

Detección de *Helicobacter pylori* mediante la técnica micro ELISA en muestras fecales en perros (*Canis lupus familiaris*)

Detection of *Helicobacter pylori* using the micro ELISA technique in fecal samples in dogs (*Canis lupus familiaris*)

Yessenia Montaña-Gualán^{1*} , Nathalie Campos-Murillo¹  y Edy Castillo-Hidalgo¹ 

¹Universidad Católica de Cuenca, Postgrado. Cuenca, Azuay, Ecuador.

*Correo electrónico: jessimontano-92@hotmail.com

RESUMEN

Helicobacteriosis es una enfermedad causada por *Helicobacter pylori*, que se caracteriza por producir inflamación de la mucosa gástrica, provocando gastritis, úlcera péptica o incluso cáncer gástrico. Como reservorio natural del *H. pylori* ha sido considerado el hombre, no obstante, diversos estudios han confirmado la presencia de bacterias espirales en perros y gatos. Dada la estrecha relación que existe entre mascotas y seres humanos, algunos investigadores apuestan a la posible transmisión zoonótica entre ellos. Para diagnosticar la presencia de *H. pylori* actualmente hay pruebas de inmunoensayos enzimáticos, no invasivos, prácticos, cómodos y de fácil aplicación. Debido a esta particularidad se realizó la presente investigación, cuyo objetivo fue el diagnóstico de la presencia de antígenos de *H. pylori* en heces fecales de perros que asistieron a consulta Veterinaria en la ciudad de Cuenca, Ecuador, mediante la técnica de micro ELISA. El análisis estadístico contempló pruebas estadísticas descriptivas y ji-cuadrado; se estudiaron algunos factores predisponentes que se midieron en la consulta veterinaria, tales como el sexo, la edad, tipo de alimentación, compañía de otro animal y el hábitat. Los resultados obtenidos indican que de los 92 pacientes evaluados solo 11 (12 %) de ellos resultaron positivos a la EIA Test Kit[®]. Estos hallazgos confirman que el *H. pylori* está ampliamente distribuido en perros. Entre los factores predisponentes estudiados, a excepción de la compañía entre perros y gatos, los demás factores analizados en esta investigación no afectaron la prevalencia de la enfermedad. El sexo aproximó diferencia al 6 %, destacando que la helicobacteriosis es más frecuente en hembras que en machos. Para concluir se confirma la existencia de *H. pylori* en perros, convirtiéndole por lo tanto en un posible ente de difusión de este germen en la población.

Palabras clave: Helicobacteriosis; inmunoensayos; infecciones bacterianas; antígenos

ABSTRACT

Helicobacteriosis is a disease caused by *Helicobacter pylori*, which is characterized by producing inflammation of the gastric mucosa, causing gastritis, peptic ulcer or even gastric cancer. As a natural reservoir of *H. pylori* has been considered man, however, several studies have confirmed the presence of spiral bacteria in dogs and cats. Given the close relationship that exists between pets and humans, some researchers bet on the possible zoonotic transmission between them. To diagnose the presence of *H. pylori* there are currently tests of enzymatic immunoassays, non-invasive, practical, comfortable and easy to apply. Due to this particularity, the present research was carried out, whose objective was the diagnosis of the presence of *H. pylori* antigens in feces of dogs that attended a Veterinary consultation in the city of Cuenca, Ecuador, using the micro ELISA technique. The statistical analysis included descriptive and chi-square statistical tests; some predisposing factors that were measured in the veterinary inquiry were studied, such as sex, age, type of feeding, company of another animal and habitat. The results obtained indicate that of the 92 patients evaluated, only 11 (12 %) of them tested positive for the EIA Test Kit[®]. These findings confirm that *H. pylori* is widely distributed in dogs. Among the predisposing factors studied, with the exception of the companionship between dogs and cats, the other factors analyzed in this research did not affect the prevalence of the disease. The sex approximated a difference of 6 %, highlighting that helicobacteriosis is more frequent in females than in males. To conclude, the existence of *H. pylori* in dogs was confirmed, thus making it a possible entity for the dissemination of this microorganism in the population.

