G. Gastric *Helicobacter* infections. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012. Chap. 37, p. 374-379.
- GEYER, C. et al. Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. **Veterinary Record**, 3 jul. 1993. v. 133, n. 1, p. 18–19. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/133/1/18.abstract>>.
- GERMANI, Y. et al. Strategy for the detection of Helicobacter species by amplification of 16S rRNA genes and identification of H. felis in a human gastric biopsy. **Research in Microbiology**. v. 148, p. 315–326, 1997. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0923-2508(97)81587-2>.
- GOJI, S. et al. Helicobacter suis-Infected Nodular Gastritis and a Review of Diagnostic Sensitivity for Helicobacter heilmannii-Like Organisms. **Case Reports in Gastroenterology**, 29 maio. 2015. v. 9, n. 2, p. 179–187. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/431169>>.

GREITER-WILKE, A. et al. Association of *Helicobacter* with cholangiohepatitis in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2006. v. 20, n. 4, p. 822–827. Disponível em: < DOI: 10.1892/0891-6640(2006)20[822:aohwci]2.0.co;2>.

GROOTE, D. DE et al. ‘Candidatus *Helicobacter suis*’, a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 1 out. 1999. v. 49, n. 4, p. 1769–1777. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-4-1769>>.

HAESEBROUCK, F. et al. Gastric *Helicobacters* in Domestic Animals and Nonhuman Primates and Their Significance for Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, abr. 2009. v. 22, n. 2, p. 202–223. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/22/2/202>>.

HAESEBROUCK, F. et al. Non-*Helicobacter pylori Helicobacter* species in the human gastric mucosa: a proposal to introduce the terms *H. heilmannii sensu lato* and *sensu stricto*. **Helicobacter**, v. 16, n. 4, p. 339-340, 2011. Disponível em: < DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00849.x>.

HERMANN, W. et al. *Helicobacter*-like organisms: Histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, abr. 1995. v. 112, n. 3, p. 307–318. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997505800830>>.

HONG, S. et al. Detection of *Helicobacter felis* in a cat with gastric disease in laboratory animal facility. **Laboratory Animal Research**, 2016. v. 32, n. 2, p. 122. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5625/lar.2016.32.2.122>>.

HOSHINA, S. et al. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, nov. 1990. v. 13, n. 6, p. 473–479. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/073288939090079B>>.

HWANG, C. Y.; HAN, H. R.; YOUN, H. Y. Prevalence and Clinical Characterization of Gastric *Helicobacter* Species Infection of Dogs and Cats in Korea. **Journal of Veterinary Science**, 2002. v. 3, n. 2, p. 123. Disponível em: <<https://vetsci.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2002.3.2.123>>.

INSTITUTO Pet Brasil: banco de dados. Disponível em: <http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>>. Acesso em: 17 Agosto 2020.

KARAGIN, P. H. *Helicobacter* species and common gut bacterial DNA in gallbladder with cholecystitis. **World Journal of Gastroenterology**, 2010. v. 16, n. 38, p. 4817-4122. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i38/4817.htm>>.

KIM, O. *Helicobacter* - An emerging new zoonotic pathogen. In: LORENZO-MORALES, J. **Zoonosis** Rijeka: InTec Press, 2012; pp. 89-100.

KUBOTA-AIZAWA, S. et al. Epidemiological study on feline gastric *Helicobacter* spp. in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, 2017. v. 79, n. 5, p. 876–880.

Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/79/5/79_16-0567/_article>.

KUSTERS, J. G.; VLIET, A. H. M. VAN; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, jul. 2006. v. 19, n. 3, p. 449–490. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/19/3/449>>.

LAMBERT, J. R.; MIDOLO, P. The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Alimentary & Pharmacology Therapeutics**. v. 11, (suppl. 1), p. 27–33. Disponível em: < DOI: 10.1046/j.1365-2036.11.s1.13.x>.

LIU, J. et al. Prevalence of Coinfection with Gastric Non- *Helicobacter pylori* *Helicobacter* (NHPH) Species in *Helicobacter pylori* -infected Patients Suffering from Gastric Disease in Beijing, China. **Helicobacter**, ago. 2015. v. 20, n. 4, p. 284–290. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/hel.12201>>.

