



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LETÍCIA YAMASAKI

**LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS:  
OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE *Helicobacter* spp.**

---

Londrina  
2006

**LETÍCIA YAMASAKI**

**LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS:  
OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE *Helicobacter* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense

Londrina  
2006

**LETÍCIA YAMASAKI**

**LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS:  
OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE *Helicobacter* spp.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro  
Bracarense - Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alice Fernandes Alfieri

---

Prof. Dr. Raimundo Alberto Tostes

Londrina, 29 de junho de 2006.

O presente trabalho foi realizado junto aos Laboratórios de Anatomia Patológica Veterinária e de Virologia Veterinária, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da Professora Doutora Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento dessa dissertação foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa relacionados abaixo:

- Fundação Araucária
- Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
- CNPq - CAPES

## **DEDICATÓRIA**

Por todos os sorrisos que deixei de presenciar,  
pela saudade que está impressa em cada uma  
dessas páginas, eu dedico este trabalho  
aos meus pais, Paulo e Maria, e aos meus sobrinhos  
Leandro e Alice, que são a luz da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, que amo incondicionalmente. À minha mãe e meu pai por todo o sacrifício a que se submeteram para que eu pudesse seguir meu caminho. Aos meus irmãos que contribuíram para meu crescimento emocional. Aos meus sobrinhos Leandro e Alice, que me confortam com o carinho que sentem por mim. Sempre senti apoio, confiança e amor, mesmo nas adversidades que passaram por nosso caminho.

À Professora Ana Paula, que me orientou desde os primeiros passos na patologia e que me incentivou a concluir mais esta etapa da minha vida. Agradeço toda a atenção e confiança a mim dispensada.

À Professora Alice Alfieri, que aceitou fazer parte deste momento tão importante da minha vida, como componente da minha banca de defesa. Sempre serei grata ao Professor Raimundo Alberto Tostes, que também aceitou participar deste evento, e que foi de grande importância na minha vida profissional.

Ao Professor Antonio Carlos Faria dos Reis, pela pessoa especial e querida que é. Sem seu incentivo, lá no primeiro estágio da graduação, eu não teria trilhado este caminho.

Aos professores Pedro Luiz e Amauri Alfieri, que nos momentos de desespero e de incertezas souberam me reanimar e contribuíram muito para a realização deste trabalho.

A todos meus amigos de laboratório e estagiários, que participaram de diversas formas, quer seja do trabalho como da diversão. Eu sempre serei grata pela amizade e carinho: Cláudia, Kleber, Karina Keller, Tizianne, Clarissa, Victor, Raquel, João, Reginaldo, Juliana, Kerley, Maria, Ademir, Ludmila e Shin.

Aos amigos que me acompanham desde o princípio: Juliana Galhardo (amiga desde sempre), Eduardo Fioratti, Eduardo Afonso, Eleine, Michele, Kátia, Paula (as carrapatinhas), Vanessa (sempre carismática e amiga), Bibiana, Mauro, Ronaldo e Melissa. Nunca vou esquecer os momentos especiais que passamos juntos, estudando ou nos divertindo, conversando ou brigando. Obrigada pela amizade.

Ao Elder, meu amor. As pessoas tendem a desabafar as tensões e frustrações justamente naqueles que mais amam, e eu sou uma destas. Agradeço os dias que se tornaram mais belos por sua causa. Um dia saberei retribuir a paciência e companheirismo.

Grande parte das pessoas que passaram por minha vida nesses anos não sabem a real importância que têm. Gostaria que soubessem do meu agradecimento a vocês. Em cada linha, escrita e reescrita, que está impressa nessas páginas vocês estavam presentes.

*“Sofremos demasiado pelo pouco que nos falta e  
alegramo-nos pouco pelo muito que temos”.*

*W. Shakespeare*

YAMASAKI, L. **Lesões gástricas em suínos: ocorrência e relação com a presença de *Helicobacter* spp.** 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## RESUMO

A descoberta da associação entre a infecção pelo *Helicobacter pylori* no homem e a presença de gastrites, úlceras e neoplasias como adenocarcinoma e linfoma gástrico despertou um grande interesse a respeito da participação de bactérias no desenvolvimento de gastropatias. Apesar de bem conhecida há algumas décadas, a patogenia da doença gástrica em suínos não está bem elucidada. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma relação entre o *Helicobacter* spp. e os achados anátomo-histopatológicos da mucosa gástrica de suínos de abate. Foram colhidos e examinados 236 estômagos de suínos. As lesões macroscópicas da *pars esophagea* e região glandular foram classificadas conforme a severidade em graus 0, 1, 2 e 3. Fragmentos das regiões aglandular e glandular foram processados para exame histológico e para pesquisa de *Helicobacter* spp. Dos 236 estômagos colhidos, foram selecionadas por conveniência 67 amostras, que foram então submetidas a exame histopatológico da *pars esophagea* e também a reação em cadeia pela polimerase (PCR). Do total de estômagos analisados, 203 (86.1%) apresentavam algum tipo de alteração macroscópica. A ocorrência de erosões e úlceras na região aglandular foi observada em 104 (44.1%) animais e na região glandular em 22 (9.3%). A ulceração na região gastroesofágica estava presente em 45 animais (19.1%). Utilizando a coloração de *Warthin-Starry*, observamos *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de 112 (47.5%) amostras, destas, 54 (48.2%) foram classificadas como grau 2 ou 3 (*pars esophagea*) e 58 (51.8%) como grau 0 e 1. A análise estatística revelou que não há diferença significativa entre suínos com ou sem erosões ou úlceras gastroesofágicas em relação à presença de *Helicobacter* spp. Das 67 amostras analisadas pela PCR, 47 (70,1%) mostraram resultado positivo pela PCR. A alteração microscópica mais freqüente nesses animais foi a erosão epitelial, com 40,2% das amostras analisadas. A freqüência de ulceração de mucosa de *pars esophagea* foi de 11,9% em animais em que o diagnóstico de *Helicobacter* spp foi positivo. As alterações mais freqüentes foram degeneração epitelial e o alongamento de papilas, observada em 83,5% das amostras analisadas. Em 77,5% das amostras observou-se paraqueratose da *pars esophagea* e em 61,1%, hiperplasia epitelial. Após a análise estatística observou-se que não há associação entre a presença de *Helicobacter* spp e as lesões gástricas macroscópicas ou histológicas de estômagos suínos. Com este estudo concluímos que *Helicobacter* spp não é um agente relacionado às lesões gástricas de suínos em idade de abate do Estado do Paraná.

**Palavras-chave:** *Helicobacter* spp. *Pars esophagea*. Suínos. Lesões gástricas.

## LISTA DE TABELAS

### **Lesões gástricas em suínos: ocorrência e relação com o gênero, peso ao abate e presença de *Helicobacter* spp.**

**Tabela 1** – Ocorrência de lesões de grau 1, 2 e 3 no estômago de suínos oriundos do Estado do Paraná, segundo o gênero. Londrina, Paraná, 2006..... 26

**Tabela 2** – Presença de *Helicobacter* spp na mucosa gástrica de suínos de abate com diferentes graus de lesão. Londrina, PR, 2006. .... 28

### **Alterações histológicas de *pars esophagea* de estômagos de suínos e sua relação com a presença de *Helicobacter* spp.**

**Tabela 1** – Distribuição de alterações histológicas de *pars esophagea* de suínos em idade de abate do Estado do Paraná, Brasil. 2006..... 41

**Tabela 2** - Distribuição de alterações histológicas de *pars esophagea* e relação com a identificação de *Helicobacter* spp pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em suínos em idade de abate do Estado do Paraná, Brasil. 2006. .... 43

## LISTA DE FIGURAS

### Lesões gástricas em suínos: ocorrência e relação com o gênero, peso ao abate e presença de *Helicobacter* spp.

- Figura 1** – Graus de lesão 2 e 3 de estômago de suíno em idade de abate (setas); *pars esophagea*. Londrina, Paraná, 2006. .... 26
- Figura 2**- Fotomicrografia de estômago de suíno corado pelo método de *Warthin-Starry*. Notar a presença de bactérias de formato espiralado (seta) na glândula gástrica, objetiva 100X. Londrina, Paraná, 2006. .... 26

### Alterações histológicas de *pars esophagea* de estômagos de suínos e sua relação com a presença de *Helicobacter* spp.

- Figura 1** - Fotomicrografia de *pars esophagea*, suíno. Alongamento de papilas epiteliais e paraqueratose. Hematoxilina-Eosina, objetiva 10X. Londrina, Paraná, 2006. .... 40
- Figura 2** – Fotografia digitalizada de gel de agarose com resultados de PCR para gênero *Helicobacter* spp. (400 pb) ..... 42
- Figura 3** – Fotomicrografia de *pars esophagea*, suíno. Proliferação de folículos linfóides em submucosa, epitélio degenerado e com paraqueratose grave. Úlcera acompanhada de intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Hematoxilina-Eosina, objetiva 10X. Londrina, Paraná, 2006. .... 44

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 REVISÃO DE LITERATURA: LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS:<br/>OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE<br/>HELICOBACTER SPP. ....</b> | <b>12</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>  | <b>19</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....   | 19        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 19        |
| <b>3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO .....</b>  | <b>20</b> |
| 3.1 LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS: OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM O GÊNERO, PESO AO<br>ABATE E PRESENÇA DE HELICOBACTER SPP .....          | 20        |
| Resumo .....  | 21        |
| Abstract.....   | 22        |
| Introdução.....   | 23        |
| Material e Métodos.....   | 24        |
| Resultados.....   | 25        |
| Discussão .....   | 28        |
| Referências .....   | 31        |
| 3.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE PARS ESOPHAGEA DE ESTÔMAGOS DE SUÍNOS E SUA<br>RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE HELICOBACTER SPP.....     | 34        |
| Resumo .....  | 35        |
| Abstract.....   | 36        |
| Introdução.....   | 37        |
| Material e Métodos.....   | 38        |
| Resultados.....   | 40        |
| Discussão .....   | 44        |
| Referências .....   | 47        |
| <b>4 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>51</b> |

## **1 REVISÃO DE LITERATURA: LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS: OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE *HELICOBACTER* SPP.**

As lesões envolvendo a *pars esophagea* de suínos são descritas a partir da década de 50 em diversos países, sendo associadas à produção intensiva. O impacto econômico das doenças gástricas em suinocultura se dá pela taxa de mortalidade associada à forma hemorrágica aguda em matrizes (KOWALCZYK, 1969) e pelas perdas econômicas decorrentes de anemia crônica, anorexia e diminuição do ganho de peso (O'BRIEN, 1993). Entretanto, existem controvérsias visto que Guise *et al.* (1997) e Friendship *et al.* (1999) não constataram relação entre ulceração gástrica e queda no desempenho.

Segundo Carvalho, *et al.* (1999) as alterações como paraqueratoses, erosões e ulcerações gástricas são encontradas em 43,7 a 77,4% da população suína do Brasil. Dentre estas, as úlceras gástricas são reconhecidas como uma importante doença em suínos (MUGGENBURG *et al.*, 1964; ARGENZIO e EISEMANN, 1996), com ocorrência variando de 13% (ARGENZIO e EISEMAN, 1996) em um estudo abrangendo vinte países e 22,9% no Reino Unido (GUISE *et al.*, 1997). No Brasil, a ocorrência dessa lesão específica varia de 5,5% a 23,5% (CIACCI *et al.*, 1991; ROPPA *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999).

Desde os primeiros estudos sobre as doenças gástricas de suínos, observou-se que as lesões na *pars esophagea* eram mais freqüentes do que na região glandular (MUGGENBURG *et al.*, 1964). A maior suscetibilidade desta região à injúria é atribuída a falta do muco protetor produzido pelo epitélio mucossecretor, presente na região glandular, e a incapacidade do epitélio estratificado produzir quantidade suficiente de bicarbonato para neutralizar o ácido gástrico (EMBAYE *et al.*, 1990). O número de animais que apresentam ulcerações em ambas as regiões é pequeno, sugerindo que os dois processos devem ter etiologias distintas (CARVALHO *et al.*, 1999).

Apesar de estudada há algumas décadas, a fisiopatologia da doença ainda não está totalmente esclarecida e fatores como infecção, intoxicação, nutrição, estresse, acidez gástrica e alterações hormonais tem sido relacionados a patogenia das lesões gástricas de suínos (O'BRIEN, 1993; MONTICELLI *et al.*, 1995; QUEIROZ *et al.*, 1996; ARGENZIO e EISEMANN, 1996; GUISE *et al.*, 1997).

Dentre estes itens, os relacionados à nutrição são os mais estudados. Este fator aliado à maior incidência das úlceras no epitélio estratificado sugere um mecanismo de injúria no qual a defesa desta região seja falha. Quando há elevada ingestão de carboidratos

fermentáveis como o milho, ocorre um aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia curta na porção proximal do estômago de suínos (ARGENZIO e SOUTHWORTH, 1975). Acredita-se que durante a fermentação gástrica destes compostos, metabólitos ácidos (ácido láctico, acético) sejam produzidos, reduzindo o pH gástrico. Esta injúria metabólica rompe a homeostasia celular (transporte de sódio), levando ao edema celular agudo, degeneração e necrose (ARGENZIO e EISEMANN, 1996). Assim, a ulceração da região gastresofágica seria o resultado da ação direta destes metabólitos ácidos e dos íons de hidrogênio secretados pelas células parietais.

