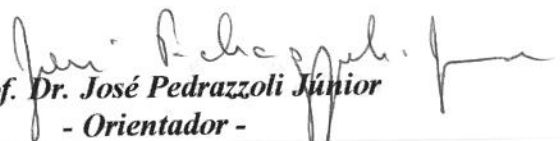


MARCO ANTÔNIO MAYA MARCHIORETTO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS ESQUEMAS
TERAPÊUTICOS PARA ERRADICAÇÃO DO *Helicobacter pylori*
UMA VISÃO SOBRE RESISTÊNCIA**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Médico Marco Antônio Maya Marchioretto.

Campinas, 16 de outubro de 2001.


Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
- Orientador -

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ PEDRAZZOLI JÚNIOR

CAMPINAS

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MARCO ANTÔNIO MAYA MARCHIORETTO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS ESQUEMAS
TERAPÊUTICOS PARA ERRADICAÇÃO DO *Helicobacter pylori*
UMA VISÃO SOBRE RESISTÊNCIA**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP)
para a obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ PEDRAZZOLI JÚNIOR

CAMPINAS

2001

UNIDADE B2
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M332a
V EX
TOMBO BCI 30546
PROC 16-837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 23/08/02
Nº CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM00172329-2

BIB ID 252393

M332a Marchioretto, Marco Antônio Maya
Avaliação da eficácia de dois esquemas terapêuticos para
erradicação do *Helicobacter pylori* uma visão sobre resistência/ Marco
Antônio Maya Marchioretto. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : José Pedrazzoli Júnior
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Úlcera Péptica. 2. Antibióticos. 3. Antibióticos – Resistência
em microorganismos. 4. Gastroenterologia. I. José Pedrazzoli Júnior.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Membros:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira

Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira

Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/10/01

200239182

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e a minha irmã (apesar de
fisicamente distante), pelo apoio
incondicional, amor e carinho,

dedico este trabalho.

Longo e árduo é o caminho que nos leva
do Inferno ao Paraíso.

Milton

A única maneira de se descobrir os limites do
possível está em aventurar-se um
pouquinho pelo impossível.

Arthur C. Clarke

AGRADECIMENTOS

Ao "Tio", meu orientador, pela oportunidade e apoio, e também por mostrar-me o que não se deve fazer em se tratando de pesquisa acadêmica.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Mendonça, pelas inúmeras conversas, conselhos e observações, e a toda sua equipe do laboratório de microbiologia, por todo o esforço despendido.

À Christina Ecclissato, pelo apoio e suor brutalmente empregados na realização deste trabalho.

À Maristela Deguer, por toda a energia e carinho.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Paraíso Ferraz, pelas aulas de sarcasmo e pelas sugestões sempre oportunas.

Aos Prof. Dr. Murilo R. Zeitune, Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira, Prof. Dr. Décio Chinzon e Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Mesquita, por terem aceitado a indicação para a minha banca de defesa, e pela leitura crítica desta dissertação.

Aos Prof. Dr. Antonio Frederico Magalhães e Prof^a. Dr^a. Mary Luci de Souza Queiroz, pelas sugestões apresentadas durante a fase de qualificação.

Ao Marcelo Ribeiro (Gustavo), pelas dicas e pelos momentos agradáveis na disputa pelo primeiro lugar no *Unreal Tournament*.

Aos funcionários da Farmacologia, pela orientação e ajuda com os entraves burocráticos.

Aos demais amigos e funcionários da UNIFAG – USF pela amizade.

A todos os pacientes que concordaram em participar deste trabalho, sem os quais nada seria possível.

À Tagliane, principal responsável pela tarefa mais ingrata de todas: a manutenção do equilíbrio imprescindível para a conclusão desta dissertação, além, é claro, de todo o apoio, o amor e carinho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Abreviaturas.....	xvii
Lista de Figuras e Tabelas.....	xx
Resumo.....	xxi
1. Introdução.....	23
1.1. Histórico.....	24
1.2. A Bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	25
1.2.1. Características Gerais.....	25
1.2.2. Virulência e Patogenicidade.....	26
1.2.3. Fisiologia Gástrica e <i>Helicobacter pylori</i>	30
1.2.4. Epidemiologia.....	33
1.2.5. Transmissão.....	35
1.2.6. Identificação.....	35
1.3. Resistência Bacteriana.....	38
1.3.1. Resistência Bacteriana e <i>Helicobacter pylori</i>	39
1.4. Medicamentos e <i>Helicobacter pylori</i>	42
1.5. Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos.....	45
1.5.1. Teste de Diluição em Ágar.....	46
1.5.2. Teste de Diluição em Meio Líquido.....	46
1.5.3. Teste de Difusão em Disco.....	46
1.5.4. Teste Epsilométrico (E-Test).....	47
1.6. Tratamento.....	47
2. Objetivos.....	53
3. Materiais e Métodos.....	55
3.1. Cepas Bacterianas.....	58
3.2. Determinação da Susceptibilidade Microbiana.....	58
3.3. Reagentes.....	59
3.4. Análise Estatística.....	59
3.5. Seguimento.....	60
4. Resultados.....	63
5. Discussão.....	73
6. Conclusões.....	79

7. Summary.....	81
8. Referências Bibliográficas.....	85
9. Anexos.....	103
Anexo 1 – Artigo aceito para publicação na revista <i>Helicobacter</i>.....	104
Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	129
Anexo 3 – Termo de Consentimento.....	131

AMO – amoxicilina

µg - micrograma

µl – microlitro

°C – grau Celsius

¹³C – isótopo 13 de carbono

¹⁴C – isótopo 14 de carbono

BHI – meio de cultura brain heart infusion

CagA – *cytotoxin-associated protein A*

cagA – gene codificador da *cytotoxin-associated protein A*

CBM – concentração bacteriana mínima

CCK – colecistocinina

CIM – concentração inibitória mínima

CLA – claritromicina

CLO – *Campylobacter-like organisms*

CO₂ – gás dióxido de carbono

D – dalton

DNA – ácido desoxirribonucléico

ECL – células êntero-cromafínicas

EHPG – Núcleo Europeu para o Estudo do *Helicobacter pylori*

ELISA – ensaio imunoenzimático

FUR – furazolidona

g – grama

G17 – forma de hormônio gastrina

GRP – peptídio liberador de gastrina

gyrA – gene codificador da DNA girase

gyrB - gene codificador da DNA girase

h – hora

H. pylori – *Helicobacter pylori*

H⁺, K⁺ - ATPase – enzima da bomba de prótons

H₂ – receptores de histamina

HCL – ácido clorídrico

HE – hematoxilina-eosina

Hsp – heat shock protein

IBP – inibidor da bomba de prótons

IC – intervalo de confiança

iceA – gene *induced by contact with epithelium*

IFN – interferon

IgA – imunoglobulina A

IgG – imunoglobulina G

IL – interleucina

l – litro

MACH – estudo multicêntrico: **Metronidazol**, **Amoxicilina**, **Claritromicina** e *Helicobacter pylori*

MALT – linfoma de baixo grau associado à mucosa

mg – miligrama

ml – mililitro

N.S. – não significativo

N² – gás nitrogênio

NIH – *National Institute of Health*

NPT – *near patient test*

O² – gás oxigênio

PAI – ilha de patogenicidade

PBS – *phosphate-buffered saline*

PCR – reação em cadeia da polimerase

RAPD – amplificação randomizada de DNA polimórfico

RNA – ácido ribonucleico

TET – tetraciclina

TNF – fator de necrose tumoral

TTC – cloreto de trifetil tetrazólio

UBT – teste respiratório da uréia

ufc – unidade formadora de colônia

USF – Universidade São Francisco

VacA – citotoxina de vacuolização (*vacuolating cytotoxin A*)

vacA – gene codificador da citotoxina de vacuolização

Figura 1 - Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA), tetraciclina (TET) e furazolidona (FUR) entre as amostras de <i>Helicobacter pylori</i> isoladas de todos os pacientes incluídos no estudo antes do tratamento.....	61
Figura 2 - Resistência primária e secundária do <i>H. pylori</i> aos antibióticos amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA), tetraciclina (TET) e furazolidona (FUR) de acordo com os grupos terapêuticos, em número de pacientes.....	69
Figura 3 - Efeito da resistência bacteriana à amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA), tetraciclina (TET) e furazolidona (FUR) nas taxas de erradicação (%) do <i>Helicobacter pylori</i> entre os pacientes do Grupo A e B.....	71
Tabela 1 - Principais mecanismos de resistência em bactérias.....	40
Tabela 2 - Alvos bacterianos das principais classes de antibióticos.....	44
Tabela 3 - Grupo A	57
Tabela 4 - Grupo B.....	57
Tabela 5 - Características dos pacientes.....	58
Tabela 6 - Efeitos colaterais.....	64
Tabela 7 - Efeito da terapia na erradicação do <i>Helicobacter pylori</i> e na cicatrização das lesões pépticas.....	65
Tabela 8 - Cicatrização das lesões pépticas nos pacientes do Grupo A onde não se observou a erradicação do <i>Helicobacter pylori</i>	66
Tabela 9 - Cicatrização das lesões pépticas nos pacientes do Grupo B onde não se observou a erradicação do <i>Helicobacter pylori</i>	66
Tabela 10 - Resistência primária total do <i>H. pylori</i>	67
Tabela 11 - Resistência primária e secundária do <i>H. pylori</i> aos antibióticos de acordo com os grupos terapêuticos.....	68
Tabela 12 - Efeito da terapia de erradicação de acordo com a resistência primária do <i>H. pylori</i> aos agentes antibióticos do Grupo A e Grupo B.....	70

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de dois esquemas comumente empregados para a erradicação do *Helicobacter pylori* e o impacto da resistência bacteriana nas taxas de erradicação.

Noventa e dois pacientes *Helicobacter pylori*-positivos com doença ulcerosa péptica ulcerosa, comprovada através de endoscopia digestiva alta, foram randomizados e receberam, durante sete dias um dos tratamentos: lansoprazol 30 mg, amoxicilina 1000 mg e claritromicina 500 mg (todos em duas tomadas diárias), ou subcitrato de bismuto 120 mg, tetraciclina 500 mg (ambos em quatro tomadas diárias) e furazolidona 200 mg (em duas tomadas diárias). A presença de *Helicobacter pylori* foi investigada trinta dias após o término da terapia medicamentosa, através de nova endoscopia digestiva alta.

Cinco pacientes de cada grupo de estudo não retornaram para o seguimento. Ambos os tratamentos resultaram em taxas similares de erradicação do *H. pylori*: 66%-60% (pelo protocolo) e 59%-52% (intenção de tratar) no grupo A e B, respectivamente. Entretanto, na ausência de resistência bacteriana à claritromicina ou amoxicilina, foi encontrada taxa de erradicação de 79%.

Pode-se concluir que, a resistência primária à claritromicina ou amoxicilina pode estar encobrindo um potencial, sério e não reconhecido problema na erradicação do *Helicobacter pylori*. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos tornam-se necessários para melhorar a eficácia terapêutica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

Há mais de 100 anos, sabe-se que uma bactéria com a forma espiralada está presente em estômagos de animais. A primeira descrição destes organismos em humanos foi feita no ano de 1906, através de estudos envolvendo pacientes com câncer gástrico, seguida pela demonstração de atividade da enzima urease no estômago em 1924. No ano de 1954, postulou-se que a presença da bactéria não passava de contaminação da mucosa gástrica, ocorrendo um certo descaso com as pesquisas e publicações nessa área, desde então. Após um hiato de 20 anos, foi constatada a presença de um microorganismo na superfície luminal das células do epitélio gástrico de pacientes com úlcera gástrica, e sugerido que fosse uma bactéria de conformação espiralada (AXON & QUINA, 1994; HEATLEY, 1995). No final do século passado, mais precisamente em 1983, uma das principais descobertas no campo da microbiologia gástrica (o isolamento do *Helicobacter pylori* através de biópsias gástricas de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica), foi publicada por Robin Warren e Barry Marshall (MARSHALL, 1983; WARREN, 1983). Dentre os motivos pelos quais essa redescoberta foi tardia, pode-se citar a dificuldade e lentidão do crescimento do *H. pylori in vitro* e a contaminação da cultura bacteriana por outros organismos (AXON & QUINA, 1994). A correlação entre a infecção pelo *Helicobacter pylori* e pacientes acometidos por gastrite crônica e úlcera péptica foi decisiva para que a referida bactéria assumisse, então, o importante papel de um agente etiológico na doença ulcerosa péptica (MARSHALL & WARREN, 1984).

