

DIAGNÓSTICO DE *Helicobacter* spp. EN MUCOSA GÁSTRICA DE EQUINOS, MEDIANTE PRUEBAS DE ACTIVIDAD UREASA

DIAGNOSIS OF *Helicobacter* spp. In Gastric Mucosa of Horses, by means of tests of Urease Activity

Angélica María Zuluaga-Cabrera^{1*} y José Ramón Martínez-Aranzales

Línea de Investigación en Medicina y Cirugía Equina (LIMCE), Centauro Research Group, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70 No. 52-21, AA 1226, Medellín – Colombia. *Autor para correspondencia: angelica.zuluaga@udea.edu.co

RESUMEN

El síndrome ulcerativo gástrico equino (SUGE) es una entidad multifactorial que ocasiona lesiones en la mucosa gástrica. El SUGE ha sido asociado a factores como el tiempo de estabulación, el suministro de concentrado, hipergastrinemia por ejercicio, estrés, uso de antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y disbiosis (*Helicobacter* spp.). El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica de equinos y determinar su asociación con SUGE. Fueron evaluados 20 caballos de diferentes razas, de ambos sexos y estabulados. Se realizó esófago-gastro-duodenoscopia a través de la cual se realizó examen de la mucosa gástrica y toma de biopsia de la porción glandular del estómago. Las muestras fueron sometidas a la prueba rápida de ureasa (PRU) y a la prueba del aliento (UBT). Se realizó estadística descriptiva y análisis de sensibilidad y especificidad para ambas pruebas. Las pruebas de detección de actividad ureasa resultaron poco sensibles con relación a la prueba de oro (agar urea); consecuentemente no fue posible establecer asociación entre la actividad ureasa relacionada con *Helicobacter* y la aparición de SUGE. No se estableció correspondencia entre las pruebas utilizadas y la presencia de *Helicobacter* spp., además de su relación con SUGE. Se requiere de diagnóstico molecular para su diagnóstico.

Palabras clave: Estómago; gastroscopia; prueba del aliento; úlcera

ABSTRACT

Equine Ulcerative Gastric Syndrome (EGUS) is a multifactorial entity that produces gastric mucosal lesions. EGUS had been associated to risks factors such as stabling, grain supply, hypergastrinemia due exercise, stress, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and disbiosis (*Helicobacter* spp.). The objective of this study was to detect *Helicobacter* spp. on equine gastric mucosa and to determine its association with EGUS. Twenty horses with different breeds, both sexes, stabled, were evaluated. An esophagus-gastro-duodenoscopy and biopsy of glandular mucosa were performed. Samples were submitted to Urease Rapid Test (URT) and Urea Breath Test (UBT) was performed in the studied population. Descriptive statistics, and sensibility/ specificity test were developed. Urease production tests were less sensitive respect to “gold standard” test (urea agar); It was not possible to determine correspondence between urease tests and *Helicobacter* spp presence, or EGUS. It was not determined correspondence between tests and EGUS or *Helicobacter* spp., it requires molecular diagnosis.

Key words: Stomach; gastroscopy; urea breath test; ulcer

INTRODUCCIÓN

Helicobacter es una bacteria Gram negativa, microaerófila, espiralada, flagelada, clasificada inicialmente dentro del género *Campylobacter*, pero re-categorizada en 1989 [14], gracias al estudio detallado de un microorganismo encontrado en antro pilórico de humanos con enfermedad gástrica, llamado desde entonces *Helicobacter pylori*. A pesar de que su forma más conocida es la espiral, es pleomórfico. Las formas de esfera (cocoides) aparecen en condiciones de privación de nutrientes, exposición a antibióticos o tiempos prolongados de incubación. Se presume que estas formas regresan a la presentación bacilar según condiciones ambientales especiales, retornando su capacidad infectiva [1, 14].

El perfil bioquímico más conocido entre el género *Helicobacter* es el de *H. pylori*, cuya actividad enzimática más notable es la capacidad de hidrolizar la urea, además de poseer actividad fosfatasa alcalina, oxidasa y catalasa. A pesar de que se considera relativamente común la actividad ureasa entre especies de *Helicobacter*, algunas de estas bacterias encontradas en mucosa gástrica de animales difieren en su actividad enzimática y efectos sobre el tejido.