A granulometria da ração é considerada um fator ulcerogênico, pois quanto menores as partículas, maior a frequência das lesões (O'BRIEN, 1993; MONTICELLI *et al.*, 1995). Esta associação é baseada na incapacidade das partículas menores de limitar a acidez à região glandular, pois a pequena granulometria permite o refluxo ácido para a *pars esophagea* (KRAKOWKA *et al.*, 1998).

No Brasil, estudos demonstraram a influência do gênero na frequência de úlceras gastresofágicas, sendo esta maior em machos castrados do que em fêmeas ou machos inteiros (MONTICELLI *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999). Porém, em estudos no exterior, outros autores não observaram esta influência (GUISE *et al.*, 1997; FRIENDSHIP *et al.*, 1999).

Recentemente as doenças gástricas têm sido associadas a presença de bactérias de formato espiralado que colonizam a mucosa gástrica. Estas bactérias parecem adaptadas a um nicho ecológico específico: o muco gástrico. As bactérias do gênero *Helicobacter* são espiraladas, curvas ou ocasionalmente cocóides, gram negativas e habitam as glândulas, as células parietais e o muco da mucosa gástrica (FOX e LEE, 1997). São bactérias altamente especializadas e que produzem urease intensamente. A urease é responsável pela degradação da uréia em bicarbonato e amônia, promovendo o tamponamento do ácido gástrico (McGEE *et al.*, 1999).

A descoberta da associação entre a infecção pelo *Helicobacter pylori* no homem e a presença de gastrites, úlceras e neoplasias como adenocarcinoma e linfoma gástrico despertou um grande interesse a respeito da participação de bactérias no desenvolvimento de gastropatias (SIMPSON *et al.*, 1999). O *Helicobacter pylori* foi a primeira espécie a ser identificada colonizando estômagos de seres humanos e está associado a doenças gástricas como gastrites, úlceras e câncer gástrico (MARSHAL e WARREN, 1984). Atualmente sabe-se que as diferentes espécies de *Helicobacter* foram identificadas da mucosa gástrica de diversas espécies animais com ou sem doenças gástricas (FOX e LEE,

1997; SIMPSON *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 1996; CANTET *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003).

Os fatores de virulência das bactérias do gênero *Helicobacter* (especificamente do *H. pylori*) foram estudados por diversos autores. A descoberta de proteínas secretadas pelo *H. pylori* e suas funções na patogenia da doença gástrica foram de grande contribuição para o entendimento das gastropatias em humanos. As citotoxinas VacA e CagA são responsáveis pela injúria ao epitélio estomacal devido a sua capacidade de produção de “poros” nas membranas celulares, fatores de aderência celular, vacuolizações citoplasmáticas indução de apoptose, imunossupressão local, entre outros (BLASER e ATHERTON, 2004; McGEE *et al.*, 1999). Aproximadamente 50% das cepas de *H. pylori* produzem as toxinas ativas com capacidade de lesar membrana celular o que pode explicar os diferentes tipos de lesão epitelial provocada por *H. pylori* em humanos.

São raros os estudos que identificam os fatores de patogenicidade das bactérias do gênero *Helicobacter* de suínos. Utriainen e Hänninen (1998), em seu estudo envolvendo 102 biópsias de estômagos suínos, identificaram o gene *vacA* em 28 amostras. Este estudo demonstrou que há evidências do gene *vacA* em *Helicobacter* spp de origem suína, porém sem relatar as possíveis lesões macro ou microscópicas em estômagos colonizados por *Helicobacter* spp. produtor de citotoxina VacA.

A infecção por *H. pylori* em humanos é amplamente disseminada, sendo que de 30 a 50% da população mundial apresentam a bactéria (TAYLOR e BLASER, 1991). As taxas de infecção apresentam-se mais elevadas em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos (FRIENDSHIP *et al.*, 1999), podendo atingir 80 a 90% em países subdesenvolvidos. A alta prevalência da infecção por *H. pylori* está relacionada à hábitos culturais e de higiene (TAYLOR e BLASER, 1991). No entanto, apenas 10 a 15% dos infectados apresentam sinais clínicos de doença gástrica. As vias de infecção propostas são a oral-oral, a fecal-oral, pela ingestão da água e alimentos contaminados, podendo haver participação de vetores como moscas (GRUBEL *et al.*, 1997).

Também em caninos e felinos a prevalência da infecção por *Helicobacter* spp. é alta, variando de 41 a 100% em gatos e 67 a 100% em cães clinicamente saudáveis (SIMPSON *et al.*, 2000). Com base no resultado de três diferentes testes, CAMARGO (2002) constatou que são altas as taxas de infecção em gatos e cães domiciliados, tanto hígidos quanto portadores de doença gastrointestinal. Este estudo demonstrou que, no Brasil, a prevalência de *Helicobacter* spp. é de 95,56 % em gatos e de 88,57 % em cães.

Em suínos destinados ao abate, identificou-se na mucosa gástrica uma bactéria de formato espiralado, denominada primordialmente de *Gastropirillum suis* (BARBOSA *et al.*, 1995) em decorrência de sua similaridade morfológica a outros *Gastropirilla* encontrados no homem e outras espécies. Estas bactérias apresentaram 99,5% de homologia com o *H. heilmannii*, sendo então classificadas dentro do gênero *Helicobacter* (MENDES *et al.*, 1994; FRIENDSHIP *et al.*, 1999). Também ROOSENDAAL *et al.* (2000) em seu estudo constataram que a presença de *H. heilmannii* (determinado através de análise de gene específico 16-S) era predominante em estômagos de suínos, e que sua presença era associada a lesões ulcerativas de *pars esophagea*.

Outra linha de investigação propõe que o *H. heilmannii* é na verdade um agente específico de suínos, sugerindo então a nova nomenclatura "*Candidatus Helicobacter suis*". A análise genética revelou que estas bactérias possuem 99.5% de homologia (De GROOTE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003). Estes autores utilizaram várias metodologias de detecção da bactéria, como imunistoquímica, *Western blot*, *Southern blot*, inoculação em camundongos, microscopia eletrônica, ELISA, entre outras. De GROOTE *et al.* (2000) afirmaram que a detecção do "*Candidatus Helicobacter suis*" pela PCR foi o método diagnóstico mais sensível, se comparado ao exame histopatológico e ao teste da urease. Apesar de ser naturalmente infectados por *H. heilmannii*, suínos gnotobióticos foram utilizados com sucesso como modelo experimental para a colonização de *H. pylori* (KRAKOWKA *et al.*, 1996).

Recentemente KRAKOWKA *et al.* (2005) relataram o isolamento de uma nova espécie de *Helicobacter* colonizando estômagos de suínos. Após o isolamento microbiológico, observaram colônias com características compatíveis com *Helicobacter* spp. e este isolado era estruturalmente e imunologicamente semelhante a *H. pylori* isolado de seres humanos. Os autores denominaram este isolado de *Helicobacter pylori – like* de origem suína.

Em relação à ocorrência da bactéria no estômago de suínos, verificou-se que os percentuais de infecção podem apresentar grandes diferenças. De acordo com QUEIROZ *et al.* (1990) e GRASSO *et al.* (1996) este percentual variou entre 9,4 e 10,8%, respectivamente. Estes autores constataram uma grande alteração na presença de *Helicobacter* em diferentes granjas, sugerindo a necessidade de estudos abrangendo um grande número de granjas para determinar a prevalência da infecção.

A partir dos anos 90, vários estudos foram realizados com o intuito de se estabelecer uma causa infecciosa para o desenvolvimento das lesões gástricas em suínos. BARBOSA *et al.* (1995) verificaram diferença significativa entre suínos com e sem úlcera

gástrica em relação à presença de bactérias espiraladas. Também QUEIROZ *et al.* (1996) observaram a presença de *H. heilmannii* em 100% dos estômagos com úlceras gastresofágicas e em 30% dos estômagos sem lesão, sugerindo que a bactéria é um importante fator na patogenia destas lesões.

Utilizando o exame histopatológico e a PCR, CANTET *et al.* (1999) observaram, respectivamente, 58% e 80% de positividade para *Helicobacter* spp. num total de 60 amostras de estômagos suínos. Através da PCR, YOUNG *et al.* (2001) encontraram resultado positivo em 63,8% das amostras, sendo que 95% das amostras com presença de úlceras ativas ou crônicas em região gastresofágica e 85% das amostras com erosões em região gastresofágica mostraram-se positivas para a PCR.

MALL, *et al.* (2004) observaram que as lesões histológicas mais comumente encontradas foram agregados linfóides em submucosa, principalmente em região de transição entre *pars esophagea* e região glandular. Em seu estudo, afirmam não haver correlação consistente entre a infecção por *H. heilmannii* e ulceração de *pars esophagea*.

A presença de bactérias espiraladas em 42% de estômagos sem lesão e 18% com lesão foi constatada em um estudo envolvendo 199 suínos (MELNICHOUK *et al.*, 1999). Estes autores afirmam não haver relação entre a infecção por *Helicobacter* spp. e as lesões gástricas.

KRAKOWKA, *et al.* (2005), relataram que suínos inoculados com *H. heilmannii* não apresentavam lesões microscópicas significativas enquanto que suínos inoculados com *H. pylori* – like de origem suína causam doença gástrica grave. Atualmente, admite-se que *H. heilmannii* é a espécie característica de suínos ("*Candidatus Helicobacter suis*") (De GROOTE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003). Estes resultados conflitantes demonstram que ainda não há uma conclusão definitiva sobre o papel do *Helicobacter* spp. na fisiopatologia das úlceras gástricas em suínos, bem como sobre as espécies que os infectam.

Em relação aos métodos diagnósticos, utilizam-se técnicas não invasivas como o teste respiratório para verificação de amônia no ar expirado ou provas sorológicas (SEIDEL *et al.*, 1999). Os métodos invasivos baseiam-se no exame de fragmentos do estômago que têm como vantagem a identificação do agente e a análise da lesão da mucosa (ANDERSEN *et al.*, 1998).

Os testes que podem ser realizados utilizando-se amostras de mucosa gástrica incluem a cultura em microaerofilia. Os relatos sobre esta técnica têm sido controversos. De acordo com NEIGER *et al.* (1996) o cultivo microbiológico apresenta alta especificidade e baixa sensibilidade, sendo que o *H. heilmannii* dificilmente é cultivável (LEE, 1991). Um

método alternativo é a inoculação de muco gástrico em camundongos e o exame posterior da mucosa gástrica destes animais para detecção do agente (QUEIROZ *et al.*, 1996). Pode-se ainda submergir o fragmento de mucosa em solução de água destilada com uréia e vermelho fenol (HAPPONEN *et al.*, 1996) visando a detecção da urease produzida pelo *Helicobacter* em fragmentos de tecido.

As colorações teciduais de Giemsa, hematoxilina-eosina ou impregnação argêntica pelo método de *Warthin-Starry* permitem a visualização do agente (QUEIROZ *et al.*, 1996). Estas colorações teciduais e a pesquisa direta em lâmina também apresentam diferentes índices de sensibilidade, porém podem auxiliar na diferenciação dos *Helicobacter*. Segundo OWEN (1998) o *H. pylori* pode ser reconhecido pela sua forma em S e seu pequeno tamanho (2-4  $\mu\text{m}$ ), enquanto que o *H. heilmannii* apresenta 7  $\mu\text{m}$  e é bastante espiralado.

A detecção e diferenciação entre as espécies de *Helicobacter* também podem ser feitas através da avaliação da morfologia do microrganismo ao microscópio eletrônico (STOFFEL *et al.*, 2000) ou pela reação em cadeia pela polimerase -PCR (De GROOTE *et al.*, 2000; CANTET *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003). Devido a sua especificidade e sensibilidade, a PCR é utilizada para identificação das principais espécies de *Helicobacter* (NEIGER, 1998). Há diversos relatos que utilizam diferentes oligonucleotídeos iniciadores (De GROOTE *et al.*, 2000; CANTET *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2004). Além disto, este método tem sido considerado o mais sensível para a detecção de pequenas quantidades do agente, possibilitando o seu uso em pesquisas do microrganismo na saliva, placas dentárias e suco gástrico (PERKINS, 1996; De GROOTE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003).

A correlação entre a presença de *Helicobacter* spp. no estômago do homem e o desenvolvimento de doenças gástricas, revolucionou conceitos sobre etiologia, meios de diagnóstico e tratamento das gastropatias e, no caso específico do homem, elevou as gastropatias à condição de doença infecto-contagiosa e problema de saúde pública.

No caso dos animais de produção, os conhecimentos sobre a ocorrência e a participação destas bactérias nas doenças gástricas são escassos e controversos. Além disso, não se conhece sua distribuição geográfica e os relatos sobre a relação entre a presença das bactérias e as lesões gástricas em suínos são conflitantes. A obtenção destes dados é importante não apenas para a redução dos prejuízos econômicos, como também para esclarecer fatores relacionados à forma de transmissão e potencial zoonótico da infecção por *Helicobacter* spp (MEINING, *et al.*, 1998).

O fato das lesões gástricas afetarem principalmente animais de granjas industriais, torna necessário o estudo sobre a ocorrência e o impacto da doença gástrica na produção de suínos. À medida que a indústria de carne suína adota cada vez mais modelos intensivos de produção, o conhecimento dos elementos envolvidos nas gastropatias torna-se premente para que seja possível diagnosticar com eficiência as lesões e implementar estratégias coerentes de profilaxia e tratamento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a relação entre as lesões gástricas em suínos em idade de abate e a presença de *Helicobacter spp.*

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a ocorrência de lesões gástricas em suínos abatidos num frigorífico da região Norte do Estado do Paraná.
- Determinar a ocorrência de *Helicobacter spp.* em estômagos de suínos utilizando a coloração de Warthin-Starry e a reação em cadeia pela polimerase.
- Verificar a relação entre o peso ao abate, o gênero (masculino ou feminino) e a presença de lesões gástricas.
- Caracterizar macroscopicamente e microscopicamente as lesões gástricas de *pars esophagea* de suínos em idade de abate.
- Verificar a relação das lesões e a infecção por *Helicobacter spp.*

### **3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO**

#### **3.1 LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS: OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM O GÊNERO, PESO AO ABATE E PRESENÇA DE *HELICOBACTER* SPP.**

Gastric lesions in swine: occurrence and correlation with sex, weigh and *Helicobacter* spp. infection.

