

---

# **DETERMINACIÓN DE HELICOBACTER ESTOMACALES NO-H. PYLORI EN UNA POBLACIÓN CANINA DE VENEZUELA**

Polanco Rito<sup>1</sup>, Contreras Mónica<sup>2</sup>, Salazar Victor<sup>2</sup>, Chávez Victor<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación Quirúrgica Veterinaria, UNEFM

<sup>2</sup> Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

rirapoz@hotmail.com

## **Resumen**

La virulencia y patogenicidad del *Helicobacter* causan daños que van desde gastritis hasta carcinoma gástrico en el hombre (*H. pylori*) y en los animales (*Helicobacter* spp.). Además de *H. felis* en perros y gatos, también se ha reportado *H. pylori*, *H. helmannii* y *H. Bizzozeronii*, sugiriendo probabilidades de zoonóticas. Existe alta prevalencia de *helicobacter* no-*H. pylori* (HNHP) en perros y gatos y en Venezuela, oficialmente muy pocos estudios describen la presencia de *Helicobacter* spp., siendo el objetivo de este trabajo determinar las especies de *Helicobacter* que afectan a los caninos domésticos en el país a través de la identificación por estudio molecular de HNHP presentes en la mucosa gástrica de perros.

Esta investigación de tipo descriptiva bajo un diseño de campo, fue aplicada en 20 perros escogidos al azar de una población de 55 pacientes del Hospital Veterinario Universitario UNEFM con y sin historia clínica de afección gastrointestinal. Cada perro fue endoscopiado y se tomó muestras de *fundus* gástrico que fueron sometidas a detección de ADN de HNHP y secuenciación del gen 16S ARNr. Se detectó ADN de HNHP en 19 perros y las secuencias del gen 16S ARNr compartieron el 99-100% de identidad con los genes 16S ARNr de *H. felis* en 15 perros, *H. salomonis* en 2 y *Helicobacter* spp. en 2 perros. En Venezuela, existe alta prevalencia de HNHP en perros, y no necesariamente provocan lesiones en la mucosa gástrica y estadísticamente no hay significancia con las lesiones.

**Palabras clave:** perros, *Helicobacter* spp., gastritis, HNHP, *H. felis*, prevalencia

## Introducción

La familia Helicobacteraceae pertenece a la subdivisión épsilon de las proteobacterias, compuesta por los géneros *Helicobacter* y *Wolinella*. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en el tracto digestivo de animales y humanos [Bohr *et al.*, (2002)]. Actualmente, *Helicobacter spp.* se encuentran divididos en un grupo gástrico, que produce una potente ureasa intracelular y un grupo entérico, que comprende especies intestinales, hepáticas, biliares y gastrointestinales, que pueden ser ureasa positiva o negativa [Gueneau y Loiseaux-De Goér, (2002); Pot *et al.*, (2007)]. Además de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), también se ha aislado en humanos *H. bizzozeronii*, *H. heilmanni*, *H. pullorum*, *H. felis*, *H. canadensis*, *H. canis*, *H. sp flexispira* [García-Campo *et al.*, (2003)]. Recientemente ha sido reportado *H. ceturum* y una especie del género *Wolinella*, denominada *Wolinella africanus* [García-Amado *et al.*, (2007)]. Se han descrito hasta ahora al menos 38 especies diferentes entre muchos más que aguardan ser clasificados [Harbour y Sutton, (2008); Haesebrouck *et al.*, (2009)]. La infección ha sido reportada en animales domésticos, caninos y felinos salvajes [Kinsel *et al.*, (1998a); Kinsel *et al.*, (1998b); Erginsoy *et al.*, (2004)]. De esta variedad, hasta ahora, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus*, *H. baculiformis* y *H. suis*, se encuentran comúnmente en perros, gatos y cerdos [Baele *et al.*, 108