MAPSTONE, N. P. et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. **Journal of Clinical Pathology**, 1 jun. 1993. v. 46, n. 6, p. 540–543. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.46.6.540>>.

MARCASSO, R. A. et al. Presence of *Helicobacter* DNA in hepatic tissues in dogs with nonspecific hepatic lesions. **African Journal of Microbiology Research**, 21 jan. 2016. v. 10, n. 3, p. 93–99. Disponível em:

<<http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/1E6F83F56889>>.

MARSHALL, B.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, jun. 1984. v. 323, n. 8390, p. 1311–1315. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673684918166>>.

MAURER, K. J. et al. Identification of cholelithogenic enterohepatic *Helicobacter* species and their role in murine cholesterol gallstone formation. **Gastroenterology**, 2005. v. 128, n. 4, p. 1023–1033.

McNULTY, C. A. et al. New spiral bacterium in the gastric mucosa. **Journal of Clinical Pathology**, 2 fev. 1989. v. 42, n. 6, p.585–592. Disponível em:

<<http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.43.3.262-b>>.

MÉNARD, A.; SMET, A. Review: Other *Helicobacter* species. **Helicobacter**, 4 set. 2019. v. 24, n. S1, p. 1–8. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/hel.12645>>.

OKUBO, B. M. et al. PREVALÊNCIA DE *Helicobacter* spp. EM CÃES DE CAMPO GRANDE-MS. **Ciência Animal Brasileira**, 2017. v. 18, n. 1, p. 1–10. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912017000100304&lng=pt&tlng=pt>.

O’ROURKE, J. L. et al. Description of ‘*Candidatus Helicobacter heilmannii*’ based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 1 nov. 2004. v. 54, n. 6, p. 2203–2211.

Disponível em:

<<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijvs.0.63117-0>>.

PRACHASILPCHAI, W. et al. Diagnosis of *Helicobacter* spp. infection in canine stomach. **Journal of Veterinary Science**, 2007. v. 8, n. 2, p. 139. Disponível em: <<https://vetsci.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2007.8.2.139>>.

RECORDATI, C. et al. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. **Veterinary Microbiology**, 2007. v. 119, n. 2–4, p. 346–351. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.08.029>.

ROBIĆ, M. et al. Histopathological changes in stomachs of dogs with naturally acquired *Helicobacter* infection. **Veterinarski Arhiv**, 2007. v. 77, n. 2, p. 103–111. Disponível em: <<http://wwwi.vet.hr/vetarhiv/papers/2007-77-2-2.pdf>>.

RODAN, I. Understanding the Cat and Feline-Friendly Handling. In: LITTLE, S.E. **The cat: clinical medicine and management**. 1st. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012. Chap. 1, p. 2-19.

ROGERS, A. B. et al. Progression of Chronic Hepatitis and Preneoplasia in *Helicobacter hepaticus*-Infected A/JCr Mice. **Toxicologic Pathology**, 2 out. 2004. v. 32, n. 6, p. 668–677. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230490524247>>.

ROSSI, G. et al. Severe Gastritis with Double *Helicobacter* spp. Infection Associated with Barrett's Esophagus in a Cheetah. **Helicobacter**, dez. 2014. v. 19, n. 6, p. 462–464. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/hel.12151>>.

SHOJAEI TABRIZI, A. et al. Identification of *Helicobacter* spp. in oral secretions vs. gastric mucosa of stray cats. **Veterinary Microbiology**, jan. 2010. v. 140, n. 1–2, p. 142–146. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113509003411>>.

SJÖDIN, S.; TROWALD-WIGH, G.; FREDRIKSSON, M. Identification of *Helicobacter* DNA in feline pancreas, liver, stomach, and duodenum: Comparison between findings in fresh and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. **Research in Veterinary Science**, dez. 2011. v. 91, n. 3, p. e28–e30. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528811000464>>.

