

# DETECCIÓN DE *Helicobacter bizzozeronii* y *Helicobacter felis* EN BIOPSIAS GÁSTRICAS DE PERROS

Detection of *Helicobacter bizzozeronii* and *Helicobacter felis* in gastric biopsy of dogs

Corina Guendulain<sup>1\*</sup>, Griselda González<sup>1</sup>, Bibiana Pelliza<sup>2</sup>, Marina Caffaratti<sup>1</sup>, Anibal Bessone<sup>1</sup> y Pablo Tamiozzo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento Clínica Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. <sup>2</sup>Departamento Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. \*0358-155486569 - cguendulain@ayv.unrc.edu.ar

## RESUMEN

Los *Helicobacter* no-*Helicobacter pylori* (HNHP) incluyen varias especies diferentes, tales como *H. suis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii sensu stricto* (s.s.), *H. cynogastricus* y *H. baculiformis*, algunas de las cuales colonizan el estómago del hombre y de los perros. La identificación de estas especies de *Helicobacter* en perros es importante debido a que existen evidencias sustanciales del potencial zoonótico de algunas de ellas, tales como *H. felis* y *H. bizzozeronii*, a pesar de su baja prevalencia. No existe información acerca de las especies predominantes en los perros del país y región y de las características de la población afectada. Se colectaron muestras de biopsias gástricas de 50 perros de entre 2 meses y 14 años de edad, 10 de razas puras y el resto mestizos, 29 machos y 21 hembras. El objetivo del trabajo fue detectar mediante PCR, HNHP en biopsias gástricas de perros y asociarlas a la raza, edad y sexo. *H. bizzozeronii* fue identificado en el 28% de las muestras y *H. felis* en el 4%. A pesar de que el perfil de riesgo fue determinado y de que los animales en los que más comúnmente se detectaron los HNHP fueron machos, mayores de 3,8 años y mestizos, no hubo evidencia estadísticamente significativa.

**Palabras clave:** *Helicobacter bizzozeronii*; *Helicobacter felis*; biopsia gástricas; perros; PCR

## ABSTRACT

No *Helicobacter pylori* *Helicobacter* (NHPH) include different species such as *H. suis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii sensu stricto* (s.s.), *H. cynogastricus* and *H. baculiformis*, some of which colonize the stomach of dogs and humans. The identification of these species in dogs is important due to the evidence of the zoonotic potential of some of them, like *H. felis* y *H. bizzozeronii*, despite of its low prevalence. There is no records about the prevailing species in dogs of the Region or Country, and about the characteristics of the affected population. Gastric biopsy specimens of 50 dogs between 2 months and 14 years of age, 10 pure-breed and 40 mixed-breed, 29 males and 21 females, were collected. The aim of this work was to detect by PCR, HNHP in dog's gastric biopsy and to associate them with breed, age and sex of the dogs. *H. bizzozeronii* was identified in 28% of the samples and *H. felis* in 4% of them. Although the risk profile was determined and that the most commonly infected dogs were male, older than 3.8 years and mixed breed, there is no significant statistic evidence.

**Key words:** *Helicobacter bizzozeronii*; *Helicobacter felis*; gastric biopsy; dogs, PCR

## INTRODUCCIÓN

El género *Helicobacter* incluye varias especies que afectan a un amplio espectro de animales y al ser humano. *H. pylori* es el más importante en el hombre dada su fuerte implicancia en las gastritis crónicas, úlceras y neoplasias gástricas [24, 28], pero existen otras especies de este género como *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii sensu stricto* (s.s.), *H. cynogastricus* y *H. baculiformis*, conocidas como *Helicobacter* no-*Helicobacter pylori* (HNHP), algunas de las cuales colonizan el estómago de perros (*canis familiaris*), gatos (*felis catus*) y humanos [4, 12, 20, 22, 26, 39].

La prevalencia de HNHP en caninos es alta y varía de un 60 a un 100% según se trate de perros clínicamente sanos o con signos digestivos [11, 12, 16, 19, 22, 38]. *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis*, *H. heilmannii* s.s. y *H. cynogastricus* han sido identificadas en perros [12, 20, 22, 26, 39] y esto es importante debido al potencial zoonótico de algunas de estas especies, como *H. bizzozeronii* y *H. felis* [9, 21]. *H. bizzozeronii* es la especie que predomina en la mucosa gástrica del perro, en cambio, *H. salomonis* se encuentra en forma esporádica [38].