Inicialmente denominado *Campylobacter* - like organisms (CLO), passou a *Campylobacter pyloridis*, e posteriormente atualizado em 1989 para *Helicobacter pylori* quando a caracterização bioquímica e genética do organismo mostrou ser o mesmo, diferente de outras espécies do gênero *Campylobacter* (GOODWIN, ARMSTRONG, CHILVERS, 1989; HEATLEY, 1995).

A infecção causada pelo *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica tem sido considerada como uma das mais comuns infecções crônicas bacterianas em seres humanos (GRAHAM, 2000). Existem estimativas de que a taxa da população mundial colonizada por este microorganismo seja superior a 50% e a importância deste fato reside na infecção estar intimamente associada à úlcera péptica, adenocarcinoma e linfoma gástrico, além de ser, reconhecidamente, um agente carcinogênico tipo I (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1994; AMERICAN DIGESTIVE HEALTH FOUNDATION, 1997).

1.2. A BACTÉRIA *Helicobacter pylori*

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

O *Helicobacter pylori* é um bacilo espiralado Gram negativo, de crescimento lento, microaerofílico (vive em ambiente com 5-6 % de O₂, 8-10% CO₂, 80-85% N₂). Possui flagelos, o que lhe permite uma grande mobilidade. Sua principal característica bioquímica é a abundante produção da enzima urease. Esta enzima tem um papel crucial na fase inicial de colonização do epitélio gastrointestinal e, por isso, tornou-se um importante marcador da presença do microorganismo, como no caso dos testes rápidos de urease, respiratórios e sorológicos (PETERSON & GRAHAM, 1998).

Outras proteínas produzidas por esta bactéria são a catalase, fosfolipase A2, protease, glicosulfatase, ATPase tipo P, hemolisina, aldeído desidrogenase, proteína inibitória da secreção de HCL, HspA, HspB e citotoxinas, todas elas podendo desempenhar um papel importante na patogênese das lesões gastroduodenais. A urease, todavia, é a mais característica e a melhor conhecida dessas substâncias. É uma enzima muito ativa, com níquel em sua estrutura, e composta por duas sub-unidades, com pesos moleculares de 66.000 D e 31.000 D (PAJARES, 1995; PETERSON & GRAHAM, 1998).

Uma característica do *Helicobacter pylori* que também desperta interesse diz respeito ao íon ferro, que é um importante elemento contribuinte para o crescimento e metabolismo bacteriano. Não existe consenso sobre a maneira como é feita a captação deste íon, sendo sugerido que o microorganismo, em situações de escassez do mesmo, utilize-se da lactoferrina humana, que possui ação na captação de íons ferro pela célula (MORAN & WADSTRÖM, 1994).

1.2.2. VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE

A sobrevivência do *H. pylori* pode ser atribuída ao desenvolvimento de características especializadas, sendo a mais importante delas a capacidade de colonizar a superfície do epitélio gástrico, abaixo da camada de muco (MCGOWAN, COVER, BLASER, 1996).

Os mecanismos patogênicos desta bactéria, em geral, favorecem os três passos de sua colonização da mucosa gastroduodenal: penetração, ajuste ao meio e aderência. Para a penetração, sua forma em espiral com múltiplos flagelos lhe proporciona grande motilidade. Algumas enzimas e proteínas favorecem seu ajuste ao meio, como a urease e a catalase. O mecanismo pelo qual a urease danifica a mucosa gástrica permanece controverso, sendo a hipótese mais aceita a de que essa enzima hidrolisa a uréia da mucosa gástrica, transformando-a em dióxido de carbono e amônia, a qual tampona a acidez gástrica, otimizando o pH do nicho gástrico à bactéria. A catalase age protegendo a bactéria contra os efeitos danosos dos metabólitos do peróxido de oxigênio produzidos pelos neutrófilos. Isso permite que a bactéria sobreviva na superfície da mucosa gástrica inflamada. A proteína inibidora da secreção de ácido gástrico não é diretamente tóxica ao epitélio gástrico. Inibindo a secreção ácida, favorece a infecção aguda, com a colonização seletiva das células parietais, explicação válida para a transitória hipocloridria que ocorre na infecção aguda pelo *H. pylori* (PAJARES, 1995; MCGOWAN, COVER, BLASER, 1996). O terceiro passo para a colonização,

a adesão às células alvo, é o evento chave na patogênese de qualquer infecção bacteriana (BEACHEY, 1981). Estudos *in vivo*, através de técnicas de microscopia eletrônica, mostraram que a aderência envolve a justaposição das membranas das células bacterianas e da mucosa gástrica, formando pedestais entre elas, semelhante ao que ocorre com a *Escherichia coli* enteropatogênica no intestino (HEATLEY, 1995; PAJARES, 1995). Alguns receptores epiteliais foram identificados como facilitadores da aderência do *H. pylori* à célula gástrica, sendo os antígenos Lewis^b do grupo sanguíneo "O" mediadores da aderência (LINGWOOD, WOODS, KRIVAN, 1991; MALFERTHEINER & HALTER, 1994).

A sequência genômica da bactéria *Helicobacter pylori* foi publicada em 1997 (TOMB *et al.*, 1997). Este organismo é relativamente simples, com cerca de 1,7 milhão de nucleotídeos (dependendo da linhagem), os quais representam aproximadamente 1600 genes, segundo DORREL & WREN (1998). Destes, 55% são encontrados em outros organismos, porém 45% são considerados exclusivos do *H. pylori*. Mutações nos nucleotídeos fornecem as diferenças entre as linhagens e afetam o comportamento do organismo favorecendo ou não a seleção, como no caso da resistência a antimicrobianos. Existe, entretanto, outro modo de se mudar a constituição genética de um organismo. Certas bactérias são capazes de transmitir segmentos de DNA para uma linhagem diferente da sua ou até mesmo para espécies diferentes. Estas pequenas porções de DNA podem permanecer separadas do DNA cromossômico, na forma de plasmídios, ou ser incorporadas ao cromossomo. Se esta sequência codifica uma série de fatores de virulência, ela pode ser considerada uma ilha de patogenicidade (PAI). Caso este trecho de DNA forneça uma vantagem para a sobrevivência do organismo, ele pode tornar-se parte do genoma de uma nova linhagem. A virulência do *H. pylori* e sua habilidade em danificar o epitélio do hospedeiro parece depender tanto da natureza de seu cromossomo, em particular do segmento que codifica a toxina vacuolizante, quanto também do DNA estrangeiro inserido dentro do cromossomo – a ilha de patogenicidade associada a citotoxina (cagPAI) (ATHERTON *et al.*, 1995; MARSHALL *et al.*, 1998).

A heterogeneidade na virulência das cepas de *H. pylori* pode ser uma das principais razões pelas quais apenas uma minoria dos pacientes infectados desenvolvem doença ulcerosa péptica (BLASER, 1995). Dentre os fatores de virulência conhecidos por diferir entre as cepas bacterianas, citam-se a estrutura lipopolissacarídea, a proteína de ativação dos neutrófilos e também a Hsp (heat shock protein), e principalmente a citotoxina de vacuolização VacA, uma proteína de peso molecular de 140.000 D, que é processada para uma toxina madura de 90.000 D, codificada pelo gene *vacA*. O gene *vacA* foi caracterizado, e possui duas famílias de alelos estruturais (m1, m2) e três famílias de alelos da sequência sinal (s1a, s1b, s2). Todas as linhagens s2m2 (não existem linhagens s2m1) são produtoras não-tóxicas apesar de *cagA*. Acima de 80% das linhagens s1m1 são produtoras tóxicas, enquanto as linhagens s1m2 estão em torno de 30%. Estudos preliminares sugerem que pacientes com úlcera péptica possuam mais linhagens de *H. pylori* s1 do que do tipo s2 (ATHERTON *et al.*, 1995; BLASER, 1996).

Outra citotoxina associada com a citotoxina de vacuolização é a CagA (*cytotoxin-associated protein A*). Esta proteína altamente antigênica, de aproximadamente 120.000 D, é codificada pelo gene *cagA*. É interessante observar que, embora a maioria das cepas de *H. pylori* possua o gene *vacA*, apenas 50-60% de todas as cepas induzem a vacuolização em células eucarióticas. Em contrapartida, o gene *cagA* está presente em cerca de 60% de todas as cepas de *H. pylori*, e a maioria delas expressa CagA (LEUNK *et al.*, 1988; TELFORD *et al.*, 1994; BLASER, 1996; PETERSON & GRAHAM, 1998; TAKATA, *et al.*, 1998).

Há evidências de que dois genes, *picA* e *picB*, distintos do *cagA*, são exclusivamente encontrados em cepas de *H. pylori* possuidoras do *cagA*, os quais estão envolvidos na indução de interleucina-8 nas células epiteliais gástricas, facilitando a resposta inflamatória (TUMMURU, SHARMA, BLASER, 1995). Em contraste com os avanços das pesquisas *in vitro* e em modelos animais, o papel da patogênese do CagA e/ou VacA na gênese da úlcera nos seres humanos permanece obscuro. Um estudo investigando a interrelação entre *cagA* e *vacA* e

doenças relacionadas ao *H. pylori* mostrou que apenas as cepas *cagA* podem estar associadas com doença ulcerosa péptica, sendo essa infecção um fator de risco para o adenocarcinoma gástrico (BLASER *et al.*, 1995; WEEL *et al.*, 1996). Um outro gene, denominado *iceA*, pode também estar associado com doença ulcerosa péptica (PEEK *et al.*, 1996; PEEK *et al.*, 1998).

A mucosa gástrica protege a si mesma contra as contínuas agressões causadas pelos alimentos e outros agentes, incluindo invasão bacteriana, de várias formas: a zona de muco-bicarbonato, a membrana da célula do epitélio gástrico e o fluxo sangüíneo da mucosa. A barreira mucosa é a primeira defesa contra qualquer agressão luminal, agindo como uma verdadeira barreira física entre o lúmen do estômago e as células do epitélio gástrico, sendo permeável para pequenas moléculas e íons, e agindo como um obstáculo difusional para substâncias com peso molecular mais elevado, como a pepsina, por exemplo. A diminuição da integridade da barreira mucosa está entre os danos diretos causados pelo *H. pylori*, integridade esta mantida através do equilíbrio dinâmico entre a síntese, secreção e degradação de seus componentes. Em muitas doenças gástricas, mudanças na superfície mucosa têm sido demonstradas e explicadas pela atividade elevada da pepsina. Ensaios *in vitro* demonstraram que a bactéria produz protease e lipase que degradam as glicoproteínas e lipídios do gel mucoso. Conseqüentemente, a degradação dos níveis profundos do gel mucoso diminui sua espessura e modifica as características físico-químicas da zona mista de ácido e bicarbonato necessária para a dissipação do ácido luminal. Como resultado, a integridade da camada de muco, agredida pelo ácido e pepsina na face luminal e pelo *H. pylori* na superfície mucosa, pode facilmente tornar-se danificada tanto pelo conteúdo luminal quanto pelas mudanças inflamatórias. A diminuição da integridade mucosa predispõe à injúria submucosa, incluindo a formação de úlcera. Uma vez invadida a camada mucosa pelo *H. pylori* e colonizada as células gástricas, as células da resposta inflamatória, neutrófilos, monócitos e macrófagos, são ativadas. Outros mediadores inflamatórios podem ser induzidos pela fosfolipase A, produzida pela bactéria, a qual degrada a

membrana fosfolipídica das células, resultando na formação de ácido aracdônico, o qual pode ser convertido em leucotrieno, prostaglandina e tromboxano. Estes componentes, que favorecem a quimiotaxia, podem alterar a permeabilidade da membrana e são citotóxicos para as células da mucosa gástrica. O fator de ativação plaquetária parece ser mais um mediador inflamatório da mucosa gástrica de pacientes infectados pelo *H. pylori*, assim como o infiltrado e a degranulação eosinofílica (PAJARES, 1995; ALLEN *et al.*, 1997).

