

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

**“DETERMINACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS
CURVO-ESPIRILADAS TIPO *Helicobacter spp.* EN ESTÓMAGO, INTESTINOS,
HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR DE PERROS (*Canis familiaris*)
DE LA CIUDAD DE VALDIVIA, CHILE”**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO

MARÍA SOLEDAD JARA VERDUGO

VALDIVIA – CHILE

2003

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Enrique Paredes H.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dra. Ximena Rojas S.

Nombre

Firma

Dr. Marcos Moreira E.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

Valdivia, 17 de Noviembre 2003

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSIÓN	26
7. CONCLUSIONES	31
8. BIBLIOGRAFÍA	32
9. ANEXOS	43
10. AGRADECIMIENTOS	48

**“DETERMINACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS
CURVO-ESPIRILADAS TIPO *Helicobacter spp.* EN ESTÓMAGO, INTESTINOS,
HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR DE PERROS (*Canis familiaris*)
DE LA CIUDAD DE VALDIVIA, CHILE”**

1. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la presencia de bacterias tipo *Helicobacter spp.*, en caninos de la ciudad de Valdivia, a través de examen histopatológico de estómago, intestinos, hígado y vesícula biliar. Se utilizaron 34 perros, 15 machos y 19 hembras, con un rango de edad de 3 meses a 15 años y un peso entre 4 y 30 kilos.

Se analizó de forma descriptiva la frecuencia de presentación de bacterias tipo *Helicobacter spp.*, mediante el uso de examen histológico, identificándose las bacterias por su morfología característica y por su afinidad por tinciones de plata (tinción Whartin Starry), considerando las variables del total de animales, zona anatómica (segmento del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar), sexo y edad.

Los resultados de este estudio indicaron la presencia de las bacterias tipo *Helicobacter spp.* en todos los perros estudiados, con un 100% de presentación en las muestras provenientes de intestino grueso (ciego, colon y recto), 94,1% en estómago, 73,5% en duodeno, 70,6% en yeyuno y 88,2% en ileon. Los porcentajes menores, se obtuvieron de las muestras analizadas de hígado (64,7%) y vesícula biliar (58,8%).

Las bacterias fueron encontradas en animales de todas las edades y de ambos sexos, observándose un predominio de hembras positivas a las bacterias en estómago, intestino delgado e hígado; presentando iguales porcentajes para ambos sexos en intestino grueso y siendo levemente menor para hembras en vesícula biliar.

La presencia de las bacterias fue semicuantificada subjetivamente, encontrándose un alto porcentaje de muestras que presentaban las bacterias en forma abundante en estómago e intestino grueso. A diferencia de las muestras analizadas de intestino delgado, hígado y vesícula biliar, en donde se observó un alto porcentaje de muestras en las que las bacterias se presentaban en escaso número.

Los resultados obtenidos permiten concluir, que las bacterias tipo *Helicobacter spp.* son habitantes comunes del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar de los perros de Valdivia.

Palabras claves: Bacterias curvo-espiriladas, *Helicobacter spp.*, perros, digestivo, hígado, vesícula biliar, histología.

“HISTOLOGICAL DETERMINATION OF THE PRESENCE OF *Helicobacter spp.*-LIKE ORGANISMS IN THE STOMACH, INTESTINES, LIVER AND GALL BLADDER OF DOGS (*Canis familiaris*), IN VALDIVIA, CHILE”

2. SUMMARY

This study was carried out in order to determine the presence of *Helicobacter spp.*-like organisms in dogs of Valdivia. Thirtyfour dogs (15 males and 19 females), were subjected to histological examination of the stomach, intestines, liver and gall bladder. The age of the animals ranged between 3 months old to 15 years old and weight ranged from 4 to 30 Kg.

The results of the histological exams were analysed according to sex, age, zone (segment of the digestive system, liver and gall bladder) and total animal. The bacteria were identified by their characteristic morphology and their affinity with silver stain (Whartin Starry).

The results of this study showed the presence of *Helicobacter spp.*-like organisms in all dogs. The bacteria were present in 100% of the samples from large intestine (caecum, colon and rectus); 94.1% in stomach; 73.5% from the duodenum; 70.6% from the jejunum and 88.2% from the ileum. The lowest presence was found in samples analyzed from the liver (64.7%) and gall bladder (58.8%).

The bacteria were found in animals of all ages and both sexes. More females than males presented the bacteria in the stomach, small intestine and liver, while both sexes presented bacteria in large intestine equally. More males than females presented bacteria in the gall bladder.

The presence of the bacteria was subjectively semiquantitated: the bacteria were abundant in a high percentage of samples taken from the stomach and large intestine, but was scarce in high percentage of the samples analyzed from the small intestine, liver and gall bladder.

It is concluded that *Helicobacter spp.*-like organisms are common inhabitants of the digestive system, liver and gall bladder of dogs from Valdivia.

Key Words: *Helicobacter spp.*-like organisms, dogs, digestive, liver, gall bladder, histology.

3. INTRODUCCIÓN

Desde que *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fue cultivado por primera vez a partir de una biopsia gástrica humana en 1982, se ha observado que muchas especies relacionadas colonizan la mucosa gástrica de seres humanos y otros animales (Solnick y Schauer, 2001). El primer organismo cultivado desde animales fue *H. felis* (Lee y col., 1988).

H. pylori coloniza el estómago del 70-80% de la población humana en países en desarrollo, iniciándose a edad temprana. Se sabe que, a los 10 años de edad, aprox. el 50% de los niños de todo el mundo portan este microorganismo, y su presencia incrementa el riesgo de desarrollar gastritis, úlcera péptica y/o cáncer gástrico (Valenzuela, 1999; Majalca y col., 2001; González y Carbajal, 2002). Aproximadamente el 90-95% de las úlceras duodenales y el 70-75% de las úlceras gástricas, son atribuidas a la infección por esta bacteria, además, se estima que el riesgo de desarrollar úlcera péptica en individuos infectados es del 10% (Ernst y Gold, 2000).

En Chile, se determinó la seropositividad para *H. pylori* en niños y jóvenes de Santiago y Punta Arenas. A los 5 años de edad, el 50% del grupo socioeconómico bajo y el 18% del grupo más alto están ya infectados. Entre los 25 y 35 años, la prevalencia alcanzó un 70% en los grupos socioeconómicos bajo y medio y 40% en el grupo más alto (Hopkins y col., 1993; Rollán, 1994).

Los factores de riesgo para la infección con *H. pylori* incluyen hacinamiento familiar, características del organismo en el país, situación socioeconómica, condiciones higiénico-sanitarias deficientes, edad y ciertos hábitos dietéticos (Rollán, 1994; Valenzuela, 1999; Ernst y Gold, 2000).

Estos microorganismos han sido clasificados en diferentes especies sobre la base de su secuencia 16 S rRNA, hibridación de DNA y por su apariencia mediante microscopía electrónica (Simpson y Burrows, 1999).

Taxonómicamente, el género *Helicobacter* (del griego: helix, helicoidal; bacter, bacteria), pertenece a la superfamilia VI de la clase *Proteobacteria*, división *Gracillicutes* (Fox y Lee, 1997).

Las bacterias del género *Helicobacter* se caracterizan por ser móviles, Gram negativas y microaerofílicas. Morfológicamente son espiraladas, curvadas o cocoides, de forma similar al género *Campylobacter* (Ettinger, 2000), por lo que originalmente se pensó que pertenecían a este género (Solnick y Schauer, 2001).

H. pylori mide aproximadamente 3,5 x 0,5 µm, posee múltiples flagelos en uno de sus polos, es activamente móvil y coloniza la capa de mucus que cubre el epitelio gástrico (Majalca y col., 2001).

Dos formas morfológicas, bacilar y cocoide, han sido descritas para *H. pylori*. La forma bacilar es la dominante y virulenta, mientras que la forma cocoide es no viable o pudiese ser la forma que protege al organismo durante la inactividad (Chan y col., 1994).

Antes de la observación de bacterias espirales gástricas en humanos, se encontraron organismos similares en animales. En 1881, se describió una bacteria espiral gástrica en el estómago de perros (Solnick y Schauer, 2001). Bacterias espirales gástricas fueron subsecuentemente vistas en gatos (Lim, 1920), *Rhesus macaques* (Doenges, 1939) y otros animales, sin embargo, no cobró importancia hasta ser cultivada y relacionada con problemas gastrointestinales y hepatobiliares en el hombre (Solnick y Schauer, 2001). Actualmente se encuentra en la lista de enfermedades emergentes de la OMS, en la cual se incluyen no sólo afecciones emergentes nuevas con sus respectivos microorganismos responsables, sino también otras ya conocidas, cuyas etiologías fueron recientemente descubiertas como es el caso de *H. pylori* como agente causal de úlcera péptica (Conti, 2001).

En la última década, el número de especies del género *Helicobacter* se ha expandido rápidamente, incluyendo al menos 24 especies nombradas formalmente; y otras 35 especies que se encuentran en espera de ser oficialmente nombradas (Fox, 2002). Se han identificado especies de *Helicobacter* cultivables provenientes del estómago de humanos y otros animales, así como también microorganismos no-cultivables. Estos microorganismos se clasifican según su ubicación, en especies gástricas y no gástricas (enterohepáticas) (Solnick y Schauer, 2001).

Las bacterias *Helicobacter* de ubicación gástrica, se caracterizan por la producción de ureasa, enzima que genera amoníaco, originando una cubierta alcalina alrededor de la bacteria, lo que le permite sobrevivir en el medioambiente ácido del estómago (Heilmann y Borchard, 1991; Hermanns y col., 1995; Happonen y col., 1996). También producen proteinasas y lipasas, lo que les permite obtener nutrientes, reducir la viscosidad del mucus y facilitar su movimiento flagelar (Valdés, 2000). Estas bacterias se desarrollan mejor en un ambiente neutro o levemente alcalino (pH 7 a 8), sin embargo, tienen alta resistencia al pH ácido ya que han sido detectadas al interior de las células parietales (productoras de ácido clorhídrico), resistiendo temperaturas de 33° a 40° C (Gitnick, 1997).

Los microorganismos *Helicobacter* se ubican en las regiones cardial, fúndica y pilórica del estómago (Hänninen y col., 1996; Paz, 2002), encontrándose sobre la superficie de la mucosa, de las fosas gástricas, glándulas gástricas y células parietales (Henry y col., 1987; Paz, 2002).

Las bacterias gástricas encontradas en perros son: *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis*, *H. heilmannii* (también conocida como *Gastrospirillum hominis*), *H. bilis* y *Flexispira rappini*; en la mucosa de gatos se han encontrado: *H. felis*, *H. heilmannii* y *H. pylori* (Simpson y Burrows, 1999). Las especies descritas más recientemente se han aislado de

vías hepáticas e intestinales de diversos animales (Rivas y Hernández, 2000). En el perro, las bacterias enterohepáticas encontradas son: *H. bilis*, *H. canis* y *H. sp. flexispira* (“*Flexispira rappini*”) (Solnick y Schauer, 2001).

Simpson y Burrows (1999), sugieren una alta prevalencia de infección gástrica por *Helicobacter spp.* en perros y gatos, describiendo una tasa de prevalencia del 67-86% en perros clínicamente sanos, del 74-80% en perros con vómitos recurrentes, y del 100% en perros beagle sanos de laboratorio. Del mismo modo, esta bacteria fue detectada en el 100% de perros asintomáticos, muestreados por biopsia gástrica a través de endoscopia (Paz, 2002).

Análisis de biopsias gástricas de perros infectados, examinados mediante microscopía electrónica, cultivos y técnicas de reacción de polimerasa en cadena (PCR); han demostrado coinfecciones con diferentes especies de *Helicobacter* (Simpson y Burrows, 1999). De la misma forma, en animales de zoológico se ha descrito la presencia de diferentes especies de *Helicobacter*, mediante PCR de muestras fecales (Abu y col., 2003).

La observación de que muchos perros y gatos infectados con especies de *Helicobacter* gástricas son asintomáticos, ha sido interpretada como que estos organismos no son patógenos en estos animales (Rodríguez y col., 2003). Esta visión puede ser algo ingenua, ya que en seres humanos la prevalencia de *H. pylori* alcanza un 80-90% en algunos países, pero sólo un porcentaje relativamente pequeño (5-10%) de los individuos afectados muestran signos clínicos evidentes (Simpson y Burrows, 1999).

Experimentos para determinar la patogenicidad de especies individuales de *Helicobacter*, han demostrado gastritis y respuesta inmuno-humoral en perros gnotobióticos después de infecciones con *H. felis* y *H. pylori* (Simpson y Burrows, 1999). Por otro lado, se ha observado que infecciones por *H. bilis* producen diarrea, pérdida de peso y gastroenteritis en ratones de laboratorio (Maggio-Price y col., 2002).

Pese a que las especies gástricas de *Helicobacter* han sido el foco de diversos estudios experimentales, debido a la importancia de *H. pylori* en relación a enfermedades gástricas en seres humanos, el descubrimiento de bacterias *Helicobacter* enterohepáticas en animales y humanos ha despertado el interés en el estudio del potencial patógeno de estos organismos (Fox y col., 2002).

Diecinueve especies de *Helicobacter* nombradas formalmente colonizan el intestino de diversos animales, muchas de las cuales también colonizan al hombre. Estas especies tienen similitudes de ultraestructura y fisiología con las especies gástricas, pero no colonizan la mucosa gástrica (Solnick y Schauer, 2001). Estas bacterias que naturalmente colonizan las criptas intestinales, y que han sido asociadas con diarrea, pueden causar bacteremia y enfermedades sistémicas, incluyendo la colonización del tracto biliar y la inducción de colecistitis y hepatitis (incluso cáncer hepático). Huéspedes inmunocomprometidos son particularmente susceptibles a estos microorganismos. Ocho especies de *Helicobacter* enterohepáticos han sido aislados desde humanos con diarrea y/o bacteremia (*H. canis*, *H.*

pullorum, *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. canadensis*, *H. winghamensis*, *H. westmeadi*, y *H. rappini*) y 2 especies en aves (Fox, 2002).

Hace algunos años, dos especies de *Helicobacter*, *H. hepaticus* y *H. bilis*, fueron aisladas desde hígados de ratones con hepatitis (Fox y col., 1994; Franklin y col., 1996). Infecciones por *H. hepaticus* también han sido asociadas con neoplasias hepáticas en ratones, así como también con hepatitis crónica y tiflitis (Ward y col., 1994a; Ihrig y col., 1999). Es la especie *Helicobacter* enterohepática prototipo mejor estudiada, tiene un tamaño de 1,5-5,0 x 0,2-0,3 μm (Solnick y Schauer, 2001; Suerbaum y col., 2003), presentando características en común con *H. pylori*. Ambas infectan persistentemente a sus hospedadores, causando inflamación crónica, y en ambos casos esta inflamación puede progresar a carcinoma (Suerbaum y Michetti, 2002).

