

## DETECCIÓN DE ORGANISMOS ESPIROIDALES GÁSTRICOS EN ESTÓMAGO DE POTRILLOS CLÍNICAMENTE SANOS

### DETECTION OF GASTRIC SPIRAL ORGANISMS IN STOMACH OF CLINICALLY HEALTHY FOALS

ORLANDO VALENZUELA O.<sup>1</sup> MV.; ÁLVARO LUZIO Q.<sup>1</sup> MV.; LISANDRO MUÑOZ A.<sup>1</sup> MV.;  
MSC.; PEDRO URRUTIA C.<sup>1</sup> MV.; APOLINARIA GARCÍA C.<sup>2</sup> B.Q., DR. CS. BIOLOG.

#### ABSTRACT

*Spiral Gastric Organisms (SGO), belonging to the Helicobacter genre, are microaerophilic Gram negative bacteria of spiral or curve morphology, widely spreaded in humans and companion animals. In this study it was analyzed the detection frequency of the SGO in biopsies taken from mucus of the gastric fundus of 27 clinically healthy foals from the National Stable located in Riñihue, X Region (Chile), through rapid urease test and modified Gram staining. Twenty six percent of the analyzed biopsies were positive for SGO by means of the rapid urease test and 56% was positive for the modified Gram staining. The urease test was positive with more frequency between 24 to 48 hours, which indicates a low bacterial charge in almost all the biopsies. This study shows the existence of bacteria with curve or spiral morphology and positive urease, according to SGO, in the mucus of the gastric fundus of foals, and suggests the presence of bacteria belonging to the Helicobacter genre. This founding seems very important to us, because according to our data there is no description of SGO nor Helicobacter pylori in clinically healthy horse. The role this bacteria in the foals stomach, specially of the zoonotic potential in the man requires further investigation.*

**KEY WORDS:** Gastric spiral organisms, foals, Helicobacter.

**PALABRAS CLAVE:** Organismos espiroidales gástricos, potrillos, Helicobacter.

#### INTRODUCCIÓN

Los Organismos Espiroidales Gástricos (OEG) que pertenecen al género *Helicobacter* son bacterias microaerofílicas Gramnegativas de forma curva,

espiralada y a veces de forma cocoide (Sato y col., 1999). Se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial en humanos y animales de compañía, habitando en las glándulas, células parietales y *mucus* del estómago (Simpson, 1997; Simpson y Burrows, 1997).

La apariencia endoscópica del estómago ante gran número de OEG se caracteriza por presencia de *mucus* y marcas puntiformes oscuras en la superficie mucosa que parecen correlacionarse con folículos linfoides (Simpson y Burrows, 1997). Las lesiones descritas incluyen hiperemia, edema antral, hipertrofia del esfínter pilórico, duodeno hiperémico, edematoso y friable. Además de un retardo del vaciamiento gástrico. La enferme-

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Medicina Veterinaria.

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Avenida Vicente Méndez N° 595. Casilla 537, Chillán.

Fuente de Financiamiento Parcial: Proyecto DIUC 203.036.024-1.0e.

dad puede progresar pronunciando los signos de pérdida de peso y enteropatía con pérdida de proteínas (Ludlow, 1997).

Más de 24 especies de *Helicobacter* se han identificado, colonizando tanto al hombre como a una amplia variedad de animales (Harper y col., 2002), varias de ellas con características zoonóticas (Andrews y Fernández, 1997). Todas estas especies causan algún grado de inflamación persistente cuando residen en el estómago de mamíferos (Tompkins y Falkow, 1995), especialmente *Helicobacter pylori*, por ser agente causal de diversas patologías gastroduodenales en humanos, tales como gastritis crónica, enfermedad gastroesofágica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma de Malt (Covacci y col., 1999), pero también se ha descrito el efecto patogénico de esta especie sobre caballos, terneros y cerdos (Dimola y Caruso, 1999). Se han sugerido tres vías principales de transmisión para los OEG: vía fecal-oral, vía oral-oral e iatrogénica (Mégraud, 1995; Oshowo y col., 1998; Tytgat, 1995). Además podemos encontrar numerosos reservorios tales como vegetales, animales silvestres y domésticos (Hopkins y col., 1993). En los últimos dos reservorios se debe centrar el interés de la salud pública.