Estas bacterias se encuentran en todas las regiones del estómago, tanto en el fundus, como en el cuerpo y el antro, y se ubican sobre la superficie mucosa, en las fosetas gástricas, en la profundidad de las glándulas gástricas y en las células parietales [11, 17].

No está claro si existe relación entre la presencia de *Helicobacter* spp. y enfermedad gástrica en el perro, ya que la gastritis acompaña la infección en algunos, pero no en todos los perros, y muchos no tienen signos clínicos a pesar de la infección. Se desconoce la importancia patogénica de las HNHP en perros y las diferencias en la patogenicidad entre las distintas cepas dentro de una misma especie [11].

La prueba más utilizada para realizar el diagnóstico es la histopatología, donde las bacterias se reconocen fácilmente usando tinciones de Hematoxilina-Eosina, Giemsa o tinciones con plata, pero la identificación de especies no es posible a través de los hallazgos histológicos, de la morfología de las colonias en el cultivo, ni de las características ultraestructurales a la microscopía electrónica (ME) [15]. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [23] permite, en cambio, mediante la amplificación de segmentos génicos, la detección de *Helicobacter* a nivel de género y especie [1, 6, 13, 27, 32, 34].

No se conoce la vía de transmisión, postulándose la vía oral-oral o bien fecal-oral debido a que se han encontrado estas bacterias tanto, en materia fecal como en saliva y placa dental [31, 36]. La detección de HNHP en la mucosa del estómago de seres humanos y perros, sugiere la posibilidad de que los animales jueguen un rol importante en la patogenia y transmisión de la infección al hombre [9, 21].

Los antecedentes acerca de la posible asociación de la presencia de la bacteria con factores de riesgo intrínsecos del

perro, como sexo o edad son escasos y poco concluyentes, ya que se ha informado la presencia del agente en perros jóvenes y viejos de ambos sexos [16, 37].

Debido al potencial zoonótico de algunas especies de HNHP, a la escasa información acerca de la presencia de estas especies en el país y región, y al desconocimiento de las características de los perros afectados, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Detectar HNHP en biopsias gástricas de perros y 2) Asociar la presencia de HNHP según raza, edad y sexo de los perros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en el hospital de Clínica Animal y en el laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAV, UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina) de acuerdo a las pautas éticas internacionales para la investigación biomédica [7].

Se realizó un estudio de corte transversal, la unidad de muestreo fueron pacientes caninos del hospital de Clínica Animal derivados a cirugía, de los cuales se colectaron muestras de biopsias gástricas y se registraron algunas variables como raza, edad y sexo.

### Población en estudio y toma de muestras

Se colectaron muestras de biopsias gástricas de perros ingresados al hospital de Clínica Animal de la FAV y derivados a cirugía por diferentes patologías (n=50). Ninguno de estos perros presentaba antecedentes de enfermedad gástrica, ni signos clínicos relacionados. Los perros tenían entre 2 meses y 14 años de edad, 10 eran de razas puras y el resto mestizos, 29 machos y 21 hembras. Previo a la inclusión de los animales en el estudio se solicitó conformidad por escrito a los propietarios de los mismos.

La toma de muestras se realizó en el momento de la anestesia, mediante endoscopia gástrica. La maniobra se realizó bajo anestesia general con el siguiente protocolo: nalbufina (1mg/kg) + acepromacina (0,05 mg/kg) como premedicación, propofol (5 mg/kg) IV a efecto para la inducción e intubación e isoflurano 1,7 vol% para el mantenimiento. Para la gastroscopia, el paciente se colocó en decúbito lateral izquierdo; el tubo de inserción se introdujo por la boca hasta el estómago y mediante el pasaje de una pinza de biopsia por el canal de trabajo del videoendoscopio (Storz, Alemania, con tubo de inserción de 1,4 m de largo, 9,8 mm de diámetro y canal de biopsia de 2,8 mm) se tomaron muestras de la mucosa gástrica. El endoscopio y la pinza de biopsia fueron lavados y desinfectados con solución acuosa de glutaraldehído al 2% entre las tomas de muestras de cada paciente, según recomendaciones de la Organización Mundial de Endoscopia [41]. Las muestras obtenidas se colocaron en tubos estériles de 1,5 mL correctamente identificados y se almacenaron en ultracongelador a -70°C (Thermo Quest, Forma Scientific 8458, EUA) hasta su posterior procesamiento.