Otra especie de *Helicobacter*, originalmente llamada “*Flexispira rappini*”, ha sido aislada desde hígados inflamados de fetos ovinos y también, a partir de heces de ratones, ovejas, perros y humanos (Kirkbride y col., 1986; Dewhirst y col., 2000). Adicionalmente, especies de *Helicobacter* han sido asociadas con enfermedades enterohepáticas en animales domésticos. *H. pullorum* ha sido cultivada a partir de hígados de pollos enfermos y desde heces de personas con diarrea (Stanley y col., 1994). *H. canadensis*, originalmente mal diagnosticado como *H. pullorum*, ha sido aislado desde pacientes Canadienses con diarrea (Fox y col., 2000). *H. canis* ha sido aislada desde fecas de perros, gatos y humanos, y desde el hígado de un cachorro con hepatitis (Stanley y col., 1993; Foley y col., 1999). *H. cinaedi*, ha sido aislada desde heces de hamsters clínicamente sanos, así como también, ha sido recuperada desde el intestino grueso inflamado y sangre de adultos inmunocomprometidos y niños con diarrea (Fennell y col., 1984; Totten y col., 1985; Gebhart y col., 1989). Últimamente ha sido aislada desde colon, hígado y nódulos linfáticos mesentéricos de un mono rhesus de 2 años de edad (Fox y col., 2001b), lo que refleja la habilidad de estas especies de migrar desde el epitelio intestinal (Fox, 2002). Sin embargo, hasta el momento los hamsters son el único reservorio natural de *H. cinaedi* (Fernandez y col., 2002). Recientemente, infecciones entéricas mixtas de *Helicobacter spp.* y *Campylobacter spp.*, han sido descritas en gatos (Shen y col., 2001).

Fox y col. (1998), reportaron infecciones por *Helicobacter spp.* en bilis y vesícula biliar de pacientes chilenos con colecistitis crónica. De igual modo, se ha reportado la identificación de especies *Helicobacter* en hígados de pacientes con carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma (Nilsson y col., 2001). Por otra parte, Matsukura y col. (2002), concluyeron que en humanos existe una asociación entre la presencia de *H. bilis* en la bilis y cáncer del tracto biliar y vesícula biliar.

Se debe destacar que las bacterias enterohepáticas son muy difíciles de detectar, tanto por microscopía como por cultivos, incluso en modelos animales establecidos (Ladas, 2002; Abu y col., 2003). Sin embargo, ellas pueden causar enfermedades severas incluso cuando se presentan en bajo número (Ladas, 2002). La infección no se ha relacionado con un grupo etario específico, detectándose en perros tan jóvenes como de 2 meses, y en perros viejos de hasta 11 años de edad (Yamasaki y col., 1998; Paz 2002).

Se desconoce la vía de transmisión en humanos, postulándose que sea de persona-persona, por vía oral-oral, o bien fecal-oral (Majalca y col., 2001). La base de tal propuesta ha sido el hallazgo de bacterias del género *Helicobacter* en placa dental (Krajden y col., 1989; Lizza y col., 1995), en saliva (Ferguson y col., 1993; Lizza y col., 1995), y la identificación de su genoma en saliva (Nguyen y col., 1993; Li y Ferguson, 1996). Del mismo modo, se ha identificado en heces mediante PCR y se ha reportado la presencia de esta bacteria en agua potable (Klein y col., 1991; Hulten y col., 1996; Hegarty y col., 1999), tanto en países en desarrollo (Klein y col., 1991), como en países industrializados (Hulten y col., 1998).

La diseminación de la bacteria por las fecas, lleva a la posibilidad de que moscas puedan actuar como vectores mecánicos de la infección. En tal sentido, se ha documentado la presencia de la bacteria en moscas domésticas (Grubel y col., 1997; Osato, 1998), así como la sobrevivencia de ésta, en moscas alimentadas con cultivos de *H. pylori* (Axon, 1995; Axon, 1997; Cave, 1997), e incluso se ha hallado el genoma de la bacteria en moscas infectadas naturalmente (Grubel y col., 1998).

Se ha descrito una posible infección iatrogénica en pacientes, dada por una inadecuada desinfección de los equipos endoscópicos (Smoot, 1996; Gitnick, 1997).

En caninos se ha descrito la transmisión desde la madre al cachorro durante la lactancia, a través del contacto oral-oral y fecal-oral (Hänninen y col., 1998).

La identificación de los reservorios y las rutas de infección han sido impedidas por la dificultad de aislar al patógeno desde el ambiente (Jiang y Doyle, 2000).

H. pylori también ha sido relacionada en la patogénesis de muchas enfermedades extragástricas, desde arteriosclerosis a enfermedades dérmicas, pero la documentación al respecto es pobre y las asociaciones son controversiales (Suerbaum y Michetti, 2002).

Harper y col. (2000), realizaron el primer aislamiento y caracterización de la bacteria (*Helicobacter spp.*) en un delfín, enfatizando el gran rango de hospedadores y el potencial patógeno de esta bacteria.

3.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Como las mayores manifestaciones de infección gástrica con especies de *Helicobacter* en perros y gatos son gastritis y vómitos, el acercamiento diagnóstico está basado en descartar causas infecciosas, parasitarias, dietéticas, tóxicas, metabólicas y causas no gástricas (Simpson y Burrows, 1999).

Existen varios procedimientos diagnósticos para detectar la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica humana. Los métodos empleados son de alta especificidad y sensibilidad (cultivo, histología, prueba de ureasa rápida, prueba de aliento con urea marcada con C^{13} ó C^{14} y serología). Estos métodos se dividen en 2 grupos: métodos invasivos que necesitan

endoscopia (biopsias) y métodos no invasivos, los cuales no necesitan endoscopia (Majalca y col., 2001). De estos métodos, los más utilizados en medicina veterinaria son invasivos: histología, prueba de ureasa y microscopía electrónica (Happonen, 1999).

La endoscopia permite al Médico Veterinario realizar un examen visual directo de la mucosa gástrica (Ettinger, 2000). La apariencia endoscópica del estómago de animales con gran número de *Helicobacter spp.*, está variablemente caracterizada por la presencia de abundante mucus y zonas hiperémicas (Simpson y Burrows, 1999). Sin embargo, Paz (2002), señala que la apariencia endoscópica de la mayoría de los perros con bacterias *Helicobacter* no presenta alteraciones evidentes.

La prueba rápida de ureasa se caracteriza por ser un test rápido, económico, de alta sensibilidad y especificidad, 93-99% y 95-99% respectivamente (Majalca y col., 2001). Esta prueba se basa en la detección de la actividad de ureasa y ha sido usada como herramienta de diagnóstico para asegurar la colonización por organismos *Helicobacter* en biopsias gástricas de perros, gatos y hurones (Happonen y col., 1996).

La presencia de la bacteria se evidencia en cortes histológicos de mucosa gástrica teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) y Giemsa, sin embargo, tinciones de plata (Warthin-Starry o Steiner modificado) (Luna, 1968), son más sensibles, siendo capaces de detectar un menor número de bacterias que con H-E, al hacerlas fácilmente distinguibles (Mackie y O'Rourke, 2003), especialmente en glándulas y células parietales, en donde la bacteria aparece como espirales negros sobre un fondo de luz café (Simpson y Burrows, 1999). La ventaja de este método, es que se puede evaluar la localización de las bacterias y las lesiones (Weber y col., 1958; Geyer y col., 1993). Además, presenta una alta sensibilidad y especificidad (Hermanns y col., 1995). Majalca y col. (2001), señalan una sensibilidad de 93-99% y especificidad de 95-99% en relación a las pruebas histológicas utilizadas para la detección de esta bacteria.

La microscopía electrónica ha sido usada para identificar morfológicamente los microorganismos *Helicobacter spp.* (Lockard y Keith, 1970; Henry y col., 1987; Geyer y col., 1993), y no requiere de equipamientos especiales de alto costo, considerando que el laboratorio este equipado con un microscopio electrónico (Happonen y col., 1996).

El cultivo de bacterias gástricas, a partir de muestras fecales o de biopsia gástrica, no es recomendada como método de rutina, debido a que su crecimiento depende de muchos factores: experiencia del laboratorista, manipulación rápida y apropiada de la muestra, medio de cultivo adecuado y fresco, y ambiente de incubación microaerofílico. Lo útil del aislamiento, si se obtiene, es que puede ser caracterizado bioquímica y morfológicamente (Happonen y col., 1996). Hasta el momento, no se ha podido cultivar *Helicobacter* a partir de muestras hepáticas o biliares (Fox, 2002).

Los métodos no invasivos, tienen la ventaja de evitar la endoscopia, disminuyen el costo del procesamiento de las muestras y aceleran el resultado. Para *H. pylori*, la característica de las pruebas existentes, es detectar globalmente la presencia de la bacteria,

evitando los falsos negativos de los métodos invasivos basados en la biopsia (Sarmiento y col., 2001). Al respecto, la colonización de *H. pylori* estimula la producción de anticuerpos séricos cuantificables. Las pruebas serológicas disponibles se basan en la prueba de ELISA, que detecta niveles de IgG. La variabilidad en la respuesta de cada paciente y la heterogeneidad de las cepas constituyen una de sus limitaciones. Su utilidad radica en el estudio epidemiológico de grupos poblacionales y en el seguimiento después del tratamiento, con una sensibilidad y especificidad cercanas, en promedio, al 89% (Sarmiento y col., 2001). La dificultad de obtener muestras de hígado y vesícula biliar, resalta la necesidad de exámenes no invasivos serológicos para determinar la prevalencia de organismos *Helicobacter* hepáticos (Fox, 2002). Aunque actualmente existe una prueba serológica para la infección por *Helicobacter* gástricos en seres humanos, no existe una prueba similar válida para perros o gatos (Willard, 2000).

La prueba del aliento urémico, ha sido recomendada como medio no invasivo para confirmar la erradicación de la infección por *H. pylori* en humanos, después del tratamiento antimicrobiano (Atherton y Spiller, 1994). Ésta prueba se basa en la hidrólisis de la urea marcada con C^{13} o C^{14} , si la ureasa de *H. pylori* está presente en la mucosa, la desdobra a CO_2 y bicarbonato, el CO_2 liberado es eliminado por el pulmón y el carbono presente en el aire espirado se detecta por el espectrofotómetro de masas (C^{13}) o contador de centelleo (C^{14}). Ésta técnica evalúa la presencia de *H. pylori* evitando falsos negativos. La desventaja es que es una prueba limitada a pocos centros hospitalarios. Su sensibilidad y especificidad son del 90 y 100% respectivamente (Sarmiento y col., 2001), por lo que dentro de los métodos no invasivos, sería una prueba de elección para el diagnóstico de la infección activa, tanto antes como después del tratamiento (Loutit, 1995).

La prueba PCR, es capaz de aislar y replicar el DNA de la bacteria en material biológico (Clayton y col., 1993). Esta prueba es muy sensible y no requiere de microorganismos vivos para detectar la infección, siendo suficientes los fragmentos de la bacteria para su reconocimiento (Malfertheiner, 1994). El PCR fecal es una prueba útil en el diagnóstico de perros con infecciones por *Helicobacter spp.*. Al ser una prueba simple, no invasiva, de alta sensibilidad y especificidad, podría ser utilizada como prueba de rutina (screening test) para esta infección (Shinozaki y col., 2002). Sin embargo, la precisión varía mucho debido a la elección de los primers y la reacción de PCR en si, no obstante, métodos PCR bien diseñados son superiores a otros métodos en términos de sensibilidad. Ensayos cuantitativos de PCR han sido desarrollados para estimar la severidad de la infección con *H. pylori* y *H. felis* (Jalava, 1999).

Hasta la fecha no está disponible una prueba de referencia aceptada universalmente (“prueba de oro”), para el diagnóstico de la infección por especies de *Helicobacter*, por lo tanto, la elección de las pruebas diagnósticas depende de la situación clínica específica (Piccolomini y col., 1999), es por ello, que se necesitan métodos de diagnóstico específicos y sensibles para dilucidar la asociación entre infecciones por diferentes especies de *Helicobacter* y enfermedades en diferentes poblaciones (Fox, 2002).

3.2 TRATAMIENTO

El desconocimiento de la patogenicidad de las diferentes especies de *Helicobacter* gástricos en perros y gatos, hace que los Médicos Veterinarios estén frente al dilema de si se debe o no tratar estas bacterias (Simpson y Burrows, 1999). Es así como, sólo se tratan aquellos perros con signos clínicos evidentes y evidencia histopatológica de la infección (Ettinger, 2000).

Los protocolos de tratamiento se basan en aquéllos encontrados efectivos en humanos infectados con *H. pylori* (Simpson y Burrows, 1999). Una combinación de metronidazol, amoxicilina y famotidina producen una marcada disminución de los signos clínicos en más del 90% de los perros tratados (Ettinger, 2000), sin embargo, Camargo y col. (2003) señalan que la estrategia terapéutica, diseñada para eliminar este patógeno de los animales, pudiese diferir de aquellas utilizadas para erradicar *H. pylori* en humanos.

En general, *H. pylori* tiende a desarrollar resistencia rápidamente cuando se utiliza un único fármaco. Actualmente, aproximadamente el 30% de la cepas son resistentes al metronidazol. Puesto que muchos perros y gatos se infectan con especies de *Helicobacter* diferentes al *H. pylori*, es posible que una terapia menos agresiva que la utilizada en humanos pudiera ser satisfactoria (Willard, 2000).

La morbilidad y mortalidad asociada a infecciones con *H. pylori* en personas, han hecho necesaria la prevención más que el tratamiento de esta infección. Por esta razón, se están realizando estudios para desarrollar una vacuna para humanos (Simpson y Burrows, 1999). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el comportamiento de la infección puede variar según el país y los factores dietéticos. También puede influir la heterogeneidad de las cepas bacterianas y la variabilidad individual del hospedador, en distintas áreas geográficas (González y Carbajal, 2002).

3.3 POTENCIAL ZONÓTICO

La prevalencia aparentemente alta de *Helicobacter spp.* en perros y gatos, aumenta la posibilidad de que las mascotas puedan servir como reservorio para la transmisión de *Helicobacter spp.* al hombre. No obstante, no pueden hacerse en este momento planteamientos claros sobre el potencial zoonótico de perros y gatos, ya que la transmisión directa no ha sido demostrada y la prevalencia de la infección con *Helicobacter spp.*, de importancia zoonótica en la población canina, no es conocida (Neiger y Simpson, 2000; Simpson, 2001).