Também como consequência da reação do hospedeiro, são os eventos imunes. No que concerne à resposta humoral, está demonstrado que os anticorpos envolvidos são, principalmente, pertencentes à classe das imunoglobulinas, mais especificamente IgG e IgA. A presença de uma IgG específica, correlacionada com a presença do *H. pylori*, fornece a base para testes sorológicos diagnósticos (PAJARES, 1995). Alguns achados sugerem resposta celular à infecção pelo *H. pylori*, como o aumento da expressão de antígenos HLA classe II no epitélio gástrico (SCHEYNIUS & ENGSTRAND, 1991). Além disso, supõe-se que a expressão de antígenos classe II seja mediada por citocinas. É aceito que os lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas estimulam a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Na gastrite crônica ativa, associada ao *H. pylori*, o TNF- α e a IL-6 podem ser derivados dos macrófagos ou das células T (PAJARES, 1995).

1.2.3. FISIOLÓGIA GÁSTRICA E *Helicobacter pylori*

Embora a infecção pelo *H. pylori* seja geralmente assintomática, este organismo não é um comensal, e é considerado um patógeno humano (PENSTON, 1996). A enfermidade primária associada com este microrganismo é a gastrite crônica ativa, que ocorre em praticamente todos os infectados (DOOLEY *et al.*, 1989). Em muitos destes indivíduos esta gastrite leva a complicações secundárias. Cerca de 50% continuará com gastrite sem atrofia, os outros

eventualmente evoluirão com atrofia, uma condição que muitas vezes é acompanhada por metaplasia intestinal. Em aproximadamente 15% uma úlcera péptica desenvolver-se-á (KUIPERS *et al.*, 1995), sendo que a doença ulcerosa duodenal afeta predominantemente indivíduos sem metaplasia, enquanto que a doença ulcerosa gástrica ocorre predominantemente nos portadores de metaplasia. Um número relativamente pequeno de infectados desenvolverá neoplasia gástrica, enquanto que alguns poderão desenvolver linfoma gástrico (KUIPERS, 1997).

O baixo pH gástrico é mantido por uma enzima, a H^+ , K^+ -ATPase (bomba protônica) localizada na membrana apical e nas vesículas que margeiam os canalículos secretores das células parietais. Esta enzima é o passo final comum para a secreção ácida, que resulta de uma série de estímulos que ativam receptores colinérgicos, histamínicos e gastrinérgicos (CLISSOLD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986).

A bactéria *H. pylori* é capaz de induzir hipocloridria transitória na infecção aguda e hipergastrinemia persistente na infecção crônica, todavia os mecanismos precisos envolvidos nestas alterações da fisiologia do hospedeiro não foram totalmente elucidados (MCGOWAN, COVER, BLASER, 1996).

A gastrina é um hormônio produzido pelas células G localizadas no antro gástrico, e que age via circulação sangüínea, estimulando a secreção ácida pelas células parietais. Isso ocorre diretamente e também através da histamina, liberada pelas células êntero-cromafínicas adjacentes (CALAM *et al.*, 1997). A infecção pelo *H. pylori* está associada a um aumento exagerado na concentração sérica da gastrina, mais especificamente da gastrina G17, que é a forma do hormônio produzida primariamente na mucosa antral em resposta ao estímulo alimentar. Uma das hipóteses desta hipergastrinemia, é a da liberação, pelo *H. pylori*, de certas substâncias que alteram a função das células G, ou que a inflamação por ele causada estimule a hipersecreção de gastrina (MCCOLL & DELTENRE, 1994; MCGOWAN, COVER, BLASER, 1996). Já a somatostatina, produzida pelas

células D presentes no antro e corpo gástrico, é um inibidor da produção de gastrina e secreção ácida. Alguns fatores que estimulam a produção de somatostatina incluem: secreção ácida luminal, jejum, peptídio liberador de gastrina (GRP) e alguns peptídios intestinais, como a colecistocinina (CCK). A liberação de somatostatina está diminuída na infecção da mucosa pelo *H. pylori* (CALAM *et al.*, 1997).

Mediadores inflamatórios, encontrados na gastrite pelo *H. pylori*, podem ser os responsáveis pela secreção aumentada de gastrina. A infecção aumenta a expressão de várias citocinas, incluindo as interleucinas (IL) 1 β , 6 e 8, fator de necrose tumoral (TNF) α , interferon gama (IFN- γ) e fator de ativação plaquetária (PAF) (BLASER, 1992).

A histamina, produzida pelas células êntero-cromafínicas (ECL) gástricas, estimula a produção ácida através dos receptores H₂ das células parietais. A gastrina estimula a produção ácida pela estimulação das células ECL e também pelo efeito direto nas células parietais. A concentração mucosa de histamina está diminuída na gastrite induzida pelo *H. pylori* (CALAM *et al.*, 1997).

O *H. pylori* é reconhecido como sendo a maior causa de gastrite atrófica, a qual é definida como a perda de células especializadas da mucosa gástrica, incluindo as células parietais. Desta maneira, a infecção pode diminuir a secreção ácida através de mudanças na histologia gástrica, independente da fisiologia das células parietais. (KUIPERS *et al.*, 1995; CALAM *et al.*, 1997).

A gastrite crônica superficial, que progride para gastrite atrófica com diminuição progressiva da secreção ácida, causa diminuição da prevalência da infecção pelo *H. pylori*, assim como diminuição de sua densidade de colonização no estômago. Estas observações sugerem que o desenvolvimento de hipocloridria ou mudanças no muco e na superfície epitelial, resultando em atrofia sejam desfavoráveis para a persistência do *H. pylori*. Outra hipótese é de que a diminuição da secreção ácida permite o crescimento de outras bactérias, levando

a uma competição com o *H. pylori* pelo nicho ecológico (BLASER, 1992; MCGOWAN, COVER, BLASER, 1996).

1.2.4. EPIDEMIOLOGIA

As diferenças epidemiológicas podem influenciar no resultado final da infecção pelo *H. pylori*. Crianças infectadas apresentam um risco aumentado para desenvolver úlcera gástrica e câncer gástrico, enquanto que a infecção ocorrida nos anos iniciais da vida adulta, parece estar associada com o desenvolvimento de úlcera duodenal (HANSSON *et al.*, 1996; PARSONNET, 1996).

A prevalência da infecção pelo *H. pylori* aumenta com a idade em todas as populações estudadas, embora haja considerável diferença, particularmente nos primeiros anos de vida e entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (TAYLOR & BLASER, 1991). No mundo desenvolvido, a infecção é relativamente rara entre as crianças, e é adquirida em uma taxa constante de, aproximadamente, 0,5-2,0% ao ano, alcançando a prevalência de 20-40% na população adulta. Nos países em desenvolvimento, o *H. pylori* é adquirido rapidamente durante a primeira infância, encontrando-se taxas de 70-90% de infecção na população com mais de 20 anos de idade (VAN DER MEER *et al.*, 1992; ROLLAN *et al.*, 2000). A alta prevalência da infecção, que aumenta com a idade, pode ser relacionada ao efeito cohort, onde a maioria das pessoas foi infectada na infância, quando as condições sócio-econômicas e de saneamento básico eram piores. Este grupo de pessoas infectadas mudou de faixa etária com o passar do tempo, e as gerações mais jovens são infectadas muito menos freqüentemente (HEATLEY, 1995; VAN DER ENDE *et al.*, 1997). Nos países desenvolvidos, associada a fatores genéticos e ambientais, a prevalência também está relacionada à grupos étnicos e status sócio-econômico (PETERSON & GRAHAM, 1998).

As variáveis mais importantes no aumento da prevalência são: baixas condições sócio-econômicas, sanitárias e de moradia, além de consumo de água não tratada e presença de crianças na família. Estas condições são, ordinariamente, encontradas em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, resultando na alta prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori* (DRUMM *et al.*, 1990; GRAHAM *et al.*, 1991a; KLIEN *et al.*, 1991; MALATY *et al.*, 1991; SITAS *et al.*, 1991; MENDALL *et al.*, 1992; MITCHELL *et al.*, 1992; ECCLISSATO *et al.*, 1999).

Alguns conceitos tornam-se importantes para um melhor entendimento da infecção pelo *H. pylori*. Define-se como reinfecção uma nova infecção ocorrida após tratamento bem sucedido para a erradicação, sendo esta última definida como a ausência da bactéria um mês ou mais após o término da terapia medicamentosa. Já recrudescência, significa reaparecimento da cepa bacteriana idêntica à inicial pré-tratamento. Não se pode descartar completamente, apesar de pequena, a possibilidade de ocorrer reinfecção por uma cepa semelhante à inicial pré-tratamento. A reinfecção e a recrudescência podem ser distinguidas através da análise do padrão dos *fingerprints* de DNA obtidos da bactéria encontrada no pré e pós tratamento. Esses *fingerprints* de DNA, são obtidos pela digestão com enzimas de restrição ou amplificação randomizada de DNA polimórfico (RAPD) com a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA cromossômico das bactérias isoladas. Entretanto, os resultados da análise dos *fingerprints* do DNA bacteriano devem ser interpretados com cuidado, pois os pacientes podem estar infectados com uma população heterogênea de *H. pylori* (VAN DER ENDE, 1997). Devido à alta incidência da infecção, superpopulação e baixas condições de higiene, é comumente aceito que as taxas de re-infecção após o tratamento sejam altas nos países em desenvolvimento, aproximando-se de 100% segundo alguns autores, porém a escassez de dados torna difícil uma conclusão definitiva (COELHO *et al.*, 1992; SACK & GYR, 1993; PARSONNET, 1995; GUISET *et al.*, 1997).

1.2.5. TRANSMISSÃO

A maneira como o *H. pylori* é transmitido permanece duvidosa. Há evidências de que seja via oral - oral e fecal - oral, essa última mais comum em crianças, principalmente em países em desenvolvimento. Esse microorganismo sobrevive por um determinado período no suco gástrico, transformando o vômito numa forma evidente de propagação (THOMAS & PRETOLANI, 1994; HEATLEY, 1995). Pode ser transmitido diretamente, através de endoscópios e pinças endoscópicas, ou sondas gástricas, caso não estejam devidamente esterilizadas (KATOH *et al.*, 1993). O microorganismo está restrito à mucosa gástrica humana e de alguns primatas, podendo ser encontrado em outros locais, como o esôfago com mucosa de Barrett; metaplasia gástrica no duodeno e em ectopias de mucosa gástrica, como o divertículo de Meckel. Isso demonstra a adaptação altamente especializada ao nicho ecológico ácido. Há afirmações de que pode ser encontrado na placa dental e nas fezes. (THOMAS & PRETOLANI, 1994; HEATLEY, 1995; PAJARES, 1995). Existem controvérsias sobre a possibilidade de animais serem reservatórios naturais do *Helicobacter pylori* (VAN DER ENDE *et al.*, 1997). As fontes de água parecem ser um meio importante de transmissão, particularmente nos países em desenvolvimento, onde não há tratamento adequado de esgoto, favorecendo a contaminação pelas fezes (HEATLEY, 1995).