Algunos microorganismos encontrados en mucosa gástrica de equinos (*Equus ferus caballus*) tanto, sana como ulcerada se han relacionado con el género *Helicobacter* [3, 7, 8, 16], entre ellos *H. equorum* [12]; sin embargo, la participación de *Helicobacter* en la patogénesis del Síndrome Ulcerativo Gástrico Equino (SUGE) aún no ha sido establecida, aunque existe la presunción de que su presencia en mucosa gástrica de equinos es potencial factor de riesgo para el síndrome en cuestión. Por esta razón, el presente estudio tuvo como objetivo detectar la bacteria a través de pruebas de actividad ureasa, además de establecer la asociación entre SUGE y presencia de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y aspectos éticos

Se realizó un estudio de tipo descriptivo prospectivo de corte transversal, a través de un muestreo por conveniencia. El estudio fue aprobado por el Comité institucional para el cuidado y uso de animales de la Universidad de Antioquia mediante el protocolo 3082013.

Esofago - gastro - duodenoscopia

Se realizó gastro-duodenoscopia, previo ayuno de doce y cuatro horas (h) para alimentos sólidos y líquidos, respectivamente. Se realizó sedación con xilacina al 10% (Anased®, laboratorios Lloyd, Iowa, EUA) (0,5mg/kg/IV). Posteriormente, se realizó la endoscopia mediante un sistema de video endoscopio (PortaScope®, 1800PVS, Bradenton, FL, EUA). Los hallazgos macroscópicos fueron clasificados según la escala de clasificación del grado de lesiones gástricas propuesto por MacAllister y col. [11].

Durante el recorrido con el endoscopio se instiló agua para mejorar la visualización de la mucosa gástrica. Una vez realizada la evaluación gastroscópica y clasificación de lesiones, se tomaron tres biopsias de la superficie gástrica, de la mucosa glandular (fundus) y antro pilórico, a través de la inserción de una pinza trans-endoscópica flexible (PortaScope®, 1800PVS, Bradenton, FL, EUA), para la realización de las pruebas rápidas de ureasa (PRU).

Prueba Rápida de Ureasa (PRU)

Para realizar la PRU, se elaboró un caldo de urea modificado [13], compuesto por agua destilada 500 mL; urea 100% (Merck, Darmstadt, Alemania) 10g; rojo fenol 0,005g; ácido clorhídrico al 97% 0,2 mL; el pH resultante fue 7, medido a través de tirilla indicadora de pH. El caldo fue alícuotado en volúmenes de 0,5 mL, y depositado en crioviales de 2 mL, cada biopsia tomada fue sumergida completamente en el caldo y rotulada. Las muestras en el caldo se incubaron a temperatura ambiente durante 12 h para su posterior lectura.

La reacción de ureasa se basó en disponer un medio rico en urea que, además contenía un indicador de pH (rojo fenol). Cuando se sumergió una fuente de la enzima ureasa (en este caso microorganismos con actividad ureasa), ésta se encargó de hidrolizar la urea presente en el medio; la liberación de amonio y dióxido de carbono resultantes de la reacción alcalinizó el medio y produjo cambio de color desde el amarillo (negativo) hacia el rojo-fucsia intenso, indicando reacción positiva a la actividad ureasa (FIG.1).