### Procesamiento de las muestras

Extracción de ADN. Para la extracción del ADN, cada una de las muestras de biopsia gástrica fue suspendida en 1 mL de solución fisiología estéril, agitada vigorosamente con vortex (MX-S, Dragonlab, China) por 1 min y centrifugada a 14.000 unidades G por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el ADN del sedimento fue extraído con kit comercial (DNAzol, Invitrogen, CA, EUA), [8], de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue almacenado a -20°C (Freezer Whirlpool, WVU26C, Whirlpool S.A., Brasil) hasta el momento de su procesamiento [8].

**Identificación de especies de HNHP.** Para la detección de HNHP a nivel de género, se amplificó mediante PCR un fragmento del gen 16SRNAr utilizando los cebadores y condiciones previamente descritas (Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler, Edison, EUA) [1]. Esta PCR fue considerada la prueba tamiz. Las muestras que dieron positivas a la PCR tamiz fueron posteriormente analizadas para determinar la presencia de *H. bizzozeronii* y *H. felis* utilizando los cebadores Fe1F, Fe3R, Bi1F y Bi2R y las condiciones previamente descritas [5]. En todos los casos se utilizaron como controles positivos, muestras de ADN cedidas para este estudio por la Universidad de Buenos Aires, Argentina y la Universidad de Ghent, Bélgica.

De las muestras remanentes, que habían sido positivas a la PCR tamiz y negativas a *H. bizzozeronii* y *H. felis*, fueron seleccionadas al azar nueve, que fueron nuevamente amplificadas [1] y los productos de la PCR fueron purificados (Puriprep-GP Kit, InbioHighway, Tandil, República Argentina), cuantificados y secuenciados (ABI 3130xl; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando los cebadores previamente mencionados [1]. Las secuencias fueron visualizadas con el software BioEdit [14] y alineadas con las bases de datos disponibles utilizando el software BLAST [2].

**Análisis estadístico.** Se confeccionó una ficha *ad-hoc* para cada paciente, donde se registró, raza, edad y sexo. Se calculó la prevalencia de HNHP total y según sexo, edad y raza de la población estudiada. Se determinó el intervalo de confianza (IC) de la prevalencia de perros positivos a HNHP, *H. bizzozeronii* y *H. felis* utilizando el programa Epidat [18]. Para determinar alguna asociación entre la detección de HNHP y la edad, raza y sexo de los perros se calculó la razón de prevalencia. Con los datos obtenidos se determinó el perfil de riesgo de perros positivos a HNHP para esta población. Para ello, las variables establecidas fueron las siguientes: 1) Edad: mayor (> de 3,8 años) y menor (< 3,8 años) al promedio; 2) Raza: puros y mestizos; 3) Sexo: macho y hembra

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia cruda de HNHP detectada en los 50 animales muestreados fue del 58% (29/50) -IC 95: 43,3-72,7%-. Por otro lado, el 68,9% fueron perros mestizos y 31,1% fueron de raza pura. En cuanto al sexo se pudo determinar que el 65,5% eran machos y 34,5% hembras, de los cuales el 48,3% eran perros menores de 3,8 años de edad y el 51,7% fueron mayores. El porcentaje de positivos de manera detallada se muestra en la TABLA I. La prevalencia de HNHP encontrada en el presente estudio fue ligeramente menor a los valores de prevalencia informados en investigaciones realizadas en otras partes del mundo, en perros con o sin sintomatología digestiva [3, 12, 16, 19, 22, 29, 38], en las cuales se encontró un amplio rango de prevalencias, entre un 60 y 100%. Sin embargo, estuvo muy por debajo de la obtenida en países vecinos, ya que se han informado prevalencias del 96% de *Helicobacter* spp. en perros sanos en Brasil [25], del 95% en perros sanos y enfermos en Venezuela [29] y entre un 75,9 - 100% de perros con y sin lesiones gástricas en Chile [37].