Foley y col. (1998), señalan que, diarrea asociada a *Helicobacter* en animales de compañía involucra un alto riesgo de zoonosis. Es así como, el rol de perros y gatos en la epidemiología de infecciones humanas, producidas por diferentes especies de *Helicobacter*, es cada vez más probable (Ganiere y col., 2001). Gerrard y col. (2001), señalan que individuos susceptibles pueden adquirir infecciones de este tipo como resultado de la exposición a perros jóvenes.

Webb y col. (1996), evaluaron anticuerpos de *H. pylori* en dueños de gatos y los compararon con humanos sin contacto con gatos, los resultados mostraron que no aumentaban el riesgo en el primer grupo. Por otro lado, Neiger y Simpson (2000), midieron el riesgo en Médicos Veterinarios de adquirir una infección de *H. pylori* a partir de las mascotas, obteniendo resultados igualmente negativos.

Se desconoce la existencia de un reservorio no humano. Habiéndose descrito que las cepas de *H. pylori* de gatos y perros son idénticas a las del humano (Majalca y col., 2001), se ha propuesto que *H. pylori* es una antroponosis, o sea, una infección animal a partir de un patógeno humano (Simpson y col., 2000).

Ya que la mayoría de las especies de *Helicobacter* no poseen un huésped específico, los humanos, primates no humanos, u otros mamíferos, pueden considerarse posibles fuentes de infección para diferentes especies animales (Mackie y O'Rourke, 2003). Es así como *H. heilmannii* y *H. felis* han sido aisladas desde humanos y diferentes aves; *H. canis* desde perros, gatos y humanos; *H. cinaedi* desde humanos, primates no humanos, perros y hamsters; *H. rappini* desde perros, gatos, ratones, humanos y primates no humanos (Fox, 2002).

En base a los antecedentes entregados, se desea profundizar en los conocimientos sobre la infección por *Helicobacter spp.* en perros, razón por la cual se plantea la siguiente investigación, con el objeto de determinar mediante examen histopatológico la presencia de bacterias del género *Helicobacter spp.* en estómago, intestinos, hígado y vesícula biliar, de perros de la ciudad de Valdivia, para lo cuál se plantean las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: Los perros presentan bacterias tipo *Helicobacter* en intestinos.

Hipótesis 2: Los perros presentan bacterias tipo *Helicobacter* en hígado y vesícula biliar.

Hipótesis 3: Los perros presentan bacterias tipo *Helicobacter* en intestinos, hígado y vesícula biliar.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material de laboratorio:

- Instrumental de disección.
- Formalina al 10%.

4.1.2 Material biológico:

Se utilizaron 34 perros (15 machos y 19 hembras), con un rango de edad desde 3 meses a 15 años, y un peso entre 4 y 30 Kg.

Los animales pertenecían al Programa de Eutanasia Voluntaria dependiente del Departamento de Medio Ambiente de la Ilustre Municipalidad de Valdivia y el Departamento de Programa sobre el Ambiente del Servicio de Salud de Valdivia (Anexo N° 1).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Muestras:

El proceso de eutanasia se realizó en la sala de necropsia del Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile (UACH), mediante inyección endovenosa de Solución para la Eutanasia^{®1}. Posteriormente se realizó una necropsia completa del animal, según la pauta descrita por Paredes y Cubillos (1995), confeccionándose el protocolo correspondiente a la necropsia de cada animal (Anexo N° 2).

La toma de muestras se realizó entre los meses de Abril y Septiembre de 2003, en la sala de necropsia, realizándose los exámenes histopatológicos en el Instituto de Patología Animal de la UACH.

De cada animal se obtuvo 9 muestras:

- 1 muestra estómago (antro pilórico).
- 3 muestras de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon)
- 3 muestras de intestino grueso (ciego, colon, recto)
- 1 muestra de hígado (parénquima hepático)
- 1 muestra de vesícula biliar.

¹ Laboratorio Intervet.

Las que posteriormente, se colocaron en frascos con formalina al 10%, identificados con el número del animal y segmento muestreado.

4.2.2 Determinaciones:

Para el posterior examen histopatológico, las muestras previamente fijadas en formalina al 10% fueron laminadas y procesadas en autotécnico (Shandon Elliott), a fin de ser deshidratadas e impregnadas en parafina. Finalmente fueron incluidas en parafina sólida, cortadas mediante micrótomo a 5-6 micras de grosor y teñidas con tinción de plata (Whartin Starry) (Luna, 1968).

4.2.2.1 Identificación de bacterias curvo-espiladas tipo *Helicobacter spp.*: Las bacterias se identificaron por su morfología característica, y por su afinidad por tinciones de plata (Whartin Starry) (Camargo y col., 2003), que para efectos de este trabajo se denominarán de aquí en adelante como *Helicobacter spp.*

4.2.2.2 Cuantificación de *Helicobacter spp.*: La presencia de las bacterias fue semicuantificada subjetivamente (Cerde, 2002), utilizando la siguiente escala:

-	:	Ausente.
+	:	Escasas.
++	:	Moderadas.
+++	:	Abundantes.

4.2.2.3 Frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*: Se analizó la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* mediante el uso de examen histológico, considerando las variables de: total de animales, zona (segmento del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar), sexo y edad.

4.2.3 Análisis de datos:

Una vez obtenida toda la información, ésta fue ingresada a una base de datos en el programa computacional Microsoft Excel para su análisis descriptivo. Los resultados se presentaron en gráficos y tablas.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CANINA EN ESTUDIO

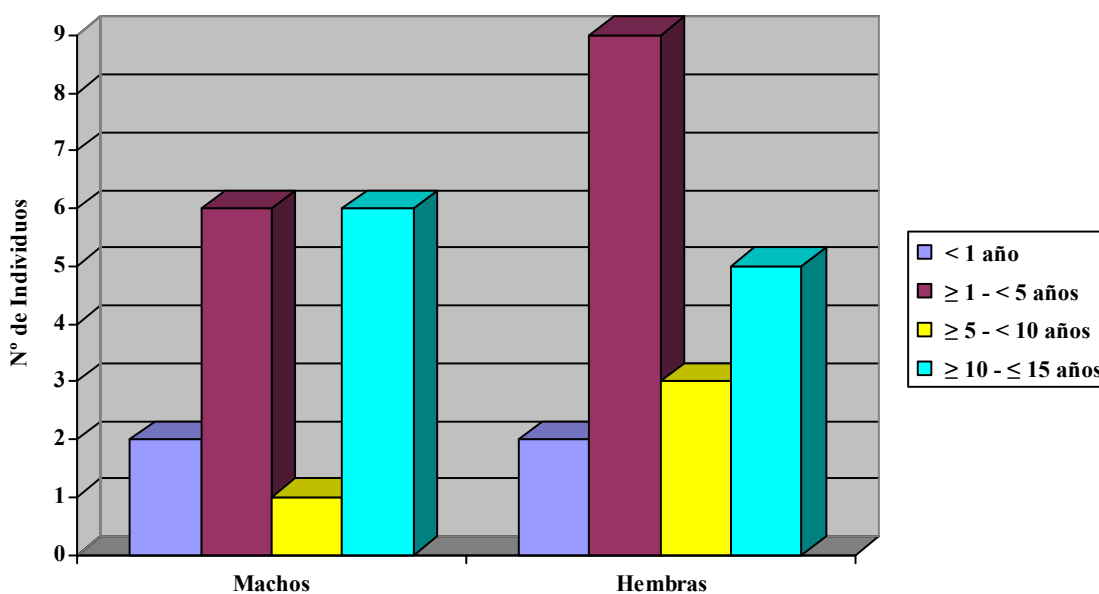


Gráfico N° 1: Distribución de edades, según sexo, de los 34 perros de la ciudad de Valdivia, analizados mediante examen histológico.

El gráfico N° 1 (Anexo 3), presenta la distribución de edades de los 34 perros (15 machos y 19 hembras), estudiados según sexo. Se observa el predominio de los animales pertenecientes al segundo grupo etario (≥ 1 año - < 5 años), en el cual las hembras se presentan en mayor número, al igual que en el tercer grupo de animales estudiados (≥ 5 años - < 10 años). Esta relación se invierte en el último grupo (≥ 10 años - ≤ 15 años), en que el número de machos es algo mayor. Los animales menores de un año no presentan diferencias.

5.2 FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE *Helicobacter spp.*

5.2.1 Distribución de *Helicobacter spp.* en los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, de los animales estudiados.

Se consideró una muestra como positiva, cuando se detectó la presencia de la bacteria *Helicobacter spp.* en ella, independiente de la cantidad. (Gráfico N° 2, anexo 3).

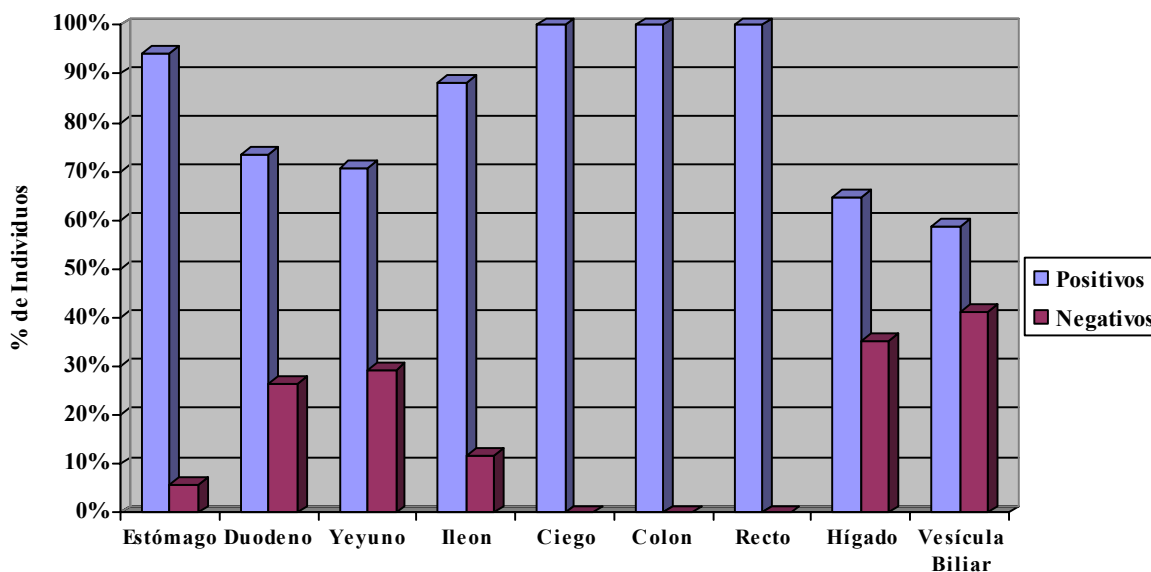


Gráfico N° 2. Frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* obtenida mediante examen histológico, de los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, en 34 perros de la ciudad de Valdivia.

La presencia de la bacteria fue determinada por su morfología característica y por su afinidad por tinciones de plata (Whartin Starry) (Figura 1).

Todos los perros resultaron positivos a la detección de la bacteria en el intestino grueso (Figuras 2, 3 y 4). Un 94,1% resultó positivo a la presencia de *Helicobacter spp.* en estómago (Figuras 5). En los diferentes segmentos del intestino delgado (Figuras 6, 7 y 8), se observó una frecuencia de presentación de 73,5%, 70,6% y 88,2%, respectivamente. Por otra parte, las muestras de hígado (Figura 9) y vesícula biliar (Figura 10), presentaron porcentajes algo menores, 64,7% y 58,8% respectivamente.

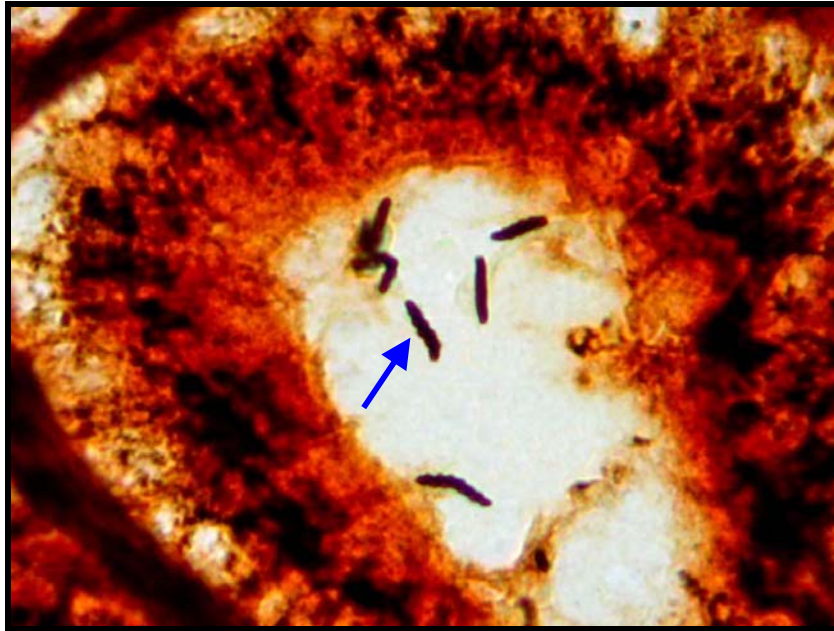


Figura 1: Estómago (Perro N° 18, ++). Obsérvese la morfología espiralada característica de *Helicobacter spp.*, en lumen de glándula pilórica, (↑) (Whartin Starry). 100X.

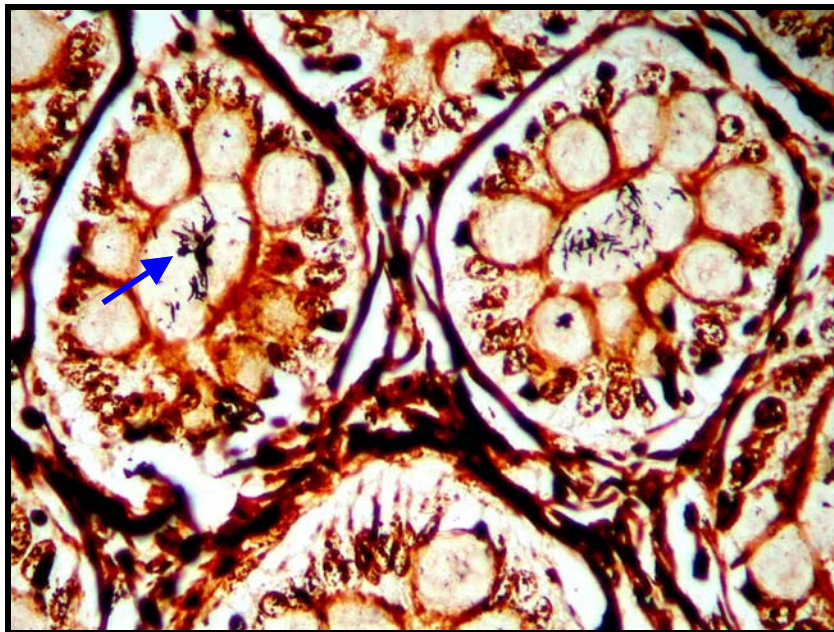


Figura 2: Ciego (Perro N° 6). Presencia de *Helicobacter spp.* en forma abundante, en el lumen de las criptas de Lieberkühn. (↑) (Whartin Starry). 40X.

