

Pesquisa de *Helicobacter* spp. enterohepáticos no fígado de gatos domésticos

Marina Dutra Basile

Lilian Rose Marques de Sá

Alex Junior Souza de Souza

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo

marinabasile@usp.br

Objetivos

A pesquisa objetivou pesquisar, molecularmente, a ocorrência de infecção por *Helicobacter* spp. enterohepáticos em amostras de fígado de gatos domésticos (*felis catus domesticus*). Adicionalmente, também objetivou avaliar características clínico-epidemiológicas e histopatológicas associadas à helicobacteriose enterohepática nesses animais.

Métodos e Procedimentos

O presente projeto foi submetido à apreciação e aprovado pela CEUA da FMVZ/USP, sob protocolo CEUAx N 9136211022. Amostras de fígado de 39 gatos domésticos (n = 39) congeladas à -20° C foram incluídas no estudo. Dezesseis casos, coletados no ano de 2012, pertenciam ao arquivo do Laboratório de Patologia Diagnóstica e Ambiental (LPDA); e outros 23 casos, coletados entre 2021 e 2022, foram doados pelo Serviço de Patologia Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo. Os dados populacionais e epidemiológicos dos animais foram obtidos a partir de prontuários clínicos disponíveis em 21 casos. Amostras de fígado dos 39 casos foram testadas para pesquisa molecular de *Helicobacter* spp. O DNA total de cada amostra foi purificado com o kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN),

aplicado segundo as instruções do fabricante. Para certificação das purificações, alíquotas de dsDNA de cada amostra foi quantificado em fluorômetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Os casos foram individualmente testados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, para amplificação de sequência parcial (399 pb) da região 16S rRNA do gênero *Helicobacter*, por um protocolo previamente descrito e validado na literatura (GERMANI *et al.*, 1997). Controles-positivos (DNA de *Helicobacter* gástrico de gato doméstico) e negativos (água livre de DNase e RNase) foram incluídos em todos os ensaios de PCR para certificação da efetividade e presença de contaminantes, respectivamente. A detecção dos produtos de amplificação foi realizada em eletroforese em gel de agarose 1,5% e amostras com tamanho aproximado de 399 pb foram consideradas como positivas para o gênero. Os *amplicons* das amostras positivas nos ensaios de PCR serão sequenciados pelo método Sanger em sequenciador automatizado ABI 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems) e as sequências serão posteriormente avaliadas para confirmação de positividade e análise filogenética. Quinze dos 39 gatos também possuíam alíquotas de fígado fixadas em formol 10% e embebidas em parafina (FFPE) que foram processadas por técnica histológica padrão para obtenção de cortes de 5 µm corados por hematoxilina-eosina. As secções

histológicas de fígado foram avaliadas microscopicamente com graduação semiquantitativa, considerando alterações circulatórias, degenerativas, necroinflamatórias e/ou fibrose do trato hepatobiliar (CULLEN, 2009; VAN WETTERE & BROWN, 2022).

Resultados

A partir dos dados disponíveis de 21 gatos, 52% da população era constituída por fêmeas (11/21) e a idade média dos animais foi de 6 anos. A principal causa de morte foi eutanásia (42,8%; 9/21) devido a um mau prognóstico clínico, na circunstância de atendimento. Em todos os ensaios de PCR o controle-positivo apresentou banda com tamanho ~400 pb, confirmando efetividade das reações, enquanto os controles-negativos não apresentaram evidências de contaminação. Dos 39 casos testados, 36 (92,3%) apresentaram resultado negativo no ensaio de PCR convencional, e 3 (7,7%) apresentaram banda com altura aproximada de 399 pb, sugerindo resultados positivos no teste de PCR para *Helicobacter* spp.. Amplicons das amostras suspeitas serão submetidos a testes adicionais de PCR e sequenciamento nucleotídico para confirmação da positividade e análise filogenética. Em relação à análise microscópica hepática, todos os casos avaliados apresentaram resultados negativos na PCR. Os principais diagnósticos morfológicos foram de hepatite reacional inespecífica (40%; 6/15), lipidose e degeneração vacuolar hepatocelular em 33,3% (5/15), 1 caso de fibrose portal, 2 casos de infiltração tumoral (linfoma) e 1 caso de colangiohepatite.