TABLA I

**PORCENTAJE DE PCR POSITIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *HELICOBACTER* SPP. SEGÚN RAZA, SEXO Y EDAD DE LOS ANIMALES MUESTREADOS**

EDAD	SEXO							TOTAL
	MACHO			HEMBRA			TOTAL	
	< 3,8 AÑOS	> 3,8 AÑOS	TOTAL	< 3,8 AÑOS	> 3,8 AÑOS	TOTAL		
PURO	100% (2/2)	83% (5/6)	87,5% (7/8)	100% (1/1)	20% (1/5)	33,3% (2/6)	64,3% (9/14)	
RAZA								
MESTIZO	53% (9/17)	50% (3/6)	52,2% (12/23)	33,3% (2/6)	86% (6/7)	61,5% (8/13)	55,5% (20/36)	
TOTAL	58% (11/19)	66,6% (8/12)	61,3% (19/31)	43% (3/7)	58,3% (7/12)	52,6% (10/19)	58% (29/50)	

En concordancia con otros investigadores [30, 38, 40] *H. bizzozeronii* fue identificado en el 28% (14/50) de las muestras analizadas (IC 95: 14,5 - 41,4 %). Esto reviste verdadera importancia, ya que se ha demostrado el potencial zoonótico de esta especie [21, 23, 42]. Sólo el 4% de las muestras arrojaron resultado positivo a *H. felis* [19, 38, 40]. En el presente estudio no se observaron infecciones mixtas con *H. bizzozeronii* y *H. felis* como ha sido recientemente informado [3]. En este sentido, se considera necesario realizar nuevas investigaciones con un número mayor de muestras y que contemplen la detección de más especies de HNHP.

Las secuencias del fragmento del gen 16SARNr de las nueve muestras analizadas mediante el análisis *in silico*, presentaron 99% de similitud con más de 60 secuencias de: *H. felis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus*, *H. baculiformis* y *H. spp.* Desafortunadamente no pudo identificarse la especie a la que pertenecían, ya que las secuencias mostraron similitud con muchas especies de HNHP. En este sentido, si bien se han informado varias PCR para la detección de *Helicobacter*

a nivel de género, amplificando segmentos del gen 16SARNr [1, 6, 13, 27, 32, 34], también se ha señalado que el análisis de este gen no permite discriminar entre *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis* debido al alto grado de semejanza entre estas especies [10]. El tema se torna más complejo aún si se considera el alto grado de similitud, entre el 93 y el 99%, observado en el análisis de las secuencias de este gen en otras especies recientemente informadas como "*Candidatus H. heilmannii*" [27], *H. cynogastricus* [39], *H. baculiformis* [4] y *H. heilmannii* s.s. [35]. Por ello, y ante la falta de PCR específicas de especie, el análisis de otros genes como el de la ureasa, deberían evaluarse cuidadosamente para una certera identificación de las mismas [27].

De las muestras positivas a *H. bizzozeronii*, 71,4% fueron perros mestizos y 28,6% perros de raza pura; 64,3% machos y 35,7% hembras y 42,8% menores de 3,8 años y 57,2% mayores. El porcentaje de positivos de manera detallada según raza, sexo y edad se muestra en la TABLA II. *H. felis* fue detectado en el 4% (2/50), ambos correspondieron a machos, mestizos, menores de 3,8 años.

TABLA II  
PORCENTAJE DE PCR POSITIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *H. BIZZOZERONII* SEGÚN RAZA, SEXO Y EDAD DE LOS ANIMALES MUESTREADOS

EDAD	SEXO	MACHO		TOTAL	HEMBRA		TOTAL	TOTAL
		< 3,8 AÑOS	> 3,8 AÑOS		< 3,8 AÑOS	> 3,8 AÑOS		
RAZA	PURO	0% (0/2)	50% (3/6)	37,5% (3/8)	0% (0/1)	20% (1/5)	16,6% (1/6)	28,6% (4/14)
	MESTIZO	29,4% (5/17)	16,6% (1/6)	26% (6/23)	16,6% (1/6)	42,8% (3/7)	30,8% (4/13)	27,7% (10/36)
TOTAL		26,3% (5/19)	33,3% (4/12)	29% (9/31)	14,3% (1/7)	33,3% (4/12)	26,3% (5/19)	28% (14/50)

El perfil de riesgo de los perros que acudieron a la guardia, positivos a *Helicobacter* spp., fue: macho, mayor de 3,8 años y mestizo. En cuanto a las razones de prevalencia, la asociación entre raza fue: 1,15 raza pura vs mestizos; edad: 1,24 más de 3,8 años vs menor de 3,8 años y sexo: 1,16 macho vs hembra. Respecto a la asociación entre la presencia de HNHP y la raza, sexo o edad de los animales estudiados, a pesar de que el perfil de riesgo fue determinado y de que aparentemente los animales en los que más comúnmente se detectaron fueron machos, mayores de 3,8 años y mestizos, no hubo evidencia estadísticamente significativa ( $P \geq 0,05$ ). Esto coincide con lo previamente informado, en donde se detectó el agente en perros jóvenes y viejos de ambos sexos [16, 37].