Artigo encaminhado para apreciação para o periódico SEMINA – Ciências Agrárias.

## LESÕES GÁSTRICAS EM SUÍNOS: OCORRÊNCIA E RELAÇÃO COM O GÊNERO, PESO AO ABATE E PRESENÇA DE *Helicobacter* spp.

### Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência lesões gástricas em suínos de abate e verificar a relação das lesões com o gênero, o peso da carcaça e a presença de *Helicobacter* spp na mucosa gástrica. Foram colhidos e examinados 236 estômagos de suínos. As lesões da *pars esophagea* e região glandular foram classificadas conforme a severidade em graus 0, 1, 2 e 3. Fragmentos das regiões aglandular e glandular foram processados para exame histológico e para pesquisa de *Helicobacter* spp. A análise macroscópica revelou que 203 (86.1%) estômagos apresentavam algum tipo de lesão. A ocorrência de erosões e úlceras na região aglandular foi observada em 104 (44.1%) animais e na região glandular em 22 (9.3%). A ulceração na região gastroesofágica estava presente em 45 animais (19.1%), dos quais 25 (21.1%) eram machos e 20 (16.5%) fêmeas. O peso médio da carcaça foi de 82.7 Kg nos animais sem lesões e com paraqueratose na *pars esophagea* e de 79.5 Kg nos animais com erosões e ulcerações. Utilizando a coloração de *Warthin-Starry*, observamos *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de 112 (47.5%) amostras, destas, 54 (48.2%) foram classificadas como grau 2 ou 3 (*pars esophagea*) e 58 (51.8%) como grau 0 e 1. Dos animais positivos para o *Helicobacter* spp, 26 (23.2%) apresentavam úlceras na *pars esophagea* e 24 (21.4%) apresentavam a mucosa sem alterações. Dos 124 (52.5%) animais negativos 50 (40.3%) foram classificados como grau 2 ou 3 e 74 (59.7%) como grau 0 ou 1. A análise estatística revelou que não há diferença significativa entre suínos com ou sem erosões ou úlceras gastresofágicas em relação à presença de *Helicobacter* spp.

**Palavras-chave:** Suínos, *Helicobacter* spp. Lesões gástricas.

## **GASTRIC LESIONS IN SWINE: OCCURRENCE AND CORRELATION WITH SEX, WEIGH AND *Helicobacter* spp. INFECTION**

### **Abstract**

The aim of this study was to investigate the association between the lesions of the gastric mucosa in slaughter pigs and sex, carcass weight and presence of *Helicobacter* spp. Stomachs from 236 swine were examined. Gastroesophageal lesions were classified in agreement severity in grade 0, 1, 2 and 3. Fragments from the aglandular and glandular area were processed for histology and for identification of *Helicobacter* spp in tissue sections. Macroscopic analysis revealed 203 (86.1%) stomachs with some degree of lesion. Grade 2 and 3 lesions were observed in 104 (44.1%) animals. Grade 3 lesions were observed in 25 (21.1%) castrated males and 20 (16.5%) females. The average carcass weight of animals with grade 0 and 1 lesions and grade 2 and 3 was 82,5 Kg and 79,5 Kg, respectively. One hundred and twelve (47.5%) pigs were positive for *Helicobacter* spp. by Warthin-Starry stain method; among them, 54 (48.2%) had grade 2 and 3 lesions; and 58 (51.8%) had grade 0 and 1 lesions. One hundred and twenty-four (52.5%) were negative for *Helicobacter* spp; among them 50 (40.3%) had grade 2 and 3 lesions, and 74 (59.7%) had grade 0 and 1. There was no significant difference between pigs with and without gastric erosions or ulcers in regard to the presence of *Helicobacter* spp.

**Key words:** Swine. *Helicobacter* spp. Gastric lesions.

**Falta sexo e peso**

## Introdução

Lesões envolvendo a *pars esophagea* de suínos foram descritas a partir da década de 50 em diversos países, sendo associadas à produção intensiva. O impacto econômico das doenças gástricas em suinocultura se dá pela taxa de mortalidade associada à forma hemorrágica aguda em matrizes (KOWALCZYK, 1969) e pelas perdas econômicas decorrentes de anemia crônica, anorexia e diminuição do ganho de peso (O'BRIEN, 1993). Entretanto, existem controvérsias visto que Guise *et al.* (1997) e Friendship *et al.* (1999) não constataram relação entre ulceração gástrica e queda no desempenho.

Alterações como paraqueratose, erosões e ulcerações gástricas são encontradas em 43,7 a 77,4% da população suína do Brasil (CARVALHO *et al.*, 1999). Dentre estas, as úlceras gástricas são reconhecidas como uma importante doença em suínos, com ocorrência variando de 13% a 22,9% (MUGGENBURG *et al.*, 1964; ARGENZIO e EISEMANN, 1996; GUISE *et al.*, 1997). No Brasil, a ocorrência dessa lesão específica varia de 5,5% a 23,5% (CIACCI *et al.*, 1991; ROPPA *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999).

Desde os primeiros estudos sobre as doenças gástricas de suínos, observou-se que as lesões na *pars esophagea* eram mais freqüentes do que na região glandular (MUGGENBURG *et al.*, 1964; CARVALHO *et al.*, 1999). A maior suscetibilidade desta região à injúria é atribuída a falta do muco protetor produzido pelo epitélio mucossecretor, presente na região glandular, e a incapacidade do epitélio estratificado produzir quantidade suficiente de bicarbonato para neutralizar o ácido gástrico (EMBAYE *et al.*, 1990). O número de animais que apresentam ulcerações em ambas as regiões é pequeno, sugerindo que os dois processos devem ter etiologias distintas (CARVALHO *et al.*, 1999).

No Brasil, estudos demonstram a influência do gênero na freqüência de úlceras gastresofágicas, sendo esta maior em machos castrados que em fêmeas ou machos inteiros (MONTICELLI *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999). Porém, em estudos no exterior, outros autores não observaram esta influência (GUISE *et al.*, 1997; FRIENDSHIP *et al.*, 1999).

A descoberta da associação entre a infecção pelo *Helicobacter pylori* no homem e a presença de gastrites, úlceras e neoplasias como adenocarcinoma e linfoma gástrico despertou um grande interesse a respeito da participação de bactérias no desenvolvimento de gastropatias (MARSHAL e WARREN, 1984; SIMPSON *et al.*, 1999). Atualmente o *Helicobacter pylori* é reconhecido como a maior causa de doenças da mucosa gástrica

(ERNST *et al.*, 2006), sendo a infecção essencial para o desenvolvimento de câncer gástrico no homem (BRENNER *et al.*, 2004). Em suínos, a etiologia e fisiopatologia das úlceras gástricas permanecem incertas. No passado as pesquisas enfocaram fatores dietéticos e relacionados ao stress (ARGENZIO e EISEMANN, 1996). Recentemente, a ocorrência de lesões gástricas foi associada à presença de *Helicobacter* spp. (QUEIROZ, *et al.*, 1996).

A associação entre *Helicobacter* spp e a ocorrência de úlceras gastroesofágicas em suínos tem sido controversa. Estudos afirmam que as bactérias do gênero *Helicobacter* predisõem o estabelecimento de úlceras (BARBOSA *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 2004; MALL *et al.*, 2004). Entretanto, outros autores afirmaram que esta associação é inconsistente (MELNICHOUK *et al.*, 1999; KRAKOWKA, *et al.*, 2005; SZEREDI *et al.*, 2005).

O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência lesões gástricas em suínos de abate e verificar a relação das lesões com o gênero, o peso da carcaça e a presença de *Helicobacter* spp na mucosa gástrica.

## **Material e Métodos**

Foram utilizados 236 estômagos de suínos, colhidos por conveniência durante o abate, em um frigorífico com Serviço de Inspeção Federal, localizado na macroregião de Londrina. Por ocasião da colheita das amostras foram anotados o gênero e o peso da carcaça. Os animais provinham de 19 municípios que foram agrupados em mesoregiões. O número de animais provenientes da região central do Estado foi 104. Da região Norte de Estado do Paraná vieram 87 suínos e das regiões Oeste e Sudeste originaram-se 34 e 11 suínos, respectivamente.

Os estômagos foram examinados externamente e incisados ao longo da curvatura maior para exame interno. As alterações macroscópicas de *pars esophagea* encontradas foram anotadas e classificadas conforme sua localização, tipo e gravidade, seguindo o modelo de classificação modificado de MORÉS *et al.* (2000) (quadro 1).

| Escore | <i>Pars esophagea</i>   | Região glandular                            |
|--------|---|---|
| Grau 0 | Ausência de alterações macroscópicas, epitélio de aspecto liso e brilhante. | Ausência de alteração                       |
| Grau 1 | Paraqueratose, epitélio proliferado, rugoso e sem brilho.                   | Hiperemia, edema e/ou hemorragia da mucosa. |
| Grau 2 | Erosões com comprometimento de menos de 33% da região gastresofágica.       | Presença de erosões                         |
| Grau 3 | Ulcerações ativas ou crônicas em mais de 33% da região gastresofágica.      | Presença de ulcerações                      |

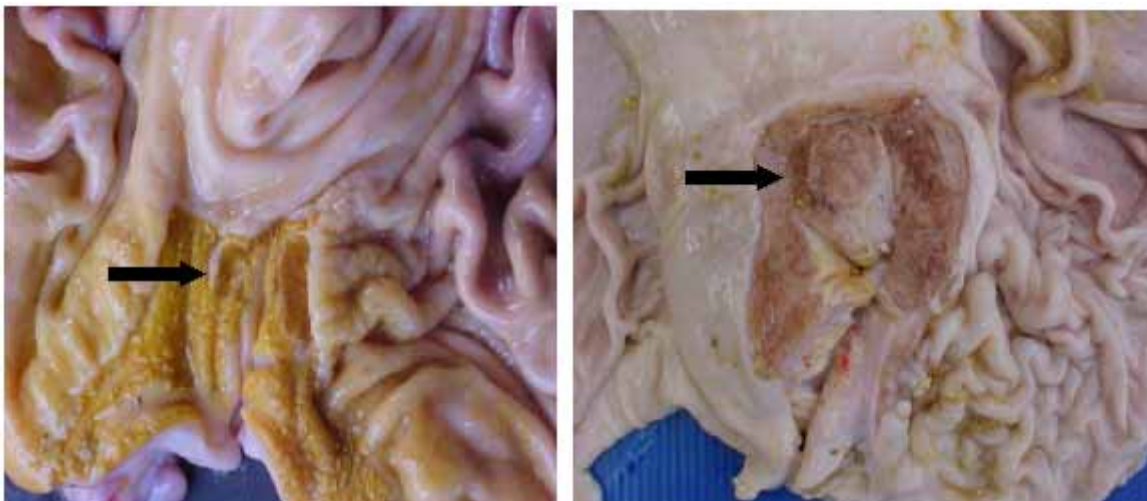
**Quadro 1** – Classificação das alterações macroscópicas de estômago suíno, modificado de MORÉS, *et al.* (2000). Londrina, Paraná, 2006.

Fragmentos de regiões pré-estabelecidas da *pars esophagea*, corpo, fundo e piloro foram colhidos e fixados em solução tamponada de formalina a 10%. Nas amostras classificadas com lesão grau 3, tanto em região glandular quanto *pars esophagea*, foram colhidos também fragmentos da lesão para análise histológica. Os fragmentos foram então submetidos ao processamento histológico de rotina. Os cortes foram corados pelo método de *Wharthin-Starry* (WS) para pesquisa de bactérias de formato espiralado nos fragmentos de mucosa gástrica, sendo consideradas positivas as amostras que apresentavam características morfológicas típicas das bactérias do gênero *Helicobacter* (apresentam aproximadamente sete  $\mu\text{m}$  e são bastante espiraladas). Os cortes foram examinados com objetiva de imersão (100x). A superfície mucosa, região de fóvea e lúmen glandular foram examinados em toda a sua extensão.

Os percentuais de ocorrência de bactérias nos grupos com e sem lesão gástrica foram comparados pelo teste do Qui-quadrado, ficando estabelecido 5% como nível de significância.

## Resultados

Ao exame macroscópico verificou-se que 203 (86,1%) estômagos apresentavam algum tipo de lesão. As lesões de grau 1 foram as mais frequentes em ambas as regiões, com 33,5% na região de *pars esophagea* e 41,5% na região glandular. A ocorrência de lesões de grau 2 e 3 na *pars esophagea* foi observada em 104 (44,1%) estômagos e na região glandular em 22 (9,3%). As lesões de grau 3 (Figura 1) na *pars esophagea* estavam presentes em 45 estômagos (19,1%) e na região glandular em cinco (2,2%)(Tabela 1).



**Figura 1** – Graus de lesão 2 e 3 (respectivamente) de estômago de suíno em idade de abate (setas); *pars esophagea*. Londrina, Paraná, 2006.