Conclusões Parciais

Em seres humanos, a infecção por *Helicobacter* enterohepáticos já foi associada a colangio- e hepatopatias, mas o impacto clínico e anatomopatológico da presença primária ou secundária dessas bactérias no trato hepatobiliar ainda permanece em debate (MÉNARD & SMET, 2019). No Brasil, estudos têm demonstrado evidências moleculares de *Helicobacter* spp. em 15,2% (5/33) fígados de

cães, principalmente em animais com hepatite crônica (TAKEMURA *et al.*, 2019). Nossos resultados apontam para uma baixa prevalência molecular de helicobactérias no fígado de gatos da casuística avaliada. Adicionalmente, não identificamos animais com evidências histológicas de hepatopatias crônicas, que podem representar um maior risco de infecção por helicobactérias. Ponderamos, entretanto, que avaliações adicionais ainda precisam ser finalizadas para complementar essas inferências. As colangio-hepatopatias são frequentes na clínica de felinos e, como os sinais clínicos e laboratoriais podem ser inespecíficos, pesquisas adicionais mais amplas, que considerem helicobactérias como potenciais agentes etiológicos de doença hepática e/ou biliar nesses animais ainda precisam ser realizadas para melhor compreensão dos impactos clínicos e anatomopatológicos do agente.

Referências

- CULLEN, J. M. Summary of the World Small Animal Veterinary Association Standardization Committee Guide to Classification of Liver Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 39, n. 3, p. 395–418, 2009.
- GERMANI, Y. et al. Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. **Research in microbiology**, v. 148, n. 4, p. 315-326, 1997.
- MÉNARD, A.; SMET, A. Other *Helicobacter* species. **Helicobacter**, v. 24, p. e12645, 2019.
- TAKEMURA, L. S. et al. *Helicobacter* infection in the hepatobiliary system and hepatic lesions: a possible association in dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 297-305, 2019.
- VAN WETTERE, A. J.; BROWN, D. L. Hepatobiliary system and exocrine pancreas. In: Zachary J. (ed). **Pathologic basis of veterinary disease** (7th ed). Elsevier, 2022. p. 486-546.

Research for enterohepatic *Helicobacter* spp. in the liver of domestic cats

Marina Dutra Basile

Lilian Rose Marques de Sá

Alex Junior Souza de Souza

School of Veterinary Medicine and Animal Science – University of São Paulo

marinabasile@usp.br

Objectives

The research aimed to investigate, molecularly, the occurrence of infection by enterohepatic *Helicobacter* spp. in liver samples from domestic cats (*felis catus domesticus*). Additionally, it also aimed to evaluate clinical-epidemiological and histopathological characteristics associated with enterohepatic helicobacteriosis in these animals.

Materials and Methods

The present project was submitted for consideration and approved by the CEUA of FMVZ/USP, under protocol CEUAX N 9136211022. Liver samples from 39 domestic cats (n = 39) frozen at -20° C were included in the study. Sixteen cases, collected in 2012, belonged to the archive of the Laboratory of Diagnostic and Environmental Pathology (LPDA); and another 23 cases, collected between 2021 and 2022, were donated by the Animal Pathology Service, of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, of the University of São Paulo. Animal population and epidemiological data were obtained from clinical records available in 21 cases. Liver samples from the 39 cases were tested for molecular screening of *Helicobacter* spp.. Total DNA from