Los resultados obtenidos en el presente trabajo generan antecedentes relevantes acerca de la presencia de HNHP en el país y en la región bajo estudio, dado que no se ha encontrado

información alguna acerca de la identificación de *Helicobacter* a nivel de especie en Argentina ni en países vecinos, lo que resulta fundamental para poder determinar la significancia clínica de cada especie, tanto en animales como en el hombre.

Por otro lado, debido a la detección de especies de HNHP con alto potencial zoonótico, se considera importante profundizar el conocimiento de las infecciones producidas por esta bacteria, tanto en los animales como en el hombre. En ese sentido, el equipo de investigación está llevando a cabo estudios más exhaustivos al respecto. Este informe establece un precedente para futuros estudios sobre la enfermedad y el diagnóstico de HNHP en perros del país.

#### CONCLUSIÓN

El presente trabajo es el primer estudio reportado para la identificación de HNHP a nivel de especie en perros en el país.

Se concluye que los perros bajo estudio presentan HNHP y que de las dos especies encontradas, *H. bizzozeronii* predomina sobre *H. felis*, sin el hallazgo de infecciones mixtas.

A pesar de que no hubo evidencia significativa, los perros en los que más comúnmente se encontraron los HNHP fueron machos, mayores de 3,8 años y mestizos. Se considera necesario realizar nuevas investigaciones con un número mayor de muestras y que contemplen la detección de más especies de HNHP.

#### AGRADECIMIENTO

A la Universidad de Ghent, Bélgica y a la Universidad de Buenos Aires, Argentina, quienes proporcionaron los controles positivos para las PCR.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AL-SOUD, W.; BENNEDSEN, M.; ON, S.; OUIS, I.; VANDAMME, P.; NILSSON, H.; LJUNGH, A.; WADSTROM, T. Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. **J. Med. Microbiol.** 52: 765-771. 2003.
- [2] ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. "Basic local alignment search tool." **J. Mol. Biol.** 215: 403-410. 1990.
- [3] AMORIM, I.; SMET, A.; ALVES, O.; TEIXEIRA, S.; SARAIVA, AL.; TAULESCU, M.; REIS, C.; HAESEBROUCK, F.; GÄRTNER, F. Presence and significance of *Helicobacter* spp. in the gastric mucosa of portuguese dogs. **Gut Pathog.** 7:12. 2015.
- [4] BAELE, M.; DECOSTERE, A.; VANDAMME, P.; VAN DEN BULCK, K.; GRUNTAR, I.; MEHLE, J.; MAST, J.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK F. *Helicobacter baculiformis* sp. nov., isolated from feline stomach mucosa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 357-364. 2008.
- [5] BAELE, M.; VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; VANDAMME, P.; HANNINEN, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK F. Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. **J. Clin. Microbiol.** 42 (3): 1115-1122. 2004.
- [6] BOHR, U.R.M.; PRIMUS, A.; ZAGOURA, A.; GLASBRENNER, B.; WEX, T.; MALFERTHEINER, P. A group-specific PCR assay for the detection of *Helicobacteraceae* in human gut. **Helicob.** 7 (6): 378-383. 2002.
- [7] CONSEJO DE ORGANIZACIONES INTERNACIONALES DE LAS CIENCIAS MÉDICAS (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Ginebra 2002. En línea: [http://www.ub.edu/rceue/archivos/Pautas\\_Eticas\\_Internac.pdf](http://www.ub.edu/rceue/archivos/Pautas_Eticas_Internac.pdf). 14/07/2016.
- [8] COX, R.A. **Methods n enzymology**. Grossmann, L. and Moldave, E., (Eds.) Vol. 12, parte B, Pp 120-129, Academic Press, Orlando, FL. 1968.
- [9] DE BOCK, M.; VAN DELBULCK, K.; HELLEMANS, A.; DAMINET, S.; COCHE, J.; DEBONGNIE, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Peptic ulcer disease associated with *Helicobacter felis* in a dog owner. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** 19 (1): 79-82. 2007.
- [10] DE GROOTE, D.; HAESEBROUCK, F.; VAN DOORN, L.; VANDAMME, P.; DUCATELLE, R. Evaluation of a group-specific 16S ribosomal DNA-based PCR for detection of *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter salomonis* in fresh and paraffin-embedded gastric biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.** 39 (3): 1197-1199. 2001.
- [11] DIKER, S.; HAZIROGLU, R.; AKAN, M.; CELIK, S.; KABAKCI, N. The prevalence, colonization sites and pathological effects of gastric *Helicobacter* in dogs. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 26: 345-351. 2002.
- [12] EATON, K.; DEWHIRST, F.; PASTER, B.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B.; PAOLA, J.; SHERDING, R. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animals and public health implications. **J. Clin. Microbiol.** 34 (4): 3165-3170. 1996.
- [13] GERMANI, Y.; DAUGA, C.; DUVAL, P.; HUERRE, M.; LEVY, M.; PIALOUX, G.; SANSONETTI, P.; GRIMONT, P.A.D. Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16s rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. **Res. Microbiol.** 148: 315-326. 1997.
- [14] HALL, T. BioEdit 2007: Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP. On Line: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Website last modified on June 27, 2007. 13/09/13.
- [15] HÄNNINEN, M.L.; HAPPONEN, I.; SAARI, S.; JALAVA, K. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 46: 160-166. 1996.
- [16] HAPPONEN, I.; LINDEN, J.; SAARI, S.; KARJALAINEN, M.; HÄNNINEN, M.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E. Detection and effects of *Helicobacters* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 213 (12): 1767-1774. 1998.
- [17] HAPPONEN, I.; SAARI, S.; CASTRENO, L.; TYNI, M.; HANNINEN, L.; WESTERMARCK, E. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter* like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. **J. Vet. Med. A.** 43: 305-315. 1996.