Quanto ao gênero, dos 236 animais avaliados, 115 eram machos e 121 fêmeas, sendo que 80% dos machos e 75,2% das fêmeas tinham algum grau de lesão macroscópica na *pars esophagea*. A ocorrência dos diferentes graus de lesão no estômago está descrita na tabela 1. Pela análise estatística não se evidenciou influência do gênero sobre a ocorrência de lesões gástricas.

Em relação ao peso médio da carcaça, verificou-se que os animais com lesões na *pars esophagea* de grau 0 e 1 apresentaram peso médio de 82,7 kg e os com lesões de grau 2 e 3, 79,5 kg. A média de peso dos animais infectados por bactérias espiraladas foi de 78,9 kg e a dos não infectados 77 kg. Pela análise estatística não se evidenciou influência da presença de lesões gástricas ou de *Helicobacter spp* sobre o peso médio da carcaça.

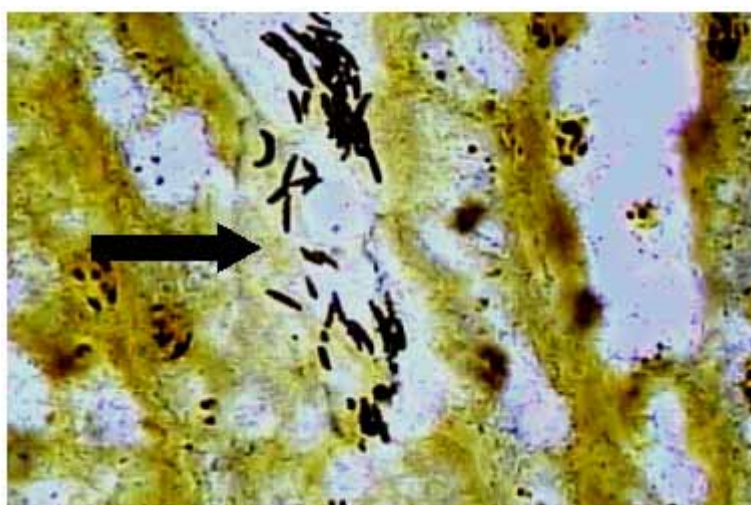
**Tabela 1** – Ocorrência de lesões de grau 1, 2 e 3 no estômago de suínos oriundos do Estado do Paraná, segundo o gênero. Londrina, Paraná, 2006.

|                    | Gênero | Grau 1 (%) | Grau 2 (%) | Grau 3 (%) | Total (%) |
|--------------------|--------|------------|------------|------------|-----------|
| <u>Aglandular*</u> | Machos | 37 (32,1)  | 30 (26)    | 25 (21,7)  | 92 (80)   |
|                    | Fêmeas | 42 (34,7)  | 29 (23,9)  | 20 (16,5)  | 91 (75,2) |
|                    | total  | 79         | 59         | 45         | 183       |
| Glandular**        | Machos | 44 (38,2)  | 10 (8,7)   | 2 (1,7)    | 56 (48,7) |
|                    | Fêmeas | 54 (44,6)  | 7 (5,8)    | 3 (2,5)    | 64 (52,9) |
|                    | total  | 98         | 17         | 5          | 120       |

\*Qui-quadrado=0,88; p=0.6429

\*\*Qui-quadrado=1.22; p=0,5428

Utilizando a coloração de *Warthin-Starry*, constatou-se a presença de *Helicobacter* spp (Figura 2) colonizando a mucosa gástrica em 47,5% (112/236) dos animais analisados. Os microrganismos foram observados principalmente na superfície mucosa e na região da fóvea do estômago glandular. A presença de *Helicobacter* spp foi verificada principalmente nas regiões de piloro, corpo e fundo, sendo que raramente foram observadas na região de *pars esophagea*. O número de amostras positivas para a presença de *Helicobacter* spp nos diferentes graus de lesão da região aglandular e glandular está descrito na tabela 2.



**Figura 2-** Fotomicrografia de estômago de suíno corado pelo método de *Warthin-Starry*. Presença de bactérias de formato espiralado (seta) na glândula gástrica, objetiva 100X. Londrina, Paraná, 2006.

Dentre os 236 estômagos analisados, 45 (19,1%) apresentavam lesões de grau 3 na região de *pars esophagea*, sendo que em 26 (57,7%) verificamos a presença de *Helicobacter* spp. Na região glandular observamos lesões de grau 3 em cinco animais, sendo que em três observamos bactérias na mucosa gástrica. Quando analisamos as lesões de graus 0 e 1 de região glandular observamos que 100 (46,7%) desses estômagos tinham *Helicobacter* spp. Já nos animais classificados como graus 0 e 1 de *pars esophagea*, constatamos a presença de *Helicobacter* spp em 58 (43,9%) animais (Tabela 2).

**Tabela 2** – Presença de *Helicobacter* spp na mucosa gástrica de suínos de abate com diferentes graus de lesão. Londrina, PR, 2006.

|                         | Presença de<br><i>Helicobacter</i> spp | Grau 0 | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 | Total |
|-------------------------|--|--------|--------|--------|--------|-------|
| <i>Pars esophagea</i> * | Positivo                               | 24     | 34     | 28     | 26     | 112   |
|                         | Negativo                               | 29     | 45     | 31     | 19     | 124   |
|                         | Total                                  | 53     | 79     | 59     | 45     | 236   |
| Glandular**             | Positivo                               | 49     | 51     | 9      | 3      | 112   |
|                         | Negativo                               | 67     | 47     | 8      | 2      | 124   |
|                         | Total                                  | 116    | 98     | 17     | 5      | 236   |

\*Qui-quadrado=2,64; p= 0,4502

\*\*Qui-quadrado=2,61; p=0,4554

Dos 112 estômagos positivos para a presença da bactéria, 26 (23,2%) apresentavam úlceras na *pars esophagea* e 24 (21,4%) apresentavam a mucosa sem alterações. Constatamos úlceras de região glandular em três animais dos 112 em que se observou *Helicobacter* spp., e 49 (43,7%) animais sem alteração macroscópica. A análise estatística não demonstrou influência da presença da bactéria sobre a ocorrência de lesões gástricas.

## Discussão

A análise dos resultados revelou que 86,1% dos estômagos apresentavam algum grau de lesão, valor superior ao descrito por Carvalho *et al.* (1999), que relataram frequência de 77,4%. Em relação às lesões na *pars esophagea*, observamos que 44,1% dos animais apresentavam lesões de grau 2 e 3, sendo 19,1% de ulcerações. Estes resultados são semelhantes aos descritos em outros estudos (MUGGENBURG *et al.*, 1964; ROPPA *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999). Poucas são as citações na literatura que se referem a alterações na região glandular. Entretanto, constatamos que 9,3% dos animais apresentavam erosões e ulcerações de região glandular, ocorrência superior às relatadas anteriormente (MUGGENBURG *et al.*, 1964; ROPPA *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999). A escassez de relatos caracterizando as lesões macroscópicas da região glandular pode ser um fator que dificultou a comparação de resultados.

Os percentuais de ocorrência de *Helicobacter* spp em suínos são bastante variáveis. A ocorrência da bactéria variou de 9,4 e 10,8% segundo Queiroz *et al.* (1990) e Grasso *et al.*

(1996). Cantet *et al.* (1999) observaram 80% de positividade para *Helicobacter* spp. num total de 60 amostras de estômagos suínos, utilizando a PCR. Young *et al.* (2001) encontraram resultado positivo em 63,8% das amostras, também utilizando PCR. A sensibilidade para o diagnóstico de *Helicobacter* spp varia de acordo com a metodologia utilizada. Segundo De Groote *et al.* (2000), a PCR é o método diagnóstico mais sensível e específico quando comparado a outros métodos utilizados para diagnóstico de infecção por *Helicobacter* spp. em animais. Neste trabalho, ao utilizarmos a impregnação argêntica como método diagnóstico, constatamos a presença de bactérias espiraladas na mucosa gástrica de 47,5% dos animais avaliados. Resultado superior ao observado por Queiroz *et al.* (1990), que utilizaram metodologia diagnóstica semelhante e inferior ao relatado por Cantet *et al.* (1999) e Young *et al.* (2001), que utilizaram a PCR.

A associação entre *Helicobacter* spp e a ocorrência de úlceras gastroesofágicas em suínos tem sido controversa. Estudos afirmam que as bactérias do gênero *Helicobacter* predisõem o estabelecimento de úlceras (QUEIROZ *et al.*, 1990; BARBOSA *et al.*, 1995; CANTET *et al.*, 1999; De GROOTE *et al.*, 2000; YOUNG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2004; MALL, *et al.*, 2004). Entretanto, diversos autores afirmam que esta associação é inconsistente (MELNICHOUK *et al.*, 1999; KRAKOWKA, *et al.*, 2005; SZEREDI *et al.*, 2005). Os resultados encontrados sugerem que não há associação entre as lesões gástricas e o *Helicobacter* spp., pois o número de animais com lesões gástricas acompanhadas da presença do *Helicobacter* spp não foi significativamente diferente dos animais com lesões gástricas e sem a bactéria. A razão para esta diferença de resultados permanece incerta.

O mecanismo pelo qual o *Helicobacter pylori* causa lesão em estômagos humanos é bem conhecido (MARSHAL e WARREN, 1984; BRENNER *et al.*, 2004; ERNST *et al.*, 2006), porém esses estudos são escassos quando se trata de *Helicobacter* spp. e suínos. Uma das características da doença gástrica de humanos causada pela infecção pelo *Helicobacter pylori* é o seu caráter de cronicidade. Numa escala temporal, talvez os suínos infectados não desenvolveram doenças gástricas devido ao curto tempo de vida. Sabe-se que suínos voltados para a reprodução (matrizes) são mais predispostos a lesões gástricas graves (KOWALCZYK, 1969) e tais lesões podem estar associadas ao *Helicobacter* spp.

CARVALHO *et al.* (1999) sugerem que as lesões erosivas e ulcerativas de região glandular devem ter etiologias ou mecanismos de agressão distintos. O *Helicobacter* spp. é uma bactéria que vive em meio ao muco protetor da mucosa gástrica e a região de *pars esophagea* é uma região desprovida de muco protetor. Os fatores de patogenia e os mecanismos de agressão à mucosa gástrica podem agir de forma diferente na *pars esophagea*

e na região glandular de suínos, o que justifica mais investigações sobre a patogenia das lesões gástricas, bem como sobre as espécies de *Helicobacter* que infectam suínos.

A influência do gênero na frequência de úlceras gastresofágicas já foi reportada por outros autores (MONTICELLI *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999). Entretanto, outros estudos não verificaram a relação do gênero e as úlceras gástricas ou qualquer outra doença do estômago dos suínos (GUISE *et al.*, 1997 e PARK *et al.*, 2004). Verificamos que não houve influência do sexo na ocorrência de lesões gástricas, o mesmo relatado por Guise *et al.* (1997) e Park *et al.* (2004).

Ao analisarmos o peso médio da carcaça ao abate, dos animais com e sem lesão, observamos que as médias foram semelhantes, não sendo possível relacionar as lesões gástricas com uma diminuição significativa no peso da carcaça. Poucos são os relatos encontrados relacionando lesões gástricas e peso do animal. Kowalczyk (1969) relatou que na forma assintomática da doença gástrica, a taxa de crescimento dos animais é adequada para os padrões da produção industrial. Nesta forma o diagnóstico é feito no abatedouro com a observação de alterações como paraqueratose, erosões ou úlceras. Nossos resultados estão de acordo com o relatado por outros autores e sugerem que mesmo as lesões mais graves (graus 2 e 3) não afetaram significativamente o desenvolvimento dos animais (KOWALCZYK, 1969; FRIENDSHIP, 1999; GUISE *et al.*, 1997).

Desta forma, podemos concluir que a ocorrência de lesões na mucosa gástrica é elevada nos suínos abatidos na região Norte do Estado do Paraná. Apesar da alta ocorrência, não foi possível estabelecer a relação entre a infecção por *Helicobacter* spp. e a presença de tais lesões. Conclui-se também que não houve relação entre a ocorrência de lesões gástricas, o gênero e o peso da carcaça.