La infección por *Helicobacter pylori* puede ser diagnosticada por técnicas invasivas (como análisis histológico, reacción de polimerasa en cadena, detección directa de la actividad ureasa o cultivo del microorganismo) (Vaira y col., 2002) y técnicas no invasivas como anticuerpos anti *H-pylori* en saliva y orina, serología y la prueba del aliento (Vaira y col., 2002; Savarino y col., 1999).

Según la literatura revisada sólo en escasos trabajos se describe la existencia de OEG y de *Helicobacter pylori* en equinos con patología gástrica (Dimola y Caruso, 1999; Belli y col., 2003) y no se describe su existencia en potrillos clínicamente sanos.

En los últimos años ha existido interés en el potencial zoonótico que representan los animales para el hombre como fuente de infección de OEG (Andrews y Fernández, 1997). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia de OEG en estómago de potrillos clínicamente sanos, mediante test rápido de ureasa (HEPY-test) y tinción de Gram modificada en biopsias de mucosa gástrica provenientes de *fundus* de potrillos y comparar ambas técnicas y determinar el tiempo de reacción al test rápido de ureasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES

Se realizó muestreo a 27 potrillos lactantes de ambos sexos y distintas edades (de 20 días hasta 5 meses de edad), de raza Fina Sangre Inglés (FSI), tipo Holstein y tipo Silla Francés, pertenecientes al Haras Nacional (Riñihue, X Región, Chile). La condición de paciente clínicamente sano fue establecida mediante examen directo y anamnesis, asociado a la historia del animal que señala a un paciente que no ha presentado signos y síntomas de enfermedad, pérdida de peso, decaimiento y diarrea desde su nacimiento. Estos animales se encontraban en las mismas condiciones ambientales y dietarias, en reposo y sin haber recibido tratamiento antibiótico de ningún tipo.

### TOMA DE LA BIOPSIA

Se ubicó al potrillo de pie en un brete o una pesebrera para facilitar la maniobra, en algunos casos fue necesario utilizar un arial para hacer más expedito el trabajo (Usón y Tejedo, 1985). En todos los potrillos se utilizó sedación con Xilacina en solución acuosa al 2% endovenosa, en dosis de 0,5-0,7 mg/kg (Murray, 1989). Se obtuvieron dos muestras de la mucosa gástrica extraídas desde el *fundus*, utilizando un fórceps de biopsia fenestrado (Usón y Tejedo, 1985).

**Test rápido de ureasa:** Las biopsias una vez obtenidas fueron inmediatamente colocadas en placas para test rápido de ureasa (HE-PY® test del Laboratorio Bios-Chile S.A.) e incubadas a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron cada 30 min las primeras 3 h y posteriormente cada 1 h hasta completar las 48 h.

Los resultados de actividad de ureasa fueron clasificados como sigue: (-), no reacciona dentro de 48 h, carga bacteriana ausente; (+), reacción positiva entre 24 y < 48 h, carga bacteriana baja; (++) , reacción positiva entre 12 y < 24 h, carga bacteriana moderada; (+++), reacción positiva en < 12 h, carga bacteriana alta (Otto y col., 1994).

**Tinción de Gram modificada:** Las muestras de biopsias para tinción Gram modificada fueron recibidas en suero fisiológico e inmediatamente refrigeradas hasta su tinción. Para esto se procedió a macerar las biopsias en un mortero. De este macedado se depositó una pequeña cantidad en el portaobjeto para realizar la tinción (Guidelines for

clinical trials in *Helicobacter pylori* infection, 1997; Van Horn y Dworkin, 1990). Los preparados fueron analizados por microscopia de luz, bajo inmersión (100X), para determinar la presencia de organismos espiroidales gástricos.