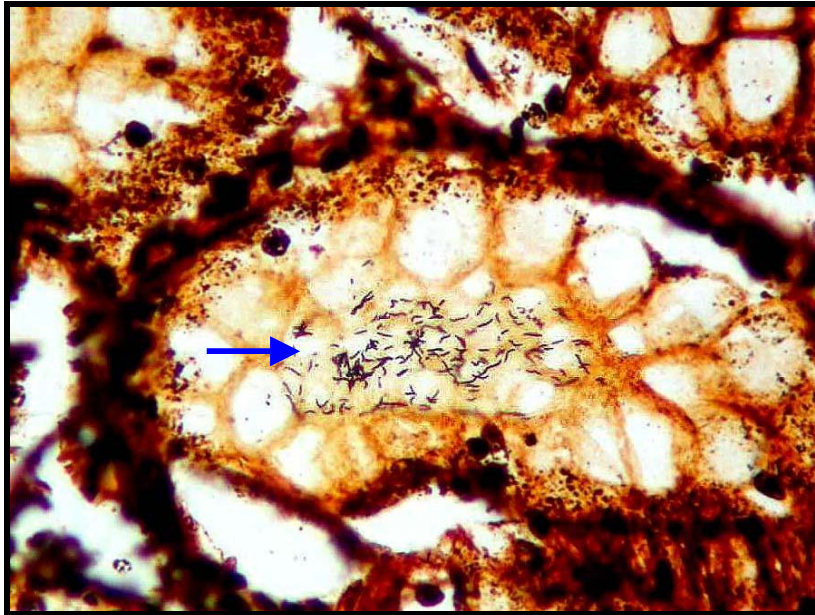


Figura 3: Colon (Perro N° 24). Presencia de *Helicobacter spp.* en forma abundante, en lumen de cripta de Lieberkühn (↑). (Whartin Starry). 40X.

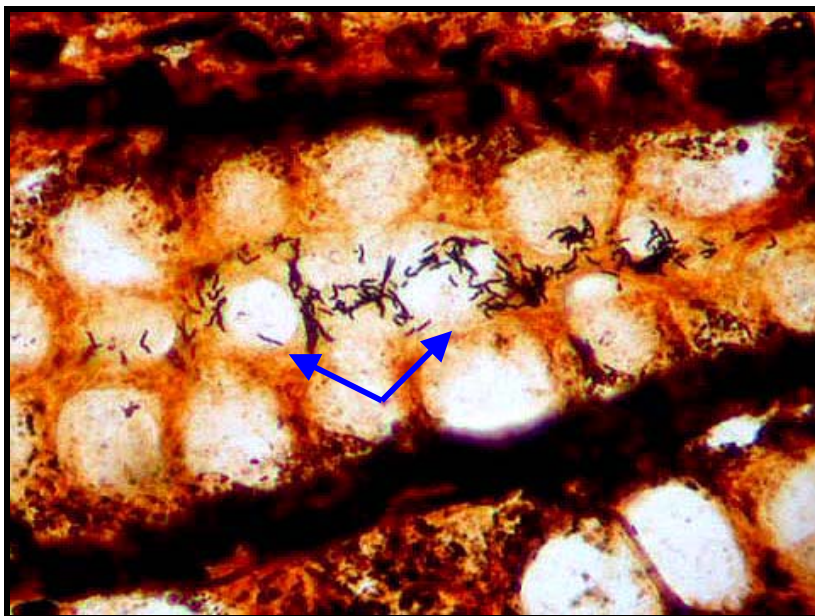


Figura 4: Recto (Perro N° 31). Presencia de *Helicobacter spp.* en forma abundante. (↑) (Whartin Starry). 40X.



Figura 5: Estómago (Perro N° 6). Presencia de *Helicobacter spp.* en forma abundante, en lumen de glándula pilórica. (↑) (Whartin Starry). 40X.

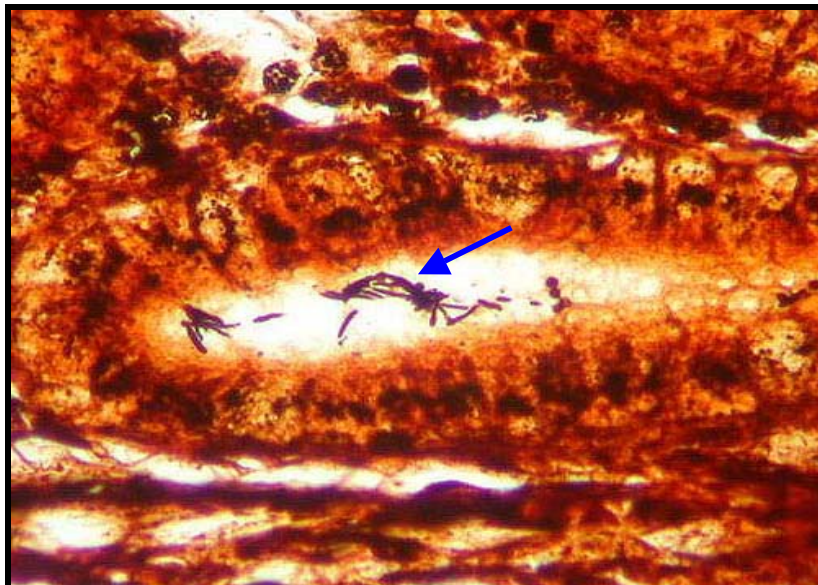


Figura 6: Duodeno (Perro N° 16). Presencia de *Helicobacter spp.* en forma moderada, en lumen de glándula de Brünner. (↑) (Whartin Starry). 40X.

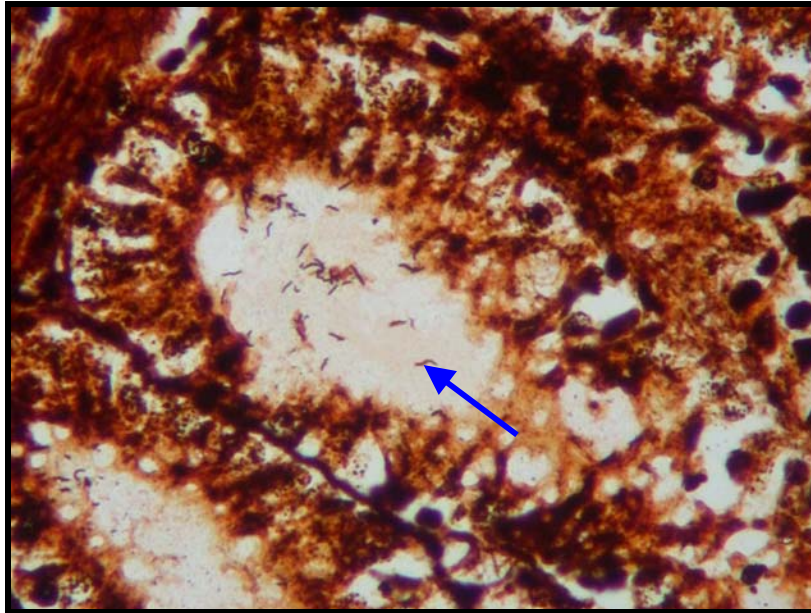


Figura 7: Yeyuno (Perro N° 22). Presencia de *Helicobacter spp.* en forma moderada, en lumen de cripta de Lieberkühn. (↑) (Whartin Starry). 40X.

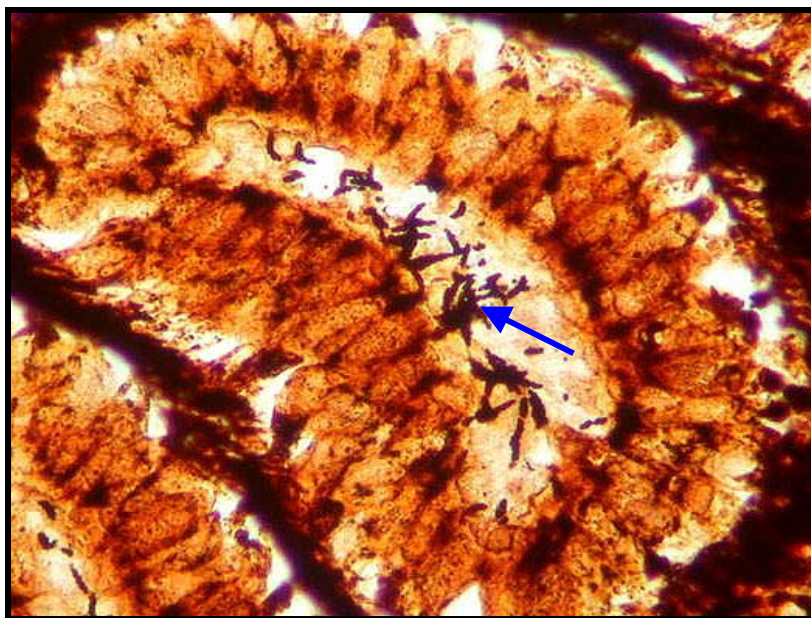


Figura 8: Ileon (Perro N° 26). Presencia de *Helicobacter spp.* en forma abundante, en lumen de cripta de Lieberkühn. (↑) (Whartin Starry). 40X.

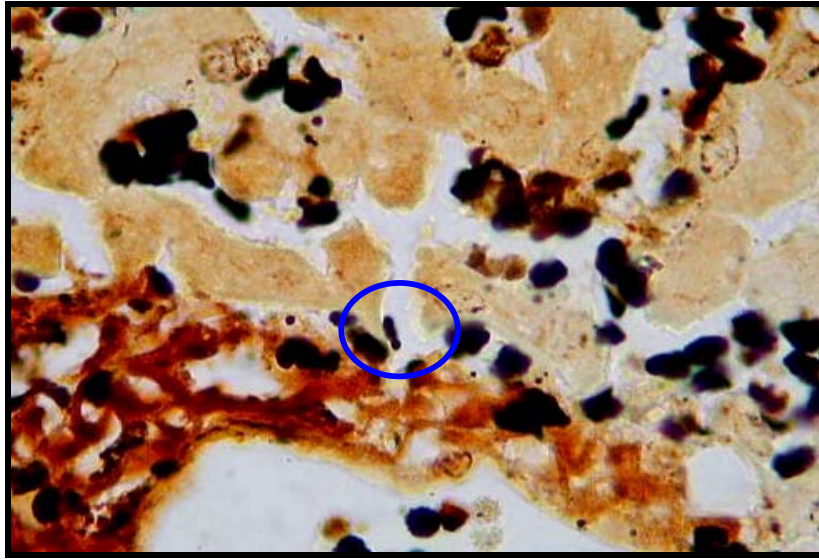


Figura 9: Hígado (Perro N° 30). Obsérvese la presencia de *Helicobacter spp.*, en espacio sinusoidal. (O) (Whartin Starry). 100X.



Figura 10: Vesícula biliar (Perro N° 12). Obsérvese la presencia de *Helicobacter spp.* (O) (Whartin Starry). 40X.

5.2.2 Frecuencia de *Helicobacter spp.* según sexo.

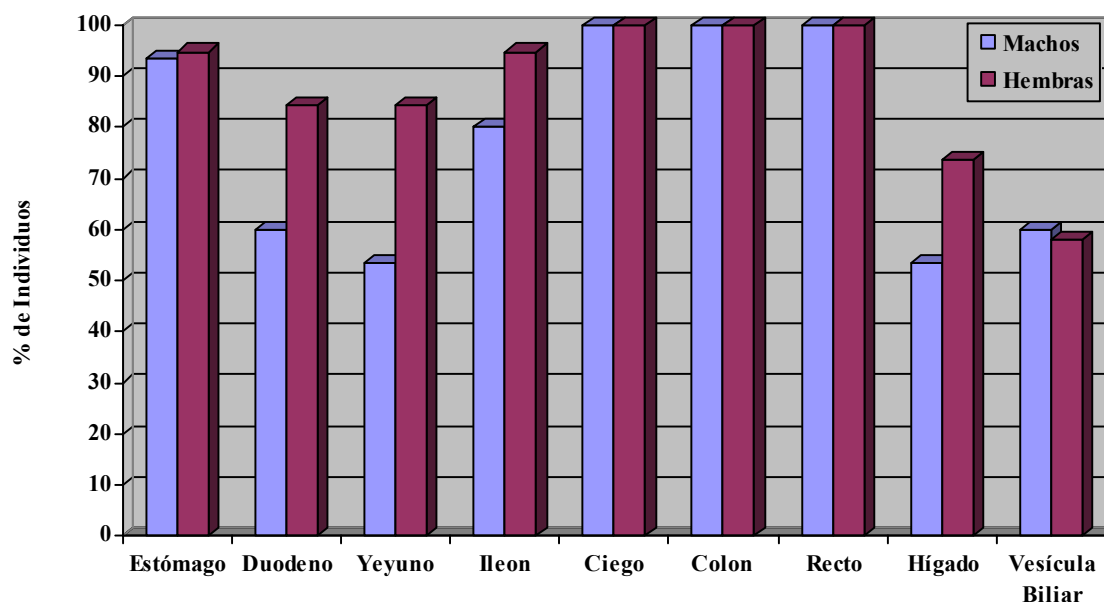


Gráfico N° 3. Frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* en 34 perros de la ciudad de Valdivia, según sexo, con respecto a los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante examen histológico.

El gráfico N° 3 (Anexo 3), muestra los valores de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* según sexo, con respecto a los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante histología, en los 34 perros de la ciudad de Valdivia. En donde, se observa un leve predominio de hembras positivas a *Helicobacter spp.* en estómago, siendo mayor la presentación, en intestino delgado e hígado. En intestino grueso, se presentaron iguales porcentajes para ambos sexos, siendo en vesícula biliar levemente menor para hembras.