## Referências

- ARGENZIO, R.A.; EISEMANN, J. Mechanisms of acid injury in porcine gastroesophageal mucosa. **Am. J. Vet. Res.**, v.57, p. 564-573, 1996.
- BARBOSA, A.J.A.; SILVA, J.C.P.; NOGUEIRA, M.M.F.; PAULINO Jr., E.; MIRANDA, C.R. Higher incidence of *Gastropirillum* sp. in swine with gastric ulcer of the *pars oesophagea*. **Vet. Pathol.**, v.32, p. 134-139, 1995.
- BRENNER, H.; ARNDT, V.; STEGMAIER, C.; ZIEGLER, H.; ROTHENBACHER, D. Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? **Am. J. Epidemiol.**, v. 159. p. 252-258, 2004.
- CANTET, F.; MAGRAS, C.; MARAIS, A.; FEDERIGUI, M.; MÉGRAUD, F. *Helicobacter* species colonizing pig stomach: molecular characterization and determination of prevalence. **Enviroment Microbiol.**, v.65, p. 4672-4676, 1999.
- CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B.; MARTINEZ, P.A.O.; MAZZUCATO, B.C.; ALESSI, A.C. Frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto, SP. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, p.223-227, 1999.
- CIACCI, J.R.; MORES, N.; SOBESTIANSKY, J. Úlcera gástrica como causa de morte e como achado de necropsia em três rebanhos suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.43, p.525-533, 1991.
- DE GROOTE, D.; DUCATELLE, R.; VAN DOORN, L.J; TILMANT, K.; VERSCHUUREN, A.; HAESBROUCK, F. Detecion of “*Candidatus Helicobacter suis*” in gastric samples of pig by PCR: comparison with other invasive diagnostic techniques. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1131-1135, 2000.
- EMBAYE, H.; THOMLINSON, J.R.; LAWRENCE, T.L.J. Histopathology of oesophagogastric lesions in pigs. **J. Comp. Pathol.**, v.103, p. 253-264, 1990.
- ERNST, P. B.; PEURA, D. A.; CROWE, S. E. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patiet care. **Gastroenterol.** v. 206, p. 130-188, 2006.
- FRIENDSHIP, R.M.; MELNICHOUK, S.; SMART, N.L. *Helicobacter* infection: what should a swine practitioner know ? **Swine Health Prod.**, v.7, p.167-172, 1999.
- GRASSO, G.M.; RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M.; RUBERTO, A.; IANNETTO, G. Prevalence of *Helicobacter*-like organisms in porcine gastric mucosa. A study of swine slaughtered in Italy. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 213-217, 1996.
- GUISE, H.J.; CARLYLE, W.W.H.; PENNY, R.H.C. Gastric ulcers in finishing pigs: their prevalence and failure to influence growth rate. **Vet. Rec.**, v.141, p.563-566, 1997.
- KRAKOWKA, S.; RINGS, D. M.; ELLIS, J. A. Experimental induction of bacterial gastritis and gastric ulcer disease in gnotobiotic swine inoculated with porcine *Helicobacter*-like species. **Am J Vet Res.**, v. 66, p. 945-952, 2005.

KOWALCZYK, T. Etiologic factors of gastric ulcers in swine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 30, n. 3. p. 393-400, 1969.

MALL, A. S.; SULEMAN, N.; TAYLOR, K.; KIDD, M.; TYLER, M.; LOTZ, Z.; ROSEMARY, H.; KAHN, D. The relationship os a *Helicobacter heilmannii* infection to the mucosal changes in abattoir and laboratory pig stomach. **Surg. Today**. v. 34, p. 943-949. 2004.

MARSHAL, B. J.; and WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.1, p. 1311-1314. 1984.

MELNICHOUK, S.I.; FRIENDSHIP, R.M.; DEWEY, C.E.; BILDFELL, R.J.; SMART, N.L. Helicobacter-like organisms in the stomach of pigs with and without gastric ulceration. **Swine Health Prod.**, v.7, p. 201-205, 1999.

MONTICELLI, C.J.; MENTEN, J.F.M.; ZANOTTO, D.L. Efeito da granulometria do milho, da área por animal e do sexo sobre lesões gástricas de suínos. In: **Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos**, 7, 1995, Blumenau. *Anais...*, Blumenau: ABRAVES, 1995, P. 165.

MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J.; LOPES, A. Avaliação Patológica de Suínos no Abate – Manual de Identificação. **Embrapa**. Brasília, DF. p 22 – 24, 2000.

MUGGENBURG, B.A.; REESE, B.S.; KOWALSKY, M.S.; GRUMMER, R.H.; HOCKSTRA, W.G. Survey of the prevalence of gastric ulcers in swine. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.1673-1678, 1964.

O'BRIEN, J.J. Gastric ulcers. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L. *et al. Diseases of Swine*. 7 ed. Ames, Iowa State University Press, 1993. p.680-691.

PARK, J. -H.; SEOK, S.-H.; CHO, S. -A.; BAEK, M.-W.; LEE, H. -Y.; KIM, D. -J.; PARK, J.-H. The higt prevalence of Helicobacter sp. in porcine pyloric mucosa and its histopathological and molecular characteristics. **Vet. Microbiol.** v.104, p. 219-225. 2004.

QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.F.; MENDES, E.N.; LAGE, A.P.; CARVALHO, C.T.; BARBOSA, A.J.A. A spiral microorganism in the stomach of pigs. **Vet. Microbiol.**, v.24, p. 199-204, 1990.

QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.F.; MENDES, E.N.; MOURA, S.B.; OLIVEIRA, A.M.R.; MIRANDA, D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. **Gastroenterol.**, v.27, p.111-119, 1996.

ROPPA, L.; SARTOR, A.B.; OTONELLI, J. Ocorrência de úlcera gastroesofágica em suínos ao abate no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, 7, 1995, Blumenau. *Anais...* Blumenau: ABRAVES, 1995. p.108.

SIMPSON, K.W.; MC DONOUGH, P.L.; STRAUSS-AYALI, D.; CHANG, Y.F.; HARPENDING, P.; VALENTINE, B.A. *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. **Vet. Pathol.**, v.36, p. 237-248, 1999.

SZEREDI, L.; PALKOVICS, G.; SOLYMOSI, N.; TEKES, L.; MEHESFALVI, J. Study on the role of gastric *Helicobacter* infection in gross pathological and histological lesions of the stomach in finishing pigs. **Acta Vet Hung.**, v.53, p. 371-83, 2005.

YOUNG, Y. K.; HAN, J. H.; JOO, H.S. Identification of novel *Helicobacter* species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, Vol. 39, p. 3311-3315, 2001.

### **3.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE *PARS ESOPHAGEA* DE ESTÔMAGOS DE SUÍNOS E SUA RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE *HELICOBACTER* SPP.**

Histological findings in *pars esophagea* in swine and correlation with *Helicobacter* spp.

## ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE *PARS ESOPHAGEA* DE ESTÔMAGOS DE SUÍNOS E SUA RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE *Helicobacter* spp.

### Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar a relação entre *Helicobacter* spp e a presença de alterações histológicas da *pars esophagea* de suínos. Foram analisados 67 estômagos de suínos em idade de abate, provenientes de municípios do Estado do Paraná, abatidos em frigoríficos com Serviço de Inspeção Federal. As alterações histológicas foram identificadas e classificadas como presença ou ausência de ulceração, alongamento de papilas, degeneração epitelial, paraqueratose, erosão, hiperplasia e número de folículos linfóides. Para identificação das helicobactérias utilizou-se a técnica de PCR com *primers* específicos para o gênero *Helicobacter*. As alterações mais frequentes foram degeneração epitelial e o alongamento de papilas, observada em 83,5% das amostras analisadas. Em 77,5% das amostras observou-se paraqueratose da *pars esophagea* e em 61,1%, hiperplasia epitelial. Das 67 amostras analisadas, 47 (70,1%) mostraram resultado positivo pela PCR. A erosão foi a lesão mais freqüente em animais PCR positivos para *Helicobacter* spp, com 40,2% das amostras analisadas. A freqüência de ulceração de mucosa de *pars esophagea* foi de 11,9% em animais em que o diagnóstico de *Helicobacter* spp foi positivo. Animais que não tinham ulceração e foram PCR positivos para *Helicobacter* spp apresentaram freqüência de 58,2%. Após a análise estatística observou-se que não há associação entre a presença de *Helicobacter* spp e as lesões gástricas histológicas de estômagos suínos. Com este estudo concluímos que *Helicobacter* spp não é um agente relacionado as lesões gástricas de suínos em idade de abate do Estado do Paraná.

**Palavras-chave:** Suínos. Histopatologia. Estômago. *Helicobacter* spp.

## HISTOLOGICAL FINDINGS IN *PARS ESOPHAGEA* IN SWINE AND CORRELATION WITH *Helicobacter* spp.

### Abstract

The aim of this study was to investigate the association between the histopathologic lesions of gastric mucosa in abattoir pigs and presence of *Helicobacter* spp, identify by PCR. Stomachs from 67 swine were examined. Histopathologic lesions of *pars esophagea* were identified and classified in gastric ulcers, erosion, degeneration, paraqueratosis, hiperplasia and distortion of papils. Microscopic analysis revealed the most frequent alteration: 83,5% stomachs with epithelial degeneration and distortion of papils. Paraqueratosis of *pars esophagea* was observed in 77,5% and epithelial hiperplasia in 61%. Forty seven (70,1%) pigs were PCR positive. Erosion of *pars esophagea* was most frequently observed in pigs *Helicobacter* spp. PCR positive, with 40,2%; ulceration were observed in 11,9% animals PCR positive to *Helicobacter* spp. The frequency of animals without ulceration and *Helicobacter* spp. PCR positive is 58,2%. The statistics analysis revealed no association with *Helicobacter* spp and histological findings in gastric mucosa in swine. In conclusion, the infection with *Helicobacter* spp is not associated with gastric lesions in slaughtered swine at Paraná state, Brazil.

**Key words:** *Helicobacter* spp. Swine. Stomach. Histological findings.

## Introdução

As paraqueratoses e as ulcerações da *pars esophagea* do estômago são lesões comuns descritas em suínos de todo o mundo. Os suínos acometidos demonstram sinais de anorexia, anemia crônica, decréscimo no ganho de peso, gastrite hemorrágica aguda e morte súbita (GUISE *et al.*, 1997; O'BRIEN, 1993). As úlceras gástricas são caracterizadas por diferentes graus de lesão do epitélio estratificado, podendo se estender pelas camadas adjacentes do estômago. As demais alterações de *pars esophagea* podem variar de leve paraqueratose a graus severos de degeneração e gastrite (MUGGENBURG *et al.*, 1964).

O *Helicobacter pylori* foi a primeira espécie de bactéria a ser identificada colonizando o estômago de seres humanos e foi associado a doenças gástricas como gastrites, úlceras e câncer gástrico (MARSHAL e WARREN, 1984; ERNST *et al.*, 2006), sendo a infecção essencial para o desenvolvimento de câncer gástrico no homem (BRENNER *et al.*, 2004). Atualmente sabe-se que diferentes espécies de *Helicobacter* foram identificadas na mucosa gástrica de diversas espécies animais com ou sem doenças gástricas (FOX e LEE, 1997; SIMPSON *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 1996; CANTET *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003). As bactérias do gênero *Helicobacter* são espiraladas, curvas ou ocasionalmente cocóides, gram negativas e habitam as glândulas, as células parietais e o muco da mucosa gástrica (FOX e LEE, 1997).

A associação entre a presença de *Helicobacter* spp ou *H. heilmannii* e o diagnóstico macroscópico de úlceras gastroesofágicas em suínos foi relatada por diversos autores (BARBOSA *et al.*, 1995; QUEIROZ *et al.*, 1996; ROOSEDAAL *et al.*, 2000). Vários autores relatam que há uma forte associação entre *Helicobacter* spp e doenças gástricas de suínos, tanto quanto as úlceras como outras alterações como erosões e paraqueratose (BARBOSA *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003; MALL *et al.*, 2004). Porém, outros autores afirmaram que esta associação é inconsistente (MELNICHOUK *et al.*, 1999; KRAKOWKA, *et al.*, 2005; SZEREDI *et al.*, 2005).

Todos os estudos demonstram que a prevalência da infecção por *Helicobacter* spp. é marcadamente diferente de acordo com o método de diagnóstico utilizado, bem como a área do estômago utilizada para análise, variando de 8,0% a 80,0% (QUEIROZ *et al.*, 1990; GRASSO *et al.*, 1996; CANTET *et al.*, 1999; De GROOTE *et al.*, 2000; YOUNG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003; MALL, *et al.*, 2004).

O objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência das diferentes alterações histológicas da *pars esophagea* em suínos em idade de abate e sua relação com a presença de *Helicobacter* spp. diagnosticada pela reação em cadeia pela polimerase – PCR.

## **Material e Métodos**

Foram analisados 67 estômagos de suínos em idade de abate, provenientes de municípios do Estado do Paraná, abatidos em frigorífico com Serviço de Inspeção Federal. Os estômagos foram transportados do frigorífico ao laboratório de Patologia Animal da Universidade Estadual de Londrina em caixas refrigeradas e processados em seguida.

### **Exame histopatológico**

Após a abertura do estômago pela curvatura maior, fragmentos da *pars esophagea* dos estômagos foram colhidos e fixados em solução de formalina a 10% tamponada, sendo então submetidos ao processamento de rotina. Os cortes com 4 µm de espessura foram corados pelo método de Hematoxilina – Eosina (HE) para exame histopatológico.

As alterações histológicas foram identificadas e classificadas em presença ou ausência de ulceração e/ou erosão. As alterações de alongamento de papilas, degeneração epitelial, paraqueratose, hiperplasia foram classificadas em ausência, lesão discreta e lesão grave. A análise do infiltrado inflamatório foi realizada com objetiva de 40x em três diferentes campos e sua intensidade graduada em 0 (até 4 células/campo); 1 (5 a 15 células/campo); 2 (16 a 25 células/campo) e 3 (mais de 25 células/campo). A contagem de folículos linfóides da região de *pars esophagea* foi realizada em objetiva de 10X e classificada em ausência, até dois folículos por campo observado e três ou mais folículos linfóides por campo observado.

Outras alterações, como a intensidade do infiltrado inflamatório, presença de tecido de granulação e micropústulas, quando observadas, foram também anotadas e comparadas à identificação de *Helicobacter* spp.

## Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Amostras de mucosa gástrica (*pars esophagea*, corpo, fundo e piloro) foram imediatamente acondicionadas em frasco estéril, identificadas e mantidas sob congelamento à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento.

As amostras foram tratadas com tampão de lise constituído de dodecil sulfato de sódio (SDS) e proteinase K\*<sup>1</sup> em concentração final de 1% e 0,2 mg/mL, respectivamente. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a  $56^{\circ}\text{C}$  em banho maria durante 3 horas. O material resultante foi submetido à purificação e extração de DNA pela técnica do fenol/clorofórmio/álcool isoanílico seguida pela sílica/tiocianato de guanidina (BOOM, *et al.*, 1990) com modificações descritas por Alfieri, *et al.* (2004). Em todos os procedimentos foi incluída como controle negativo uma alíquota de água ultrapura autoclavada. O material obtido permaneceu estocado em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$  até amplificação pela PCR.