**Comparación de las pruebas diagnósticas:** Las pruebas del Test rápido de ureasa y tinción de Gram modificada fueron comparadas para medir sensibilidad relativa y especificidad relativa de ambos test diagnósticos. Para esto, se consideró biopsias negativas a OEG mediante la tinción a aquellas que después de la observación de un total de 50 campos microscópicos, elegidos aleatoriamente, no se observaba la morfología compatible con OEG. En las muestras positivas a OEG se contaba el número de células para posteriormente verificar si el tiempo de reacción al test de ureasa es concordante con la carga bacteriana observada con la tinción de Gram modificada.

**Registro de datos de los potrillos:** Se registraron los antecedentes de cada potrillo en una ficha endoscópica, donde, mediante un número de serie, se indicaba nombre de la madre, edad y sexo de la cría, tipo de alimentación, fecha de endoscopia, resultado del test de ureasa y tinción de Gram modificada.

## RESULTADOS

### TINCIÓN DE GRAM MODIFICADA

Las biopsias de mucosa gástrica provenientes de *fundus* sometidas a tinción Gram modificada dieron una positividad de 56% a OEG, observándose en mayor cantidad de frotis bacterias de morfología curva que bacterias espiraladas. En los frotis restantes o no se observaron células bacterianas o éstas no eran compatibles con OEG.

Los valores expresados en la Tabla 1 muestran las biopsias positivas a OEG mediante la tinción y su carga bacteriana, de un total de 50 campos microscópicos observados.

### DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN AL TEST DE UREASA

El análisis de las 27 biopsias evaluadas por medio del tiempo de reacción al test rápido de ureasa (HEPY-test) para determinar la presencia de OEG se aprecia en la Tabla 2. Se consideró que una muestra estaba negativa cuando no hubo viraje del

TABLA 1  
DETERMINACIÓN DE OEG EN BIOPSIAS DE *FUNDUS* GÁSTRICO DE POTRILLOS (N=27) MEDIANTE TINCIÓN DE GRAM MODIFICADA EN 50 CAMPOS MICROSCÓPICOS

Carga Bacteriana	N° Campos (+) OEG	Muestras (n)	Muestras (%)
Negativa	0	12	44
Baja	0-16	11	41
Moderada	17-33	4	15
Alta	34-50	0	0

n: Número de biopsias.

TABLA 2  
DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE REACCIÓN AL TEST RÁPIDO DE UREASA EN BIOPSIAS DE *FUNDUS* GÁSTRICO DE POTRILLOS (N=27) Y CATEGORÍA DE LA CARGA BACTERIANA

Tiempo de reacción Al test de ureasa (h)*	<i>Fundus</i> gástrico n	%	Categoría carga bacteriana
>48 h	20	74	ausencia
>24 y <48 h	6	22	baja
>12 y <24 h	1	4	moderada
< 12 h	0	0	alta

\*Adaptado de Otto y col., 1994.

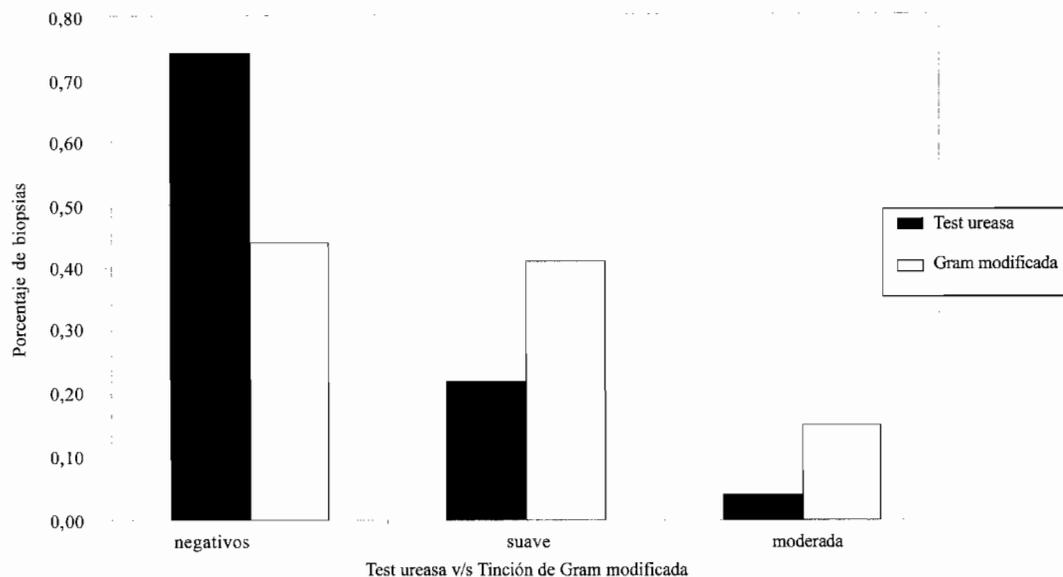
reactivo dentro de las 48h, el 74% de las muestras analizadas estaban en esta categoría. El 26% restante de las muestras dio una reacción positiva entre las 48 y 12h, lo que equivale a una carga bacteriana baja (22%) o moderada (4%), respectivamente. Ninguna de las biopsias analizadas presentó una carga bacteriana alta, ya que no hubo reacción positiva en ellas dentro de las primeras 12 h de reacción.

### COMPARACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Se compararon los resultados obtenidos con ambas pruebas diagnósticas para establecer la sensibilidad relativa y especificidad relativa de ellos. La sensibilidad relativa del test rápido de ureasa respecto a la tinción de Gram modificada fue de un 47% y la especificidad relativa fue de un 100% (Figura 1).

Figura 1

Evaluación de los porcentajes negativos a ambas técnicas diagnósticas y la relación carga bacteriana v/s tiempo de reacción al test de ureasa



### DISCUSIÓN

La tinción de Gram modificada produce un índice muy alto en el éxito de la detección de *Helicobacter* sp. (Goodwin, 1997). Estudios en curso realizados en nuestro laboratorio indican que esta tinción fue efectiva en diagnosticar OEG en gatos domésticos sanos en un 97% de los animales muestreados (datos no publicados). Vaira y col. (2002) indican que esta tinción es un método diagnóstico muy eficiente al ser comparado con la histología y cultivo, ya que admite en poco tiempo determinar la presencia de OEG, además de permitir observar su morfología y tamaño. En este estudio se detectaron porcentajes relativamente similares entre las biopsias positivas (56%) a OEG y las negativas (44%); cabe señalar que se observaron bacterias mayoritariamente de morfología curva y en menor cantidad espiraladas en relación a este grupo bacteriano en otras especies de animales (Goodwin, 1997; Simpson, 1997; Simpson y Burrows, 1997). Sin embargo, según nuestros antecedentes no existe descripción de OEG ni de *Helicobacter* sp. en equinos clínicamente sanos (Collier y Stoneham, 1997).

Marshall (1988), Simpson (1997) y Yamasaki y col. (1998) indican que la rapidez con la que se produce el cambio calorimétrico del test de ureasa, depende de la cantidad de ureasa que se produzca a partir del número de bacterias presentes en la mues-

tra incubada. En este estudio los tiempos de reacción positivos al test más frecuentes se ubican en el rango de 24 y 48 h (22%), considerándose este tiempo de reacción como una carga bacteriana baja o ligera. El 74% de las biopsias no dio reacción positiva dentro de las 48 h, lo que puede interpretarse como la no existencia de OEG en estas muestras, o bien que la cantidad de células bacterianas era menor de  $10^5$  según lo señalado por Mégraud y col. (1997), quienes indican que los test de ureasa son útiles para detectar el microorganismo, pero es necesario un mínimo de  $10^5$  bacterias en la muestra para obtener resultados positivos. También considera que con el uso de dos biopsias la sensibilidad del test es mayor y que con tiempos largos de lectura aumenta el riesgo de obtener falsos-positivos por incremento en la producción de ureasa por otras bacterias presentes en el estómago. Sin embargo, éstas no exceden el 5%. En este estudio sólo se trabajó con una biopsia de *fundus* por potrillo, sería interesante, por lo tanto, trabajar con más de una biopsia y comparar los resultados obtenidos con los presentes.