Key words: Helicobacteriosis; immunoassays; bacterial infections; antigens

INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo helicoidal que habita en el epitelio gástrico de los animales y humanos [22]. La infección por *H. pylori* se caracteriza por producir inflamación de la mucosa gástrica, la cual puede progresar llegando a producir gastritis, úlcera péptica y representa un factor importante en el desarrollo de cáncer gástrico, por lo que es considerado un agente carcinógeno de tipo I en el humano, produciendo adenocarcinomas o bien el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), siendo declarada en 1994 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) "carcinógeno biológico definitivo" [1, 6].

Como reservorio natural del *H. pylori* ha sido considerado el hombre, no obstante diversos estudios realizados a finales del siglo XIX han determinado la presencia de bacterias espirales también en el estómago de perros (*Canis lupus familiaris*) y gatos (*Felis catus*) sanos y con sintomatología de enfermedades gástricas; por lo que, la identificación de estos microorganismos en perros es relevante, debido al rol patógeno que estas bacterias espirales desempeñan y sus evidencias sustanciales del potencial zoonótico [23]. Estudios revelan que el estrecho contacto de las mascotas con seres humanos permiten manifestar una probable transmisión zoonótica al haber un predominio bacteriano en la mucosa gástrica de los perros, dando prioridad a estudios de las infecciones bacterianas ocasionadas por este patógeno e importancia dentro de la Medicina [9].

En los animales, el espectro de hospedadores es amplio e incluye distintos mamíferos como perros, felinos, hurones (*Mustela putorius furo*), nutrias (*Lutrinae*), suinos (*Sus scrofa domestica*), lobos marinos (*Otaria flavescens*), entre otros; además, se ha logrado amplificar el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano a partir de materia fecal de numerosas especies, principalmente mamíferos, pero también en un número pequeño de aves y reptiles [26]. Esta capacidad de infectar a un amplio número de especies es una muestra de su éxito en la colonización de vertebrados y también de la diversidad que podría albergar el género. Las bacterias gástricas encontradas en perros son: *H. felis*, *H. bizzozeroni*, *H. salomonis*, *Flexis pira rappini* (*H. rappini*) y *H. heilmannii* [4, 31]. La infección se ha detectado en cachorros de tan solo de 2 meses (mes) y hasta perros adultos de 11 años de edad (ADE), así como en gatos de 5 mes a 10 ADE, *Helicobacter* spp. se ha sugerido como un factor etiológico de gastritis crónica [7, 10, 12].

Por lo tanto, el contacto con animales de compañía se considera como un medio de transmisión, aunque no se ha podido asociar en todos los casos reportados. En perros y gatos, al igual que en el humano, la infección con estas bacterias es causa de gastritis crónica; en cuanto a los síntomas, las personas infectadas pueden presentar dolor epigástrico agudo o crónico, así como náuseas, acidez estomacal, vómito, defecación irregular, dificultad para comer y disminución del apetito [15], también ha sido reportada la coinfección de especies animales con *H. pylori* en un mismo hospedador [1].

Algunos estudios indican que el *H. pylori* no está presente en perros, siendo las formas más comunes de *Helicobacter* que se encuentran en los perros *felis* y *heilmannii*. Otras especies encontradas en perros son *H. rappini* y *H. salomonis*. Las bacterias habitan el revestimiento mucoso del estómago y las cavidades glandulares. En el humano, la infección persiste durante toda la vida, aunque se ha descrito su eliminación natural, siendo el modo de transmisión más común de persona a persona o por el contacto directo con la saliva, vomito e incluso las heces fecales [24].

La prevalencia de estas bacterias espiriformes en perros fluctúa entre un 67-100 %. *H. bizzozeronii*, seguido de *H. heilmannii*, *H. salomonis* y *H. felis* en menores proporciones [2]. A pesar de esto, la especie que más ha sido aislada en humanos asociada a infección por caninos es *H. heilmannii* [4].

Estas especies encontradas en perros y gatos suelen ser de un mayor tamaño y más espiraladas que *H. pylori*, por lo cual pueden diferenciarse fácilmente al microscopio óptico, aunque no pueden diferenciarse entre sí, por lo que actualmente, para mencionar a estas bacterias cuando son identificadas por su morfología y no a nivel de especie, se utiliza el término *Helicobacter* no *H. pylori* "non-*H. pylori Helicobacter*". (NHPH) [14, 15].