SOLNICK, J. V. et al. An Uncultured Gastric Spiral Organism Is a Newly Identified *Helicobacter* in Humans. **Journal of Infectious Diseases**, 1 ago. 1993. v. 168, n. 2, p. 379–385. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/168.2.379>>.

SOUSA, D. A. De et al. Epidermal growth factor receptor 2 immunoexpression in gastric cells of domestic cats with *H. heilmannii* infection. **Acta Histochemica**, 2019. v. 121, n. 4, p. 413–418. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.03.004>>.

STOLTE, M. et al. *Helicobacter heilmannii* (Formerly *Gastrospirillum hominis*) Gastritis: An Infection Transmitted by Animals? **Scandinavian Journal of**

Gastroenterology, 8 jan. 1994. v. 29, n. 12, p. 1061–1064. Disponível em:
<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365529409094888>>.

TAKEMURA, L. S. et al. Helicobacter infection in the hepatobiliary system and hepatic lesions: a possible association in dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, 5 jan. 2019. v. 50, n. 1, p. 297–305. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s42770-018-0003-8>>.

WATSON, P. J. Hepatobiliary Diseases in the Cat. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Small Animal Internal Medicine**. 5th ed. Missouri: Elsevier, 2014. chap. 37, p.536-558.

XUAN, S.-Y. Helicobacter infection in hepatocellular carcinoma tissue. **World Journal of Gastroenterology**, 2006. v. 12, n. 15, p. 2335. Disponível em:
<<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v12/i15/2335.htm>>.

YOSHIMURA, M. et al. A Case of Acute Gastric Mucosal Lesions Associated with Helicobacter heilmannii Infection. **Helicobacter**, out. 2002. v. 7, n. 5, p. 322–326. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1523-5378.2002.00103.x>>.

**APÊNDICE A – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CORPO GÁSTRICO
(PARTE 1)**

Protocolo	Lesão em epitélio superficial*	Lesão em fossa gástrica*	Atrofia da mucosa*	Linfócitos intraepiteliais*
1477-20	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1480-20	0	0	0	1
1481-20	0	0	0	0
1482-20	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1483-20	Ausente ^a	0	0	0 ^b
1497-20	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1499-20	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1506-20	0	0	0	0
1507-20	0	0	0	1
1510-20	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1548-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1552-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1553-21	0	0	0	0
1554-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1555-21	0	0	0	0
1558-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1562-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1565-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1566-21	0	0	0	0
1570-21	Ausente ^a	0	0	0
1572-21	0	0	0	1
1574-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1583-21	0	0	0	0
1586-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1605-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1616-21	Ausente ^a	0	0	0
1621-21	0	0	0	0
1625-21	0	0	0	0
1626-21	Ausente ^a	Ausente ^a	0	0
1627-21	Ausente ^a	0	0	0

*0: ausente (normal); 1: leve; 2: moderada; 3: acentuada. ^aEpitélio ausente por autólise.

^bFolículo linfoide ausente no espécime de biópsia. Avaliação adaptada de Day et al. 2008.

**APÊNDICE B – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CORPO GÁSTRICO
(PARTE 2)**

Protocolo	Linfócitos e plasmócitos na LP*	Eosinófilos na LP*	Neutrófilos na LP*	Hiperplasia linfóide folicular*
1477-20	0	0	0	0
1480-20	1	0	0	0
1481-20	0	0	0	0
1482-20	0	0	0	Ausente ^b
1483-20	0	0	0	Ausente ^b
1497-20	0	0	0	Ausente ^b
1499-20	0	0	0	Ausente ^b
1506-20	0	0	0	0
1507-20	1	0	0	Ausente ^b
1510-20	0	0	0	Ausente ^b
1548-21	0	0	0	Ausente ^b
1552-21	0	0	0	Ausente ^b
1553-21	0	0	0	Ausente ^b
1554-21	0	0	0	Ausente ^b
1555-21	0	0	0	0
1558-21	0	0	0	Ausente ^b
1562-21	0	0	0	0
1565-21	0	0	0	Ausente ^b
1566-21	0	0	0	Ausente ^b
1570-21	0	0	0	Ausente ^b
1572-21	1	0	0	Ausente ^b
1574-21	0	0	0	0
1583-21	0	0	0	0
1586-21	0	0	0	Ausente ^b
1605-21	0	0	0	Ausente ^b
1616-21	0	0	0	Ausente ^b
1621-21	0	0	0	Ausente ^b
1625-21	0	0	0	Ausente ^b
1626-21	0	0	0	0
1627-21	0	0	0	Ausente ^b

*0: ausente (normal); 1: leve; 2: moderada; 3: acentuada. ^bFolículo linfóide ausente no espécime de biópsia. Avaliação adaptada de Day et al. 2008.