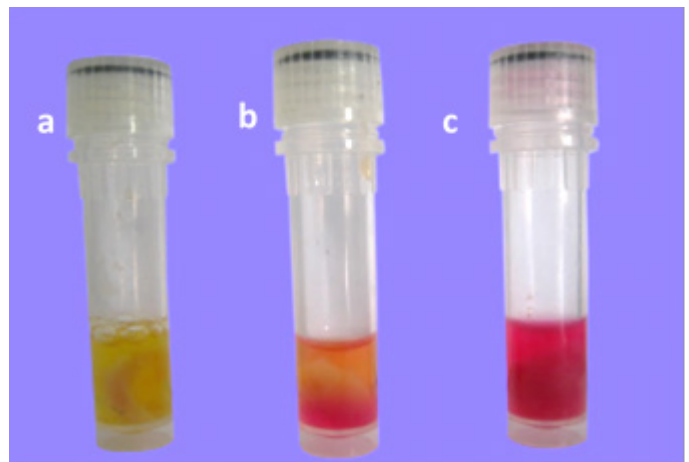


FIGURA 1. IMAGEN DEMOSTRATIVA DE LOS RESULTADOS: NEGATIVO (A), POSITIVO DÉBIL (B) Y POSITIVO (C) A LA PRUEBA RÁPIDA DE LA UREASA, A PARTIR DE BIOPSIAS GÁSTRICAS DE ALGUNOS ANIMALES DEL ESTUDIO.

Se tomaron veinte muestras de mucosa glandular por duplicado para ser sometidas a caldo urea y agar urea ("prueba de oro"), utilizado en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, con el fin de validar el resultado entre ambos medios. El agar urea fue compuesto por un gel base (Urea agar Base

Christensen® Merck Millipore, MA, EUA) 3,6 g, Sal de urea (Carlo Erba Reagents SAS, Chaussée du Vexin, FR) 7,5 g, y 5 gotas de ácido clorhídrico al 97%. Con el fin de validar la efectividad del caldo se utilizó un inóculo de un microorganismo con actividad ureasa positiva (*Proteus spp.*).

Prueba del aliento (Urea Breath Test - UBT)

Se tomó aliento basal de cada equino, introduciendo un tubo de vidrio (Exetainer® Vial for 13C breath Testing, Labco limited, Reino Unido) en un ollar, mientras se ocluía simultáneamente el contralateral, cuando el equino espiraba, se cerraba el tubo inmediatamente. Posteriormente, se suministró a cada individuo a través del canal de trabajo de la sonda del endoscopio, 50 mg de urea C¹³ (Lote U23001) diluida en 5 mL de agua y aplicada directamente contra la mucosa gástrica. Seguidamente, 10 minutos después de suministrar el reactivo, se tomaba un segundo aliento (espiración) en otro frasco de vidrio. Cada tubo se leyó en espectrómetro de masas de relación isotópica (ABCA₂ Automated Breath CO₂Analyser, Sercon® limited, Reino Unido). Se consideró positivo aquel resultado que evidenció cociente entre gases, mayor a 2Δ (delta). La reacción química esperada es representada en la siguiente ecuación: ¹³CO (NH₂) + H₂O → NH₃ + ¹³CO₂

Análisis estadístico (sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas)

Para determinar la capacidad de las pruebas diagnósticas para detectar verdaderas reacciones ureasa positiva se realizó una comparación de curvas ROC (receiver operating characteristic curve) entre PRU, UBT y agar urea (“prueba de oro”). Este análisis fue realizado con el software EPIDAT® V 3,1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se evidenció una distancia significativa entre la línea patrón (diagonal) y las curvas de PRU y UBT evaluadas (FIG. 2), lo que indicó que los resultados son atribuibles al azar y no a la correspondencia con la prueba de oro (prueba J²=0,1728; valor P=0,6777). El análisis de curva ROC, demostró que ni PRU y ni UBT son sensibles para la detección de actividad ureasa (TABLA I) cuando se les comparó con la prueba de oro.