As reações da PCR foram feitas em volume final de 25  $\mu\text{L}$ , sendo 5 $\mu\text{L}$  de mix de DNA (1 $\mu\text{L}$  do material extraído, 3,5 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  e 0,5 $\mu\text{L}$  de cada *primer* a 20 pmol de concentração) e 20 $\mu\text{L}$  do mix de reação (11,75  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 4  $\mu\text{L}$  de dNTP, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR, 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase\*<sup>1</sup> e 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ ). Os *primers* utilizados eram específicos para o gênero *Helicobacter*, de acordo com Riley *et al.* (1996) e continham a seguinte seqüência: 5' CTATGACGGGTATCCGGC 3', 5' ATTCCACCTACCTCTCCCA 3' \*<sup>1</sup>. A amplificação foi executada em termo ciclador\*<sup>2</sup> de acordo com as seguintes condições de tempo e temperatura: 2 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 2 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$  e 1 minuto a  $54^{\circ}\text{C}$ , com 35 ciclos. Em todas as reações de amplificação foram utilizados como controle positivo uma amostra de *Helicobacter spp.* conhecida e como controle negativo uma alíquota de água destilada estéril.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), em solução de TEB pH 8,4 e visualizados em transluminador ultravioleta. As alturas das bandas obtidas foram comparadas a um marcador de 100 pb e fotografadas com sistema digital\*<sup>3</sup>.

\*<sup>1</sup> GIBCO BRL PRODUCTS – Life Technologies do Brasil Ltda. São Paulo – BR.

\*<sup>2</sup> Modelo PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research INC)

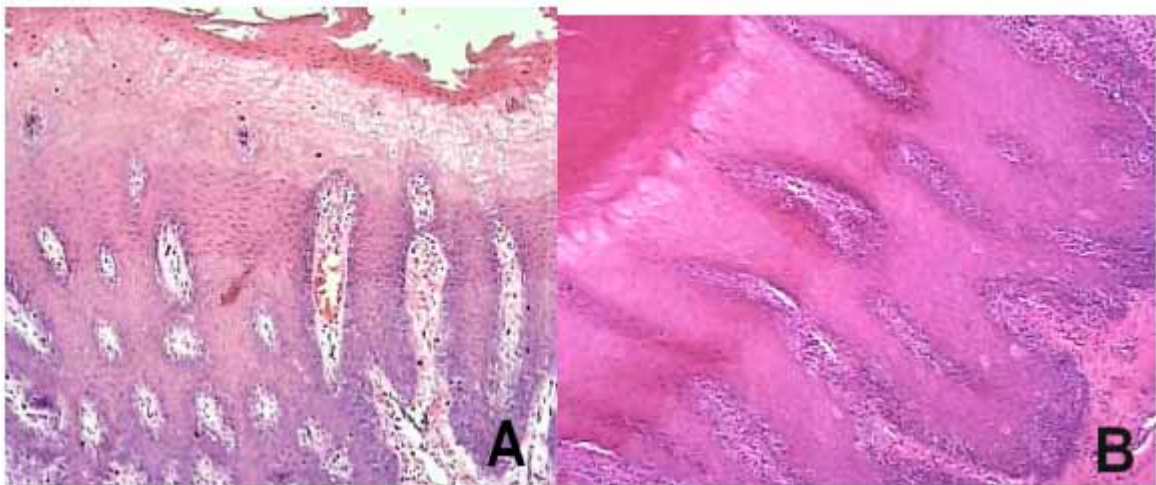
\*<sup>3</sup> Kodak (cúpula Kodak EDAS 290 e KODAK digital câmera DC290 ZOOM – EASTMAN KODAK COMPANY).

## Análise estatística

Os percentuais de ocorrência de bactérias nos grupos com e sem lesão gástrica foram comparados pelo teste do Qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher ficando estabelecido 5% como nível de significância.

## Resultados

A classificação histológica das alterações e sua ocorrência estão descritas na tabela 1. As alterações mais frequentes foram a degeneração epitelial e o alongamento de papilas, observada em 56 (83,5%) amostras analisadas. A degeneração epitelial discreta foi observada em 40 (59,7%) estômagos. Em 52 (77,5%) amostras observou-se paraqueratose e em 42 (61,1%), hiperplasia epitelial. Lesões graves de paraqueratose e alongamento de papilas epiteliais foram observadas em 24 e 25 amostras, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1** – Fotomicrografia de *pars esophagea*, suíno. Alongamento de papilas epiteliais e paraqueratose (A e B). Hematoxilina-Eosina, objetiva 10X. Londrina, Paraná, 2006.

As erosões de epitélio foram mais frequentes, acometendo 59,7% dos animais, enquanto que a ulceração de *pars esophagea* foi observada em 12 (17,9%). A ocorrência destas alterações e sua associação com a presença de *Helicobacter* spp está demonstrada na tabela 2. Nas amostras em que foram observadas úlceras, notou-se acentuado infiltrado inflamatório misto ou mononuclear e em três das 12, verificou-se também tecido de granulação. A contagem de folículos linfóides demonstrou que apenas 13 animais (19,4%) não apresentavam folículos nesta região (Tabela 2), os demais apresentaram mais de dois folículos linfóides por campo observado (Figura 1A).

**Tabela 1** – Distribuição de alterações histológicas de *pars esophagea* e a relação com a identificação de *Helicobacter* spp pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em suínos em idade de abate. Paraná, Brasil. 2006.

|   | <i>Helicobacter</i> spp |          |            |
|---|-------------------------|----------|------------|
|   | Positivo                | Negativo | Total      |
| <b>Hiperplasia epitelial *</b>              |                         |          |            |
| Ausência                                    | 18                      | 8        | 26 (38,8%) |
| Lesão discreta                              | 25                      | 7        | 32 (47,7%) |
| Lesão grave                                 | 4                       | 5        | 9 (13,4%)  |
| <b>Degeneração epitelial**</b>              |                         |          |            |
| Ausência                                    | 8                       | 3        | 11 (16,4%) |
| Lesão discreta                              | 33                      | 7        | 40 (59,7%) |
| Lesão grave                                 | 6                       | 10       | 16 (23,8%) |
| <b>Alongamento de papilas epiteliais***</b> |                         |          |            |
| Ausência                                    | 8                       | 3        | 11 (16,4%) |
| Lesão discreta                              | 20                      | 11       | 31 (46,2%) |
| Lesão grave                                 | 19                      | 6        | 25 (37,3%) |
| <b>Paraqueratose ****</b>                   |                         |          |            |
| Ausência                                    | 8                       | 7        | 15 (22,3%) |
| Lesão discreta                              | 20                      | 8        | 28 (41,7%) |
| Lesão grave                                 | 19                      | 5        | 24 (35,8%) |
| <b>Infiltrado inflamatório*****</b>         |                         |          |            |
| Grau 0                                      | 12                      | 5        | 17 (25,4%) |
| Grau 1                                      | 16                      | 9        | 25 (37,3%) |
| Grau 2                                      | 12                      | 3        | 15 (22,4%) |
| Grau 3                                      | 7                       | 3        | 10 (14,9%) |

\*Qui-quadrado= 3,82; p=0,51

\*\*\* Qui-quadrado= 0,91; p=0,63

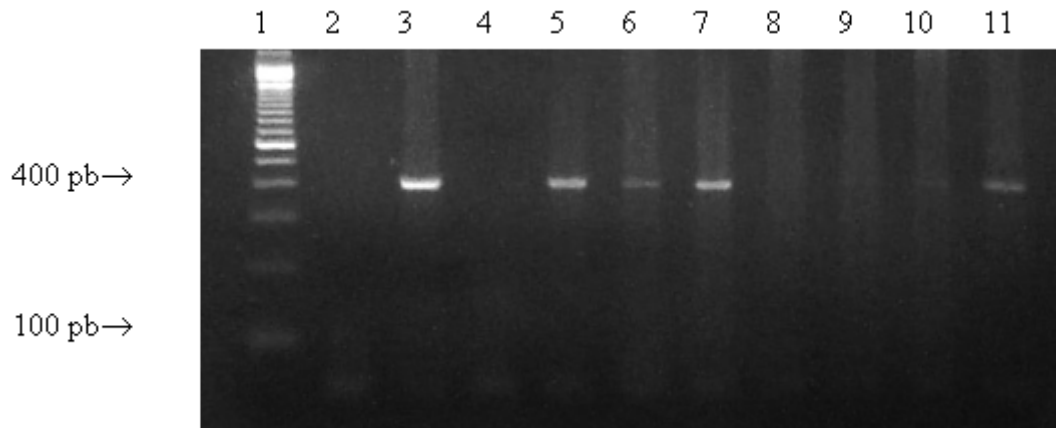
\*\*\*\*\* Qui-quadrado= 1,15; p=0,765

\*\* Qui-quadrado= 0,02; p=574

\*\*\*\* Qui-quadrado= 2,98; p=0,225

Infiltração de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria foi observada em todos os animais. A graduação mais freqüente foi a de 6 a 15 células/campo (Tabela 1). Neutrófilos dispostos em pequenos agregados no epitélio estratificado ou na lâmina própria ocorreram em 16 (23,9%) amostras. Discretos a moderados infiltrados eosinofílicos foram observados em 25

animais (37,3%) distribuídos na lâmina própria. Associação estatisticamente significativa não foi verificada entre intensidade do infiltrado inflamatório e a presença de *Helicobacter* spp.



**Figura 2** – Fotografia digitalizada de gel de agarose a 2 % com resultados de PCR para gênero *Helicobacter* spp. (400 pb). Coluna 1: padrão de tamanho molecular de 100 pares de base; 2: controle negativo da reação; coluna 3: controle positivo da reação; 4: controle negativo da extração. Colunas 5 a 11 correspondem a amostras provenientes de estômagos de suínos abatidos a região norte do estado do Paraná. Londrina, Paraná, 2006.

Das 67 amostras analisadas, 47 (70,1%) mostraram resultado positivo pela PCR para o gênero *Helicobacter* (Figura 2). A relação entre ulceração, erosão, número de folículos linfóides e a presença de *Helicobacter* spp está descrita na tabela 2. A erosão foi a lesão mais freqüente em animais PCR positivos para *Helicobacter* spp, com 40,2% das amostras analisadas. A freqüência de ulceração de mucosa de *pars esophagea* foi de 11,9% em animais em que o diagnóstico de *Helicobacter* spp foi positivo. Animais que não tinham ulceração e eram *Helicobacter* spp positivo apresentaram freqüência de 58,2%. Após a análise estatística pelo teste do Qui-quadrado não se constatou diferença significativa entre as variáveis analisadas.

**Tabela 2** - Distribuição de alterações histológicas de *pars esophagea* e relação com a identificação de *Helicobacter* spp pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em suínos em idade de abate do Estado do Paraná, Brasil. 2006.

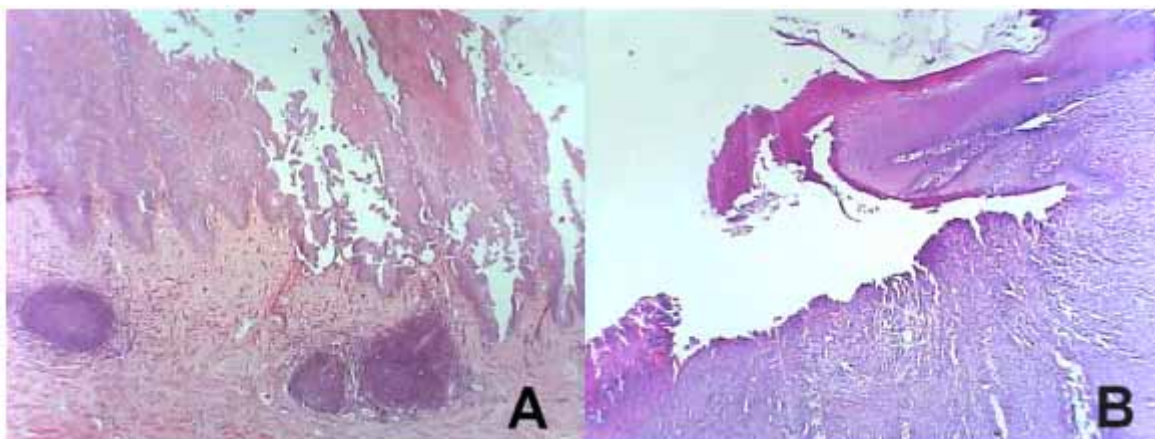
|                               | <i>Helicobacter</i> spp |            |            |
|-------------------------------|-------------------------|------------|------------|
|                               | Positivo                | Negativo   | Total      |
| <b>Ulceração*</b>             |                         |            |            |
| Ausência                      | 39 (58,2%)              | 16 (23,8%) | 55 (82,0%) |
| Presença                      | 8 (11,9%)               | 4 (5,9%)   | 12 (17,9%) |
| <b>Erosão**</b>               |                         |            |            |
| Ausência                      | 20 (29,8%)              | 7 (10,4%)  | 27 (40,2%) |
| Presença                      | 27 (40,2%)              | 13 (19,4%) | 40 (59,7%) |
| <b>Folículos linfóides***</b> |                         |            |            |
| Ausência                      | 7 (10,4%)               | 6 (8,9%)   | 13 (19,4%) |
| Até dois por campo            | 26 (38,8%)              | 9 (13,4%)  | 35 (52,2%) |
| ≤ três por campo              | 14 (20,8%)              | 5 (7,4%)   | 19 (28,3%) |

\*Qui-quadrado= 0,08; p= 0,510    \*\* Qui-quadrado= 0,09; p=0,760

\*\*\* Qui-quadrado= 2,05; p=0,358

Quanto ao número de folículos linfóides, constatou-se que 54 (80,5%) amostras apresentavam mais de um folículo linfóide por campo observado, sendo que 40 (59,7%) dessas amostras foram positivas na PCR. Dezenove (28,3%) amostras tiveram contagem de folículos igual ou superior a três por campo observado e dessas, 14 (20,8%) foram positivas a PCR (Figura 3 A).