**APÊNDICE C – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ANTRO PILÓRICO
(PARTE 1)**

Protocolo	Lesão em epitélio superficial*	Hiperplasia epitelial*	Atrofia da mucosa*	Linfócitos intraepiteliais*
1477-20	Ausente ^a	0	0	0
1480-20	0	0	0	1
1481-20	Ausente ^a	0	0	0
1482-20	Ausente ^a	0	0	0
1483-20	Ausente ^a	0	0	0
1497-20	Ausente ^a	0	0	0
1499-20	Ausente ^a	0	0	0
1506-20	0	0	0	0
1507-20	0	0	0	0
1510-20	0	0	0	0
1548-21	Ausente ^a	0	0	0
1552-21	Ausente ^a	0	0	0
1553-21	Ausente ^a	0	0	0
1554-21	0	0	0	0
1555-21	0	0	0	0
1558-21	Ausente ^a	0	0	0
1562-21	0	0	0	0
1565-21	Ausente ^a	0	0	0
1566-21	Ausente ^a	0	0	0
1570-21	Ausente ^a	0	0	0
1572-21	Ausente ^a	0	0	0
1574-21	Ausente ^a	0	0	0
1583-21	0	0	0	0
1586-21	Ausente ^a	0	0	0
1605-21	Ausente ^a	0	0	0
1616-21	0	0	0	0
1621-21	0	0	0	0
1625-21	0	0	0	0
1626-21	Ausente ^a	0	0	1
1627-21	Ausente ^a	0	0	0

*0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: acentuada. ^aEpitélio ausente por autólise. Avaliação adaptada de Day et al. 2008.

**APÊNDICE D – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ANTRO PILÓRICO
(PARTE 2)**

Protocolo	Linfócitos e plasmócitos na LP*	Eosinófilos na LP*	Neutrófilos na LP*	Hiperplasia linfóide folicular*
1477-20	0	0	0	0
1480-20	1	0	0	1
1481-20	0	0	0	0
1482-20	0	0	0	0
1483-20	0	0	0	0
1497-20	0	0	0	0
1499-20	0	0	0	0
1506-20	0	0	0	Ausente ^b
1507-20	0	0	0	0
1510-20	0	0	0	0
1548-21	0	0	0	Ausente ^b
1552-21	0	0	0	0
1553-21	0	0	0	0
1554-21	0	0	0	Ausente ^b
1555-21	0	0	0	0
1558-21	0	0	0	Ausente ^b
1562-21	0	0	0	0
1565-21	0	0	0	Ausente ^b
1566-21	0	0	0	Ausente ^b
1570-21	0	0	0	Ausente ^b
1572-21	0	0	0	Ausente ^b
1574-21	0	0	0	Ausente ^b
1583-21	1	0	0	1
1586-21	0	0	0	0
1605-21	0	0	0	Ausente ^b
1616-21	0	0	0	0
1621-21	0	0	0	Ausente ^b
1625-21	0	0	0	0
1626-21	1	0	0	0
1627-21	0	0	0	0

*0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: acentuada. ^bFolículo linfóide ausente no espécime de biópsia. Avaliação adaptada de Day et al. 2008.