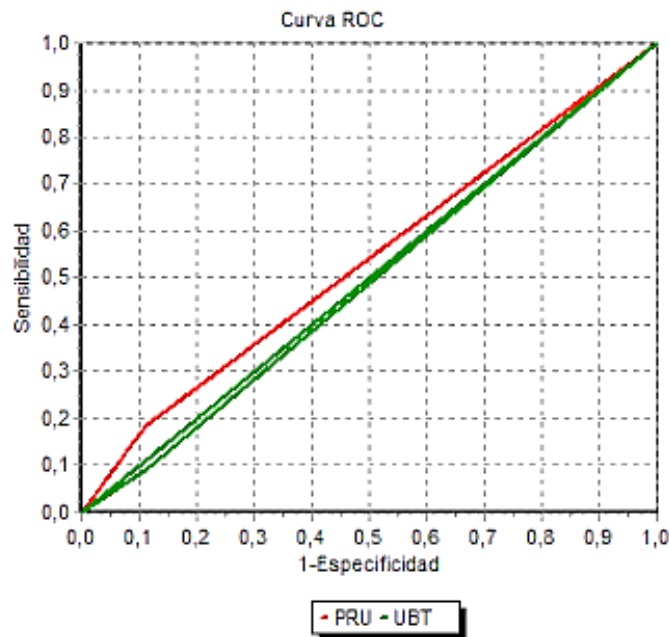


FIGURA 2. CURVA ROC PARA LA EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS DOS PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD UREASA: PRU Y UBT, EMPLEADAS EN EL ESTUDIO.

TABLA I
ÁREA BAJO LA CURVA, ERROR ESTÁNDAR E INTERVALO DE CONFIANZA DE LAS DOS PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD UREASA (PRU Y UBT)

Curva	Área ROC	EE (DeLong)	IC (95%)
PRU	0,5354	0,0825	0,3737 - 0,6970
UBT	0,4899	0,0718	0,3492 - 0,6306

EE= Error estándar; IC= Intervalo de confianza; PRU=Prueba rápida de la ureasa; UBT= Urea Breath Test

La (TABLA II) muestra en detalle los resultados para cada una de las pruebas realizadas, según el equino. Cabe anotar que se eligió fragmentos de la mucosa glandular, puesto que se considera que es la porción donde se lleva a cabo la infección por

Helicobacter spp. No fue posible establecer una relación entre las pruebas PRU y UBT, tampoco entre cada una de ellas y la reacción ureasa en agar urea.

TABLA II
RESULTADOS DE REACCIÓN UREASA EVALUADA MEDIANTE PRU, UBT Y AGAR UREA, EN 20 BIOPSIAS DE ESTÓMAGO PROVENIENTES DE LA PORCIÓN GLANDULAR DE LOS INDIVIDUOS DEL GRUPO DE ESTUDIO

Muestra	M. Glandular (PRU)	M. Glandular (AGAR UREA)	UBT
1	Positivo débil	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Positivo	Negativo
5	Negativo	Positivo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	Positivo	Positivo débil	Positivo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Positivo	Negativo
13	Negativo	Positivo	Negativo
14	Negativo	Positivo débil	Negativo
15	Negativo	Positivo	Negativo
16	Negativo	Positivo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Positivo débil	Negativo
19	Negativo	Positivo débil	Negativo
20	Negativo	Positivo débil	Negativo

PRU= Prueba rápida de la ureasa; UBT: Urea Breath Test; M. Glandular= mucosa glandular.

Cuando se evaluó la capacidad de PRU o UBT para predecir la ulceración gástrica, fue evidente que en ninguna circunstancia la frecuencia de positivos se inclinó hacia aquellos individuos que presentaron ulceración (cualquier grado).

No se realizó PRU a todas las regiones del estómago de todos los animales, se consideró principalmente para aquellos que evidenciaban lesiones gástricas grado ≥ 2 (severidad). Tal como se evidenció en la FIG. 2 y la TABLA I, las pruebas de detección de actividad resultaron ser poco sensibles con respecto a la prueba de oro elegida (agar urea). Algunos resultados “positivo débil” en PRU también fueron positivos débiles para UBT, esto se explica en la helicobacteriosis, debido a que *H. pylori*, al producir una lesión severa, tiende a disminuir la actividad ureasa; este comportamiento de la prueba UBT se evidencia en humanos que aún, siendo positivos y evidenciando cuadro clínico compatible con Helicobacteriosis, resultan positivos dudosos a UBT.

Es posible que las pruebas de detección de actividad ureasa funcionen mejor en lesiones superficiales, debido a que a ese nivel no se ha producido disbiosis de los microorganismos comensales, en contraste, cuando existe lesión severa el sustrato para los microorganismos desaparece y éstos finalmente disminuyen o mueren. Se ha reportado que la insuflación temporal

del estómago durante la endoscopia interfiere con UBT debido a que la oxigenación artificial afecta la actividad ureasa, además, el pobre ayuno hace que exista interferencia entre los restos de alimento y la actividad ureasa [5].