1.2.6. IDENTIFICAÇÃO

Existem inúmeros métodos para se identificar o *Helicobacter pylori*, os quais podem ser divididos entre métodos endoscópicos e não endoscópicos. Geralmente, as técnicas endoscópicas envolvem a aquisição de biópsias gástricas e duodenais através de pinças de biópsia. O material assim obtido é analisado, com a finalidade de se verificar a presença de organismos, diretamente através da cultura ou histologia, ou indiretamente, pela presença de atividade da urease. Através da endoscopia, também se pode observar lesões *in loco* sugestivas da

presença da bactéria, como úlceras duodenais, úlceras gástricas e nodularidade antral (COHEN & LAINE, 1997).

Embora a técnica histológica não seja livre de falhas, a especificidade e a sensibilidade são altas, em torno de 95%. Além da identificação da bactéria, possibilita avaliar o tipo e a intensidade da inflamação da mucosa gástrica, a presença ou não de atrofia, metaplasia, displasia, eventual neoplasia e a classificação correta da gastrite. As colorações mais utilizadas são a hematoxilina-eosina (HE), Giemsa, carbol-fucsina e as colorações pela prata (Warthin-Starry). Na maioria dos casos, a coloração HE é suficiente, porém nos casos duvidosos, deve-se empregar a coloração de Giemsa. A cultura do *H. pylori* é demorada, requerendo cerca de 7 dias para o crescimento da bactéria. Além disso, depende de diversos fatores, como obtenção adequada das amostras, estocagem, transporte das amostras até o laboratório de microbiologia, e da própria técnica de cultura, porém é considerada "gold-standart", pois permite a identificação da bactéria, e a possibilidade de se determinar a resistência bacteriana aos compostos antibióticos. O CLOtest (Delta West Ltd, Perth), foi o primeiro dos testes rápidos da urease, desenvolvido por Marshall, e consiste num gel de ágar contendo vermelho fenol e uréia. Na presença da urease, a uréia é hidrolizada, causando uma elevação do pH, e conseqüente mudança da coloração do indicador de pH (vermelho fenol). A especificidade deste método é excelente (95 a 100%), porém se a leitura for realizada após muitas horas, resultados falso positivos podem ser encontrados. Outras vantagens são o baixo custo, a simplicidade e rapidez dos resultados. É considerado método de escolha para o diagnóstico do *H. pylori*. (COHEN & LAINE, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2000).

Os métodos não endoscópicos possuem a vantagem de ser menos custosos e mais convenientes para os pacientes. As duas principais técnicas são: teste respiratório da uréia (UBT) e o teste sorológico para detecção de anticorpos. O princípio do UBT é simples, e consiste em se oferecer uma dieta que retarde o esvaziamento gástrico (dieta rica em gordura) a pacientes previamente em jejum, seguido por uma solução de uréia marcada isotopicamente com ^{13}C ou ^{14}C . O ar

expirado é coletado para posterior análise. Caso o *H. pylori* esteja presente, sua enzima urease catalisará a hidrólise da uréia, e o dióxido de carbono será absorvido pela corrente sangüínea. A molécula de gás com o isótopo marcado, será detectada no ar expirado. Essa técnica tem provado ser muito acurada, até mais que os testes baseados na obtenção de biópsias endoscópicas. Resultados falso-positivos podem ser devido à hidrólise da uréia por bactérias da cavidade oral. Nos casos em que se deve aferir o sucesso da terapia, porém sem a necessidade de uma nova endoscopia, como por exemplo, nas úlceras duodenais, o UBT é o melhor teste (HEATLEY, 1995; ATHERTON, 1997).

Testes para se identificar os anticorpos originados pela resposta à infecção pelo *H. pylori* têm sido desenvolvidos. Geralmente são realizados através da técnica de ELISA (ensaio imunoenzimático) ou látex-aglutinação. Tais testes utilizam-se de soro, embora a detecção de IgG na urina tem sido possível. A detecção de IgA na saliva é menos sensível (ALEMOHAMMAD, FOLEY, COHEN, 1993; LUZZA *et al.*, 1995; WESTON, CAMPBELL, BARTHOLOMEW, 1995; ATHERTON, 1997). O grande problema com esses testes, é que as respostas às proteínas antigênicas do *H. pylori* variam consideravelmente entre indivíduos, e nenhum antígeno em particular é reconhecido no soro de todos os pacientes. Dessa maneira, as preparações com antígenos utilizadas devem conter múltiplos antígenos, os quais diferem também entre países, tornando os testes específicos para uma determinada população (MARCHILDON *et al.*, 1996; ATHERTON, 1997).

Os NPTs, ou "near patient tests", são testes para detecção de anticorpos que podem ser realizados até num consultório médico, oferecendo resultados em poucos minutos. São baseados na aglutinação pelo látex ou na fase sólida do ELISA, e apresentam enorme variabilidade em seus resultados. A vantagem é o baixo custo do método. Outros testes sorológicos estão sendo desenvolvidos, inclusive para a detecção de cepas *cagA* ou *vacA* (ATHERTON, 1997).

A amplificação do DNA do *H. pylori* nas fezes através da reação em cadeia da polimerase (PCR) é possível, porém tem-se provado difícil. Testes urinários com isótopos são factíveis, também (PATHAC *et al.*, 1994; VAN ZWET *et al.*, 1994; ATHERTON, 1997).

1.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA

O estudo da resistência bacteriana aos antimicrobianos mais utilizados em cada região é de fundamental importância na previsão da probabilidade de sucesso do tratamento terapêutico com um determinado agente antimicrobiano. Para isso, a concentração inibitória mínima (CIM) é a ferramenta mais utilizada, e é definida como a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento da bactéria. A concentração bactericida mínima (CBM), isto é, a menor concentração de antibiótico capaz matar mais de 99,9% das bactérias, também pode ser utilizada em algumas situações (MÉGRAUD, 1997).

Duas definições de resistência bacteriana foram propostas pela Organização Mundial de Saúde em 1961. A primeira é uma definição essencialmente bacteriológica, onde uma linhagem é considerada resistente quando a concentração de antimicrobiano tolerada é significativamente maior que a concentração inibitória de crescimento de outras linhagens da mesma espécie. A definição se baseia no fato de linhagens da mesma espécie não serem homogêneas pois algumas podem possuir mecanismos especiais de resistência. Esta ocorrência é comum em alguns casos: por exemplo, em uma distribuição bimodal de CIM ou em uma distribuição multimodal, quando muitos mecanismos de resistência coexistem. A segunda definição é farmacológica, onde uma linhagem é considerada resistente quando a concentração de antimicrobiano tolerada é maior que a concentração encontrada *in vivo* no local da infecção. Em termos práticos, porém, como a concentração no local da infecção geralmente não é conhecida, é considerada a concentração do antimicrobiano encontrada no soro.

Como última consideração, pode-se também utilizar uma definição clínica para resistência, onde uma linhagem será considerada resistente quando a probabilidade de erradicação frente a um determinado tratamento for relativamente baixa (MÉGRAUD, 1997).

No caso da resistência natural ou intrínseca (também conhecida por primária), o suporte genético da resistência é sempre cromossômico e o composto antibacteriano nunca deve ser utilizado para o tratamento da bactéria em particular. Espécies bacterianas que são normalmente suscetíveis podem tornar-se resistentes a um determinado antibiótico. Isto é conhecido como resistência adquirida ou secundária, e pode acontecer por dois mecanismos genéticos diferentes: mutação cromossômica ou aquisição de DNA exógeno, principalmente plasmídios (MÉGRAUD, 1997).

1.3.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA E *Helicobacter pylori*

O mecanismo genético essencial de resistência bacteriana do *Helicobacter pylori* parece ser o da mutação cromossômica. Mutações pontuais têm sido encontradas para resistência a macrolídeos e fluoroquinolonas, enquanto plasmídios, apesar da sua presença na maior parte das linhagens de *H. pylori*, aparentemente não estejam envolvidos. Entretanto, a possibilidade de obtenção de DNA exógeno e, portanto, de genes mutados, existe (MÉGRAUD, 1997).

A resistência a uma certa classe de antibióticos pode envolver diferentes mecanismos e pode ocorrer com todas as linhagens de uma determinada espécie bacteriana. Ao nível bioquímico existem quatro mecanismos principais de resistência a agentes antimicrobianos (Tabela 1) (MÉGRAUD, 1997).

Tabela 1. Principais mecanismos de resistência em bactérias

Mecanismo	Antibióticos afetados
Perda da penetração	Pode afetar todos os antibióticos
Modificação do alvo	Macrolídeos Fluoroquinolonas Aminoglicosídeos Betalactâmicos Rifamicinas Tetraciclina
Inativação enzimática do antibiótico	Betalactâmicos Aminoglicosídeos
Efluxo ativo do medicamento	Tetraciclina

(MÉGRAUD, 1997)

A perda da penetração do agente antimicrobiano parece ocorrer com todos eles, porém, o nível de resistência é normalmente baixo, e pode ser superado pelo aumento da dosagem. Inativação enzimática dos antibióticos ocorrem principalmente com os betalactâmicos e aminoglicosídeos. Por exemplo, certas bactérias podem produzir enzimas extracelulares que são capazes de hidrolisar o anel betalactâmico de diferentes compostos antes da molécula penetrar na célula bacteriana (MÉGRAUD, 1997).

Existe diversidade na resistência bacteriana aos diferentes agentes antimicrobianos. Exemplificando, a resistência à amoxicilina e à tetraciclina tem sido reportada, porém é de rara ocorrência (GRAHAM, 2000)

Entre os macrolídeos, a claritromicina é amplamente utilizada devido a sua baixa CIM para *H. pylori*, enquanto a eritromicina tem sido utilizada apenas em alguns ensaios. A frequência de resistência aos macrolídeos apresenta variação

entre diferentes regiões e parece haver uma relação quanto a sua utilização no passado, principalmente no tratamento de infecções do trato respiratório. Apesar dos macrolídeos atuarem através da ligação com o ribossomo, não existem evidências de participação das proteínas ribossômicas no mecanismo de resistência em isolados clínicos. Dados recentes sugerem que um fenômeno de mutação pontual no gene do RNA 23s seja realmente o componente mais significativo de resistência a macrolídeos (WEISBLUM, 1995; GRAHAM, 2000).

Existem dois compostos nitroimidazóis usados no tratamento de *H. pylori*: o metronidazol e o tinidazol. Uma diferença significativa têm sido encontrada nas taxas de resistência aos nitroimidazóis nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. As diferenças devem estar relacionadas ao seu uso generalizado. Nos países desenvolvidos, a taxa de resistência varia de 10 a 50% como apresentado num estudo europeu em 1991. A causa dessa resistência deve estar relacionada à utilização destes compostos para o tratamento de infecções urogenitais e, de fato, linhagens isoladas de mulheres apresentam maior resistência que aquelas isoladas de homens. Nos países em desenvolvimento as taxas de resistência encontradas tem sido da ordem de 80 a 90% (GLUPCZYNSKI, 1992; MÉGRAUD, 1998a). A experiência clínica mostra que a resistência observada *in vitro* muitas vezes não se correlaciona com a observada *in vivo*, sendo o mecanismo exato de resistência ainda não bem conhecido. Todavia, estudos têm demonstrado que a resistência ao metronidazol "*in vitro*" pode desaparecer quando as linhagens resistentes são incubadas em anaerobiose por algumas horas antes do crescimento. A ativação de uma via metabólica de anaerobiose que não funciona bem em condições de microaerofilia pode ser a causa, e explicaria a aparente instabilidade da resistência. Também têm sido relatadas mutações em genes que interferem na produção de enzimas relacionadas à ativação do composto nitroimidazólico (CEDERBRANT, KAHLMETER, LJUNGH, 1992; SMITH & EDWARDS, 1995; VAN ZWET, THIJIS, GRAAF, 1995; GRAHAM, 2000; KWON *et al.*, 2001).