Por otra parte, ya que no se ha descrito OEG desde el estómago de equinos clínicamente sanos, no sabemos qué rol pueden estar cumpliendo y si pueden ser potencialmente patógenos para los mismos potrillos a mayor edad, lo que caracteriza el tipo de infección causada por este grupo de bacterias, de naturaleza crónica.

La sensibilidad relativa del test rápido de ureasa comparado con la tinción Gram modificada fue de un 47%, valor cercano al 50%; esto indica la capacidad que tiene el test rápido de ureasa para detectar las muestras que son verdaderamente positivas. Estos valores están dados por la presencia de biopsias débilmente positivas o que cuentan con una pequeña cantidad de bacterias, las que no alcanzan a hacer virar el indicador que lleva el test de ureasa. Esto concuerda con lo descrito por Mégraud y col. (1997), quienes consideran que el uso de tinciones especiales facilita la identificación del género *Helicobacter* y mejora la sensibilidad a la detección histológica, particularmente cuando las bacterias son insuficientes o están distribuidas focalmente.

En relación a la especificidad relativa, los resultados indican un 100% de efectividad, lo que significa que el porcentaje de detección de biopsias que no poseen OEG es acertada en todos los casos, o dicho de otra forma no hubo test de ureasa positivos que no presentaran la bacteria. El test de ureasa para la detección de *H. pylori* en biopsias humanas también presenta una alta sensibilidad y especificidad (National Institute of Health, 1994).

En el presente estudio no existen diferencias estadísticamente significativas (prueba de comparación de proporciones,  $p > 0,05$ ) entre sexo y edad de los potrillos muestreados, lo que sugiere que tanto el sexo como la edad de los potrillos no constituyen factores de riesgo para la infección con OEG, aun cuando para hacer una afirmación categórica al respecto habría que diseñar un estudio para ello.

Por último, se concluye la necesidad de utilizar otras técnicas diagnósticas como cultivo y PCR, para conocer a qué especie de OEG pertenecen las bacterias presentes en biopsias de *fundus* gástrico de potrillos, de morfología curva o espiralada, con reacción positiva para la ureasa.

## RESUMEN

Los Organismos Espiroidales Gástricos (OEG), que pertenecen al género *Helicobacter*, son bacterias microaerofílicas Gram negativas de forma curva o espiralada que se encuentran ampliamente distribuidas en humanos y animales de compañía. En este trabajo se analizó la frecuencia de detección de OEG en biopsias de mucosa de *fundus* gástrico de 27 potrillos clínicamente sanos provenientes del Haras Nacional ubicado en Riñihue Décima Región (Chile) a través del test rápido de ureasa y tinción de

Gram modificada. El 26% de las biopsias analizadas fueron positivas para OEG mediante el test rápido de ureasa y el 56% fue positiva a la tinción de Gram modificada. El test de ureasa fue positivo con mayor frecuencia entre las 24 y 48 horas, lo que indica una carga bacteriana leve en la mayoría de las biopsias. Este estudio muestra la existencia de bacterias de morfología curva o espiralada, ureasa positiva, concordante con OEG, en la mucosa de *fundus* gástrico de potrillos y sugiere la presencia de bacterias del género *Helicobacter*. Este hallazgo nos parece importante, ya que según nuestros antecedentes no existe descripción de OEG ni de *Helicobacter pylori* en equinos clínicamente sanos. Es necesario seguir investigando qué rol pueden estar jugando estas bacterias en el estómago de potrillos, especialmente por el potencial zoonótico que pudieran representar para el hombre.