Por otro lado, el volumen de reactivo utilizado pudo haber interferido en el desempeño de esta técnica puesto que no fue ajustado al volumen y superficie del estómago equino, además la ausencia de temperatura de incubación recomendada (37°C) [5]; estos factores pueden explicar la aparición de posibles falsos negativos a UBT. La prueba UBT, en seres humanos ha mostrado una alta eficiencia en el diagnóstico de *H. pylori* [6]. Sin embargo, la utilización de la UBT en el equino no mostró resultados similares; además, existen factores químicos y microbiológicos que hacen que la evaluación de la actividad ureasa en estómago equino no sea una herramienta diagnóstica de helicobacteriosis y a su vez de SUGE. Como primera medida, no está claro cuál es la cantidad propicia de caldo urea y consecuentemente la cantidad mínima de unidades formadoras de colonia (UFC) de un microorganismo ureasa positivo para lograr reacción positiva en el tiempo que se tiene estipulado para su lectura; esta incertidumbre hace que se haga necesario un acercamiento diferente a esta prueba en campo. Sin embargo, Valenzuela y Luzio [16] sugieren una cantidad mínima de 10^5 bacterias por

test para evidenciar reactividad durante las siguientes 48 h; de cualquier manera, no se menciona la cantidad óptima de caldo urea para que esta premisa se cumpla.

Por otra parte, se conoce que existen otros microorganismos productores de ureasa en estómago de equinos, tales como *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aureginosa* [2], *Klebsiella* spp. y *Yersinia* spp. [7] que pueden confundir los resultados de los test de actividad ureasa y por tanto, los hace poco concluyentes para la determinación de *Helicobacter* spp. [7]. Se ha encontrado *Lactobacillus salivarius* y *Sarcina ventriculi*, tanto en mucosa gástrica equina sana como en lesiones ulcerativas; además, en una lesión ulcerativa se encontró *Enterococcus faecium* y *Escherichia fergusonii* superficial e intraepitelial, respectivamente [10]. Por otro lado, *H. equorum*, que ha sido aislado específicamente de equinos, tanto sanos como enfermos, no cuenta con actividad ureasa [9], lo que sugiere que algunos de estos microorganismos pueden participar en la fisiopatología de SUGE y no ser encontrados utilizando pruebas de detección de actividad ureasa.

Otro problema con las pruebas de ureasa es la eventual acidez gástrica presente en pacientes con SUGE, esto se explica debido a la curva pH gástrico/actividad de la ureasa de *Helicobacter*; el pico de actividad ureasa ocurre a pH gástrico de 7,5, no hay actividad perceptible por debajo de pH 4,5 y a pH 4, la inactivación es irreversible [9], lo que significa que en aquellos individuos donde se presumió pH gástrico igual o menor a 4 la prueba pudo resultar falsamente negativa a *Helicobacter* spp. En el caso del presente estudio, no fue medido el pH en las diferentes porciones del estómago, por lo tanto esta información no pudo ser corroborada. Es ideal, verificar el pH gástrico, y relacionarlo con la aparición de úlceras en las diferentes regiones gástricas, además de su correspondencia con actividad ureasa [4].

Además, se ha encontrado que algunos factores epigenéticos (níquel como apoenzima) y genéticos como capacidad de ARNm de traducir suficientemente las órdenes de los genes reguladores de la producción de ureasa, influyen en la sensibilidad de las pruebas de detección de ureasa. La actividad ureasa intrabacterial del *Helicobacter* es regulada en por lo menos tres vías: primero, una respuesta rápida vía activación de Urel; segundo, una respuesta más lenta basada en el incremento de la activación enzimática y tercero, una respuesta crónica de ARN mensajero estimulando la síntesis de nueva ureasa; todos estos factores sugieren que es posible que existan microorganismos ureasa positivos como *Helicobacter* spp., inclusive participando en el SUGE, pero que podrían no ser fácilmente detectados por las pruebas de detección de ureasa.