Outras alterações foram observadas, como a presença de infiltrados localizados de neutrófilos no epitélio. Estes infiltrados estavam presentes em 10 (14,9%) das 67 amostras analisadas. O infiltrado inflamatório difuso, constituído por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, na *pars esophagea* também foi anotado. Em 47 amostras observou-se de uma a quatro células inflamatórias por campo observado (objetiva de 40X) e em 20 (29,8%) não se observou infiltrado inflamatório. Em oito animais constatou-se a presença de bacilos na superfície epitelial.



**Figura 3** - Fotomicrografia de *pars esophagea*, suíno. Proliferação de folículos linfóides em submucosa e erosão epitelial (A). Estômago suíno, *pars esophagea*. Úlcera acompanhada de intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Notar região íntegra de epitélio apresentando paraqueratose grave (B). Hematoxilina-Eosina, objetiva 10X. Londrina, Paraná, 2006.

## Discussão

No Brasil são escassos os estudos envolvendo análise histológica de *pars esophagea* em suínos. CARVALHO *et al.* (1999) observaram alterações histológicas como paraqueratose, edema e degeneração, porém sem definir a frequência de tais alterações. Outras lesões relatadas nesta região são necrose epitelial, infiltração neutrofílica e eosinofílica e hiperplasia linfóide (MUGGENBURG *et al.*, 1964; O'BRIEN, 1993; SZEREDI *et al.*, 2005). A elevada ocorrência de alterações histológicas na *pars esophagea* observadas neste estudo e os resultados obtidos em outras investigações com análise macroscópica sugerem que tais patologias continuam muito frequentes no plantel de suínos brasileiro (ROPPA *et al.*, 1995; MONTICELLI *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999).

Neste estudo, a prevalência de *Helicobacter* spp foi de 70,1%. Prevalência similar foi observada por Cantet *et al.* (1999) e Young *et al.* (2001), que utilizando a PCR observaram 80 e 63,8%, de amostras positivas, respectivamente. Porém os resultados deste estudo foram superiores aos relatados por Queiroz *et al.* (1990) e Grasso *et al.* (1996) que utilizaram apenas a histopatologia como método diagnóstico, com percentuais de 10,8 e 9,4% respectivamente. Este fato pode ser explicado pela escolha do método de diagnóstico da infecção por *Helicobacter* spp. A PCR é uma prova baseada na amplificação do material genético específico do agente. Além disso, este método tem sido considerado o mais sensível para a detecção de pequenas quantidades do agente, se comparado ao exame histopatológico e ao teste da urease (De GROOTE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004).

Em suínos a associação entre lesões gástricas e infecção por *Helicobacter* spp ainda é controversa. Diversos autores afirmam que há uma estreita relação entre o estabelecimento das lesões na *pars esophagea* e as bactérias (QUEIROZ *et al.*, 1990; De GROOTE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003; MALL *et al.*, 2004). Entretanto, outros autores discordam desta afirmação. MELNICHOUK *et al.* (1999) relataram que não há relação entre as lesões gástricas e *Helicobacter* spp, pois a presença de bactérias espiraladas foi constatada em 42% de estômagos sem lesão e em 18% dos estômagos com lesão. SZEREDI *et al.* (2005) avaliaram 89 suínos de abate e verificaram associação entre a presença de *Helicobacter* spp e alterações histológicas da região glandular do estômago, como dilatação de glândulas gástricas, abscessos glandulares e degeneração epitelial, não ocorrendo associação quando analisaram a *pars esophagea* macroscopicamente ou histologicamente.

KRAKOWKA *et al.* (2005) relataram que em suínos inoculados com *Helicobacter heilmannii* não foram observadas lesões microscópicas significativas em *pars esophagea* ou região glandular, enquanto que suínos inoculados com *H. pylori* – *like* de origem suína apresentavam doença gástrica grave. Atualmente, admite-se que o *H. heilmannii* é a espécie característica de suínos (PARK *et al.*, 2003) e que a patogenia das lesões gástricas está relacionada à espécie infectante. Neste estudo não foi identificada a espécie de *Helicobacter* infectante.

No presente estudo foi possível observar que as alterações histológicas foram mais freqüentes em animais com diagnóstico positivo para *Helicobacter* spp. A degeneração epitelial e o alongamento de papilas (discreta e grave) estavam presentes em 56 (83,6%) das amostras, sendo 39 positivas para *Helicobacter* spp. Das 24 amostras que apresentavam lesão grave de paraqueratose, 19 foram positivas a PCR. Desta forma, apesar de a relação entre as lesões histológicas e o *Helicobacter* spp. não ser estatisticamente significativa, algumas alterações mostravam-se mais freqüentes em animais positivos em comparação aos negativos.

A relação entre a hiperplasia de folículos linfóides ou infiltrado inflamatório difuso e o *Helicobacter pylori* em humanos já foi reportada por diversos autores (ERNST *et al.*, 2006). Em suínos, Krakowka *et al.* (2005) observaram que os suínos infectados experimentalmente desenvolveram quadro inflamatório de mucosa gástrica com infiltrado inflamatório mononuclear difuso e formação de agregados linfóides em lâmina própria tanto em região aglandular como em região glandular. Embaye *et al.* (1990) ao analisar estômagos de suínos de 10 a 22 semanas de idade constataram a presença de infiltrado inflamatório discreto na *pars esophagea* de aspecto macroscópico normal.

Quando comparamos a presença de folículos linfóides, constatamos que 40 (74,1%) animais apresentavam um ou mais folículos e eram positivos para helicobactérias, enquanto que nos animais negativos apenas 14 (25,9%) apresentavam folículos. Observamos que os animais positivos para a presença de *Helicobacter* spp. e com contagem de folículos maior ou igual a três por campo foi de 20,8%, enquanto que 10,4% dos animais foram positivos e possuíam até um folículo por campo. As amostras que tinham contagem de folículos de até dois folículos por campo observado foram 35 (52,2%), dessas 26 eram positivas para a presença de *Helicobacter* spp. Apesar de observarmos uma maior frequência de amostras com proliferação de folículos na *pars esophagea* no grupo de amostras positivas para *Helicobacter* spp., a análise estatística através do teste do Qui-quadrado revelou que não há diferença estatística entre as variáveis.

Este estudo permite afirmar que as alterações histológicas na mucosa da região aglandular de suínos em idade de abate ocorrem com elevada frequência. Embaye et al. (1990) também observaram uma alta ocorrência de alterações degenerativas e erosivas nesta região. Os autores sugerem que estas lesões são consequência de uma dieta rica em carboidratos fermentáveis, com partículas finas, bem como a presença de lactobacilos capazes de produzir ácido no estômago.

Os resultados conflitantes a respeito das lesões gástricas justificam estudos mais minuciosos para se estabelecer corretamente a patogenia de tais alterações, pois estas podem acarretar prejuízos para a produção animal (KOWALCZYK, 1969; O'BRIEN, 1993). Também o fato de alterações histológicas, como gastrites e câncer gástrico consequentes à infecção por *Helicobacter pylori* no homem (ERNST et al., 2006), justificam maiores estudos para se conhecer as espécies de *Helicobacter* em suínos e seus possíveis fatores de patogenicidade. No Brasil são escassos os relatos que identificam as espécies de *Helicobacter* no plantel suíno, inexistindo estudos que identifiquem fatores de patogenicidade da bactéria.

O presente estudo nos permite afirmar que, apesar de não haver diferença estatística, as amostras infectadas por *Helicobacter* spp. apresentaram alterações histológicas numa frequência maior que em amostras negativas. Estes resultados sugerem que a bactéria *Helicobacter* pode ter um importante papel no estabelecimento de tais lesões. Estudos que envolvam também região glandular de estômagos suínos devem ser realizados, bem como a identificação de espécie de *Helicobacter* e de fatores de patogenicidade bacterianos.

## Referências

- ALFIERI, A. F. **Caracterização dos genótipos G (VP7) e P (VP4) de Rotavírus grupo A de origem animal (bovina e suína) e humana pela Reação em Cadeia pela Polimerase (multiplex RT-PCR)**. 1999. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BARBOSA, A.J.A.; SILVA, J.C.P.; NOGUEIRA, M.M.F.; PAULINO Jr., E.; MIRANDA, C.R. Higher incidence of *Gastropirillum* sp. in swine with gastric ulcer of the *pars oesophagea*. **Vet. Pathol.**, v.32, p. 134-139, 1995.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-van DILLEN, P.M.E.; NOORDAA, J. van der. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 495 – 503, 1990.
- BRENNER, H.; ARNDT, V.; STEGMAIER, C.; ZIEGLER, H.; ROTHENBACHER, D. Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? **Am. J. Epidemiol.**, v. 159. p. 252-258, 2004.
- CANTET, F.; MAGRAS, C.; MARAIS, A.; FEDERIGUI, M.; MÉGRAUD, F. *Helicobacter* species colonizing pig stomach: molecular characterization and determination of prevalence. **Environ Microbiol.**, v.65, p. 4672-4676, 1999.
- CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B.; MARTINEZ, P.A.O.; MAZZUCATO, B.C.; ALESSI, A.C. Frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto, SP. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, p.223-227, 1999.
- DE GROOTE, D.; DUCATELLE, R.; VAN DOORN, L.J; TILMANT, K.; VERSCHUUREN, A.; HAESBROUCK, F. Detection of “*Candidatus Helicobacter suis*” in gastric samples of pig by PCR: comparison with other invasive diagnostic techniques. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1131-1135, 2000.
- EMBAYE, H.; THOMLINSON, J.R.; LAWRENCE, T.L.J. Histopathology of oesophagogastric lesions in pigs. **J. Comp. Pathol.**, v.103, p. 253-264, 1990.
- ERNST, P. B.; PEURA, D. A.; CROWE, S. E. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. **Gastroenterol.** v. 206, p. 130-188, 2006.
- FOX, J.G.; LEE, A. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. **Lab. Anim. Sci.**, v.47, p.222-255, 1997.
- GUISE, H.J.; CARLYLE, W.W.H.; PENNY, R.H.C. Gastric ulcers in finishing pigs: their prevalence and failure to influence growth rate. **Vet. Rec.**, v.141, p.563-566, 1997.
- GRASSO, G.M.; RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M.; RUBERTO, A.; IANNETTO, G. Prevalence of *Helicobacter*-like organisms in porcine gastric mucosa. A study of swine slaughtered in Italy. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 213-217, 1996.
- KOWALCZYK, T. Etiologic factors of gastric ulcers in swine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 30, n. 3. p. 393-400, 1969.

- KRAKOWKA, S.; RINGS, D. M.; ELLIS, J. A. Experimental induction of bacterial gastritis and gastric ulcer disease in gnotobiotic swine inoculated with porcine *Helicobacter*-like species. **Am J Vet Res.**, v. 66, p. 945-952, 2005.
- MALL, A. S.; SULEMAN, N.; TAYLOR, K.; KIDD, M.; TYLER, M.; LOTZ, Z.; ROSEMARY, H.; KAHN, D. The relationship os a *Helicobacter heilmannii* infection to the mucosal changes in abattoir and laboratory pig stomach. **Surg. Today.**, v. 34, p. 943-949, 2004.
- MARSHAL, B. J.; and WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.1, p. 1311-1314, 1984.
- MELNICHOUK, S.I.; FRIENDSHIP, R.M.; DEWEY, C.E.; BILDFELL, R.J.; SMART, N.L. *Helicobacter*-like organisms in the stomach of pigs with and without gastric ulceration. **Swine Health Prod.**, v.7, p. 201-205, 1999.
- MONTICELLI, C.J.; MENTEN, J.F.M.; ZANOTTO, D.L. Efeito da granulometria do milho, da área por animal e do sexo sobre lesões gástricas de suínos. In: **Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos**, Blumenau. *Anais...*, Blumenau: ABRAVES, 1995, p.165.
- MUGGENBURG, B.A.; REESE, B.S.; KOWALSKY, M.S.; GRUMMER, R.H.; HOCKSTRA, W.G. Survey of the prevalence of gastric ulcers in swine. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.1673-1678, 1964.
- NEIGER, R. *Helicobacter* infection in animals – what do we really know ? **Proc. 16 th ACVIM Forum**: San Diego, CA, 1998.
- O'BRIEN, J.J. Gastric ulcers. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L. *et al. Diseases of Swine*. 7 ed. Ames, Iowa State University Press, 1993. p.680-691.
- PARK, J. -H.; HONG, J.J.; PARK, J.-H. Experimental infection of mice with tightly coiled spiral bacteria ("*Candidatus Helicobacter suis*") originating from the pig stomach. **J. Comp. Pathol.**, v. 129, p. 154-160, 2003.
- PARK, J. -H.; SEOK, S.-H.; CHO, S. -A.; BAEK, M.-W.; LEE, H. -Y.; KIM, D. -J.; PARK, J.-H. The higt prevalence of *Helicobacter* sp. in porcine pyloric mucosa and its histopathological and molecular characteristics. **Vet. Microbiol.** v.104, p. 219-225, 2004.
- QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.F.; MENDES, E.N.; LAGE, A.P.; CARVALHO, C.T.; BARBOSA, A.J.A. A spiral microorganism in the stomach of pigs. **Vet. Microbiol.**, v.24, p. 199-204, 1990.
- QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.F.; MENDES, E.N.; MOURA, S.B.; OLIVEIRA, A.M.R.; MIRANDA, D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. **Gastroenterol.**, v.27, p.111-119, 1996.
- RILEY, L. K.; FRANKLIN, C.L.; HOOK, R.R.; BESCH-WILLIFORD, C. Identification of murine helicobacters by PCR and restricition enzyme analises. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.942-946, 1996.