APÊNDICE E – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA HEPÁTICA

Protocolo	Infiltrado Portal		Ductos Portais (Grau) ^b	Fibrose (Grau) ^c
	Tipo*	Grau ^a		
1477-20	Linfoplasmocítico	1	0	0
1480-20	Misto	2	2	2
1481-20	Linfoplasmocítico	1	2	2
1482-20	Linfoplasmocítico	1	0	0
1483-20	Linfoplasmocítico	0	0	0
1497-20	Linfoplasmocítico	1	1	0
1499-20	Linfoplasmocítico	2	2	2
1506-20	Linfoplasmocítico	1	0	0
1507-20	Linfoplasmocítico	1	1	1
1510-20	Linfoplasmocítico	2	3	2
1548-21	Linfoplasmocítico	1	1	1
1552-21	Neutrofílico	1	0	0
1553-21	Linfoplasmocítico	1	1	1
1554-21	Linfoplasmocítico	1	1	0
1555-21	Linfoplasmocítico	1	1	0
1558-21	Neutrofílico	2	1	0
1562-21	Linfoplasmocítico	1	1	1
1565-21	Linfoplasmocítico	1	1	1
1566-21	Misto	1	1	2
1570-21	Linfoplasmocítico	1	1	2
1572-21	Linfoplasmocítico	2	2	2
1574-21	Linfoplasmocítico	2	1	1
1583-21	Misto	2	1	0
1586-21	Misto	2	2	2
1605-21	Linfoplasmocítico	1	1	0
1616-21	Misto	3	3	2
1621-21	Linfoplasmocítico	1	0	0
1625-21	Linfoplasmocítico	1	1	0
1626-21	Linfoplasmocítico	1	1	1
1627-21	Linfoplasmocítico	1	1	0

*Neutrofílico: puro ou predominante em neutrófilos, podendo incluir apenas alguns linfócitos e/ou plasmócitos; linfoplasmocítico: constituído exclusivamente de linfócitos e plasmócitos; misto: uma combinação do infiltrado neutrofílico com o linfoplasmocítico, ambos em mesma quantidade. ^aGrau 0: ausência de células inflamatórias; grau 1: 5-10 células/espaco-porta (EP); grau 2: 11-40 células/EP; grau 3: >40 células/EP. ^bGrau 0: 1 ductulo/EP; grau 1: 2 ductulos/EP; grau 2: 3 ou 4 ductulos/EP; grau 3: >4 ductulos/EP. ^cGrau 0: ausência de fibrose portal; grau 1: fibrose sem expansão da área portal; grau 2: fibrose com aumento da área portal; grau 3: fibrose em ponte. Graduação adaptada de Gagne et al. 1996.

APÊNDICE F – RESULTADOS DO TESTE RÁPIDO DE UREASE

Protocolo	Urease	
	Corpo	Antro
1477-20	+	+
1480-20	+	+
1481-20	+	+
1482-20	-	+
1483-20	+	+
1497-20	-	-
1499-20	-	-
1506-20	+	+
1507-20	+	+
1510-20	+	-
1548-21	+	+
1552-21	+	-
1553-21	+	-
1554-21	+	-
1555-21	-	-
1558-21	+	+
1562-21	+	+
1565-21	-	-
1566-21	+	+
1570-21	-	-
1572-21	+	-
1574-21	-	-
1583-21	+	+
1586-21	-	-
1605-21	-	-
1616-21	-	-
1621-21	-	-
1625-21	+	+
1626-21	-	+
1627-21	+	+

APÊNDICE G – RESULTADOS DA PCR PARA *HELICOBACTER SPP.*

Protocolo	Estômago	Fígado	Bile
1468-20	+	-	-
1476-20	+	-	-
1480-20	+	-	+
1481-20	+	-	-
1482-20	+	-	-
1483-20	+	+	-
1497-20	-	-	-
1499-20	-	-	-
1506-20	+	-	-
1507-20	+	-	-
1548-21	+	-	-
1552-21	+	-	-
1553-21	+	-	-
1554-21	-	-	-
1555-21	-	-	-
1558-21	+	-	-
1562-21	+	-	-
1565-21	-	-	-
1566-21	-	-	-
1570-21	+	-	-
1572-21	-	-	-
1574-21	+	-	-
1583-21	+	+	-
1586-21	-	-	-
1605-21	-	-	-
1616-21	-	-	-
1621-21	-	+	-
1625-21	+	+	-
1626-21	+	-	-
1627-21	+	+	-