As fluoroquinolonas têm sido usadas, principalmente, no tratamento de

infecções severas em hospitais e não na comunidade, como no caso dos macrolídeos. Devido a isso, a taxa de seleção de mutantes resistentes parece ser mais baixa que para o metronidazol ou qualquer outro macrolídeo (HAAS, NIX, SCHENTAG, 1990). Observou-se uma alta taxa de resistência secundária quando as fluoroquinolonas foram utilizadas como único agente antimicrobiano contra *H. pylori* (CEDERBRANT, KAHLMETER, LJUNGH, 1993).

Não tem sido reportada resistência à furazolidona, um composto da classe dos nitrofuranos, a qual tem sido utilizada, empiricamente, no tratamento da doença ulcerosa péptica por mais de 20 anos. O mecanismo de resistência aos nitrofuranos parece envolver mutações, semelhante ao que ocorre com os compostos nitroimidazólicos (HAAS, NIX, SCHENTAG, 1990; ZHENG & WANG, 1992; KWON *et al.*, 2001).

Às vezes, a bactéria adquire a forma cocóide espontaneamente *in vivo*, ou *in vitro* quando em cultura prolongada. Em ambos os casos, indica um estado de latência, reversível, propiciando ao organismo sobreviver em locais com condições desfavoráveis para seu crescimento. O estado cocóide do *H. pylori* pode ser uma das causas de sua resistência às substâncias antibacterianas (PAJARES, 1995).

1.4. MEDICAMENTOS E *Helicobacter pylori*

A bactéria *Helicobacter pylori* tem mostrado alta susceptibilidade (CIM₉₀ ≤ 1 mg/l) à maioria dos agentes antibióticos, exceção feita ao ácido nalidíxico, vancomicina, trimetoprim e sulfonamidas (TYTGAT & NOACH, 1993).

A parede celular é um envelope encontrado exclusivamente em bactérias, sendo um importante alvo para a classe de antibióticos betalactâmicos (Tabela 2). Destes, a amoxicilina tem sido utilizada quase que exclusivamente para se tratar infecções por *H. pylori*, possivelmente devido a sua CIM (CIM₉₀ em torno de 0,06

mg/ml). O mecanismo de ação dos betalactâmicos é bem conhecido. Eles possuem a habilidade de se ligar irreversivelmente com a transpeptidase, uma das 15 enzimas envolvidas na síntese da parede celular. Isto é possível devido a analogia estrutural entre o anel betalactâmico e o dipeptídeo D alanil-D alanina normalmente transportado e incorporado em peptidoglicano, o principal componente da parede celular. Em consequência, ocorre a formação de parede celular defeituosa com o surgimento de formas anormais de bactéria, levando finalmente a morte celular (MÉGRAUD, 1997).

O ribossomo é também um importante alvo da ação dos agentes antibióticos. Compostos que atuam no ribossomo devem penetrar na célula bacteriana para serem efetivos. Eles normalmente possuem uma região hidrofóbica que promove sua entrada por difusão através da membrana lipídica. Este não é o caso dos aminoglicosídeos, que são altamente polares e requerem lesão na membrana como um pré-requisito para a sua penetração. Uma vez nas células, os grupos catiônicos e os anéis destes compostos promovem uma interação com o RNA ribossômico. A ligação ao ribossomo influencia a flexibilidade conformacional, bloqueando a síntese protéica pela inibição da elongação da cadeia polipeptídica emergente. Atualmente, os únicos antibióticos utilizados contra o *H. pylori* que agem em ribossomos são a tetraciclina e certos macrolídeos com CIMs baixas, como a claritromicina (MÉGRAUD, 1997).

Tabela 2. Alvos bacterianos das principais classes de antibióticos

Alvo	Classe	Ação
Parede celular	Betalactâmicos Glicopeptídeos	Inibem a síntese de peptidoglicano
Membrana citoplasmática	Polipeptídios	Ação detergente
Ribossomo	Aminoglicosídeos Macrolídeos Tetraciclina Cloranfenicol	Inibem a síntese protéica
DNA	Fluoroquinolonas Rifamicinas Nitrofuranos Nitroimidazóis	Inibem a DNA girase Inibem a enzima RNA polimerase DNA-dependente bacteriana Pouco conhecido Pouco conhecido
Metabolismo	Trimetoprima Sulfonamidas	Inibem a síntese de ácido fólico

(MÉGRAUD, 1997)

Um outro importante alvo dos antibióticos é a síntese de DNA. As fluoroquinolonas inibem a subunidade A da enzima DNA girase. Esta enzima é um tetrâmero que consiste de duas subunidades A e B codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente, e está intimamente envolvida no processo de replicação. Fluoroquinolonas têm sido utilizadas no tratamento do *H. pylori*, porém em casos mais severos. O mecanismo de atuação dos nitroimidazóis não está muito bem definido (MÉGRAUD, 1997).

Quanto à furazolidona, um nitrofurano, também seu mecanismo de ação não é bem conhecido. Aparentemente, tem sua atividade antimicrobiana baseada na interferência com o sistema enzimático da bactéria (MÉGRAUD, 1997).

Os inibidores de bomba protônica (IBP) são uma classe relativamente nova de agentes utilizada para o tratamento de condições patológicas associadas com secreção excessiva de ácido, ou exposição excessiva ao mesmo. São os mais potentes inibidores da secreção ácida gástrica, sendo o omeprazol o primeiro dos IBP a ser utilizado na prática clínica, na década de 80 do século passado. Outros novos IBP incluem o lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol (ROBINSON, 1999). Recentemente, foi desenvolvido o esomeprazol, o S-isômero do omeprazol (ANDERSSON *et al.*, 2001). Os IBP causam uma inibição dose dependente da secreção ácida basal e estimulada, com uma inibição quase completa da secreção com uma dose de 60 mg. A secreção ácida estimulada por pentagastrina é inibida de forma potente durante 4 a 5 h com uma inibição moderada ocorrendo ainda por 24 h após uma dose única. Os efeitos inibitórios se acumulam durante os primeiros dias de administração repetida e continuam por pelo menos 24 h após a administração da última dose. As concentrações séricas de gastrina, tanto em jejum como pós-prandiais elevam-se durante administrações repetidas, provavelmente em resposta à redução da acidez intra-gástrica, o que leva a um aumento de secreção da mesma pelo antro gástrico (LONDONG *et al.*, 1983; HOWDEN, FORREST, REID, 1984; VERDU *et al.*, 1994). Adicionalmente ao efeito de diminuição da secreção ácida, os IBP auxiliam na supressão do crescimento do *H. pylori*, como foi demonstrado *in vitro* (HIRAI *et al.*, 1995).

Os sais de bismuto têm sido empregados na prática clínica há mais de 300 anos, sendo utilizados para o tratamento da dispepsia desde 1786. Possuem ação antibacteriana, porém, os mecanismos pelos quais causa danos ao *H. pylori*, permanecem incertos. O uso de compostos como o subcitrato de bismuto coloidal por exemplo, pode prevenir o aparecimento de resistência do *Helicobacter pylori* aos antibióticos, além de auxiliar na cicatrização de úlceras, tanto gástricas como duodenais (GORBACH, 1990; LAMBERT & MIDOLO, 1997).

1.5. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Os testes de susceptibilidade podem ser classificados em testes de difusão e testes de diluição. Atualmente, não há um teste de referência proposto para analisar a susceptibilidade do *H. pylori* frente a antibióticos. Entretanto, existem discussões sugerindo a utilização do teste de diluição em ágar como padrão (MÉGRAUD, 1997).

1.5.1. TESTE DE DILUIÇÃO EM ÁGAR

Este é um teste que consome tempo, porém, é geralmente utilizado como método de referência para a avaliação da precisão de outros métodos. O método consiste na preparação de placas com meio adequado, acrescidas de agentes antimicrobianos em diluições sucessivas, possuindo cada placa a metade da concentração da placa anterior. As linhagens são inoculadas em todas as placas através de uma alça de multinóculo, podendo-se analisar as susceptibilidades de várias colônias simultaneamente. Existe a necessidade de uma padronização de algumas condições como o meio adequado, a suplementação, o tamanho do inóculo, a atmosfera de incubação e o tempo apropriado para a leitura das placas (MÉGRAUD, 1997).

1.5.2. TESTE DE DILUIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

A princípio, este método não é usado devido a dificuldade de crescimento do *H. pylori* em meio líquido (MÉGRAUD, 1997).

1.5.3. TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO

Este é o método mais fácil e de menor custo para se testar a

suscetibilidade a antimicrobianos em geral. Discos impregnados com quantidades definidas de agentes antimicrobiano são colocados na superfície do meio sólido apropriado, já com a bactéria homogeneamente inoculada. O agente antimicrobiano se difunde no meio e um gradiente de concentração é estabelecido. A bactéria irá crescer a uma certa distância do disco a qual é inversamente proporcional à CIM da linhagem. Esta técnica ainda necessita de uma padronização quanto a correlação entre a CIM e o diâmetro dos discos, utilizando um grupo de linhagens relevantes. Devido a isto, esta técnica têm sido evitada por diversos pesquisadores (MÉGRAUD, 1997).

1.5.4. TESTE EPSILOMÉTRICO (E-TEST)

O teste epsilométrico é uma tentativa de se obter a CIM da linhagem diretamente pela observação do método de difusão. Uma fita de plástico contendo um gradiente de agente antimicrobiano de interesse em um lado e uma escala de outro é colocado sobre uma placa com a bactéria homogeneamente inoculada, da mesma maneira que no teste de difusão em disco. A leitura é realizada ao ponto da elipse onde o crescimento da bactéria foi inicialmente inibido. Estudos realizados para se comparar a precisão deste método em relação ao método de diluição em ágar têm demonstrado boa correlação (MÉGRAUD, 1997).

1.6. TRATAMENTO

O *H. pylori* é um patógeno altamente adaptado, que reside na superfície do estômago, abaixo da camada de muco, aderido às células da mucosa, e também pode ser encontrado entre as células epiteliais. Estes variados nichos proporcionam desafios na terapia antimicrobiana. Existem suposições de que a bactéria também possa localizar-se intracelularmente, um problema a mais

quando se leva em conta a ação extracelular de certos antibióticos, como a amoxicilina, por exemplo. Adicionalmente, o lúmen gástrico é um meio hostil para os compostos utilizados na terapêutica antimicrobiana, pois têm que penetrar na espessa camada de muco, e precisam ser ativos em níveis baixos de pH. Além disso, o conteúdo gástrico está em constante mudança, devido ao esvaziamento fisiológico, e não se pode esquecer que a principal razão do fracasso de terapias utilizadas para erradicação do *H. pylori* deve-se a resistência observada a alguns antimicrobianos utilizados (MCGOWAN, COVER, BLASER, 1996; BJÖRKHOLM *et al.*, 2000; GRAHAM, 2000).

Tem sido reportada variabilidade da resistência primária do *Helicobacter pylori* a vários antibióticos e quimioterápicos, incluindo metronidazol, amoxicilina e outros. Isto pode depender da área geográfica estudada (regiões ou países desenvolvidos *versus* não desenvolvidos), onde as condições sanitárias, o acesso aos serviços de saúde, à educação e à informação não são uniformes, além do emprego abusivo de antibióticos (QUEIROZ *et al.*, 1993; GOTOH *et al.*, 1997; SEGURA *et al.*, 1997; BARTOLOMÉ *et al.*, 1998; DORE *et al.*, 1998; DEBETS-OSSENKOPP *et al.*, 1999; MENDONÇA *et al.*, 2000).