La ciencia asegura que los perros y gatos pueden ser colonizados por diversas especies de *Helicobacter* spp., las cuales cuentan con diversas variedades como *H. felis*, *H. bizzozeroni*, *H. salomonis* (cultivables) y *H. bilis* en estómagos caninos, todos ureasa y catalasa positivos, semejantes en longitud y grosor [1]. Las infecciones ocasionadas por estos microorganismos se pueden proveer por dos o más especies de *Helicobacter*, tanto en perros como en gatos siendo las más encontradas las variedades de *H. fennelliae*, *H. cinaedi*, *H. canis* y *H. bilis* en perros aisladas de materia fecal e intestino a diferencia de *H. canis* y *H. bilis* que fueron aisladas del hígado [13, 14, 18].

Existen diferentes métodos para diagnosticar la infección por *H. pylori*; uno es detectando anticuerpos o antígenos específicos en una muestra de sangre del paciente o de heces. En el humano también se utiliza la prueba del aliento con urea, en la cual el paciente bebe urea marcada con C¹⁴ o C¹³, produciéndose posteriormente (debido al metabolismo de la bacteria) dióxido de carbono marcado, el cual es detectado en la respiración. Otro método de diagnóstico es la biopsia, al igual que el método histológico o de cultivo celular. Uno de los métodos de detección más sensibles corresponde a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permite también identificar genes asociados a virulencia (CagA y VacA), genes asociados a adhesión (BabA) y genes de resistencia a antibióticos [14, 21, 32].

En la actualidad, los métodos de diagnóstico más utilizados, al no ser invasivos, siendo prácticos, baratos, cómodos y de fácil aplicación son los inmunoensayos enzimáticos y la PCR, ya que son métodos confiables para diagnosticar una infección activa y confirmar un tratamiento efectivo [27, 33].

La prueba de EIA del antígeno de *H. pylori* (Kit) es un inmunoensayo enzimático de fase sólida basado en el principio de doble sándwich para la detección semicuantitativa del antígeno de *H. pylori* en heces humanas, no obstante, utilizada en perros y gatos [33]. La metodología consiste en poner en contacto la placa del micropocillo, la cual está recubierta con un anti-H monoclonal (anticuerpos Pylori). Tomada las muestras de heces del paciente, se procede a extraer los antígenos (*H. pylori*) con una solución de extracción y se agregan a la placa de micropocillos recubierta de anticuerpos con los anticuerpos conjugados enzimáticamente contra *H. pylori*. Si los especímenes contienen antígenos, se unirán a los anticuerpos recubierto en la placa de micropocillos y este conjugado formará complejos antígeno-conjugado, en caso no presentar antígenos los complejos no se formarán. Después de la incubación inicial, la placa de micropocillos se lava para eliminar materiales no enlazados, se agregan sustrato A y sustrato B y luego se incuban para producir un color azul que indica la cantidad de antígenos presentes en los especímenes. Se agrega una solución de ácido sulfúrico a la placa del micropocillo para detener la reacción que produce un cambio de color a partir de azul

a amarillo, la intensidad del color que corresponde a la cantidad de antígenos de *H. pylori* presentes se mide con un lector de microplacas (As Instruments, AMR-100, LabX Scientific, Mexico) a 450/630-700 nanómetros (nm) o 450 nm [20, 21].

Siendo esta técnica sencilla, específica y práctica, aunado a la importancia que a salud pública se refieren las infecciones con *H. pylori*, tanto para animales como las personas; se realizó la presente investigación, donde se diagnosticó la presencia de antígenos de *H. pylori* en heces fecales de perros en la ciudad de Cuenca mediante la técnica de microElisa, contribuyendo al diagnóstico del agente causal de la patología y el posterior control de la Helicobacteriosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

El presente estudio corresponde a un análisis descriptivo transversal.