(2004); Baele *et al.*, (2009); Smet *et al.*, (2011)]. *H. heilmanni* y *H. felis* se han asociado con gastritis en animales, y principalmente en la mucosa antral de humanos (Fox, 2002). *Helicobacter felis* fue aislada por primera vez en estomago de gatos y posteriormente de perros [De Groote *et al.*, (2001)]. Morfológicamente difiere del resto de las especies por ser más espiralado y como característica morfológica ultraestructural presenta fibras periplásicas y entre 10 y 17 flagelos envainados, monopolares ligeramente excéntricos. Su taxonomía y filogenia ha demostrado que ser una especie muy próxima a *H. pylori*, cuya seroconversión es de respuesta inmunológica más energética que para *H. pylori* [Pastar *et al.*, (1991)]. El aislamiento de *H. pylori* en un grupo de gatos de laboratorio, planteó la posibilidad de transmisión a humanos [Simpson y Burrows, (1999)], razón por lo que los estudios moleculares, comienzan a dilucidar las posibilidades de transmisión de esta bacteria [Debongnie *et al.*, (2005); Gómez *et al.*, (2006)]. Según Harbour y Sutton (2008), el contagio en humanos sucede al menos por 11 diferentes especies y el riesgo está dirigido a veterinarios, agricultores y propietarios de mascotas. El método diagnóstico para *Helicobacter spp* deberá ser capaz de indicar la presencia o ausencia de la bacteria [Harris *et al.*, (2005)]. Estos métodos han sido utilizados en todas las especies de este género (Dewhirst *et al.*, (2005); Jergens *et al.*, (2009); Harbour y

Sutton, (2008)] y pueden ser invasivos y no invasivos [Happonen *et al.*, (1998); Strauss-Ayali *et al.*, (1999); Bravo *et al.*, (2000); Esteves *et al.*, (2000); Firman, (2000); Zerpa, (2003)]. Últimamente se han incluido dos métodos: uno, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para demostrar la presencia del ADN del *Helicobacter* spp en biopsias gástricas, aun cuando el número es bajo para ser detectado por otros métodos [Gómez *et al.*, (2006)]; secuenciación del RNA ribosomal para codificar los genes 16S y 23S permitiendo la diferenciación de *H. suis* gástrico de los demás especies *Helicobacter* no *H. pylori*, pero no puede distinguir entre *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii*, *H. cynogastricus* y *H. baculiformis* [Haesebrouck *et al.*, (2009); Haesebrouck *et al.*, (2011)] y el otro método, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que es una técnica utilizada para la detección de bacterias en su hábitat natural a través del empleo de la microscopía de fluorescencia en muestra preparadas y en este caso, de la mucosa gástrica de seres humanos o animales infectados [De Reuse *et al.*, (1997); Hwang *et al.*, (2002); Harbour y Sutton (2008); Jergens *et al.*, (2009)]. En animales, aunque la infección por *H. felis* es suficiente para iniciar la inflamación gástrica y atrofia, la erradicación bacteriana y la respuesta inmune sistémica a la infección están significativamente influenciadas por la microbiota gástrica preexistente y adquirida [Schmitz *et al.*, (2011)], la cual

puede ser confirmada por microscopía electrónica de transmisión [Simpson y Burrow, (1999); Lanzoni *et al.*, (2011)]. A nivel internacional es reportada alta prevalencia de NHPH gástrica en perros y gatos ( $> 70\%$ ) y no se correlacionan con los signos clínicos y la gravedad de gastritis [Happonen *et al.*, (1998)]. Las primeras investigaciones sobre género *Helicobacter* y su relación con mascotas domésticas en Venezuela, se iniciaron en el estado Lara con el estudio serológico de 22 perros de los cuales, el 77,28% (17 perros) resultó con anticuerpos contra *H. pylori* [Orellana, (1997)]. En una muestra de 43 perros sin distinción de raza, sexo ni edad perteneciente a una población canina del estado Aragua, Polanco *et al.*, (2006) reportan 100 % de positividad a la prueba de ureasa, 4.7% de perros con anticuerpos contra *H. pylori* y la presencia de bacterias espiraladas en mucosa gástrica por histoquímica. Un estudio en 30 perros pacientes del Hospital Veterinario “Dr. Guillermo Carrillo”, la Unidad de Investigación Quirúrgica Veterinaria UNEFM, inició una investigación en afecciones gastrointestinales, revelando 6.67% de pacientes positivos a la prueba rápida de determinación de anticuerpos contra *H. pylori* Jaimes, (2007) y 19 pacientes (63.33%) positivos a la prueba de ureasa Lora, (2007). La microscópica óptica constató que el 60% (18 perros), registrarón lesiones histopatológicas y en algunos casos, acompañados de bacterias espiraladas Muñoz y Varela, (2007), revelando por microscopía

electrónica la presencia de bacterias gástricas semejantes a especies del género *Helicobacter* en el 80% de las muestras analizadas (Oviol, 2007). Estos resultados no indicaron relación entre la presencia de bacterias y los daños registrados, ya que estas también fueron encontradas en pacientes con mucosa gástrica normal Polanco, (2008). En consecuencia, este trabajo tuvo como objetivo determinar las especies de *Helicobacter* que afectan a los caninos domésticos en el país a través de la identificación por estudio molecular de HNHP presentes en la mucosa gástrica de perros.