ROPPA, L. ; SARTOR, A.B.; OTONELLI, J. Ocorrência de úlcera gastroesofágica em suínos ao abate no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, 7, 1995, Blumenau. **Anais...**Blumenau: ABRAVES, 1995. p.108.

ROSENDAAAL, R.; VOS, J. H.; ROUMEN, T.; VAN VUGT, R.; CATTOLI, G.; BART, A.; KLAASEN, H.L.; KUIPERS, E. J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; KUSTERS, J. G. Slaughter pigs are commonly infected by closely related but distinct gastric ulcerative lesion-inducing gastropirilla. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.2661-2664, 2000.

SIMPSON, K.W.; MC DONOUGH, P.L.; STRAUSS-AYALI, D.; CHANG, Y.F.; HARPENDING, P.; VALENTINE, B.A. *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. **Vet. Pathol.**, v.36, p.237-248, 1999.

SZEREDI, L.; PALKOVICS, G.; SOLYMOSI, N.; TEKES, L.; MEHESFALVI, J. Study on the role of gastric *Helicobacter* infection in gross pathological and histological lesions of the stomach in finishing pigs. **Acta Vet Hung.**, v.53, p. 371-83, 2005.

YOUNG, Y. K.; HAN, J. H.; JOO, H.S. Identification of novel *Helicobacter* species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3311-3315, 2001.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- As lesões macroscópicas de estômagos suínos estão presentes em suínos de abate com alta ocorrência.
- As alterações histológicas de pars esophagea estão presentes em um grande número de animais, sendo as degenerações epiteliais e alongamento de papilas as alterações mais freqüentemente observadas.
- Não há relação entre o peso ao abate, o gênero e as lesões gástricas macroscópicas.
- A ocorrência de *Helicobacter* spp em estômagos suínos é de 47.5% utilizando a coloração de *Warthin-Starry* e de 70,1% utilizando a PCR.
- A presença do *Helicobacter* spp não foi relacionada às lesões gástricas macroscópicas ou histológicas, sugerindo que não há participação da bactéria no estabelecimento de tais alterações.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, L.P.; KIILERICK, S.; PEDERSEN, G.; THORESON, A.C.; JORGENSEN, F.; RATH, J.; LARSEN, N-E.; BORUP, O.; KROGFELT, K.; SCHEIBEL, J.; RUNE, S. An analysis of seven different methods to diagnose *Helicobacter pylori* infections. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 33, p. 24-30, 1998.
- ARGENZIO, R.A.; SOUTHWORTH, M. Sites of organic acid production and absorption in the gastrointestinal tract of the pig. **Am. J. Physiol.**, v.228, p. 454-462, 1975.
- ARGENZIO, R.A.; EISEMANN, J. Mechanisms of acid injury in porcine gastroesophageal mucosa. **Am. J. Vet. Res.**, v.57, p. 564-573, 1996.
- BARBOSA, A.J.A.; SILVA, J.C.P.; NOGUEIRA, M.M.F.; PAULINO Jr., E.; MIRANDA, C.R. Higher incidence of *Gastropirillum* sp. in swine with gastric ulcer of the *pars oesophagea*. **Vet. Pathol.**, v.32, p. 134-139, 1995.
- BLASER M. J. e ATHERTON, J. C. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p.321-333. 2004.
- CAMARGO, P. L. **Identificação das espécies de *Helicobacter* spp. presentes na mucosa gástrica de cães, gatos e seres humanos, e sua correlação com as alterações da mucosa.** São Paulo, 2002. 93 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- CANTET, F.; MAGRAS, C.; MARAIS, A.; FEDERIGUI, M.; MÉGRAUD, F. *Helicobacter* species colonizing pig stomach: molecular characterization and determination of prevalence. **Enviroment Microbiol.**, v.65, p. 4672-4676, 1999.
- CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B.; MARTINEZ, P.A.O.; MAZZUCATO, B.C.; ALESSI, A.C. Frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto, SP. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, p.223-227, 1999.
- CIACCI, J.R.; MORES, N.; SOBESTIANSKY, J. Úlcera gástrica como causa de morte e como achado de necropsia em três rebanhos suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.43, p.525-533, 1991.

De GROOTE, D.; DUCATELLE, R.; VAN DOORN, L.J.; TILMANT, K.; VERSCHUUREN, A.; HAESEBROUCK, F. Detecion of “*Candidatus Helicobacter suis*” in gastric samples of pig by PCR: comparison with other invasive diagnostic techniques. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1131-1135, 2000.

EMBAYE, H.; THOMLINSON, J.R.; LAWRENCE, T.L.J. Histopathology of oesophagogastric lesions in pigs. **J. Comp. Pathol.**, v.103, p. 253-264, 1990.

FRIENDSHIP, R.M.; MELNICHOUK, S.; SMART, N.L. *Helicobacter* infection: what should a swine practitioner know ? **Swine Health Prod.**, v.7, p.167-172, 1999.

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

GRASSO, G.M.; RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M.; RUBERTO, A.; IANNETTO, G. Prevalence of *Helicobacter*-like organisms in porcine gastric mucosa. A study of swine slaughtered in Italy. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 213-217, 1996.

GRUBEL, P.; HOFFMAN, J. S.; CHONG, F. K.; BURSTEIN, N. A.; MEPANI, C.; CAVE, D.R. Vector Potential of Houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 6, p. 1300-1303, 1997.

GUISE, H.J.; CARLYLE, W.W.H.; PENNY, R.H.C. Gastric ulcers in finishing pigs: their prevalence and failure to influence growth rate. **Vet. Rec.**, v.141, p/563-566, 1997.

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

KOWALCZYK, T. Etiologic factors of gastric ulcers in swine. **Am. J. Vet. Res.**,v. 30, n. 3. p. 393-400, 1969.

KRAKOWKA, S.; RINGLER, S.S.; EATON, K. EATON, K.A.; GREEN, W.B.; LEUNK, R. Manifestations of the local gastric immune response in gnotobiotic piglets infected with *Helicobacter pylori*. **Vet. Immun. Immunopathol.**, v.52, p.159-173, 1996.

KRAKOWKA, S.; EATON, K.A.; RINGS, D.M.; ARGENZIO, R.A. Production of gastroesophageal erosions and ulcers (GEU) in gnotobiotic swine monoinfected with fermentative commensal bacteria and fed high-carbohydrate diet. **Vet. Pathol.**, v.35, p.272-282, 1998.

KRAKOWKA, S., RINGS, D. M., ELLIS, J.A. Experimental induction of bacterial gastritis and gastric ulcer disease in gnotobiotic swine inoculated with porcine *Helicobacter*-like species. *Am. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 945-952, 2005.

KOWALCYZK, T. Etiologic factors of gastric ulcers in swine. *Am. J. Vet. Res.*, v. 30, n. 3. p. 393-400, 1969.

LEE, A. Spiral organisms: what are they? A microbiologic introduction to *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 187, p. 9-22, 1991.

MALL, A. S.; SULEMAN, N.; TAYLOR, K.; KIDD, M.; TYLER, M.; LOTZ, Z.; ROSEMARY, H.; KAHN, D. The relationship os a *Helicobacter heilmannii* infection to the mucosal changes in abattoir and laboratory pig stomach. *Surg. Today*. v. 34, p. 943-949. 2004.

MARSHAL, B. J.; and WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, v.1, p. 1311-1314, 1984.

McGEE, D. J.; RADCLIFF, F. J.; MENDZ, G. L.; FERRERO, R. L.; MOBLEY, H. L. T. *Helicobacter pylori rocF* is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J. of Bacteriol.*, v. 181, p. 7314–7322, 1999.

MEINING, A.; KROHER, G.; STOLTE, M. Animals reservoirs in the transmittion of *Helicobacter heilmannii*. Results of a questionnaire-based study. *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 33, p.795-798, 1998.

MELNICHOUK, S.I.; FRIENDSHIP, R.M.; DEWEY, C.E.; BILDFELL, R.J.; SMART, N.L. *Helicobacter*-like organisms in the stomach of pigs with and without gastric ulceration. *Swine Health Prod.*, v.7, p. 201-205, 1999.

MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M.M.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; ROCHA. G.A.; FOX, J.G. Are pigs a reservoir host for human *Helicobacter* infection? *Am. J. Gastroenterol.*, v.89, p.1296-1300, 1994.

MONTICELLI, C.J.; MENTEN, J.F.M.; ZANOTTO, D.L. Efeito da granulometria do milho, da área por animal e do sexo sobre lesões gástricas de suínos. In: **Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos**, 7, 1995, Blumenau. *Anais...*, Blumenau: ABRAVES, 1995, P. 165.

MUGGENBURG, B.A.; REESE, B.S.; KOWALSKY, M.S.; GRUMMER, R.H.; HOCKSTRA, W.G. Survey of the prevalence of gastric ulcers in swine. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.1673-1678, 1964.

NEIGER, R.; DIETERICH, C.; BURNENS, A.; WALDVOGEL, A.; CORTHESEY-THEULAZ, I.; HALTER, F.; LAUTERBURG, B.; SHMASSMANN, A. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.634-637, 1996.

NEIGER, R. Helicobacter infection in animals – what do we really know ? **Proc. 16 th ACVIM Forum**: San Diego, CA, 1998.

O'BRIEN, J.J. Gastric ulcers. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L. *et al. Diseases of Swine*. 7 ed. Ames, Iowa State University Press, 1993. p.680-691.

OWEN, R.J. *Helicobacter* – species classification and identification. **British Med. Bull.**, v.54, p. 17-30, 1998.

PARK, J. -H.; HONG, J.J.; PARK, J.-H. Experimental infection of mice with tightly coiled spiral bacteria (“*Candidatus Helicobacter suis*”) originating from the pig stomach. **J. Comp. Pathol.**, v. 129, p. 154-160, 2003.

PARK, J. -H.; SEOK, S.-H.; CHO, S. -A.; BAEK, M.-W.; LEE, H. -Y.; KIM, D. -J.; PARK, J.-H. The high prevalence of *Helicobacter* sp. in porcine pyloric mucosa and its histopathological and molecular characteristics. **Vet. Microbiol.** v.104, p. 219-225. 2004.

PERKINS, S.E.. Use of PCR and culture to detect *Helicobacter pylori* in naturally infected cats following triple antimicrobial therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, p. 1486-1490, 1996.

QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.F.; MENDES, E.N.; LAGE, A.P.; CARVALHO, C.T.; BARBOSA, A.J.A. A spiral microorganism in the stomach of pigs. **Vet. Microbiol.**, v.24, p. 199-204, 1990.

QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.F.; MENDES, E.N.; MOURA, S.B.; OLIVEIRA, A.M.R.; MIRANDA, D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. **Gastroenterol.**, v.27, p.111-119, 1996.

ROPPA, L.; SARTOR, A.B.; OTONELLI, J. Ocorrência de úlcera gastroesofágica em suínos ao abate no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, 7, 1995, Blumenau. **Anais...** Blumenau: ABRAVES, 1995. p.108.

ROOSENDAAL, R.; VOS, J. H.; ROUMEN, T.; VAN VUGT, R.; CATTOLI, G.; BART, A.; KLAASEN, H.L.; KUIPERS, E. J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; KUSTERS, J. G. Slaughter pigs are commonly infected by closely related but distinct gastric ulcerative lesion-inducing gastropirilla. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 2661-2664. 2000.

SEIDEL, K.E.; Antibodies against *Helicobacter felis* in sera of cats and dogs. **J. Vet. Med. B.**, v. 38, p. 182-188, 1999.

SIMPSON, K.W.; MC DONOUGH, P.L.; STRAUSS-AYALI, D.; CHANG, Y.F.; HARPENDING, P.; VALENTINE, B.A. *Helicobacter felis* infection in dogs: effect on gastric structure and function. **Vet. Pathol.**, v.36, p. 237-248, 1999.

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

STOFFEL, M. H., FRIESS, A. E., BURNENS, A., SCHUMASSMANN, A., NEIGER, R. Distinction of gastric *Helicobacter* spp. in humans and domestic pets by scanning electron microscopy. **Helicobacter**, v.5, n.4, p 232-239, 2000.

TAYLOR, D.N; BLASER, M.J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epid. Rev.**, v.13, p.42-59, 1991.

UTRIAINEN, M.; HÄNNINEN, M. L.; detection of *Helicobacter*-like bacteria in porcine gastric biopsy samples by amplification of 16S rRNA, ureB, vacA and cagA genes by PCR. **Vet. Res. Commun.** v. 22, p.373-383. 1998

YOUNG, C. K.; HAN, J. H.; JOO, H.S. Identification of novel *Helicobacter* species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, Vol. 39, p. 3311-3315, 2001.