Muestras analizadas

El estudio se realizó en las parroquias el Valle sector Santa Ana y Llaqueo sector Zhiquir de la ciudad de Cuenca: Ecuador, donde se llevaron a cabo muestreos aleatorios de muestras fecales en perros aparentemente sanos que llegaron con sus dueños a la campaña de esterilización de la Universidad Católica de Cuenca, pero con sintomatología de disfunciones gastrointestinales, lográndose obtener un total 92 muestras aptas para la detección de helicobacteriosis, a través de la técnica de micro ELISA.

Preparación de la muestra

Las muestras obtenidas fueron recolectadas en envases estériles y transportadas a 4°C en una nevera portátil de anime hasta al laboratorio. Para emplear la técnica planteada en la investigación se trabajó con Inmunoensayo enzimático (EIA Test Kit®), la cual contiene una solución de extracción, un Wash Buffer, *H. pylori* Antigen Conjugate, Substrate A, Substrate B, Stop Solution.

El procedimiento fue realizado de la siguiente forma: los reactivos fueron atemperados. El Kit contiene envases para aplicar 1 mililitro (mL) de Extraction Solution, más una considerable cantidad de muestra fecal (aproximadamente 1 gramo (g)), las cuales fueron centrifugadas (Science Med, DM4012S, Cer America Lanita, Finlandia) a 410G por un lapso de 5 minutos (min), para la toma del sobrenadante de la centrifugación se requirió de los pocillos que vienen en el Kit y se tomaron 5 microlitros (µL) de suero de la muestra fecal, previamente centrifugada más 100 µL de Substrate A, se homogenizó y se resguardó de la luz solar por un tiempo de 30 min. Al cumplirse este tiempo se procedió a eliminar el reactivo y se lavó 3 veces con 250 µL de Wash Buffer, sin dejar burbujas, a continuación se añadieron 100 µL de *H. pylori* Antigen Conjugate, de igual manera se homogenizó y se cubrió de la luz por un tiempo de 10 min y al culminar este tiempo se desechó el reactivo y se agregó 50 µL de Substrate B y 50 µL de Stop Solution, se leyó mediante el equipo de micro ELISA Reader (Rayto, RT2300, China).

Cabe recalcar que en las muestras positivas existe un viraje en el reactivo (cambian de color el reactivo de turquesa a amarillo intenso) como determina la norma técnica del Kit y el manual de prácticas de laboratorio.

Análisis estadístico

Se emplearon pruebas estadísticas descriptivas de distribución de frecuencias, además de las inferenciales ji-cuadrado, determinando cuantos pacientes resultaron positivo o negativo en la prueba de micro ELISA. Así mismo, se tomó en cuenta el sexo del animal, la edad mediante la metodología de Tuemmers y col. [30] (grupo etario: Jóvenes de 1 a 5 ADE; Adultos de 5 a 8 ADE y Viejos mayor de 8 ADE), el tipo de alimentación (balanceado, casero o mixta), agua administrada (potable o cruda) y compañía de otro animal (solo, o con otra especie); todo ello se evaluó mediante el test exacto de Fisher, mediante el uso del programa estadístico SAS versión 9.1.3 [28].

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos indican que de los 92 pacientes evaluados, solo 11 (12 %) de ellos resultaron positivos a la EIA Test Kit®, los restantes 81 (88 %) resultaron negativos (FIG 1).

Estos hallazgos positivos de las pruebas inmunológicas indican que *H. pylori* está ampliamente distribuido en perros, convirtiéndole por lo tanto en un posible ente de difusión de este germen en la población. Elharri y col. [8] indicaron que, el *H. pylori* produce una de las infecciones bacterianas más comunes entre los humanos y a su vez se encuentra también distribuidas entre el ganado bovino (*Bos taurus*) y los perros en Egipto. En ensayos experimentales con perros gnotobióticos, se ha visto que esta bacteria fue capaz de colonizar el estómago [17].

Así mismo Waheeb y col. [33], compararon las técnicas de ELISA vs PCR y encontraron la presencia de *H. pylori* en las heces de perros y gatos, con una tasa de casos positivos 20,5 % por ELISA y 22,7 % por la prueba de PCR. Este valor superior de +2 % indica la clara sensibilidad que posee la prueba del PCR, al necesitar para su diagnóstico, mucha menos cantidad del microorganismo presente en la muestra.