## Materiales y Métodos

Esta investigación fue de tipo descriptiva bajo un diseño de campo aplicada los municipios Miranda y Colina del estado Falcón, Venezuela y desarrollada en el Hospital Veterinario Universitario “Dr. Guillermo J. Carrillo H.” de la Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda”, estado Falcón. Involucró a 30 pacientes caninos entre 0, 8-9 años de edad, con signos clínicos de enfermedad del tracto digestivo superior, durante marzo y junio de 2009. En el 2010, fueron reclutados 20 de estos perros con el objetivo de realizar estudios de diagnóstico por biología molecular planteado en esta investigación.

## Procedimiento

Se realizaron técnicas diagnósticas por biología molecular para confirmar los registros obtenidos anteriores. Se tomaron 2 muestras de fundus gástrico

de cada perro con un endoscopio de fibra óptica estándar de 0,8 mm. Olympus, GFX II (Japón) siguiendo el protocolo de anestesia y de rutina endoscópica aprobado por el Comité de Ética UNEFM. Ambas muestras se utilizaron para extracción de ADN y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y fueron procesadas en Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para los ensayos de PCR se extrajo el ADN de las biopsias de fundus por medio de la QIAamp DNA Mini Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen Inc, Valencia, CA). El ADN de Helicobacteraceae y de *Helicobacter* se detectaron con ensayos de PCR específicos para la familia y el género dirigidas a 764 pb y 399 pb de los fragmentos del gen 16S ARNr [Germani *et al.*, (1997) y Bohr *et al.*, (2002)]. La presencia de ADN del *H. pylori* se descartó mediante ensayos específicos para un fragmento 294 pb del gen glmM y un fragmento de 128 pb del gen cagA [Kansau *et al.*, (1996), Rugge *et al.*, (1999)]. Las PCR se realizaron con el kit Ready to-Go PCR (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) en un modelo termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Hayward, C.A). Los amplificados se visualizaron mediante la ejecución de la mezcla de reacción en un gel de agarosa TBE (2,0%), tinción con bromuro de etidio, y la observación con un transiluminador UV. Para la secuenciación del gen 16S ARNr y análisis de la secuencia, los fragmentos específicos Helicobacteraceae del gen 16S ARNr (764 pb) amplificados fueron

procesados como lo describe [Bohr *et al.* (2002)]. Las diecinueve ampliaciones de ambas hebras purificados y secuenciados en las instalaciones de CeSAAN (IVIC, Altos de Pipe, Venezuela) con un secuenciador ABI PRISM™ 3130xl (Applied Biosystems, Foster, C.A). Las secuencias se compararon por el buscador BLAST con la compilación de secuencias de genes 16S ARNr disponibles en la biblioteca de búsqueda de nucleótidos GenBank y sus resultados fueron depositados bajo los números de acceso GQ181184-GQ181202. El análisis filogenético fue realizado, alineado y verificado en el sitio web greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>) según lo indicado por [DeSantis *et al.*, (2006a), DeSantis *et al.*, (2006b)] El árbol filogenético fue construido siguiendo lo citado por Takemura *et al.*, (2007).

Los análisis estadísticos: la detección de ADN por PCR, las secuencias de genes 16S ARNr de los HNHP, se evaluó mediante estadística descriptiva.

## Resultados y Discusión

En este estudio, la infección HNHP fue determinada por PCR. Los HNHP se identificaron en el 95% de los perros, coincidiendo con lo descrito por Haesebrouck *et al.*, (2009), que indican que en perros la prevalencia va desde 67 hasta 86% en sujetos sanos, y 61 a 100% en perros con vómitos. Fue detectado ADN HNHP por PCR para la familia Helicobacteraceae y *Helicobacter* específico del género en 18 perros con gastritis y en uno con mucosa gástrica normal, mientras que uno de los perros que presentó gastritis no se detectó HNHP (Tabla 1). *H. felis* fue la