each sample was purified with the DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN), applied according to the manufacturer's instructions. To certify the purifications, aliquots of dsDNA from each sample were quantified using a Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). The cases were individually tested using the conventional polymerase chain reaction (PCR) technique, for amplification of a partial sequence (399 bp) of the 16S rRNA region of the *Helicobacter* genus, using a protocol previously described and validated in the literature (GERMANI et al., 1997). Positive controls (gastric *Helicobacter* DNA from domestic cat) and negative controls (DNase- and RNase-free water) were included in all PCR assays to certify effectiveness and presence of contaminants, respectively. Detection of amplification products was carried out using 1.5% agarose gel electrophoresis and samples with an approximate size of 399 bp were considered positive for the genus. The amplicons from positive samples in the PCR assays will be sequenced using the Sanger method in an automated sequencer ABI 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems) and the sequences will be subsequently evaluated to confirm positivity and phylogenetic analysis. Fifteen of the 39 cats also had liver aliquots fixed in 10% formalin and embedded in paraffin (FFPE) that were processed using standard histological techniques to obtain 5-µm sections

stained with hematoxylin-eosin. Histological liver sections were evaluated microscopically with semiquantitative grading, considering circulatory, degenerative, necroinflammatory changes and/or fibrosis of the hepatobiliary tract (CULLEN, 2009; VAN WETTERE & BROWN, 2022).

Results

From the available data on 21 cats, 52% of the population were females (11/21) and the average age of the animals was 6 years. The main cause of death was euthanasia (42.8%; 9/21) due to a poor clinical prognosis in the circumstances of care. In all PCR assays, the positive control showed a band with a size of ~400 bp, confirming the effectiveness of the reactions, while the negative controls showed no evidence of contamination. Of the 39 cases tested, 36 (92.3%) presented a negative result in the conventional PCR assay, and 3 (7.7%) presented a band with a height of approximately 399 bp, suggesting positive results in the PCR test for *Helicobacter* spp.. Amplicons from suspected samples will be subjected to additional PCR and nucleotide sequencing tests to confirm positivity and phylogenetic analysis. Regarding liver microscopic analysis, all cases evaluated presented negative PCR results. The main morphological diagnoses were nonspecific reactional hepatitis (40%; 6/15), lipidosis and hepatocellular vacuolar degeneration in 33.3% (5/15), 1 case of portal fibrosis, 2 cases of tumor infiltration (lymphoma) and 1 case of cholangiohepatitis.

Partial Conclusions

In humans, enterohepatic *Helicobacter* infection has already been associated with cholangio- and hepatopathies, but the clinical and anatomopathological impact of the primary or secondary presence of these bacteria in the hepatobiliary tract still remains under debate (MÉNARD & SMET, 2019). In Brazil, studies have demonstrated molecular evidence of

Helicobacter spp. in 15.2% (5/33) dog livers, mainly in animals with chronic hepatitis (TAKEMURA et al., 2019). Our results point to a low molecular prevalence of helicobacteria in the liver of cats in the series evaluated. Additionally, we did not identify animals with histological evidence of chronic liver disease, which may represent a greater risk of helicobacterial infection. We consider, however, that additional evaluations still need to be completed to complement these inferences. Cholangiohepatopathies are common in feline clinics and, as clinical and laboratory signs may be nonspecific, additional, broader research that considers helicobacteria as potential etiological agents of liver and/or biliary disease in these animals still needs to be carried out for a better understanding of the clinical and anatomopathological impacts of the agent.

References

- CULLEN, J. M. Summary of the World Small Animal Veterinary Association Standardization Committee Guide to Classification of Liver Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 39, n. 3, p. 395–418, 2009.
- GERMANI, Y. et al. Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. **Research in microbiology**, v. 148, n. 4, p. 315-326, 1997.
- MÉNARD, A.; SMET, A. Other *Helicobacter* species. **Helicobacter**, v. 24, p. e12645, 2019.
- TAKEMURA, L. S. et al. *Helicobacter* infection in the hepatobiliary system and hepatic lesions: a possible association in dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 297-305, 2019.
- VAN WETTERE, A. J.; BROWN, D. L. Hepatobiliary system and exocrine pancreas. In: Zachary J. (ed). **Pathologic basis of veterinary disease** (7th ed). Elsevier, 2022. p. 486-546.