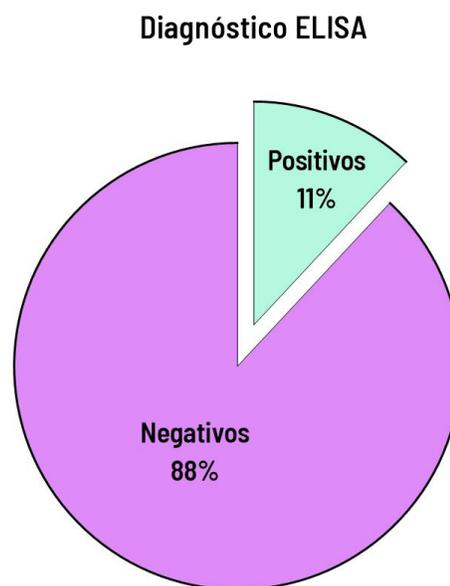


FIGURA 1. Resultados de los caninos analizados por el EIA Test Kit®, para diagnóstico de *Helicobacter pylori*

Por mucho tiempo se pensó que, la posibilidad de contagio perro:hombre o la de hombre:perro, era poco probable, aunque ya se habían conseguido *H. heilmannii*, *H. salomonis* y *H. felis* en pacientes humanos, y producto de una contaminación vía indirecta [4, 18, 31].

Aunque los modos de infección no están claros, parece ser que ese contacto estrecho entre personas y animales es un factor de riesgo importante para que se dé la zoonosis, siendo esta posibilidad ya señalada por Fox [11]. Al igual que los hallazgos encontrados por Husson y col. [19], y Dore y col. [5], al conseguir anticuerpos para *H. pylori* en trabajadores de mataderos en Francia y al norte de Cerdeña que habitaban en una misma habitación, con sus perros pastores.

Araujo-Soto [1] destaca el amplio espectro de hospedadores para el *H. pylori*, el cual incluye distintos mamíferos, demostrando el potencial zoonótico de estas bacterias. Logrado amplificar ADN de la bacteria a partir de materia fecal de numerosas especies [26]. La detección de ADN en un amplio número de especies es una muestra de su éxito en la colonización de vertebrados y también de la diversidad que podría albergar el género, destacando su capacidad de infectar distintos hospedadores y la presencia de más de una especie en un mismo anfitrión.

En la TABLA I se puede apreciar el número de casos negativos y positivos encontrados en perros, de acuerdo al posible factor predisponente. En la misma se puede apreciar que a excepción de la compañía entre perros y gatos, los demás factores estudiados en esta investigación (edad, tipo de alimentación, el hábitat) no afectan la mayor o menor tasa de contaminación con *H. pylori* en esta población. El sexo acerca una diferencia estadística al 6 %, indicando que la helibacteriosis es más frecuente en hembras que en machos, también es cierto que en este estudio se presentaron en una proporción 2:1, entre hembras y machos.

A pesar de que la edad no resultó ser estadísticamente significativa, se aprecia que la mayor tasa de animales positivos se encontró en las categorías cachorros y jóvenes, presentándose cero (0) casos en adultos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Gómez y col. [13], quienes afirman que no existe asociación por género en los perros, ni correlación del grado de densidad de colonización con la edad, a diferencia de los gatos, en los que es más frecuente esta bacteria en animales adultos que en cachorros. Hänninen y col. [16], describieron la transmisión de *H. salomonis* de una madre a sus cachorros, por lo que se sospecha que la transmisión sería oral-oral u oral gástrico, por el íntimo contacto que tiene la madre con sus cachorros.

El tipo de alimento consumido al igual que el agua de consumo de los perros, son al parecer otro probable elemento a considerar en la transmisión y contagio por *H. pylori*. Vesga-Perez [32] estudiaron la detección y viabilidad de esta bacteria en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en la ciudad de Bogotá; en el mismo, se logró demostrar la presencia de células cultivables de *H. pylori* en 56 de las 310 muestras de las tres plantas de potabilización (11-24 %). También se detectó ADN de *H. pylori* en las 3 plantas por PCR convencional y PCR cuantitativa (qPCR), llegándose a cuantificar *H. pylori* en 13 (8,4 %) muestras de agua cruda y en 20 (12,9 %) de agua potable, siendo el genotipo vacA m1/s1, el que mostró mayor frecuencia.