5.2.3 Frecuencia de *Helicobacter spp.*, según edad.

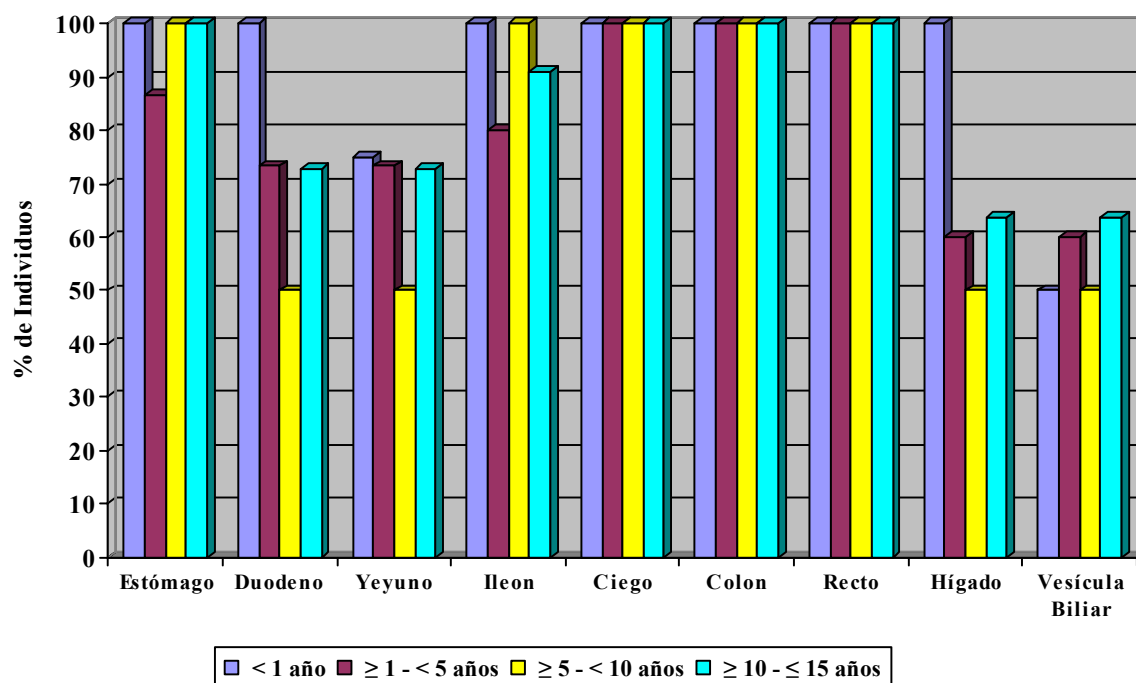


Gráfico N° 4. Frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, en 34 perros de la ciudad de Valdivia, analizados mediante examen histológico, según edad, con respecto a los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar estudiados.

El gráfico N° 4 (Anexo 3), muestra los porcentajes de presentación de *Helicobacter spp.*, según edad, con respecto a los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante histología, en 34 perros de la ciudad de Valdivia.

Los animales del primer grupo etario (menores de un año), resultaron positivos a la bacteria en un 100% en la mayoría de las muestras estudiadas, con excepción de yeyuno (75%) y vesícula biliar (50%).

En los animales pertenecientes al segundo grupo etario (≥ 1 año - < 5 años), se observó una frecuencia de presentación del 100% en intestino grueso, 86,7% en estómago, 80% en ileon y 73,3% en los dos primeros segmentos de intestino delgado. En hígado y vesícula biliar, se detectó sólo un 60% de presentación de la bacteria.

En el tercer grupo de animales (≥ 5 años - < 10 años), se observó una frecuencia de presentación del 100% en estómago, ileon e intestino grueso, y de un 50% en las muestras provenientes de duodeno, yeyuno, hígado y vesícula biliar.

En el último grupo de animales (≥ 10 años - ≤ 15 años), se pudo observar un 100% de presentación en estómago e intestino grueso, 90,9% en ileon y 72,9% en duodeno y yeyuno, mientras que en hígado y vesícula biliar, se observó un 63,6%.

5.2.4 Graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, según ubicación anatómica.

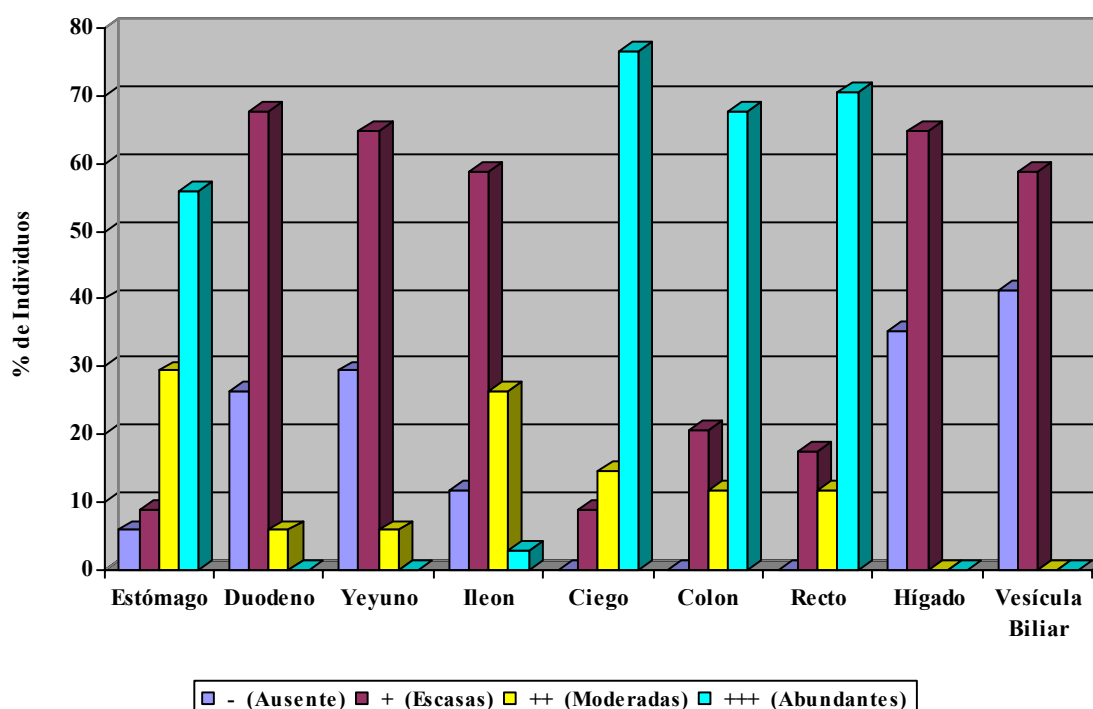


Gráfico N° 5. Graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, según segmento del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante examen histológico, en 34 perros de la ciudad de Valdivia.

El gráfico N° 5 (Anexo 4), muestra los valores de la graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, según segmento del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante examen histológico, en 34 perros de la ciudad de Valdivia. En donde se aprecia que un alto porcentaje de muestras presentaron la bacteria en forma abundante en estómago e intestino grueso, alcanzando un máximo de 76,5% en las muestras pertenecientes a ciego.

En un alto porcentaje de las muestras de intestino delgado, hígado y vesícula biliar, la bacteria se presentó en escaso número.

5.2.5 Graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* según edad.

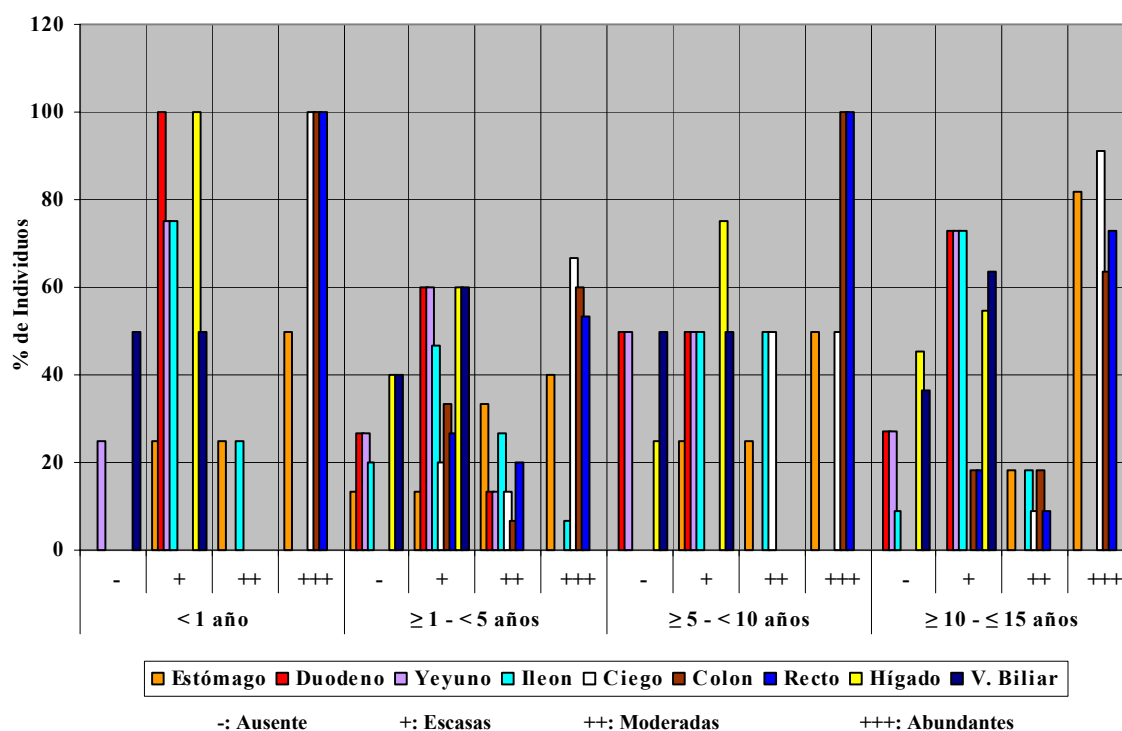


Gráfico N° 6. Graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, según edad, para los segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante examen histológico, en 34 perros de la ciudad de Valdivia.

El gráfico N° 6 (Anexo 4), muestra los valores de la graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, según edad, con respecto a los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante examen histológico, en 34 perros de la ciudad de Valdivia.

En los animales del primer grupo etario (menores de un año), se observó la bacteria en forma abundante en un alto porcentaje de las muestras de intestino grueso y estómago. Por otra parte, en intestino delgado, hígado y vesícula biliar, predominaron las muestras en las que la bacteria se presentó en forma escasa. En el 50% de las muestras de vesícula biliar y el 25% de yeyuno no se observó la bacteria.

Los animales del segundo grupo etario (≥ 1 año - < 5 años), presentaron un alto porcentaje de muestras de estómago e intestino grueso, en que las que la bacteria se observó

en forma abundante. Sin embargo, en la mayoría de las muestras de intestino delgado, hígado y vesícula biliar, se encontró la bacteria en escaso número. No se encontró la bacteria en el 40 % de las muestras provenientes de hígado y vesícula biliar, 26,7% de duodeno y de yeyuno, 20% de ileon y en el 13,3% de las muestras de estómago.

En los animales del tercer grupo etario (≥ 5 años - < 10 años), se observó un predominio de muestras provenientes de estómago, colon y recto, que presentaban la bacteria en forma abundante, sin embargo, en el 50% de las muestras de ciego la bacteria se encontró en forma abundante y en el resto en forma moderada. A su vez, en el 50% de las muestras de duodeno, yeyuno y vesícula biliar, no se encontró la bacteria y en el 50% restante se observó en forma escasa. En ileon, la bacteria se observó en forma escasa en el 50% de las muestras y en el otro 50% fue moderada. Finalmente, el 75% de las muestras de hígado presentó la bacteria en escaso número.

En el último grupo de animales (≥ 10 años - ≤ 15 años), se observó un predominio de las muestras en las cuales la bacteria se encontraba en forma abundante en estómago e intestino grueso. A su vez, se observó que la mayoría de las muestras de intestino delgado, hígado y vesícula biliar, presentaron la bacteria en escaso número.

6. DISCUSIÓN

6.1 FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE *Helicobacter spp.*

6.1.1 Distribución de *Helicobacter spp.*, en los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, de los perros estudiados (Gráfico N° 2).

Se sabe que casi todos los perros y gatos adultos sanos, albergan bacterias espirales (*Helicobacter spp.*) en la mucosa gástrica (Jalava y col., 1998). Sin embargo, diversas especies enterohepáticas de *Helicobacter* se han empezado a estudiar, al ser consideradas como importantes colonizadores naturales y patógenos animales emergentes. Ellas colonizan el tracto intestinal (y algunas veces el hígado) de humanos y animales. Muchas de estas especies son consideradas como componentes de la flora normal, aunque pueden inducir hepatitis (y en algunas ocasiones cáncer hepático), o causar bacteremia y enfermedades sistémicas en hospedadores inmunocomprometidos (Fox col., 1994; Ward y col., 1994a; Fox, 2002).

En este estudio, el 94,1% de las muestras de estómago (antro pilórico) resultaron positivas a la presencia de *Helicobacter spp.*, lo que es algo menor a lo reportado por Paz (2002), quien obtuvo una frecuencia de presentación del 100%. Recientemente, Rodríguez y col. (2003) realizaron un estudio en 70 perros, obteniendo una prevalencia del 64,3%. Del mismo modo, Eaton y col. (1996), al estudiar tres grupos diferentes de perros, detectaron mediante examen histológico y test de ureasa, la bacteria en el 100% de dos de los grupos estudiados: A (perros de laboratorio) y B (perros de un albergue), y en el 67% del grupo C (animales con patología gastrointestinal). A su vez, Cattoli y col. (1999), trabajaron con 25 perros clínicamente sanos y 21 perros con signología de gastritis, encontrando *Helicobacter spp.* en el 100% y 95% de los animales, respectivamente. Por otro lado, Jalava y col. (1998), cultivaron 95 biopsias de mucosa gástrica de perros, obteniendo una frecuencia de presentación del 51%. Del mismo modo, Hermanns y col. (1995) estudiaron biopsias gástricas de 122 perros, encontrando una frecuencia de presentación del 82%.

Diker y col. (2002), analizaron mediante diferentes métodos diagnósticos, la presencia de *Helicobacter spp.* en estómago de 122 perros, detectando la bacteria en el 84,4% de los animales estudiados. Por otra parte, JungHo y col. (1999), investigaron, mediante diferentes técnicas diagnósticas, la prevalencia de *Helicobacter spp.* en muestras gástricas provenientes de 70 perros clínicamente sanos, siendo detectados los mayores porcentajes mediante examen histológico (92,3%, 79% y 4,8% en fondo, antro y duodeno, respectivamente).

Vajner y col. (2000), encontraron *Helicobacter* gástricos en el 97,8% de las muestras provenientes de 275 perros. A su vez, Hunwoo y Doo (2000), detectaron en el 88,5% de 87 perros la presencia de especies gástricas de *Helicobacter* utilizando la técnica de PCR. Por otro lado, Yamasaki y col. (1998) investigaron, mediante histología, la incidencia de microorganismos gástricos de forma espiralada en 21 perros sanos y 56 perros con

enfermedades gastrointestinales, observando una presentación del 86% y 61%, respectivamente.