Sería factible de considerar repetir las pruebas en condiciones idénticas para determinar su variabilidad y reproducibilidad [15], o por ejemplo, llevar a cabo análisis por duplicado. La variabilidad de una prueba también está dada por el estadio de la infección que cursa el paciente [15] y por el pH de la muestra per sé que puede retardar la reacción del rojo fenol; de modo que algunos

falsos positivos y falsos negativos pueden encontrarse durante el desarrollo de las pruebas y la combinación de signos clínicos y evidencias paraclínicas recopiladas, son la mejor conducta para el diagnóstico de Helicobacteriosis en caballos. Además, se considera el diagnóstico molecular como instrumento clave al momento de esclarecer la presencia de *Helicobacter* spp. en la mucosa gástrica de estos equinos.

Las dificultades para realizar aislamiento de *Helicobacter* spp. para confirmar su participación en SUGE, hace que el estudio presente error tipo II, es decir, afirmar que el microorganismo no está relacionado con la presencia de lesiones gástricas cuando realmente si está asociado; sin embargo, la participación de otros microorganismos ureasa positivos, puede llevar a cometer errores de tipo I, asociando positividad con presentación de SUGE, cuando realmente su causalidad no es cierta. Sin embargo, varios trabajos han reportado la presencia de microorganismos compatibles con especies de *Helicobacter*, tanto en mucosa gástrica intacta como ulcerada e inflamadas [8], lo que ha generado controversia respecto de su participación en el SUGE. Por consiguiente, se continúa requiriendo estudios moleculares para determinar su relevancia en la patología gástrica de equinos, como es claro en seres humanos.

En este sentido, un estudio realizado en animales de abasto público en Chile encontró 65% de reacción ureasa positiva y la observación de bacterias curvo-espinaladas tipo *Helicobacter* en un grupo de estómagos ulcerados en fundus y antro pilórico [7], mostrando mayores reacciones en el fundus, lo que difiere con lo reportado para otras especies. En contraste, el presente estudio evidenció actividad ureasa positiva en lesiones mayor o igual a 2 grados en el 6% de los antros pilóricos y 0% en la mucosa glandular. Posiblemente esta diferencia obedeció a que no se consideró la discriminación de las porciones en el trabajo de Cardona y col. [7]. Estos hallazgos incentivan a realizar más estudios específicos para la plena identificación de los microorganismos involucrados en estas reacciones.

El presente estudio no determinó correspondencia entre lesiones gástricas y actividad ureasa; es muy importante considerar que estos resultados son ambiguos debido a que las pruebas utilizadas (PRU y UBT) son poco sensibles en comparación con el agar urea (*gold standard*). Por lo tanto, no es adecuado referirse a la “prueba rápida de la ureasa” como “prueba diagnóstica” para *Helicobacter* spp., hace falta corroborar todo su perfil bioquímico y molecular para su correcta identificación, así como hace falta determinar el tiempo óptimo entre la colecta de la muestra y la introducción en el caldo urea. Además, faltan estudios sobre la determinación de zonas predilectas de crecimiento de bacterias espiraladas en la superficie gástrica del caballo para su aislamiento, conforme los hallazgos encontrados y reportados por otros autores.

CONCLUSIÓN

Las pruebas de detección de actividad ureasa para el diagnóstico de *Helicobacter* spp. en caballos son ambiguas, y fácilmente interferidas por condiciones como pobre ayuno y presencia de microorganismos comensales con perfiles bioquímicos similares, no deben ser utilizadas para diagnosticar helicobacteriosis, para este fin es recomendable realizar diagnóstico molecular. Tampoco debe utilizarse como método de predicción de lesiones ulcerativas en mucosa gástrica de equinos.

AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de microbiología veterinaria de la Universidad de Antioquia, al comité para el desarrollo de la investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia por el apoyo financiero otorgado al trabajo, a la estrategia de sostenibilidad 2013 – 2014 de la misma entidad, y a COLCIENCIAS en su programa jóvenes investigadores 2015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAYONA, M.; GUTIÉRREZ, A. Biopelícula: un mecanismo de supervivencia de *Helicobacter pylori*. *Rev. U.D.C.A Actualid. & Divulg. Cientif.* 16(2): 335-342. 2013.
- [2] BELLI, C.; FERNANDES, W.; SILVA, L. Teste de urease positivo em equino adulto com úlcera gástrica-*Helicobacter* spp. *Arquiv. Instit.Biolog.* 70(1): 17-20. 2003.
- [3] BEZDEKOVA, B.; FUTAS, J. *Helicobacter* species and gastric ulceration in horses: a clinical study. *Vet. Med.* 54(12): 577-582. 2009.
- [4] CAMACHO, P.L.; ANDREWS, F.M. Equine Gastric Ulcer Syndrome. In: Robinson, NE; Sprayberry, KA. (Eds.). **Robinson's Current Therapy in Equine Medicine**. 7th Ed. St. Louis: Elsevier. Pp 280-284. 2015.
- [5] CAMPUZANO, G. An optimized 13C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* 13(41):5454-64. 2007.
- [6] CAMPUZANO, G. Diagnóstico no-invasivo de *Helicobacter pylori*: ¿serología, prueba de aliento con 13 C-urea o antígenos de *Helicobacter pylori* en materia fecal. *Med. & Lab.* 13(5-6): 211-231. 2007a.
- [7] CARDONA, J.; PAREDES, H.; FERNÁNDEZ, H. Determinación de *Helicobacter* spp., enúlcera gástrica en caballos. *Rev. MVZ. Córdoba.* 14(3):1831-1839. 2009.
- [8] CONTRERAS, M.; MORALES, A.; GARCÍA, M.; DE VERA, M.; BERMÚDEZ, V.; GUENEAU, P. Detection of *Helicobacter*-like DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses. *Let. Appl.Microbiol.* 45(5): 553-7. 2007.
- [9] HEPBURN, R. Investigation into the Presence of *Helicobacter* in the equine stomach by urease testing and polymerase chain reaction and further investigation into the application of the 13C-urea blood test to the horse. Leesburg: Virginia Polytechnic Institute and State University. Thesis of Grade. 63-71. 2004.
- [10] HUSTED, L.; JENSEN, T.; OLSEN, S.; MØLBAK, L. Examination of equine glandular stomach lesions for bacteria, including *Helicobacter* spp. by fluorescence *in situ* hybridisation. *BMC Microbiol.* 19:10-84. 2010.
- [11] MACALLISTER, C.G.; ANDREWS, F.M.; DEEGAN, E.; RUOFF, W.; OLOVSON, S.G.A scoring system for gastric ulcers in the horse. *Equ. Vet. J.* 29(6):430-3.1997.
- [12] MOYAERT, H.; DECOSTERE, A.; VANDAMME, P.; DEBRUYNE, L.; MAST, J.; BAELE, M.; CEELEN, L.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from horse faeces. *Internat. J. System. Evolut. Microbiol.* 57(Pt 2):213-8. 2007.
- [13] ORTÍZ, J.; SANTACRUZ, J.J.; ÁLVAREZ, A.; REINOSA, E.C.; MEISSEL, E.; SALAZAR, F.; LÓPEZ, H.S. Estudio comparativo de dos pruebas rápidas de ureasa elaboradas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica de Pereira frente a una comercial para detección de *H. pylori* en biopsia gástrica. *Rev. Med. Risaralda.* 13(1): 1-9. 2007.
- [14] OWEN, R.J. *Helicobacter* - species classification and identification. *British Med. Bull.* 54(1): 17-30.1998.
- [15] RIEGELMAN, R.K.; HIRSCH, R.P. Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. Washington: Organización Panamericana de la Salud; Pp 123 – 124. 1992.
- [16] VALENZUELA, O.; LUZIO, Á. Detección de organismos espiroidales gástricos en estómago de potrillos clínicamente sanos. *Avan. Cien.Vet.* 19(1-2): 40-45. 2004.