- [18] HERVADA-VIDAL, X.; SANTIAGO-PÉREZ, M.I.; VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, E.; CASTILLO-SALGADO, C.; LOYOLA-ELIZONDO, E.; SILVA-AYÇAGUER, L.C. Epidat 3.0: programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. **Rev. Esp. Salud Publ.** 78: 277-80. 2004.
- [19] HWANG, C.; HAN, H.; YOUN, H. Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. **J. Vet. Sci.** 3 (2): 123-133. 2002.
- [20] JALAVA, K.; KAARTINEN, M.; UTRIAINEN, M.; HAPPONEN, J.; HANNINEN, M.L. *Helicobacter salomonis* sp. nov. A canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 975-982. 1997.
- [21] JALAVA, K.; ON, S.; HARRINGTON, C.; ANDERSEN, L.; HANNINEN, M.; VANDAMME, P. Cultured strain of "*Helicobacter heilmannii*" a human gastric pathogen, identified as *Helicobacter bizzozeronii*, evidence for zoonotic potencial of *Helicobacter*. **Emerg. Infec. Dis.** 7: 1036-1038. 2001.
- [22] JALAVA, K.; ON, S.; VANDAMME, P.; HAPPONEN, I.; SUKURA, A.; HANNINEN, M. Isolation and identification de *Helicobacter* spp. from canine and feline gastric mucosa. **Eukaryotic Cell. Appl. Environ. Microbiol.** 64 (10): 3998-4006. 1998.
- [23] KIVISTÖ, R.; LINROS, J.; ROSSI, M.; RAUTELIN, H.; HÄNNINEN, M.L. Characterization of multiple *Helicobacter bizzozeronii* isolates from a finnish patient with severe dyspeptic symptoms and chronic active gastritis. **Helicob.** 15: 58-66. 2008.
- [24] KUSTERS, J.G.; VAN VLIET, A.H.M.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 19: 449-490. 2006.
- [25] MOUTINHO, F.Q.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M.J.; SUZANO, S.M.C.; SEQUEIRA, J.L. Prevalência de helicobactérias e alterações na mucosa gástrica de cães saudáveis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 59 (4): 1080-1083. 2007.
- [26] NEIGER, R.; TSCHUDI, M.; BURNENS, A.P.; GÖKE, B.; SCHMASSMANN, A. Diagnosis and identification of gastric *Helicobacter* species by PCR in dogs. **Microb. Ecol. Health Dis.** 11: 234-240. 1999.
- [27] O'ROURKE, J.L.; SOLNICK, J.V.; NEILAN, B.A.; SEIDEL, K.; HAYTER, R.; HANSEN, L.M.; LEE, A. Description of '*Candidatus Helicobacter heilmannii*' based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 2203-2211. 2004.
- [28] PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G.D.; VANDERSTEEN, D.P.; CHANG, Y.; VOGELMAN, J.H.; ORENTREICH, N.; SIBLEY, R.K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N. Engl. J. Med.** 17: 1127-1131. 1991.
- [29] POLANCO, R.; SALAZAR, V.; REYES, N.; GARCÍA-AMADO, M.A.; MICHELANGELI, F.; CONTRERAS, M. High prevalence of DNA from non-*H. pylori* helicobacters in the gastric mucosa of Venezuelan pet dogs and its histological alterations. **Rev. Inst. Med. Trop.** 53 (4): 207-212. 2011.