## REFERENCIAS

- ANDREWS, E., H. FERNÁNDEZ. 1997. Género *Helicobacter*: Una entidad taxonómica en expansión, de características zoonóticas. *Rev. Chil. Cs. Méd. Biol.* 7: 17-24.
- BELLI, C., W. FERNANDES, L. SILVA. 2003. Teste de urease positivo em equino adulto com úlcera gástrica-*Helicobacter* sp.?. *Arq. Inst. Biol., São Paulo* 70: 17-20.
- COLLIER, D., J. STONEHAM. 1997. Gastro-oesophageal ulcers in man and horse: semblance and dissemblance. *Equine Vet. J.* 29: 410-412.
- COVACCI, A., J. TELFORD, G. DEL GIUDICE, J. PARSONNET, R. RAPPUOLI. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333.
- DIMOLA, S., M. CARUSO. 1999. *Helicobacter pylori* in animal affecting the human habitat through the food chain. *Anticancer Res.* 19: 3889-3894.
- GUIDELINES FOR CLINICAL TRIALS IN *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION. 1997. Technical annex: tests used to assess *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 2: S10-S18.
- GOODWIN, S. 1997. Detection of *H. pylori* infection by biopsy urease, histology, and culture pp. 7-18 In: Christopher, L. C and H. L. Mobley (Eds.) *Helicobacter pylori* protocols. Humana Press. New Jersey, U.S.A.
- HARPER, C., Y. FENG, S. XU, N. TAYLOR, M. KINSEL, F. DEWHIRST, B. PASTER, M. GREENWELL, G. LAVINE, A. ROGERS, J. FOX. 2002. *Helicobacter cetorum* sp. nov., a Urease-Positive *Helicobacter* species Isolated from Dolphins and Whales. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4536-4543.
- HOPKINS, R., P. VIAL, C. FERRECCIO, J. OVALLE, P. PRADO, V. SOTOMAYOR, R. RUSSELL, S. WASSERMAN, J. MORRIS. 1993. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: Vegetables may serve as one route of transmission. *J. Infect. Dis.* 168: 222-226.
- LUDLOW, C. 1997. Endoscopy case of the month. *Vet. Med.* 92: 237-249.
- MARSHALL, B. 1988. The *Campylobacter pylori* story. *Scand. J. Gastroenterol.* 23: 58-66.

- MÉGRAUD, F. 1995. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther.* 9: 85-91.
- MÉGRAUD, F., C. O'MORAIN, P. MALFERTHEINER. 1997. Technical annex: test used to assess *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 41: S10- S17.
- MURRAY, M. 1989. Endoscopic appearance of gastric lesions in foals: 94 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195: 1135-1141.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. CONSENSUS CONFERENCE. 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 65-69.
- OSHOWO, A., D. GILLAM, A. BOTHA, M. TUNIO, J. HOLTON, P. BOULUS, M. HOBBSLEY. 1998. *Helicobacter pylori*: The mouth, stomach, and gut axis. *Ann. Periodont.* 3: 276-280.
- OTTO, G.S., H. HAZELL, J.G. FOX, C.R. HOWLETT, J. C. MURPHY, J. L. O'ROURKE, A. LEE. 1994. Animal and public health implications of gastric colonization of cats by *Helicobacter*-like organisms. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1043-1049.
- SAVARINO, V., S. VIGNERI, G. CELLE. 1999. The C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 48: 118- 122.
- SATO, F., N. SAITO, E. SHOUJI, A. RANI., H. TAKEDA., T. SUGIYAMA, M. ASAKA. 1999. The maintenance of viability and spiral morphology of *Helicobacter pylori* in mineral water. *J. Med. Microbiol.* 48: 971.
- SIMPSON, K. 1997. *Helicobacter* spp. in dogs and cats. The North American Veterinary Conference. Veterinary Proceedings, January 11-15. World Small Animal Vet. Assoc. Orlando, Florida, U.S.A.
- SIMPSON, K., C. BURROWS. 1997. Gastritis, úlceras y helicobacterias en humanos, perros y gatos. *Waltham Focus* 7: 2-6.
- TOMPKINS, L., S. FALKOW. 1995. The new path to preventing ulcers. *Science* 267: 1621-1622.
- TYTGAT, G. 1995. Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9: 105-110.
- USÓN J., V. TEJEDO. 1985. Técnica de las gastroscopias. pp. 93-109. En: Fibroendoscopia digestiva veterinaria y medicina experimental en pequeños animales. Publicaciones de la Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.
- VAIRA D., L. GATTA, C. RICCI, M. MIGLIOLI. 2002. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 16-23.
- VAN HORN, K., B. DWORKIN. 1990. Direct Gram stain and urease test to detect *Helicobacter pylori*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 449-452.
- 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.