En relación a la alta frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, obtenida en estómago en este estudio, algunos autores señalan que ésta bacteria se presenta en animales que viven en grupos (Weber y col., 1958; Eaton y col., 1996). Considerando que los animales analizados, si bien tenían propietarios, lo más probable es que permanecieran gran parte del tiempo en la vía pública, facilitando la transmisión de la bacteria al estar en contacto con otros animales (Happonen, 1999).

En todos los segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e ileon), analizados en este estudio se detectó la bacteria, observándose una frecuencia de presentación de 73,5%, 70,6% y 88,2% respectivamente. Sin embargo, en la literatura examinada no se encontraron referencias sobre la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* en intestino delgado de perros.

Phillips y Lee (1983) observaron en roedores gnotobióticos, mediante experimentos con cultivos puros, que la colonización de la bacteria *Helicobacter spp.* presentaba una particular afinidad por las criptas intestinales. Del mismo modo, Mendes y col. (1996) detectaron la presencia de una nueva especie de *Helicobacter* enterohepática (*H. trogontum*), en la mucosa de colon de ratas. Por otra parte, Moura y col. (1998), señalan que *H. trogontum* coloniza principalmente intestino grueso de ratones gnotobióticos, donde se pueden observar en el lumen y también en el interior de los enterocitos. Finalmente, Fox y col. (2001a), aislaron *H. cinaedi*, desde colon, hígado y nódulos linfáticos mesentéricos; de un mono rhesus de 2 años de edad, lo que resalta la habilidad de las especies de *Helicobacter* entéricos en atravesar el epitelio intestinal.

Con relación a los segmentos de intestino grueso (ciego, colon y recto), en el examen histológico se detectó la bacteria en el 100% de las muestras analizadas. Al igual que en el caso de intestino delgado, la literatura examinada no presenta referencias sobre la presencia de *Helicobacter spp.* en intestino grueso de perros. Sin embargo, Queiroz y col. (1992), en una colonia de ratones, observaron en el 100% de los animales la presencia de *H. muridarum* en muestras de ciego, señalando que en la mayoría de ellos la bacteria se encontraba al mismo tiempo en ileon.

Se describen diversas especies de *Helicobacter spp.* que colonizan el hígado de diferentes especies animales e inducen hepatitis (Fox y col., 1994; Fox y col., 1995; Fox y col., 1996; Fox y col., 2001a). Además, otros estudios indican la presencia de *Helicobacter spp.* en personas con carcinoma hepático (Avenaud y col., 2000; Nilsson y col., 2001; Fox, 2002).

En el presente estudio se determinó en hígado (64,7%) y vesícula biliar (58,8%), los menores porcentajes de presentación de la bacteria, con respecto a los demás órganos estudiados. Cabe destacar que, Fox y col. (1996), identificaron *H. canis* en el hígado de un perro. Por otro parte, Stanley y col. (1994) aislaron *H. pullorum* desde hígado, duodeno y

ciego de pollos broiler y desde humanos con gastroenteritis. Del mismo modo, Fox y col. (1995), detectaron *H. bilis* en hígado, bilis e intestino grueso de ratones híbridos adultos. Posteriormente, Franklin y col. (1996), aislaron *H. cholecystus* desde vesícula biliar de hamsters con colangiofibrosis y pancreatitis centrolobular. Se debe señalar, que existen escasos estudios en los cuales se haya investigado la presencia de *Helicobacter spp.* en hígado y vesícula biliar de perros, razón por la cual, los resultados obtenidos son un importante aporte que servirán de base a futuros trabajos destinados a la identificación completa de la bacteria.

6.1.2 Frecuencia de *Helicobacter spp.*, según sexo.

En este estudio, existe un predominio de las hembras (55,9%) sobre los machos (44,1%) (Gráfico N° 1), lo que concuerda con lo descrito por Pradenas (2000) y Carvallo (2001), para una población bajo similares condiciones.

La mayor proporción de hembras en la población en estudio, se puede explicar debido a que son éstas las que generalmente se desean eliminar primero, por significar mayores problemas, principalmente durante el estro y gestación, lo que involucra tiempo, cuidados y un gasto que muchas familias no están dispuestas a asumir. Por esta razón, debido a que los animales pertenecían a un Programa de Eutanasia Voluntaria, la distribución según sexo de los perros estudiados no es extrapolable a la población de perros de Valdivia.

En relación al sexo de los animales estudiados se observó un predominio de hembras positivas a *Helicobacter spp.*, en las muestras analizadas de estómago, intestino delgado e hígado (Gráfico N° 3), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Vajner y col. (2000), quienes, en un estudio realizado en perros beagles, encontraron un mayor número de hembras positivas a la bacteria *Helicobacter spp.* en muestras gástricas. Asimismo, Lecoindre y col. (1995), detectaron que los machos presentaban una menor incidencia de presentación de *Helicobacter spp.* gástrico con relación a las hembras estudiadas. Sin embargo, Baba y col. (1999), señalaron que la incidencia de la infección gástrica por *Helicobacter spp.* fue mayor en machos que en hembras. Por otra parte, Happonen (1999), no encontró diferencias entre machos y hembras.

Con respecto a las muestras de intestino grueso, en este estudio se observaron iguales porcentajes para ambos sexos, a diferencia de las muestras de vesícula biliar en las que se detectó un mayor porcentaje de presentación en las muestras de machos. Cabe destacar que en la literatura examinada, no se encontraron referencias sobre la frecuencia de *Helicobacter spp.* en intestinos, hígado y vesícula biliar, en relación al sexo de perros.

6.1.3 Frecuencia de *Helicobacter spp.*, según edad (Gráfico N° 4).

La mayor proporción de animales estudiados se encontró en el segundo grupo etario (mayores o iguales de 1 año y menores de 5 años), con un 44,1% (Gráfico N° 1). Por otra parte, los animales menores de un año y los animales pertenecientes al tercer grupo etario (mayores o iguales a 5 años y menores de 10 años), mostraron igual porcentaje de presentación (11,8%), lo que concuerda con estudios realizados por Pradenas (2000), San

Martín (2000) y Carvallo (2001) en Valdivia. El cuarto grupo de animales (mayores o iguales a 10 años y menores o iguales a 15 años), correspondió al 32,3% de la población en estudio.

Los animales menores de un año resultaron positivos a la bacteria en un 100% en la mayoría de las muestras estudiadas, con excepción de yeyuno (75 %) y vesícula biliar (50 %); esto concuerda con lo expresado por Baba y col. (1999), quienes señalan que la incidencia de presentación de *Helicobacter spp.* es alta en cachorros lactantes, lo que se explicaría por la transmisión durante el período de lactancia, actuando la madre como reservorio. Por otra parte, se debe tener en cuenta que los cachorros pueden infectar a otros animales durante su etapa de vida temprana (Hänninen y col., 1998).

En contraposición a lo anteriormente señalado, diversos autores señalan que la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* aumenta con la edad (Ward y col., 1994b; Lecoindre y col., 1995; Baba y col., 1999; Sörberg y col., 2003). En este estudio se observó la bacteria en animales de todas las edades, al igual que en el estudio realizado por Paz (2002), en el que la bacteria fue encontrada tanto en animales jóvenes como viejos de ambos sexos, lo que además, coincide con lo señalado por Happonen (1999), en el sentido que la tasa de prevalencia de la bacteria fue similar en perros de todas las edades (46 perros entre 1 y 13 años de edad) y de ambos sexos, además, no detectó asociación entre edad y densidad de colonización. Otro estudio, en el cual se utilizaron 21 perros clínicamente sanos y 56 con signología gastrointestinal, con edades entre 2 meses y 18 años, no demostró diferencia significativa en relación a la prevalencia obtenida en perros jóvenes y viejos (Happonen y col., 1998).

6.1.4 Graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, según ubicación anatómica (Gráfico N° 5).

En la presente investigación, se observó que un alto porcentaje de las muestras (55,9%) presentaron la bacteria en forma abundante en estómago (antro pilórico), lo que concuerda con lo señalado por Paz (2002), quien determinó que el 68% de las muestras gástricas de la zona del antro pilórico, que se analizaron por histología, presentaban moderado a marcado grado de infección. Del mismo modo, Eaton y col. (1996), en tres grupos de perros: A (perros de laboratorio), B (perros de un albergue) y C (perros con afección gastrointestinal), detectaron que la mayoría de los animales presentaban un grado de infección moderado a marcado, sin presentar diferencias significativas entre los grupos. A su vez, Happonen y col. (1998), en 25 perros sanos y 21 perros con gastritis, obtuvieron principalmente una clasificación en grado moderado a marcado en ambos grupos.

En la mayoría de los segmentos del intestino grueso analizados en este estudio, se detectó la bacteria en forma abundante, principalmente en ciego (76,5%). Por otro lado, en las muestras de intestino delgado, hígado y vesícula biliar, se observó un alto porcentaje de muestras en las que la bacteria se presentó en escaso número. Al respecto, se debe considerar lo señalado por Hermanns y col. (1995), quienes observaron diferencias considerables en el grado de colonización de esta bacteria con relación al área analizada, lo que pudiese haber influido en los resultados obtenidos en este estudio, ya que no se pudo obtener información

que señalase el lugar adecuado a muestrear en los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, analizados mediante histología. Además, del hecho que sólo se tomó una muestra por segmento, considerando que en el caso de seres humanos es necesario realizar al menos 4 biopsias gástricas por paciente (Bayerdörffer y col., 1992).

6.1.5 Graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.*, según edad (Gráfico N° 6).

En el presente estudio, se observó que en todos los grupos etarios existe un alto porcentaje de muestras que presentan la bacteria en forma abundante en estómago e intestino grueso, a diferencia de las muestras de intestino delgado, hígado y vesícula biliar, en donde se observó un alto porcentaje de muestras en las que la bacteria se presentaba en escaso número. Sin embargo, no se encontraron referencias sobre la graduación de la frecuencia de presentación de *Helicobacter spp.* en los segmentos analizados, según edad, en perros.

Se han descrito diferentes especies de *Helicobacter spp.*, en estómago, intestinos, hígado y vesícula biliar, de diferentes animales, relacionándolas con diferentes patologías en ellos, así como también en humanos, por lo que no se debe desestimar el real potencial zoonótico de este agente, razón por la cual, en base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se hace necesario realizar mayores estudios con respecto a esta bacteria.

7. CONCLUSIONES

De la presente investigación es posible concluir que:

- Las bacterias tipo *Helicobacter spp.* son habitantes comunes del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar, de los perros estudiados de la ciudad de Valdivia.
- Bacterias tipo *Helicobacter spp.* fueron encontradas en perros de todas las edades y en ambos sexos, observándose un predominio de hembras positivas a las bacterias en estómago, intestino delgado e hígado.
- La mayor parte de las muestras de estómago e intestino grueso, presentaron las bacterias en forma abundante, a diferencia de las muestras de intestino delgado, hígado y vesícula biliar, en donde se observó un alto porcentaje de muestras en las que las bacterias se encontraban en escaso número.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABU, W., M. BENNEDSEN, S. ON, I. OUIS, P. VANDAMME, H. NILSSON, A. LJUNGH, T. WADSTRÖM. 2003. Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. *J. Med. Microbiol.* 52:765-771.
- ATHERTON, J.C., R.C. SPILLER. 1994. The urea breath test for *Helicobacter pylori*. *Gut* 35:723-725.
- AVENAUD, P., A. MARAIS, L. MONTEIRO, B. LE BAIL, P. BIOLAC SAGE, CH. BALABAUD, F. MÉGRAUD. 2000. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 89:1431-1439.
- AXON, A. 1995. Review Article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:585-588.
- AXON, A. 1997. Transmisión of *Helicobacter pylori*. *Yale J. Biol. Med.* 70:1-6.
- BABA, A., C. CATOI, A. PRICA, C. BABA, S. FARTAN. 1999. *Helicobacter spp.* infection and gastritis in dogs. *Revista Romana de Medicina Veterinaria* 9:281-288.
- BAYERDÖRFFER, E., N. LEHN, R. HATZ, G. MANNES, H. OERTEL, T. SAUERBRUCH, M. STOLTE. 1992. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterol.* 102:1575-1582.
- CAMARGO, P., A. ALFIERI, A. BRACARENSE, R. MENOLI, S. SPINOSA, M. HAGIWARA. 2003. Use of polymerase chain reaction and enzymatic cleavage in the identification of *Helicobacter spp.* in gastric mucosa of human beings from north Paraná, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98:265-268.
- CARVALLO, F. 2001. Estudio anatómopatológico de las patologías renales en 100 perros de la ciudad de Valdivia, Chile. Tesis M.V. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.
- CATTOLI, G., R. VAN VUGT, R. G. ZANONI, V. SANGUINETTI, R. CHIOCCHETTI, M. GUALTIERI, C. VANDENBROUCKE-GRAULS, W. GAASTRA, J. G. KUSTERS. 1999. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter spp.* in naturally infected dogs. *Vet. Microbiol.* 70:239-250.
- CAVE, D. 1997. How *Helicobacter pylori* is transmitted? *Gastroenterol.* 113:9-14.

- CERDA, C. 2002. Efecto de la quinacrina en el tracto reproductivo de la perra. Tesis M.V. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.
- CHAN, W., P. HUI, K. LEUNG, J. CHOW, F. KWOK, C. NG. 1994. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 102:503-507.
- CLAYTON, C. L., H. KLEANTHOUS, D. D. MORGAN. 1993. Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polimerasa analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:1420-1425.
- CONTI, I. 2001. Enfermedades emergentes y reemergentes en Uruguay. *Rev. Med. Uruguay* 17:180-199.
- DEWHIRST, F., J. FOX, E. MENDES, B. PASTER, C. GATES, C. KIRKBRIDE, K. EATON. 2000. *Flexispira rappini* strains represent at least ten *Helicobacter* taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1781-1787.
- DIKER, K., R. HAZIROGLU, M. AKAN, S. CELIK, N. KABAKCI. 2002. The prevalence, colonization sites and pathological effects of gastric *Helicobacter spp.* in dogs. *Turk Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi* 26:345-351.
- DOENGES, J. 1939. Spirochetes in the gastric glands of *Macacus rhesus* and of man without related disease. *Arch. Pathol.* 25:469-477.
- EATON, K., F. DEWHIRST, B. PASTER, N. TZELLAS, B. COLEMAN, J. PAOLA, R. SHERDING. 1996. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *J. Clin. Microbiol.* 34:3165-3170.
- ERNST, P., B. GOLD. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:615-640.
- ETTINGER, S. 2000. Textbook of veterinary internal medicine. 5th ed., W.B. Saunders, Philadelphia. USA.
- FENNELL, C., P. TOTTEN, T. QUINN, D. PATTON, K. HOLMES, W. STAMM. 1984. Characterization of *Campylobacter*-like organisms isolated from homosexual men. *J. Infect. Bacteriol.* 43:58-66.
- FERGUSON, D., N. PATEL, W. MAYBERRY, D. CHI, E. THOMAS. 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol.* 31:2802-2804.
- FERNANDEZ, K., L. HANSEN, P. VANDAMME, B. BEAMAN, J. SOLNICK. 2002. Captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) are commonly infected with *Helicobacter cinaedi*. *J. Clin. Microbiol.* 40:1908-1912.