Não menos importante, outros fatores, incluindo a escolha inadequada das substâncias – muitas terapias são baseadas em tentativa e erro, ausência de um adequado conhecimento sobre a melhor opção terapêutica, baixa adesão dos pacientes ao tratamento, também contribuem para a falência da terapêutica de erradicação do *Helicobacter pylori* (LEE & O'MORAIN, 1997; BREUER *et al.*, 1998; GRAHAM, 1998; LAHEIJ *et al.*, 1999; GRAHAM, 2000).

Uma série de tratamentos foram inicialmente testados *in vitro*, mas essas condições experimentais não necessariamente refletem a situação real, quando a infecção está estabelecida na mucosa gástrica (HEATLEY, 1995).

Um regime de erradicação eficaz e aceitável é aquele onde a taxa de erradicação situa-se, pelo menos, em torno de 80%, sem intolerabilidade clínica

ou efeitos colaterais e sem indução de resistência bacteriana (GRAHAM *et al.*, 1991b; HENTSCHEL *et al.*, 1993).

Os esquemas terapêuticos baseados em monoterapia apresentaram eficácia muito baixa. Estudos com sais de bismuto, por exemplo, atingiram taxas de 20% de erradicação. O subcitrato de bismuto foi mais efetivo que o subsalicilato. Entre os antibióticos, a claritromicina é o que apresentou melhores índices, embora altas doses, como 2g/dia por duas semanas erradicaram a bactéria em apenas 50% dos casos (POUNDER & WILLIAMS, 1997).

Na sequência cronológica, vieram as estratégias baseadas em múltiplos compostos, sendo os esquemas triplos com bismuto inicialmente os mais extensamente estudados. Em 1990, foram obtidos bons resultados (94% de taxa de erradicação) com a utilização de subcitrato de bismuto associado à tetraciclina e metronidazol, comparando-se com o regime de subcitrato de bismuto, metronidazol e amoxicilina (73% de taxa de erradicação) (CHIBA, 1992). A maior vantagem da co-administração de substâncias antissecretoras, como os IBP, inclui o aumento do pH intra-gástrico, cujos valores normalmente baixos, constituem a maior barreira contra a efetividade dos compostos antibióticos (GRAHAM, 1998).

Em 1992 foi proposto pelo comitê organizador da Primeira Semana Européia de Gastroenterologia em Atenas, a utilização de três esquemas terapêuticos para a erradicação do *H. pylori*: terapia tripla com bismuto, metronidazol e tetraciclina; terapia tripla com bismuto, metronidazol e amoxicilina e terapia dupla, com omeprazol e amoxicilina, com a finalidade de se tornar mais simples e convenientes os esquemas posológicos e minimizar a ocorrência de efeitos colaterais (LEE, 1993).

A combinação de amoxicilina e omeprazol, obteve taxa de erradicação com alta variabilidade, apresentando valores entre 0 e > 90%. Estudos bem controlados encontraram taxas de aproximadamente 50%. Com a substituição da amoxicilina pela claritromicina, taxas de erradicação em torno de 70% foram

encontradas, sendo mais efetivos os tratamentos com 1g/dia de claritromicina e 40mg/dia de omeprazol durante 2 semanas (POUNDER & WILLIAMS, 1997).

A necessidade por taxas de erradicação maiores do que as obtidas com a terapia dupla envolvendo IBP, levaram a estudos com IBP associado a dois compostos antibióticos. Regimes incluindo a combinação de claritromicina e tinidazol ou metronidazol mostraram taxas de erradicação em torno de 90%. Um dos primeiros e mais importantes estudos multicêntricos foi o MACH-1, sigla obtida através da combinação das iniciais de metronidazol, amoxicilina, claritromicina, *Helicobacter pylori* e a duração da terapia (1 semana), envolvendo 787 pacientes com história de úlcera duodenal. Os melhores resultados foram derivados da combinação de omeprazol 20mg, amoxicilina 1g e claritromicina 500mg, em duas tomadas diárias, por 7 dias, com os seguintes resultados entre intenção de tratar e pelo protocolo, respectivamente: 91% e 98%, *versus* 90% e 94% obtido com o esquema omeprazol 20mg, claritromicina 250mg e metronidazol 400mg, também em duas tomadas diárias, durante 7 dias (POUNDER & WILLIAMS, 1997; LIND *et al.*, 1999).

Conforme resultados publicados em 1999, o estudo MACH-2 foi útil para a avaliação do papel do omeprazol na erradicação do *H. pylori*, além de apresentar evidências de que esta substância reduz o impacto da resistência primária, e diminui o risco de resistência secundária aos antimicrobianos associados, quando feita a comparação com regimes contendo apenas agentes antibióticos (LIND *et al.*, 1999).

Os antagonistas dos receptores H₂ têm sido utilizados para promoverem a cicatrização da doença ulcerosa péptica, porém não possuem efeito contra o *H. pylori*. Existem estudos nos quais são associados a agentes com ação antibiótica, como a ranitidina-citrato de bismuto. O uso desta associação suprime, porém raramente erradica a infecção. O uso de ranitidina-citrato de bismuto 400 mg conjuntamente à claritromicina 500 mg, ambas em duas tomadas diárias, alcançou taxas em torno de 96% de erradicação. O uso de ranitidina associada à terapia

tripla de curta duração (< 1 semana), merece investigação para avaliar melhor seus benefícios (WYETH *et al.*, 1996; AXON *et al.*, 1997; POUNDER & WILLIAMS, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1998; PETERSON & GRAHAM, 1998;).

Em 1994 uma reunião de consenso nos E.U.A., concluiu que, todos os pacientes com doença ulcerosa péptica, portadores de *H. pylori*, deveriam receber antibióticos além de medicação específica para a doença péptica. Tal reunião, porém, não indicou um tratamento em particular para a erradicação deste agente infeccioso, deixando uma lacuna para a melhor terapia a ser instituída (NIH CONSENSUS CONFERENCE, 1994; PEURA & GRAHAM, 1994).

No ano de 1997, o Núcleo Europeu para o Estudo do *Helicobacter pylori* (EHPSG), reunido em Maastrich, dividiu as indicações de tratamento em: a) altamente recomendável, incluindo doença ulcerosa péptica, linfoma MALT, gastrite com anormalidades severas e após ressecção de tumores gástricos precoces; b) aconselhável, que inclui terapêutica continuada com IBP na doença do refluxo gastro-esofágico, após cirurgia de úlcera péptica, dispepsia não ulcerosa, história familiar de câncer gástrico, terapia com antiinflamatórios e segundo a vontade do paciente; c) incerta, onde se enquadram a prevenção do câncer gástrico, indivíduos assintomáticos e doenças extra-intestinais (THE MAASTRICH CONSENSUS REPORT, 1997).

No Brasil, o Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter pylori* recomendou à classe médica brasileira em 1997, dois esquemas terapêuticos iniciais para a erradicação da bactéria: terapia tripla com omeprazol, claritromicina e amoxicilina e uma opção mais econômica com subcitrate de bismuto, tetraciclina e furazolidona. Além disso, o Núcleo sugeriu 3 esquemas para retratamento, utilizando IBP, sal de bismuto e antibióticos como amoxicilina, claritromicina, azitromicina, tetraciclina e quimioterápicos como o metronidazol e tinidazol em combinações variadas (CARVALHAES *et al.*, 1997).

Alguns estudos pilotos têm sido desenvolvidos, utilizando-se da combinação da furazolidona com tetraciclina e metronidazol ou claritromicina, mais um IBP, com resultados promissores (taxas de erradicação através da "intenção de tratar" variando entre 85 a 100%) (GRAHAM *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

Entre os objetivos deste estudo prospectivo, controlado e randomizado, está a avaliação da eficácia de dois esquemas terapêuticos correntemente aceitos e recomendados pelo Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter pylori* para a erradicação da infecção pelo *H. pylori* e tratamento da doença ulcerosa péptica ativa, sendo um deles constituído por inibidor de bomba protônica, amoxicilina e claritromicina, e o outro por subcitrato de bismuto, furazolidona e tetraciclina, com ênfase em um dos aspectos responsáveis pela falência terapêutica, como a resistência primária do *Helicobacter pylori* aos agentes antibióticos. Também foi avaliada a presença de resistência secundária após o tratamento instituído.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Noventa e dois indivíduos, consecutivamente em investigação pela queixa de dispepsia provenientes do Ambulatório de Gastroenterologia da Universidade São Francisco – USF, com positividade documentada para a infecção pelo *Helicobacter pylori* e com doença ulcerosa péptica, foram incluídos neste estudo. As úlceras foram detectadas durante a realização de endoscopia digestiva alta e a infecção pelo *Helicobacter pylori* foi determinada através da coleta de múltiplas biópsias gástricas do fundo, corpo e antro (avaliação histológica, com coloração HE e de Giemsa, e cultura). O teste rápido da urease (Probac, São Paulo, Brasil) foi realizado, utilizando-se amostras do antro gástrico. Os critérios de exclusão foram: presença de aspecto de malignidade à endoscopia; antecedente de cirurgia gastroduodenal; tratamento de infecção por *Helicobacter pylori* prévio; uso de antibióticos ou substâncias de inibição de secreção ácida gástrica no mês anterior ao da realização do estudo; gravidez; lactação; intensidade dos efeitos adversos. Os pacientes que não retornaram para o seguimento também foram excluídos do estudo. Houve uma distribuição aleatória em dois grupos de tratamento: Grupo A: lansoprazol 30 mg (Ogastro®, Abbott, Brasil) duas vezes ao dia (em jejum pela manhã e antes do almoço), amoxicilina 1000 mg (Amoxil®, Smith Kline Beecham, Brasil) duas vezes ao dia (após o café da manhã e jantar) e claritromicina 500 mg (Klaricid®, Abbott, Brasil) duas vezes ao dia (após o café da manhã e jantar) (Tabela 3); Grupo B: subcitrate de bismuto 120 mg (Peptulan®, Farmasa, Brasil) quatro vezes ao dia (após o café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir à noite), tetraciclina 500 (Terramicina®, Pfizer, Brasil) quatro vezes ao dia (após o café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir à noite) e furazolidona 200 mg (Giarlam®, UCI Farma, Brasil) duas vezes ao dia (após o café da manhã e jantar) (Tabela 4). O período de tratamento consistiu em 7 dias para ambos os grupos. Todos os medicamentos foram fornecidos aos pacientes, e nenhuma outra substância anti-ulcerosa foi administrada durante o estudo. Os pacientes foram detalhadamente informados sobre a necessidade do tratamento para erradicação do *Helicobacter pylori*, da importância da adesão e dos efeitos colaterais esperados. Explicação verbal e instruções impressas foram-lhes entregues para

auxiliá-los na ingesta das medicações. Cada paciente assinou um termo de consentimento prévio à entrada do estudo, e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco e conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki.

Tabela 3 – Grupo A

MEDICAMENTO	mg	Nº DE DOSES DIÁRIAS
LANSOPRAZOL	30	2
AMOXICILINA	1000	2
CLARITROMICINA	500	2

Tabela 4 – Grupo B

MEDICAMENTO	mg	Nº DE DOSES DIÁRIAS
SUBCITRATO DE BISMUTO COLOIDAL	120	4
TETRACICLINA	500	4
FURAZOLIDONA	200	2

Não houve diferenças entre os grupos de estudo, no que diz respeito às características demográficas (todos os pacientes eram provenientes da região de Bragança Paulista) e ao tabagismo (Tabela 5).

Tabela 5 : Características dos pacientes.