especie mayormente encontrada en la base de secuencias de genes 16S ARNr, coincidiendo esto con los estudios de Eaton *et al.*, (1996), quienes sugieren que *H. felis* es un microorganismo común en perros. La prevalencia de 75% para *H. felis*, no concuerdan con lo citado en investigaciones realizadas con perros de diferentes países (Bélgica, Dinamarca y Finlandia) reportados por [Hwang *et al.*, (2002); Van den Bulck *et al.*, (2005); Wiinberg *et al.*, (2005)], en donde refieren que la prevalencia *H. felis* oscilan entre 3.6 a 22.2%; por otro lado, sostienen también que *H. bizzozeronii* es el organismo con prevalencia que va desde 55.6 hasta 70.0%, sin embargo, esta especie no fue identificado en las muestras caninas de nuestro estudio. Los PCR utilizados en este estudio contenían 600 a 711 pb de amplicones que compartían 99-100% de identidad de secuencia con los genes 16S ARNr de *H. felis*, *H. salomonis* y *Helicobacter spp.*, coincidiendo este hallazgo con lo citado por [Haesebrouck *et al.*, (2011); Smet *et al.*, (2011)]. Estas especies están muy relacionadas fenotípica y filogenéticamente tal como lo describen [Beale (2004) Takemura *et al.*, (2009)], teniéndose en cuenta además que algunos animales puede ser a menudo infectados por múltiples especies HNHP gástrica tal como lo describen [Takemura *et al.*, (2009); Van den Bulck *et al.*, (2005)]. Las secuencias fueron 99 a 100% idénticas a las secuencias del gen 16S ARNr de *H.*

*felis* en 15 perros (75%), *H. salomonis* en 2 perros (10%), y especies de *Helicobacter*. en 2 perros (10%). La secuenciación del gen 16S ARNr fue específico y sensible para la detección de estos HNHP.

**Tabla 1. Detección de ADN de NHPH en los perros evaluados.**

<b>Helicobacter no-H. pylori (HNHP)</b>	<b>Número de perros</b>	<b>%</b>
H. felis	15	75
H. salomonis	2	10
Helicobacter spp.	2	10
Negativos	1	5

## Conclusiones

Se logró demostrar la presencia de *Helicobacter* no-*H. pylori* (HNHP) en la mucosa gástrica de los perros domésticos al identificar el ADN bacteriano por técnicas moleculares. La mucosa gástrica de los perros domésticos puede ser colonizada por varias especies de HNHP. El *H. felis* es la especie identificada con mayor frecuencia, seguido de *H. salomonis* y *Helicobacter spp.*

## Referencias Bibliográficas

Baele, M.; Pasmans, F.; Flahou, B.; Chiers, K.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. (2009). Non-*Helicobacter pylori* helicobacters detected in the stomach of humans comprise several naturally occurring *Helicobacter* species in animals. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55:306-313.

Baele, M.; Van den Bulck, K.; Decostere, A.; Vandamme, P.; Hanninen, M.; Ducatelle, R. (2004). Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. *J. Clin. Microbiol.* 42:1115-1122.

Bohr, R.; Primus, A.; Zagoura, B.; Glasbrenner, T.; Malfertheiner, P. (2002). A Group-Specific PCR Assay

for the detection of helicobacteraceae in human gut. *Blackwell Science Ltd. Helicobacter*. 7: 378-383.

Bravo, L.; Cortés, A.; Carrascal, E.; Correa, P.; Ordóñez, N. (2000). Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico, [en línea]. Recuperado el 15 de Mayo de 2007, de <http://colombiamedica.univalle.edu.co/VOL31NO3/seroprevalencia.html/>

De Groote, D.; Haesebrouck, F.; van Doorn, L.J.; Vandamme, P.; Ducatelle, R. (2001). 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):1197-1999.

De Reuse, H.; Labigne, A.; Mengin-Lecreux, D. (1997). The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* 179:3488-3493.