- FOLEY, J., J. SOLNICK, J. LAPOINTE, S. JANG, N. PEDERSEN. 1998. Identification of a novel enteric *Helicobacter* species in a kitten with severe diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 36:908-912
- FOLEY, J., S. MARKS, L. MUNSON, A. MELLI, D. DEWHIRST, S. YU, Z. SHEN, J. FOX. 1999. Isolation of *Helicobacter canis* from a colony of Bengal cats with endemic diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 37:3271-3275.
- FOX, J., F. DEWHIRST, J. TULLY, B. PASTER, L. YAN, N. TAYLOR, M. COLLINS, P. GORELICK, J. WARD. 1994. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J. Clin. Microbiol.* 34:1238-1245.
- FOX, J., L.-L. YAN, F. DEWHIRST, B. PASTER, B. SHAMES, J. MURPHY, A. HAYWARD, J. BELCHER, E. MENDES. 1995. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J. Clin. Microbiol.* 33:445-454.
- FOX, J., R. DROLET, R. HIGGINS, S. MESSIER, L. YAN, B. COLEMAN, B. PASTER, F. DEWHIRST. 1996. *Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2479-2482.
- FOX, J., A. LEE. 1997. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Lab Anim. Sci.* 47:222-255.
- FOX, J., F.E. DEWHIRST, Z. SHEN, Y. FENG, N.S. TAYLOR, B.J. PASTER. 1998. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterol.* 114:755-763.
- FOX, J., C. CHIEN, F. DEWHIRST, B. PASTER, Z. SHEN, P. MELITO, D. WOODWARD, F. RODGERS. 2000. *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea: an example of an emerging pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 38:2546-2549.
- FOX, J., L. HANDT, B. SHEPPARD, S. XU, F. DEWHIRST, S. MOTZEL, H. KLEIN. 2001a. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from the Colon, Liver, and Mesenteric Lymph Node of a **Rhesus Monkey** with Chronic Colitis and Hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1580-1585.
- FOX, J., L. HANDT, S. XU, Z. SHEN, F. DEWHIRST, C. DANGLER, K. LODGE, S. MOTZEL, H. KLEIN. 2001b. Novel *Helicobacter* spp. isolated from colonic tissue of rhesus monkeys with chronic idiopathic colitis. *J. Med. Microbiol.* 50:421-429.
- FOX, J. 2002. The non-*H. pylori* *Helicobacters*: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50:273-283.

- FOX, J., Z. SHEN, S. XU, Y. FENG, CH. DANGLER, F. DEWHIRST, B. PASTER, J. CULLEN. 2002. *Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestines of cats. *J. Clin. Microbiol.* 40:2513-2519.
- FRANKLIN, C., C. BECKWITH, R. LIVINGSTON, L. RILEY, S. GIBSON, C. BESCHWILLIFORD, R. HOOK. 1996. Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2952-2958.
- GANIERE, J., N. RUVOEN, A. FONTAINE. 2001. Infectious zoonoses transmitted from dog and cat. X^o Colloque sur le controle epidemiologique des maladies infectieuses (CEMI): Epidemiologie, surveillance et prevention des zoonoses, 4 mai 2001, Institut Pasteur, Paris, France. *Medicine-et-Maladies-Infectieuses* 31:109-125.
- GEBHART, C., C. FENNELL, M. MURTAUGH, E. STAMM. 1989. *Campylobacter cinaedi* is normal intestinal flora in hamsters. *J. Clin. Microbiol.* 27:1692-1694.
- GERRARD, J., D. ALFREDSON, I. SMITH. 2001. Recurrent bacteremia and multifocal lower limb cellulitis due to *Helicobacter*-like organisms in a patient with W-linked hypogammaglobulinemia. *Clin. Infectious Dis.* 33:e116-e118.
- GEYER, C., F. COLBATZKY, J. LECHNER, W. HERMANN. 1993. Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. *Vet. Rec.* 133:18-19.
- GITNICK, G. 1997. Diagnosis and management of peptic ulcer disease. Professional Communications Inc. Fulfillment Center. 2nd ed., Caddo, USA. Citado por: Valdés, A. 2000. *Helicobacter spp.* ¿Nuevo patógeno en caninos y felinos?. *Monografías Med. Vet.* 20:117-123.
- GONZÁLEZ, M., P. CARBAJAL. 2002. El problema de la erradicación del *Helicobacter pylori*, la infección bacteriana más difundida en el mundo. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 18:1-4.
- GRUBEL, P., J. HOFFMAN, F. CHONG, N. BURSTEIN, C. MEPANI, D. CAVE. 1997. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1300-1303.
- GRUBEL, O., L. HUANG, N. MASUBICHI, F., STUTZENBERGER, D. CAVE. 1998. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in houseflies (*Musca domestica*) on three continents. *Lancet* 352:788-789.
- HÄNNINEN, M.-L., I. HAPPONEN, S. SAARI, K. JALAVA. 1996. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, and new canine gastric *Helicobacter spp.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:160-166.

- HÄNNINEN, M.-L., I. HAPPONEN, K. JALAVA. 1998. Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. *Vet. Microbiol.* 62:47-58.
- HAPPONEN, I., S. SAARI, L. CASTREN, O. TYNI, M.-L. HÄNNINEN, E. WESTERMARCK. 1996. Comparison of diagnostic methods for detecting gastric *helicobacter*-like organisms in dogs and cats. *J. Comp. Path.* 115:117-127.
- HAPPONEN, I., J. LINDEN, S. SAARI, M. KARJALAINEN, M.-L. HÄNNINEN, K. JALAVA, E. WESTERMARCK. 1998. Detection and effects of *Helicobacter* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. *J. Am. Med. Assoc.* 213:1767-1774.
- HAPPONEN, I. 1999. Canine and feline gastric *Helicobacters*: diagnosis and significance in chronic gastritis. Thesis, M.V., University of Helsinki, Finland, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland.
- HARPER, C., CH. DANGLER, S. XU, Y. FENG, Z. SHEN, B. SHEPPARD, A. STAMPER, F. DEWHIRST, B. PASTER, J. FOX. 2000. Isolation and characterization of a *Helicobacter spp.* from the gastric mucosa of dolphins, *Lagenorhynchus acutus* and *Delphinus delphis*. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 4751-4757.
- HEGARTY, J., M. DOWD, K. BAKER. 1999. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:697-701.
- HEILMANN, K., F. BORCHARD. 1991. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut.* 32:137-140.
- HENRY, G., P. LONG, L. BURNS, D. CHARBONNEAU. 1987. Gastric spirillosis in beagles. *Am. J. Vet. Res.* 48:831-836.
- HERMANN, W., K. KREGEL, W. BREUER, J. LECHNER. 1995. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J. Comp. Path.* 112:307-318.
- HOPKINS, R., P. VIAL, C. FERRECCIO, J. OVALLE, P. PRADO, V. SOTOMAYOR, R. RUSSELL, S. WASSERMAN, J. GLENN MORRIS. 1993. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J. Infect. Dis.* 168:222-226.
- HULTEN, K., S. HAN, H. ENROTH, P. KLEIN, A. OPEKUN. 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterol.* 110:1031-1035.
- HULTEN, K., H. ENROTH, T. NYSTROM, L. ENGSTRAND. 1998. Presence of *Helicobacter pylori* in Swedish faeces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *J. Appl. Microbiol.* 85:282-286.

- HUNWOO, N., K. DOO. 2000. Prevalence of *Helicobacter* species infection in dogs. *Korean Journal of Veterinary Research* 40:747-753.
- IHRIG, M., M. SCHRENZEL, J. G. FOX. 1999. Differential susceptibility to hepatic inflammation and proliferation in AXB recombinant inbred mice chronically infected with *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol.* 155:571-582.
- JALAVA, K., S. ON, P. VANDAMME, I. HAPPONEN, A. SUKURA, M. HÄNNINEN. 1998. Isolation and identification of *Helicobacter spp.* from canine and feline gastric mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3998-4006.
- JALAVA, K. 1999. Taxonomic studies on canine and feline gastric *Helicobacter* species. Thesis, M.V., University of Helsinki, Finland, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland.
- JIANG, X., M. DOYLE. 2000. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 38:1984-1987.
- JUNGHO, A., N. HUNWOO, H. JEONGHEE, K. DOO, J. AN, H. NAM, J. HAN, D. KIM. 1999. The detection of *Helicobacter*-like organisms in dogs. *Korean Journal of Veterinary Clinical Medicine* 16:281-288.
- KIRKBRIDE, C., C. GATES, J. COLLINS. 1986. Abortion in sheep caused by a non-classified anaerobic, flagellated bacterium. *Am. J. Vet. Res.* 47:259-262.
- KLEIN, P., D. GRAHAM, A. GAILLOUR, A. OPEKUN, E. O. SMITH. 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* 337:1503-1506.
- KRAJDEN, S., M. FUKSA, J. ANDERSON, J. KEMPSTON, A. BOCCIA, C. PETREA. 1989. Examination of human stomach, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 27:1397-1398.
- LADAS, S.D. 2002. Diagnosis and socio-economics in general practice. XVth International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter*. Disponible en: http://www.helicobacter.org/ehsg_workshop_athens_work7.html. Consultado el: 02 de enero de 2003.
- LECOINDRE, P., M. CHEVALLIER, S. PEYROL, M. BOUDE, H. DE-MONTCLOS. 1995. A study of dogs stomach *Helicobacter spp.* and their pathogenicity. *Revue de Médecine Vétérinaire* 146:671-680.
- LEE, A.K., S.L. HAZELL, J. O'ROURKE, S. KOUPRACH. 1988. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect. Immun.* 56:2843-2850.

- LI, C., T. HA, D. FERGUSON. 1996. A new developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy, saliva and faeces. Evidence of high prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva support oral transmission. *Digest. Dis. Sci.* 41:2142-2149.
- LIM, R. 1920. A parasitic spiral organism in the stomach of the cat. *Parasitology* 12:108-113.
- LOCKARD, V., R. KEITH. 1970. Ultrastructure of spiraled microorganism in the gastric mucosa of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 31:1.453-1.462.
- LOUTIT, J. 1995. Using molecular techniques to diagnose infectious diseases. *Infect. Med.* 12:454-469.
- LUNA, L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3th Ed. Mc Graw-Hill Book Company. New York.
- LUZZA, F., M. MALETTA, M. IMENEO, A. FABIANO, P. DOLPO. 1995. Evidence against an increased risk of *Helicobacter pylori* infection in dentists: a serological and salivary study. *Eur. J. Gastroenterol. & Hepatol.* 27:149-151.
- MACKIE, J., J. O'ROURKE. 2003. Gastritis associated with *Helicobacter*-like organisms in Baboons. *Vet. Pathol.* 40:563-566.
- MAGGIO-PRICE, L., D. SHOWS, K. WAGGIE, A. BURICH, W. ZENG, S. ESCOBAR, P. MORRISEY, J. VINEY. 2002. *Helicobacter bilis* infection accelerates and *H. hepaticus* infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (mdr1a-/-) mice. *Am. J. Pathol.* 160:739-751.
- MAJALCA, C., J. RIVERA, S. OCHOA, S. GIONO. 2001. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica* 26:85-89.
- MALFERTHEIRNER, P. 1994. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. En: *Helicobacter pylori* its role in gastrointestinal disease. Edited by A.T.R. Axon, Leeds, UK.
- MATSUKURA N., T. TAJIRI, S. YOKOMURO, S. YAMADA, K. MORINO, J. YAMAHATSU, A. TOGASHI, S. KAMIYA, J.G. FOX. 2002. Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. XVth International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter*. Disponible en: http://www.helicobacter.org/ehsg_workshop_athens_work7.html. Consultado el: 02 de enero de 2003.
- MENDES, E., D. QUEIROZ, F. DEWHIRST, B. PASTER, S. MOURA, J. FOX. 1996. *Helicobacter trogonum* sp. nov., isolated from the rat intestine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:916-921.

- MOURA, S., E. MENDES, D. QUEIROZ, E. CAMARGOS, M. EVANGELINA, F. FONSECA, G. ROCHA, J. NICOLI. 1998. Ultrastructure of *Helicobacter trogontum* in culture and in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. *J. Med. Microbiol.* 47:513-520.
- NEIGER, R., K. SIMPSON. 2000. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *J. Vet. Inter. Med.* 14:125-133.
- NGUYEN, A., L. ENGSTRAND, R. GENTA, D. GRAHAM, F. ZAATARI. 1993. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polimerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31:783-787.
- NILSSON, H., R. MULCHANDANI, K. TRANBERG, U. STENRAM, T. WADSTROM. 2001. *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiosarcoma and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol.* 120:323-324.
- OSATO, M. 1998. Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 36:2786-2788.
- PAREDES, E., V. CUBILLOS. 1995. Manual de necropsia en animales domésticos y envío de muestras a laboratorio. Instituto de Patología Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.
- PAZ, V. 2002. Determinación de la presencia de *Helicobacter sp.* en caninos de Valdivia, a través de biopsia gástrica obtenida por endoscopia, identificadas por histopatología y test de ureasa rápida. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- PHILLIPS, M., A. LEE. 1983. Isolation and characterization of a spiral bacterium from the crypts of rodent gastrointestinal tracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:675-683.
- PICCOLOMINI, R., G. DI BONAVENTURA, M. NERI, A. DI GIROLAMO, G. CATAMO, E. PIZZIGALLO. 1999. Usefulness of Leifson straining in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Microbiol.* 37:199-201.
- PRADENAS, M. 2000. Caracterización demográfica, motivos de eutanasia y principales hallazgos anatomopatológicos, en una población canina sometida a un programa de eutanasia voluntaria en la ciudad de Valdivia, Chile. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- QUEIROZ, D., C. CONTIGLI, R. COIMBRA, A. NOGUEIRA, E. MENDES, G. ROCHA, S. MOURA. 1992. Spiral bacterium associated with gastric, ileal and caecal mucosa of mice. *Lab. Anim.* 26:288-294.