	GRUPO A (n = 46)	GRUPO B (n = 46)
IDADE (anos[variação])	42 (23-73)	41 (20-70)
HOMENS (n/%)	27/59	35/70
FUMANTES (n/%)	17/36	18/40

3.1. CEPAS BACTERIANAS

As biópsias obtidas durante a endoscopia foram imediatamente transportadas em meio de Brucella com 10% de glicerol para o laboratório de microbiologia. A bactéria *Helicobacter pylori* foi isolada através da inoculação dos espécimes em meios de cultura seletivos (brain heart infusion – BHI – base de ágar, extrato de levedura, 10% sangue de carneiro, 10 mg/l vancomicina, 20mg/l ácido nalidíxico, 10mg/l anfotericina B, 40 mg/l cloreto de trifetil tetrazólio – TTC) e meio não seletivo (BHI ágar) e incubados à 37°C sob condições microaerofílicas (8-10% CO₂, 5-6% O₂, 80-85% NO₂), com 95% de umidade relativa, sendo inspecionadas a partir do 3º dia de incubação. A identificação das colônias foi confirmada pela coloração de Gram, e produção de oxidase, catalase e urease. As amostras de *Helicobacter pylori* foram estocadas à -70°C em meio de Brucella contendo 25% de glicerol.

3.2. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE MICROBIANA

As amostras viabilizadas foram inoculadas em BHI ágar contendo 10% de sangue de carneiro, e incubadas à temperatura de 37°C, sob condições

microaerofílicas. As colônias foram suspensas em PBS (pH 7.2) e ajustadas à turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/ml). As bactérias foram, então, inoculadas nas placas de ágar com replicador, depositando-se 1 µl de amostra para um inóculo final de 10^5 ufc/ml. A concentração inibitória mínima (CIM) para claritromicina, amoxicilina, tetraciclina e furazolidona foi determinada pelo método da diluição em ágar, com concentração variando entre 64 a 0,125 µg/ml. As placas de ágar foram incubadas à temperatura de 37°C em condições microaerofílicas por 72 h. A resistência primária das cepas de *Helicobacter pylori*, isoladas de amostras gástricas de pacientes não tratados, foi considerada quando a CIM foi >2 µg/ml para a tetraciclina, >16 µg/ml para amoxicilina, >2 µg/ml para a claritromicina e >2 µg/ml para a furazolidona (Figura 1). Todos os testes foram feitos em duplicata. A resistência secundária foi definida quando cepas de *Helicobacter pylori* obtidas de pacientes com erradicação não satisfatória apresentaram níveis de CIM superior para cada antibiótico como já descrito acima.

3.3. REAGENTES

O cloreto de trifetil tetrazolium 40 mg, anfotericina B, vancomicina, ácido nalidíxico, amoxicilina, tetraciclina, furazolidona, e claritromicina utilizados foram provenientes da Sigma (St. Louis, EUA). O meio BHI-ágar utilizado, foi proveniente da DIFCO (Maryland, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A erradicação do *Helicobacter pylori* foi a medida da eficácia do tratamento. As taxas de erradicação foram avaliadas de acordo com a intenção de tratar e pelo protocolo. Os dados foram analisados utilizando-se o teste “t” de

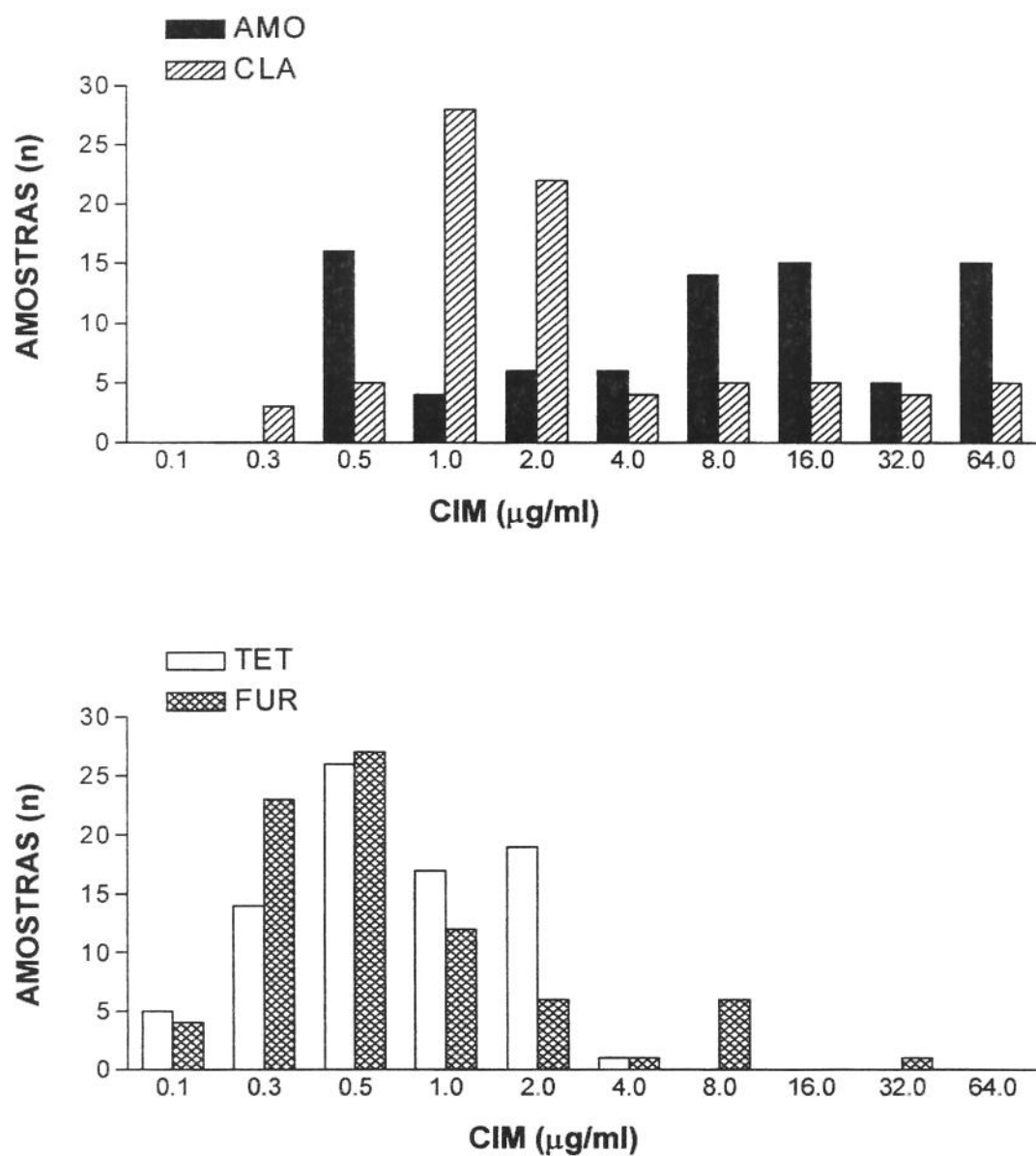
Student. Um valor p menor que 0,05 foi tomado como indicador de significância estatística.

3.5. SEGUIMENTO

Os pacientes foram reavaliados no final da terapia, onde a adesão foi avaliada por intermédio de uma entrevista. Eles foram submetidos a um segundo exame endoscópico 30 dias após o término da terapia, com o objetivo de se avaliar a erradicação do *Helicobacter pylori* e a cicatrização da úlcera. A especificidade da avaliação de quatro semanas após o tratamento é de 96% (VAN DER HULST, RAUWS, KÖYCÜ, 1996).

A cicatrização das lesões pépticas foi considerada na ausência de úlceras no exame prévio, ou na presença de uma cicatriz definitiva. Foram realizadas biópsias do fundo, corpo e antro gástricos para se determinar a presença do *H. pylori* pelo teste rápido da urease, cultura e exame histológico. A erradicação do *Helicobacter pylori* foi definida por uma cultura negativa, histologia e teste da urease também negativos. O endoscopista, o patologista e o microbiologista envolvidos no estudo, desconheciam o tratamento ao qual o paciente foi submetido.

Figura 1 : Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA), tetraciclina (TET) e furazolidona (FUR) entre as amostras de *Helicobacter pylori* isoladas de todos os pacientes incluídos no estudo antes do tratamento.



4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Cinco pacientes de cada grupo de estudo não retornaram para seguimento. Os efeitos colaterais mais comumente observados foram: diarreia, náusea e desconforto abdominal, com 9, 2 e 2 eventos relatados, respectivamente, no Grupo A, e escurecimento das fezes, náusea, desconforto abdominal e gosto metálico, com 10, 4, 3 e 3 eventos relatados, respectivamente, no Grupo B (Tabela 6). Estes sintomas foram considerados leves pelos pacientes de ambos os grupos, com exceção de 1, excluído do Grupo B, que não chegou a completar o tratamento. Um mesmo paciente pode ter relatado mais que 1 evento adverso.

Tabela 6 : Efeitos Colaterais.

GRUPO A (n=41)		GRUPO B (n=40)	
Manifestações Clínicas	Eventos Relatados	Manifestações Clínicas	Eventos Relatados
Diarreia	9 (22%)	Escurecimento das Fezes	10 (25%)
Náusea	2 (5%)	Náusea	4 (10%)
Desconforto Abdominal	2 (5%)	Desconforto Abdominal	3 (8%)
		Gosto Metálico	3 (8%)

A erradicação do *Helicobacter pylori* foi bem sucedida em 66% (27/41) dos pacientes do Grupo A, e em 60% (24/40) dos pacientes do Grupo B ($p>0,05$, N.S.). Similarmente, não houve diferenças entre os grupos de tratamento quando os pacientes foram avaliados pelo critério intenção de tratar, apresentando 59% de

taxa de erradicação (27/46) no Grupo A e 52% (24/46) no Grupo B, ($p>0,05$, N.S.). Taxas de cicatrização foram comparáveis entre os grupos, tanto pela análise pelo protocolo, quanto pela intenção de tratar. Todas as proporções encontram-se dentro de intervalo de confiança de 95% (Tabela 7).

Tabela 7: Efeito da terapia na erradicação do *Helicobacter pylori* e na cicatrização das lesões pépticas.

	GRUPO A		GRUPO B	
	Pelo protocolo	Intenção de tratar	Pelo protocolo	Intenção de tratar
ERRADICAÇÃO	66% (27/41)	59% (27/46)	60% (24/40)	52% (24/46)
	(0,513;0,804)	(0,445;0,729)	(0,448;0,752)	(0,377;0,666)
CICATRIZAÇÃO	90% (37/41)	80% (37/46)	87% (35/40)	76% (35/46)
	(0,812;0,993)	(0,670;0,919)	(0,773;0,978)	(0,638;0,884)

IC (95%)

A cicatrização das ulcerações foi observada em todos os pacientes cuja erradicação do *H. pylori* ocorreu com sucesso, e também em alguns onde não se notou a erradicação. Dos 14 pacientes do Grupo A onde não se observou a erradicação, em 10 (71,4%) foi notada a cicatrização e em 4 deles (28,6%) não houve a cicatrização completa das ulcerações (Tabela 8), enquanto que entre os 16 pacientes do Grupo B, os valores respectivos foram de 11 (68,8%) e 5 (31,2%) (Tabela 9).

Tabela 8 : Cicatrização das lesões pépticas nos pacientes do Grupo A onde não se observou a erradicação do *Helicobacter pylori*.

GRUPO A (n=41)		
Não Erradicação	Cicatrização	Não Cicatrização
14 (34,2%)	10 (71,4%)	4 (28,6%)

Tabela 9 : Cicatrização das lesões pépticas nos pacientes do Grupo B onde não se observou a erradicação do *Helicobacter pylori*.

GRUPO B (n=40)		
Não Erradicação	Cicatrização	Não Cicatrização
16 (40%)	11 (68,8%)	5 (31,2%)

Resistência primária do *Helicobacter pylori* à amoxicilina, claritromicina, tetraciclina e furazolidona, foi detectada em 22 (23,9%), 26 (28,3%), 2 (2,2%), e 7 (7,6%) pacientes do total de noventa e dois (Tabela 10).