En los humanos, la infección con *H. pylori* está relacionada con el nivel socioeconómico, condiciones higiénicas incorrectas, estrés, y un grado elevado de una mala alimentación es adquirido por la ingesta oral del microorganismo y transmitido principalmente dentro de las familias en la infancia [4], y se da a través de contacto oral-oral, fecal-oral o ambas, probablemente durante la infancia, influyendo el bajo nivel socioeconómico, la existencia de un familiar portador de *H. pylori* y el consumo de agua no potable [3]. En perros, las malas condiciones sanitarias y el hacinamiento parecen facilitar la propagación de la infección, tal y como sucede en refugios, donde la prevalencia de *Helicobacter* llega a ser del 100 %.

En este estudio (TABLA I) se ve que los perros solos o en compañía con otros perros, presentaron la mayor tasa de contagio; mientras que los perros acompañados con gatos en su casa, solo presentó una prevalencia de 5,36 vs 20-33,3 %, respectivamente (P<0,03). Aparentemente, la transmisión entre perros y entre gatos es oral-oral y fecal oral, ya que se ha detectado ADN de *Helicobacter* en saliva, placa dental y heces de perros y gatos con y sin signos gastrointestinales [25, 29].

El método por el cual se transmite esta infección sigue siendo desconocido, pero debido a su mayor prevalencia en perros de refugio, la transmisión oral y/o fecal se considera una posibilidad. Este supuesto se apoya en la presencia de organismos similares a *Helicobacter*, llamados GHLO (gastric *Helicobacter*-like organisms), en el vómito, las heces y la saliva de los animales que han sido infectados [29].

CONCLUSIONES

Se confirma que la existencia *H. pylori* con un 12 % de muestras positivas, lo cual es indicativo que el microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en perros, convirtiéndole por lo tanto en un posible ente de difusión de esta bacteria en la población.

De los factores estudiados solo el sexo y la posible relación mostraron efecto, indicando que es más frecuente en hembras y en perros que viven solos.

TABLA I

Prevalencia de *H. pylori* de acuerdo al sexo, edad, tipo de alimentación, hábitat y la compañía de otro animal

Factor Predisponente	Categoría	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor-P
Sexo	Hembras	83,6	16,4 ^a	0,06*
	Machos	96,8	3,2 ^b	
Edad	Cachorros	86,8	13,2	NS
	Jóvenes	87,8	12,2	
	Adultos	100,0	0	
Tipo de Alimentación	Balanceado	100,0	0	NS
	Casera	92,6	7,4	
	Mixta	85,5	14,5	
Compañía	Solos	66,7	33,3 ^a	0,03*
	Con otros perros	80,0	20,0 ^a	
Hábitat	Con perros y gatos	94,6	5,4 ^b	NS
	Dentro de casa	76,9	23,1	
	En el patio	88,4	11,6	
	A la intemperie	100,0	0	

*= valor significativo; NS= valor no significativo; superíndices diferentes dentro del mismo grupo de un factor, expresan diferencias estadísticas