- [30] RECORDATI, C.; GUALDI, V.; CRAVEN, M.; SALA, L.; LUINI, M.; LANZONI, A.; RISHNIW, M.; SIMPSON, K.W.; SCANZIANI, E. Spatial distribution of *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract of dogs. **Helicob.** 14: 180-91. 2009.
- [31] RECORDATI, C.; GUALDI, V.; TOSI, S.; VAILATI FACCHINI, R.; PENGO, G.; LUINI, M.; SIMPSON, K.W.; SCANZIANI, E. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. **Vet. Microbiol.** 119: 346-351. 2007.
- [32] RILEY, L.K.; FRANKLIN, C.L.; HOOK, R.R. JR.; BESCH-WILLIFORD, C. Identification of murine *Helicobacters* by PCR and restriction enzyme analyses. **J. Clin. Microbiol.** 34 (4): 942-946. 1996.
- [33] SAIKI, R.K.; GELFAMD, D.H.; STOFFEL, S.; SCHREF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239 (4839): 487-491. 1988.
- [34] SHEN, Z.; FENG, Y.; FOX, J.G. Identification of enterohepatic *Helicobacter* species by restriction fragment-length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. **Helicob.** 5 (3): 121-128. 2000.
- [35] SMET, A.; FLAHO, B.; D'HERDE, K.; VANDAMME, P.; CLEENWERCK, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F. *Helicobacter heilmannii* sp. nov., isolated from feline gastric mucosa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 62: 299-306. 2012.
- [36] SUNG-WOO, H.; JONG-HYUN, Y.; TAE-HO, CH.; WOO-SUNG, J.; HWA-YOUNG, Y.; JOON-SEOK, CH.; CHEOL-YONG, H. PCR based detection of *Helicobacter* spp. in saliva, dental plaque, vomitus and feces of dogs. **J. Vet. Clin.** 25 (6): 447-451. 2008.
- [37] THIBAUT, J.; PAZ, V.; PAREDES, E.; ERNST, S. Determinación de la presencia de *Helicobacter* spp. en perros, mediante biopsia gástrica obtenida por endoscopia. **Rev. Cientif.** XVII (3): 217-225. 2007.
- [38] VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DRIESSEN, A.; DEBONGNIE, J.C.; BURETTE, A.; STOLTE, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. **J. Clin. Microbiol.** 43(5): 2256-2260. 2005.
- [39] VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; VANDAMME, P.; MAST, J.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 1559-1564. 2006.

- [40] WIINBERG, B.; SPOHR, A.; DIETZ, H.H.; EGELUND, T.; GREITER-WILKE, A.; MCDONOUGH, S.P.; OLSEN, J.; PRIESTNALL, S.; CHANG, Y.F.; SIMPSON, K.W. Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. infection. **J. Vet. Intern. Med.** 19: 4-14. 2005.
- [41] WGO/WEO Global Guideline Endoscope disinfection. World Gastroenterology Organization-World Endoscopy Organization. En línea: <http://www.worldgastroenterology.org/UsersFiles/file/guidelines/endoscope-desinfection-spanish-2011.pdf>.
- [42] WUPPENHORST, N.; VON LOEWENICH, F.; HOBMAIER, B.; VETTER-KNOLL, M.; MOHADJER, S.; KIST, M. Culture of a gastric non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* from the stomach of a 14-year-old girl. **Helicob.** 18 (1): 1-5. 2012.