Debongnie, J.; Burette, A.; Stolte, M.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. (2005). Identification of non-*Helicobacter pylori*

- spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *J. Clin. Microbiol.* 43(5): 2256-2260.
- DeSantis, TZ Jr.; Hugenholtz, P.; Keller, K.; Brodie, EL.; Larsen, N.; Piceno, YM. (2006). NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 34: 394-399.
- DeSantis, TZ.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, EL.; Keller, K. (2006). Greengenes, a chimera checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5069-5072.
- Dewhirst, FE.; Shen, Z.; Scimeca, MS.; Stokes, LN.; Boumenna, T. (2005) Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics. *J. Bacteriol.* 187: 6106-6118.
- Domínguez-Bello, MG.; Michelangeli, F.; Romero, R.; Beker, B.; Lara, D.; Morera, C. (1997). Modification of Christensen urease test as an inexpensive tool for detection of *Helicobacter pylori*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28:149-152.
- Eaton, KA.; Dewhirst, FE.; Paster, BJ.; Tzellas, N.; Coleman, BE.; Paola, J. (1996) Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *J. Clin. Microbiol.* 34:3165-3170.
- Erginsoy, S.; Sozmen, M.; Ozcan, K.; Tuzcu, M. (2004). Occurrence of *Helicobacter* Infection in the gastric mucosa of free-living red foxes (*Vulpes vulpes*). *J. Wildl Dis.* 40(3): 548-554.
- Esteves, M.; Schrenzel, M.; Marini, R.; Taylor, N.; Xu, S. (2000). *Helicobacter pylori* Gastritis in Cats with Long-Term Natural Infection as a Model of Human Disease. *Am. J. Pathol.* 156:709-720.
- Firman, G. (2002). Pruebas diagnósticas para detección de infección por *Helicobacter pylori*. Avances Médicos, [en línea]. <http://www.intermedicina.com>.
- Fox, JG. (2002). The non-H. pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*. 50:273-283.
- García-Amado, A.; Al-Soud, W.; Borges, P.; Contreras, M.; Cedeño, S.; Baéz-Ramirez, E.; Domínguez-Bello, M.; Wadström, T.; Gueneau, P. (2007). Non-pylori Helicobacteraceae in the Upper Digestive Tract of Asymptomatic Venezuelan Subjects: Detection of *Helicobacter cетorum* like and *Candidatus Wolinella africanus* -like DNA. *Helicobacter*. 12: 553-558.
- García-Campos, J.; Alarcón, T.; López-Brea, M. (2003). Infección por *Helicobacter pylori*. Servicio de Microbiología Hospital Universitario de La Princesa, [en línea]. <http://Madrid.Biopress.net>. N. 8.
- Germani, Y.; Dauga C.; Duval P.; Huerre M.; Levy M.; Pialoux G. (1997). 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.
- Gómez, G.; Leonardo, F.; Orozco, P.; Salas S.; Sergio, A. (2006). *Helicobacteriosis canina y felina*. Veterinaria México. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México. 37: 97-116.

- Gueneau, P.; Loiseaux-De Goér, S. (2002). Helicobacter: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. *Infection, Genetics and Evolution.* 1:215–223.
- Haesebrouck, F.; Pasmans, F.; Flahou, B.; Chiers, K.; Baele, M.; Meyns, T. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:202-23.
- Happonen, I.; Linden, J.; Saari, S.; Karjalainen, M.; Hanninen, ML.; Jalava, K. (1998). Detection and effects of helicobacters in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213:1767-1774.
- Harbour, S.; Sutton, P. (2008). Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 122:191-203.
- Harris, P.; Serrano, C.; González, C. (2005). Utilidad del diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Rev. Chil. Pediatr.* 76 (3): 241-251.
- Hwang, C.; Han, H.; Youn, H. (2002). Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. *J. Vet. Sci.* 3:123-133.
- Jaimes, J. (1997). Determinación de anticuerpos contra *Helicobacter pylori* en caninos del Hospital Veterinario Universitario “Dr. Guillermo Carrillo”. Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda”. Coro, Falcón. Venezuela. Trabajo Especial de Grado. 52 pp.
- Jergens, AE.; Pressel, M.; Crandell, J.; Morrison, JA.; Sorden, SD.; Haynes, J. (2009). Fluorescence in situ hybridization confirms clearance of visible *Helicobacter* spp. associated with gastritis in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 23:16-23.
- Kansau, I.; Raymond, J.; Bingen, E.; Courcoux, P.; Kalach, N.; Bergeret, M. (1996). Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res. Microbiol.* 147:661-669.
- Kinsel, M.J.; Briggs, M.B.; Venzke, K.; Forge, O.; Murnane, R.D. (1998a). Gastric spiral bacteria and intramuscular sarcocysts in African lions from Namibia. *J. Wildl. Dis.* 34:317–324.
- Kinsel, M.J.; Kovarik, P.; Murnane, R. D. (1998b). Gastric spiral bacteria in small felids. *J. Zoo Wildl. Med.* 29: 214–220.
- Lanzoni, A.; Faustinelli, I.; Cristofori, P.; Luini, M.; Simpson, K.; Scanziani, E.; Recordati, C. (2011). Localization of *Helicobacter* spp. in the fundic mucosa of laboratory Beagle dogs: an ultrastructural study. *Vet. Res.* 42(1): 42, [en línea]. Recuperado el 2 de Marzo de 2011, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/10.1186/1297-9716-42-42>.
- Lora, M. (2007). Determinación Bioquímica de *Helicobacter* en caninos del Hospital Veterinario Universitario “Dr. Guillermo Carrillo” Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda”. Coro, Falcón. Venezuela. Trabajo Especial de Grado. 46 pp.
- Muñoz, L.; Varela, R. (2007). Evaluación macroscópica y microscópica de lesiones gástricas en caninos del Hospital Veterinario Universitario “Dr. Guillermo Carrillo” Universidad Nacional Experimental “Francisco de