Se destaca así mismo, que en la actualidad se cuenta con una técnica de micro ELISA, que a partir de muestras de heces, como método no invasivo, permite detectar antígenos de *H. pylori* y se posiciona como una prueba de diagnóstico altamente sensible y específica, para la detección temprana de infecciones por *Helicobacter*, lo que podría ser considerado dentro de los planes de control y erradicación de *H. pylori*, tanto en animales como en humanos, sobre todo en aquellos grupos ocupacionales que por su trabajo, mantienen un contacto diario y estrecho con animales de compañía.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores certifican que no existen conflictos de interés en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] ARAUJO-SOTO, A.T. Interacciones biológicas: el caso de *Helicobacter pylori* y el hombre. **Elementos**. 111: 49-55. 2018.
- [2] CATTOLI, G.; VAN-VUGT, R.; ZANONI, G.; SANGUINETTI, V.; CHIOC-CHEZZI, R.; GUALTIERI, M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; GASTAR, W.; KUSTERM, J. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. **Vet. Microbiol.** 70: 239-250. 1999.
- [3] CHACHUAN, J.; PIZARRO, M.; DIAZ, L.; VILLALON, A.; RIQUELME, A. Métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol. Latinoamer.** 31(2): 98-106. 2020. <https://doi.org/hzf9>.
- [4] DE GROOTE, D.; VAN DOORN, L.J.; VAN DEN BULCK, K.; VANDAMME, P.; VIETH, M.; STOLTE, M.; DEBONGNIE, J.C.; BURETTE, A.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Detection of non-pylori *Helicobacter* species in *Helicobacter heilmannii*-infected humans. **Helicob.** 10(5): 398-406. 2005.
- [5] DORE, M.P.; BILOTTA, M.; VAIRA, D.; MANCA, A.; MASSARELLI, G.; LEANDRO, G.; ATZEI, A.; PISANU, G.; GRAHAM, D.Y.; REALDI, G. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. **Dig. Dis. Sci.** 44:1161-1164.1999.
- [6] DUNN, B.E.; COHEN, H.; BLASSER, M.J. *Helicobacter pylori*. **Clin. Microbiol. Rev.** 10(4): 720-741. 1997.
- [7] EATON, K.; DEWHIRST, F.; PASTER, B.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B.; PAO, J.; SHERDING, R. 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. 1996.
- [8] ELHARRI, M.; ELHELW, R.; HAMZA, D.; EL-MAHALLAWY, H.S. Serologic evidence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in animals and humans. **J. Infect. Dev. Ctries.** 11:414-419. 2017. <https://doi.org/gbp8ww>.
- [9] FERNANDEZ, H. Genero *Helicobacter*: un grupo bacteriano en expansión, con características zoonóticas. **Gacet. Infectol. Microbiol. Clin. Latinoamer.** 2(1): 11-20. 2011.
- [10] FOX, J.; PERKINS, S.; YAN, L.; SHEN, Z.; ATTARDO, L.; PAPPO, J. Local immunem response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *H. pylori* in saliva, gastric fluid and faeces. **Immunol.** 88: 400-406. 1996.
- [11] FOX, J.G. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. **Aliment. Pharmacol. Therapy.** 9(2): 93-103.1995.
- [12] GERMANI, Y.; DAUGA, C.; DUVAL, P.; HUERRE, M.; LEVY, M.; PIALOX, G.; SANSONETTI, P.; GRIMONT, P. Strategy for the detection of *Helicobacter* species by 289 amplification of 16Sr RNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsys. **Res. Microbiol.** 148: 315-326. 1997.
- [13] GOMEZ, G.L.F.; OROZCO, P.S.; SALAS, S.S.A. Helicobacteriosis canina y felina. **Vet. Mex.** 37(1): 97-116. 2006.
- [14] GUENDULAIN, C.; SIBILLA, M.L. *Helicobacter* gástricos en perros y gatos y su significancia en la salud humana. **Ab Intus.** 2: 93-100. 2018.
- [15] HAESBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHOU, B.; CHIERS, K.; BAELE, M.; MEYNS, T.; ANNEMIE, D.; DUCATELLE, R. Gastric *Helicobacters* in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. **Clinic. Microbiol. Rev.** 22(2): 202-223. 2009.
- [16] HANNINEN, M.L.; HAPPONEN, I.; JALAVA, K. Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. **Vet. Microbiol.** 62: 47-58. 1998.
- [17] HAPPONEN, I. Canine and feline *Helicobacters*: Diagnosis and significance in chronic gastritis. Helsinki, Finland: Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki, Thesis of Grade. 83pp. 1999.
- [18] HERNANDEZ, C.; GALLON, G. Helicobácteres gástricos de perros y gatos: mínimo riesgo en salud pública. **Rev. Colomb. Cien. Pec.** 17(3): 267-273. 2016.
- [19] HUSSON, M.O.; VINCENT, P.; GRABIAUD, M.H.; FURON, D.; LECLERC, H. Anti-*Helicobacter pylori* IgG levels in abattoir workers. **Gastroenterol. Clin. Biol.** 15: 723-726. 1991.
- [20] KIM, P.S.; LEE, J.; PAI, S.H.; KIM, Y.B.; CHO, J.K.; LEE, J.W.; JEONG, S.; LEE, H.D.; KIM, H.G.; KWON, K.S.; CHO, H.G.; SHIN, Y.W.; KIM, Y.S. Detection of *H. pylori* antigen in stool by enzyme immunoassay. **Yonsei Med. J.** 43: 7-13. 2002. <https://doi.org/hzgb>.
- [21] MÉGRAUD, F.; BRASSENS-RABBÉ, M.P.; DENIS, F.; BELBOURI, A.; HOA, D.Q. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. **J. Clin. Microbiol.** 27:1870-1873. 1989. <https://doi.org/hzgc>.
- [22] MORALES, A.A.; GARCIA, F.; BERMUDEZ, V.M. El Género *Helicobacter* en los animales domésticos: Una Revisión. **Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel.** 41(2): 63-70. 2010.
- [23] PORTERO-GAVILANEZ, S.F. Prevalencia del antígeno de *Helicobacter pylori* (HpSA) en mascotas domésticas perros y gatos, como reservorios importantes de infección o recidivas en pacientes con patologías gástricas. Riobamba, 2014. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas. Tesis de Grado. 95 pp. 2014.
- [24] QUIJANO-GARCIA, I.A.; AGUIRRE-GUTIERREZ, A.A.; DENIS-RODRIGUEZ, P.B.; PARRA-USCANGA, C.L.; BARRIENTOS-SALCEDO, C. Método de ELISA para la determinación de *Helicobacter pylori* en muestras de suero y saliva. **Rev. Mex. Med. Forense.** 2 (2): 1-15. 2017.