- RIVAS, F., F. HERNÁNDEZ. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev. Biomed.* 11:187-205.
- RODRIGUEZ, F., M. GARCIA, J. DELGADO, A SAINZ. 2003. Estudio de prevalencia de *Helicobacter spp.* en 70 perros mediante test de ureasa. *Clínica veterinaria de pequeños animales* 2:101-106.
- ROLLÁN, A. 1994. *Helicobacter pylori* y úlcera peptica. *Boletín Esc. de Medicina, P. Universidad Católica de Chile* 23:130-135.
- SAN MARTÍN, H. 2000. Determinación de la fauna parasitaria en perros (*Canis familiaris*) provenientes del programa de eutanasia voluntaria del Servicio de Salud de Valdivia y la Ilustre Municipalidad de Valdivia. Tesis M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- SARMIENTO, Q., L. JARAMILLO, S. MURCIA. 2001. Pruebas diagnósticas para *Helicobacter pylori*. Reporte preliminar. Hospital de la Misericordia. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: http://www.encolombia.com/pruebas_pediatria34-1.html. Consultado el: de 10 de enero 2003.
- SHEN, Z., Y. FENG, F. DEWHIRST, J. FOX. 2001. Coinfection of enteric *Helicobacter spp.* and *Campylobacter spp.* in cats. *J. Clin. Microbiol.* 39:2166-2172.
- SHINOZAKI, J., R. SELTON, G. CANTOR, T. BESSER, K. MEALEY, S. VADEN. 2002. Fecal polymerase chain reaction with 16S ribosomal RNA primers can detect the presence of gastrointestinal *Helicobacter* in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 16:426-432.
- SIMPSON, K., C. BURROWS. 1999. Gastric *Helicobacter* species infection in dogs and cats. *In Practice* 21:427-435.
- SIMPSON, K., R. NEIGER, R. DE NOVO, R. SHERDING. 2000. The relationship of *Helicobacter spp.* Infection to gastric disease in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 14:223-227.
- SIMPSON, K. 2001. *Helicobacter spp.*: ¿provocan enfermedad en perros y gatos?. Disponible en: <http://www.portalveterinaria.com>. Consultado el: 03 de enero de 2003.
- SMOOT, D. 1996. Microbiology and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Drug Benefit Trends* 8:10-15.
- SOLNICK, J., D. SCHAUER. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59-97.

- SÖRBERG, M., O. NYREN, M. GRANSTRÖM. 2003. Unexpected decrease with age of *Helicobacter pylori* seroprevalence among Swedish blood donors. *J. Clin. Microbiol.* 41:4038-4042.
- STANLEY, J., D. LINTON, A. BURENS, F. DEWHIRST, R. OWEN, A. PORTER, S. ON, M. COSTAS. 1993. *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J. Gen. Microbiol.* 139:2495-2504.
- STANLEY, J., D. LINTON, A. BURNENS, F. DEWHIRST, S. ON, A. PORTER, R. OWEN, M. COSTAS. 1994. *Helicobacter pullorum* sp. nov.- genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiol.* 140:3441-3449.
- SUERBAUM, S., P. MICHETTI. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. M.* 347:1175-1186.
- SUERBAUM, S., CH. JOSEPHANS, T. STERZENBACH, B. DRESCHER, P. BRANDT, M. BELL, M. DRÖGE, B. FARTMANN, H. FISHER, Z. GE, A. HÖRSTER, R. HOLLAND, K. KLEIN, J. KÖNIG, L. MACKO, G. MENDZ, G. NYAKATURA, D. SCHAUER, Z. SHEN, J. WEBER, M. FROSCH, J. FOX. 2003. The complete genome sequence of carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 13:7901-7906.
- TOTTEN, P., C. FENNEL, F. TENOVER. 1985. *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J. Infect. Dis.* 151:131-139.
- VAJNER, L., V. VORTEL, B. SYKOROVA, A. BREJCHA, J. ZOCOVA. 2000. *Helicobacter* gastritis in beagle dogs. Review of 33 cases in a breeding colony. *European Journal of Veterinary Pathology* 6:49-55.
- VALDES, A. 2000. *Helicobacter* spp. ¿Nuevo patógeno en caninos y felinos?. *Monografías Med. Vet.* 20:117-123.
- VALENZUELA, J. 1999. *Helicobacter pylori*: la revolución bacteriológica. *Rev. Méd. Chile* 127:891-893.
- WARD, J., J. FOX, M. ANVER, D. HAINES, C. GEORGE, M. COLLINS, P. GORELICK, K. NAGASHIMA, M. GONDA, R. GILDEN, J. TULLY, R. RUSSELL, R. BENVENISTE, B. PASTER, F. DEWHIRST, J. DONOVAN, L. ANDERSON, J. RICE. 1994a. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1222-1227.
- WARD, J., M. ANVER, D. HAINES, R. BENVENISTE. 1994b. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am. J. Pathol.* 145:959-968.

- WEBB, P., T. KNIGHT, J. ELDER. 1996. Is *Helicobacter pylori* transmitted from cats to humans? *Helicobacter*. 1:79-81. Citado por NEIGER, R., K. SIMPSON. 2000. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *J. Vet. Intern. Med.* 14:125-133.
- WEBER, A., O. HASA, J. SAUTTER. 1958. Some observations concerning the presence of spirilla in the fundic glands of dogs and cats. *Am. J. Vet. Res.* 19:677-680.
- WILLARD, M. 2000. Tratamiento del vómito crónico. Memorias del XVII PANVET 2000. Panamá, Septiembre 2000. Disponible en: http://mascotia.com/profesionales/informes/tratamiento_del_vomito_cronico.php. Consultado el: 10 de octubre de 2003.
- YAMASAKI, K., H. SUEMATSU, T. TAKAHASHI. 1998. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212:529-533.

9. ANEXOS

Anexo 1.

**MINISTERIO DE SALUD
DÉCIMA REGIÓN DE LOS LAGOS}
SERVICIO DE SALUD VALDIVIA
DEPTO. PROGRAMAS AMBIENTE
PROG. CONTROL ZONOSIS**

SOLICITUD DE EUTANASIAI. ANTECEDENTES DEL PROPIETARIO:

Nombre y Apellidos :

N° RUT :

Dirección :

Comuna :

II. ANTECEDENTES DEL ANIMAL:

Nombre : Especie:

Raza : Sexo :

Edad : Color :

Tamaño :

Motivo Solicitud:

.....

Por intermedio de la presente **solicito y autorizo someter a eutanasia** al animal de mi propiedad individualizado en el párrafo anterior, por los motivos indicados, y/o no disponer de las condiciones para mantenerlo en confinamiento, ni para vacunarlo.

VALDIVIA,....DE.....DE 2003.-

.....
FIRMA DEL SOLICITANTE

Anexo 2.



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGIA ANIMAL
FONO FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA - CHILE

CASO N°:
 FECHA:
 PATÓLOGO:

PROPIETARIO:
 DIRECCION:
 SOLICITADO POR:
 FECHA DE EXAMEN:

ESPECIE:
 RAZA:
 SEXO:
 EDAD:

PESO:
 COLOR:
 MARCAS:

DESCRIPCIÓN ANATOMOPATOLÓGICA:

EXAMEN EXTERIOR Y PIEL

Cambios post mortem

Estado de nutrición

Piel, aberturas

Glándula mamaria

Cordón umbilical

TEJIDO SUBCUTANEO

Nódulos linfáticos

Huesos, músculos

Articulaciones

CAVIDAD ABDOMINAL

CAVIDAD TORÁCICA

CAVIDAD PÉLVICA

APARATO DIGESTIVO

Cavidad bucal

Amígdalas faringe

Esófago

Estómago

Int. Delgado

Int. Grueso

Hígado, páncreas

APARATO RESPIRATORIO

Fosas nasales

Laringe

Traquea

Pulmones

APARATO CIRCULATORIO

Corazón

Arterias, venas

Linfáticos

Sangre

SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

Bazo

Timo

SISTEMA URINARIO

Riñones

Uréteres

Vejiga, uretra

SISTEMA GENITAL

SISTEMA NERVIOSO

SISTEMA ENDOCRINO

DIAGNÓSTICO:

Anexo 3. Identificación de cada animal, con sus resultados obtenidos mediante histología, para los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar analizados.

Caso	N° Animal	Sexo	Peso (kg)	Edad (años)	Estómago	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego	Colon	Recto	Hígado	Vesícula Biliar
187-03-N	1	H	24	2	N	P	P	P	P	P	P	N	N
191-03-N	2	H	10	0,5	P	P	P	P	P	P	P	P	P
192-03-N	3	H	19	15	P	P	P	P	P	P	P	P	P
193-03-N	4	H	22	13	P	P	P	P	P	P	P	P	N
194-03-N	5	H	15	6	P	P	P	P	P	P	P	P	P
195-03-N	6	M	25	7	P	N	N	P	P	P	P	N	P
196-03-N	7	M	17	15	P	P	P	P	P	P	P	P	P
211-03-N	8	M	6	0,3	P	P	N	P	P	P	P	P	P
212-03-N	9	M	14	13	P	N	P	N	P	P	P	N	P
213-03-N	10	H	12	15	P	P	P	P	P	P	P	P	P
214-03-N	11	M	24	15	P	P	N	P	P	P	P	N	N
215-03-N	12	M	16	13	P	P	P	P	P	P	P	P	N
216-03-N	13	H	22	4	P	P	P	P	P	P	P	N	P
217-03-N	14	M	22	3	P	N	N	N	P	P	P	N	N
219-03-N	15	H	18	10	P	N	N	P	P	P	P	N	N
220-03-N	16	H	8	4	P	P	P	P	P	P	P	P	P
221-03-N	17	M	13	12	P	N	N	P	P	P	P	N	P
222-03-N	18	H	10	3	P	P	P	P	P	P	P	P	P
225-03-N	19	H	5	3	P	P	P	P	P	P	P	P	N
226-03-N	20	H	14,5	15	P	P	P	P	P	P	P	P	P
227-03-N	21	H	4	0,25	P	P	P	P	P	P	P	P	N
231-03-N	22	H	5	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P
232-03-N	23	M	30	3	P	N	N	P	P	P	P	P	P
233-03-N	24	M	15	2	P	P	P	P	P	P	P	P	P
234-03-N	25	H	20	6	P	P	P	P	P	P	P	P	N
235-03-N	26	H	5	2	P	P	P	P	P	P	P	P	P
291-03-N	27	M	22	2	P	P	P	P	P	P	P	P	N
292-03-N	28	M	25	1	N	N	N	N	P	P	P	N	N
245-03-N	29	H	11,5	3	P	P	N	N	P	P	P	N	N
249-03-N	30	M	4	0,5	P	P	P	P	P	P	P	P	N
250-03-N	31	H	18	7	P	N	N	P	P	P	P	N	N
251-03-N	32	M	15	12	P	P	P	P	P	P	P	P	P
252-03-N	33	H	8	2	P	N	P	P	P	P	P	P	P
253-03-N	34	M	18	3	P	P	P	P	P	P	P	N	P

H: Hembras M: Machos P: Positivos N: Negativos

Anexo 4. Identificación de cada animal, con sus resultados cuantificativos, obtenidos mediante histología, para los diferentes segmentos del aparato digestivo, hígado y vesícula biliar analizados.

Caso	Nº Animal	Sexo	Peso (kg)	Edad (años)	Estómago	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego	Colon	Recto	Hígado	Vesícula Biliar
187-03-N	1	H	24	2	-	+	+	+	++	+	+	-	-
191-03-N	2	H	10	0,5	++	+	+	+	+++	+++	+++	+	+
192-03-N	3	H	19	15	++	+	+	+	+++	+++	+++	+	+
193-03-N	4	H	22	13	++	+	+	+	+++	+	+	+	-
194-03-N	5	H	15	6	++	+	+	+	++	+++	+++	+	+
195-03-N	6	M	25	7	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+	+
196-03-N	7	M	17	15	+++	+	+	+	+++	+++	+++	-	+
211-03-N	8	M	6	0,3	++	+	-	+	+++	+++	+++	+	+
212-03-N	9	M	14	13	+++	-	+	-	+++	++	+++	-	+
213-03-N	10	H	12	15	+++	+	+	+	++	+	+	+	+
214-03-N	11	M	24	15	+++	+	-	+	+++	+++	+++	-	-
215-03-N	12	M	16	13	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+	-
216-03-N	13	H	22	4	++	+	+	+	+	+	+	-	+
217-03-N	14	M	22	3	++	-	-	-	+++	+++	+++	-	-
219-03-N	15	H	18	10	+++	-	-	+	+++	+++	+++	-	-
220-03-N	16	H	8	4	+++	++	++	++	++	+	+	+	+
221-03-N	17	M	13	12	+++	-	-	++	+++	+++	+++	-	+
222-03-N	18	H	10	3	++	+	+	+	+++	+	+	+	+
225-03-N	19	H	5	3	+	+	+	++	+++	+	++	+	-
226-03-N	20	H	14,5	15	+++	+	+	++	+++	++	+++	+	+
227-03-N	21	H	4	0,25	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+	-
231-03-N	22	H	5	1	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+	+
232-03-N	23	M	30	3	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+	+
233-03-N	24	M	15	2	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+	+
234-03-N	25	H	20	6	+++	+	+	++	++	+++	+++	+	-
235-03-N	26	H	5	2	+++	+	+	+++	+	+++	++	+	+
291-03-N	27	M	22	2	+	+	+	+	+++	+++	+++	+	-
292-03-N	28	M	25	1	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-
245-03-N	29	H	11,5	3	+++	+	-	-	+++	+++	+++	-	-
249-03-N	30	M	4	0,5	+++	+	+	++	+++	+++	+++	+	-
250-03-N	31	H	18	7	+	-	-	+	+++	+++	+++	-	-
251-03-N	32	M	15	12	+++	+	+	+	+++	++	++	+	+
252-03-N	33	H	8	2	++	-	+	+	+++	+++	+++	+	+
253-03-N	34	M	18	3	++	+	+	+	+	++	++	-	+

M: Machos H: Hembras -: Ausente +: Escasas ++: Moderadas +++: Abundantes

10. AGRADECIMIENTOS

Al término de este trabajo me gustaría agradecer a cada una de las personas que contribuyeron de alguna u otra forma en su desarrollo y realización, en especial a:

- Dr. Enrique Paredes H., Médico Veterinario, profesor patrocinante. Por sus constantes consejos, orientación y ayuda desinteresada, pero sobre todo, por su amistad, confianza y apoyo incondicional (paciencia) durante la realización del presente trabajo.
- Dra. Claudia López A., por su desinteresada e invaluable ayuda y apoyo.
- Dra. Mónica Pradenas F., por sus constantes consejos y ayuda.
- Sr. Ignacio Malverde, por darme las facilidades de trabajar en un ambiente grato.
- Por último, a mis amigos que me brindaron todo el apoyo en la realización de esta memoria de título.

A mis padres con cariño.