- Miranda". Coro, Falcón. Venezuela. Trabajo Especial de Grado. 65 pp.
- Orellana, N. (1997). Determinación de la respuesta serológica para *Helicobacter pylori* en caninos mediante la técnica Pyloriset Dry. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato de Ciencias Veterinarias. Barquisimeto, Lara. Venezuela. Trabajo de Ascenso. 65 pp.
- Oviol, A. (2007). Determinación por microscopía electrónica de bacterias gástricas espiraladas en caninos del Hospital Veterinario Universitario "Dr. Guillermo Carrillo" Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda". Coro, Falcón. Venezuela. Trabajo Especial de Grado. 58 pp.
- Pastar, B. J.; Lee, A.; Fox, G.; Dewhirst, F. E.; Tordoff, L. A.; Fraser, G. J.; O'Rourke, J. L. (1991). Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 31-38
- Polanco, R. (2008). Lesiones gástricas y presencia de bacterias espiraladas en mucosa estomacal de pacientes caninos del Hospital Veterinario Universitario "Dr. Guillermo Carrillo". Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda". Coro, Falcón. Venezuela. Trabajo de Ascenso. 68 pp.
- Polanco, R.; Bermúdez, V.; Vivas, I.; Saldivia, C.; Saldivia, V.; Arévalo, L. (2006). Lesiones gástricas asociadas a la presencia de bacterias del género *Helicobacter* en caninos. Revista Científica FCV-LUZ. XVI (6): 585-592.
- Pot, R.; Stoof, J.; Nuijten, P.; Haan, L.; Loeffen, P.; Kuipers, E.; Van Vliee, A.; Kusters, J. (2007). UreA2B2: a second urease system in the gastric pathogen *Helicobacter felis*. J. Immunol. Med. Microbiol. 50: 273-279.
- Schmitz, J.; Durham, C.; Schoeb, T.; Soltau, T.; Wolf, K.; Tanner, S.; McCracken, V.; Lorenz, R. (2011). *Helicobacter felis* asociada a la enfermedad gástrica en microbiota de restringidos ratones. J. Histochem. Cytochem. 59(9):826-841.
- Simpson, K.; Burrows, C. (1999). Gastric *Helicobacter* spp. Infection to gastric disease in dogs and cats. J. Vet. Intern. Med. 14 (2): 223-227.
- Smet, A.; Flahou, B.; D'Herde, K.; Vandamme, P.A.; Cleenwerck, I.M.; Ducatelle, R. (2011). *Helicobacter heilmannii* sp. nov., isolated from feline gastric mucosa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62 (2): 299-306, [en línea]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421932> doi:10.1099/ijss.0.029207-0.
- Strauss-Ayali, D.; Simpson, K.; Schein, A.; McDonough, P.; Jacobson, R.; Valentine, By Peacock, J. (1999). Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* spp. and uninfected dogs. J. Clin. Microbiol. 37 (5): 1280-1287.
- Takemura, L.; Camargo, P.; Alfieri, A.; Bracarense, A. (2009). *Helicobacter* spp. in cats: association between infecting species and epithelial proliferation within the gastric lamina proper. J. Comp. Path. 141:127-134.
- Zerpa, R. (2003). Rompiendo paradigmas en la observación microscópica. Comunicación Preliminar. Anales de la Facultad de Medicina Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 4 (64): 267 – 273.