- [25] RECORDATI, C.; GUALDI, V.; CRAVEN, M.; SALA, L.; LUINI, M.; LANZONI, A.; RISHNIW, M.; SIMPSON, K.W.; SCANZIANI, E. Spatial distribution of *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract of dogs. **Helicob.** 14(3): 180-191. 2009. <https://doi.org/c9x2n5>.
- [26] SCHERENZEL, M.D.; WITTE, C.L.; BAHL, J.; TUCKER, T.A.; FABIAN, N.; GREGER, H.; RIDEOUT, B.A. Genetic characterization and epidemiology of *Helicobacters* in non-domestic animals. **Helicob.** 15(2): 126-142. 2010.
- [27] SHIMOYAMA, T.; SAWAYA, M.; ISHIGURO, A.; HANABATA, N.; YOSHIMURA, T.; FUKUDA, S. Applicability of a rapid stool antigen test, using monoclonal antibody to catalase, for the management of *Helicobacter pylori* infection. **J. Gastroenterol.** 46:487. 2011. <https://doi.org/cx3w4t>.
- [28] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS/STAT. User's guide. Rel. 9.1.3 Cary, NC. 2014.
- [29] SUN-WOO, H.; JONG-HYUN, Y.; TAE-HO, C.; WOO-SUNG, J.; HWA-YOUNG, Y.; JOON-SEOK, C.; CHEOL-YONG, H. PCR based Detection of *Helicobacter* spp. in Saliva, Dental plaque, Vomitus and Feces of Dogs. **J. Vet. Clin.** 25(6): 447-451. 2008.
- [30] TUEMMERS, C.; LUDERS, C.; ROJAS, C.; SERRI, M.; ESPINOZA, R.; CASTILLO, C. Prevalencia de leptospirosis en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, 2011. **Rev. Chilena Infectol.** 30(3): 252-257. 2013.
- [31] VAN DE BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DRIESSEN, A.; DEBONGNIE, J.C.; BURETTE, A.; HAESBROUCK, F. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs and cats. **J. Clin. Microbiol.** 43(5): 2256-2260. 2005.
- [32] VESGA-PEREZ, F.J. Detección y viabilidad de *Helicobacter pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en la ciudad de Bogota. Universitat Politècnica de València. Tesis de Grado. 127 pp. 2018. <https://doi.org/hzgd>.
- [33] WAHEEB, N.; MAROUF, S.; NASR, E.; ABDELMALEK, S. Comparative evaluation of elisa using a semi-nested 16s rrna PCR as a master test for detection of *Helicobacter pylori* antigen in human stool and feces of dogs and cats. **Adv. Anim. Vet. Sci.** 10(3): 466-471. 2022.