Tabela 10 : Resistência primária total do *Helicobacter pylori*.

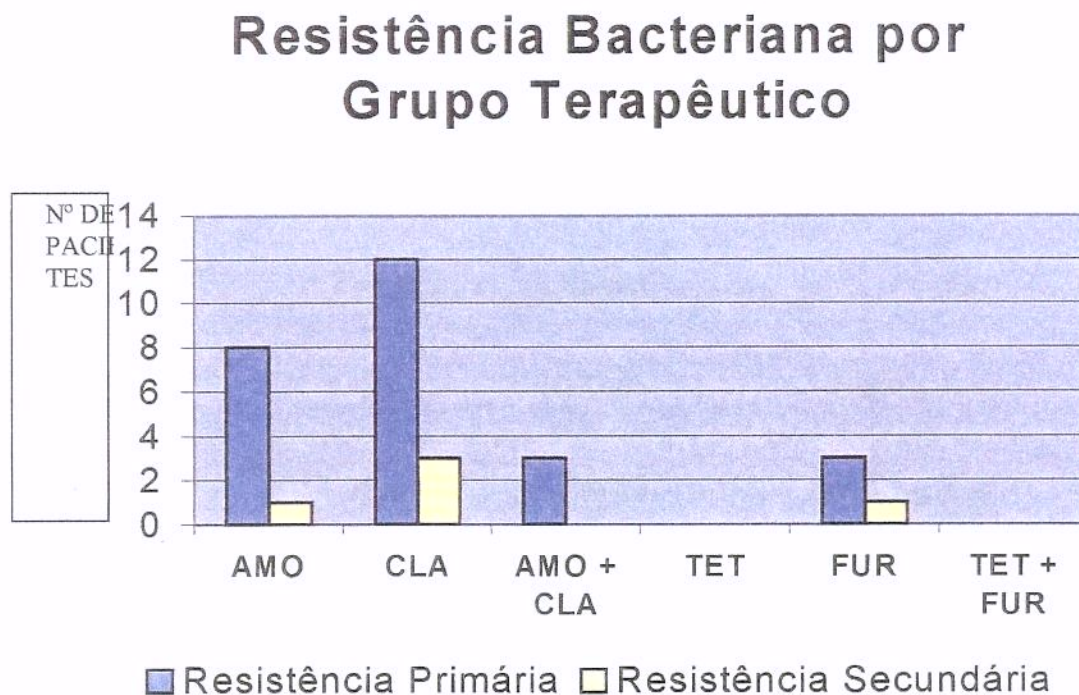
AGENTES ANTIBIÓTICOS	RESISTÊNCIA PRIMÁRIA
(GRUPO A e B)	(n=92)
Amoxicilina	22 (23,9%)
Claritromicina	26 (28,3%)
Tetraciclina	2 (2,2%)
Furazolidona	7 (7,6%)

A resistência primária individualizada por grupo de tratamento foi: 8 (19,5%) para a amoxicilina, 12 (29,3%) para a claritromicina e 3 (7,3%) para ambas no Grupo A. No Grupo B, apenas 3 (7,5%) pacientes apresentaram alguma resistência primária aos medicamentos daquele grupo, no caso, à furazolidona. Resistência a ambas, tetraciclina e furazolidona, não foi encontrada. Resistência secundária à amoxicilina foi encontrada em 1 (2,4%) e à claritromicina em 3 (7,3%) paciente. Nenhum apresentou resistência secundária a ambas. No Grupo B, resistência secundária foi detectada apenas com a furazolidona em 1 (2,5%) paciente (Tabela 11, Figura 2).

Tabela 11 : Resistência primária e secundária do *H. pylori* aos antibióticos de acordo com os grupos terapêuticos.

AGENTES ANTIBIÓTICOS	RESISTÊNCIA número de pacientes (%)	
	Primária	Secundária
GRUPO A		
Amoxicilina	8 (19,5)	1 (2,4)
Claritromicina	12 (29,3)	3 (7,3)
Amoxicilina + Claritromicina	3 (7,3)	0
GRUPO B		
Tetraciclina	0	0
Furazolidona	3 (7,5)	1 (2,5)
Tetraciclina + Furazolidona	0	0

Figura 2 : Resistência primária e secundária do *H. pylori* aos antibióticos amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA), tetraciclina (TET) e furazolidona (FUR) de acordo com os grupos terapêuticos, em número de pacientes.



Nos 24 (58,5%) pacientes do Grupo A que não apresentaram resistência alguma às medicações, foi observada taxa de erradicação de 79,2%, enquanto que nos 37 (92,5%) pacientes do Grupo B sem resistência alguma às medicações envolvidas em seu esquema terapêutico, ocorreu apenas 62,2% de erradicação. As taxas de erradicação foram reduzidas pela metade quando a resistência a pelo menos um dos agentes antibióticos foi notada (Tabela 12, Figura 3).

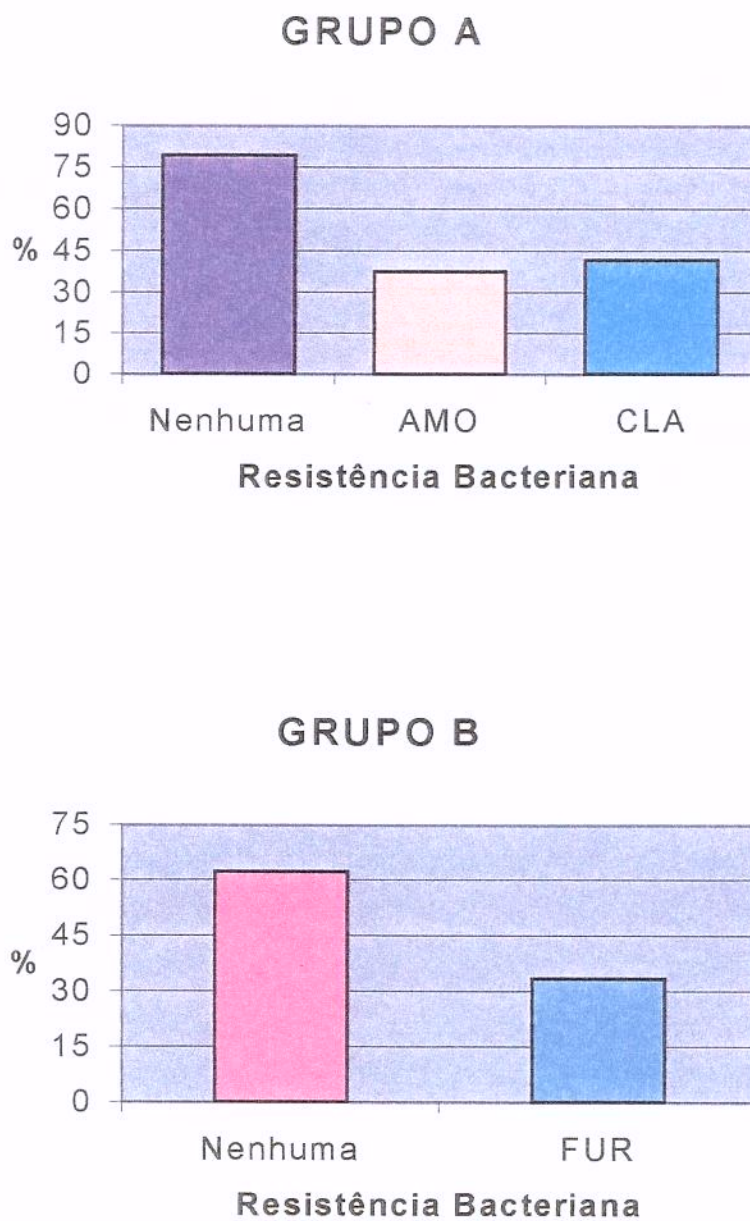
Tabela 12 : Efeito da terapia de erradicação de acordo com a resistência primária do *H. pylori* aos agentes antibióticos do Grupo A e Grupo B.

GRUPO	Resistência Primária	Pacientes	Erradicaram	Não erradicaram
		n (%)	n (%)	n (%)
A	Nenhuma	24 (58,5)	19 (79,2)	5 (20,8)
(n=41)	AMO	8 (19,5)	3 (37,5)	5 (62,5)*
	CLA	12 (29,3)	5 (41,7)	7 (58,3)*
	CLA e AMO	3 (7,3)	0	3 (100)
	CLA ou AMO	17 (41,5)	8 (40)	9 (45)
B	Nenhuma	37 (92,5)	23 (62,2)	14 (37,8)
(n=40)	FUR	3 (7,5)	1 (33,3)	2 (66,7)*

CLA = claritromicina; AMO = amoxicilina; FUR = furazolidona

* (p>0,05, N.S.)

Figura 3 : Efeito da resistência bacteriana à amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA) e furazolidona (FUR) nas taxas de erradicação (%) do *Helicobacter pylori* entre os pacientes do Grupo A e B.



5. DISCUSSÃO

O maior conhecimento do impacto da infecção pelo *Helicobacter pylori* em seres humanos, resultou em várias diretrizes de tratamento. Por exemplo, a erradicação do *Helicobacter pylori* é altamente recomendada para o tratamento da doença ulcerosa péptica, úlcera hemorrágica, linfoma de baixo grau e no seguimento de ressecções de câncer gástrico precoce (LEE & O'MORAIN, 1997).

Recentemente, a prescrição de antibióticos para todos os pacientes dispépticos positivos para *Helicobacter pylori* em áreas com alta incidência de úlcera péptica foi considerada custo-efetiva, se comparada com a investigação de todos os pacientes dispépticos com o intuito de se identificar aqueles com úlcera (DE BOER & TYTGAT, 2000).

Na seleção de um adequado regime de erradicação, deve-se levar em conta a simplicidade do mesmo, os efeitos adversos e a sensibilidade do antibiótico, além do custo (HARRIS, 1998). Como o tratamento ideal ainda não foi encontrado, muitos esquemas terapêuticos têm sido sugeridos (PENSTON, 1996). Não há um consenso a respeito de qual terapia é a ideal, e uma efetividade de erradicação de aproximadamente 90% é a desejada. A melhor terapia, correntemente disponível, consiste em um IBP, ou sais de bismuto, associados a dois agentes antibióticos (CARVALHAES *et al.*, 1997; HARRIS, 1998; DE BOER & TYTGAT, 2000; GRAHAM & OSATO, 2000;). A terapia tripla baseada na associação de sais de bismuto, não é cara, e acarreta altas taxas de cura, sendo utilizada mundialmente (LEE & O'MORAIN, 1997; BREUER *et al.*, 1998; LAHEIJ *et al.*, 1999; DE BOER & TYTGAT, 2000). Entretanto, o grande número de comprimidos necessários diariamente, bem como o impacto dos efeitos colaterais, limitou seu uso, diminuindo a adesão e a tolerabilidade (CHIBA & HUNT, 1999). Um efeito agravante seria o de que, ao não fazer o uso correto da dose do medicamento prescrito, o paciente estaria facilitando a diminuição de sua concentração no sítio da infecção, e, provavelmente, promovendo o aparecimento da resistência bacteriana. Esta é uma maneira comum de se selecionar mutantes *in vitro* (MÉGRAUD, 1997).

Como tentativa para se solucionar a problemática da abundância de comprimidos diários, vários protocolos recomendam terapia tripla com IBP como primeira linha de tratamento (CARVALHAES *et al.*, 1997; PENSTON, 1996), oferecendo conveniência e tolerabilidade. Todavia, um alto custo e um aumento da resistência aos antimicrobianos pode vir a ser um problema relevante (AL-ASSI *et al.*, 1994; GRAHAM, 1998; MÉGRAUD, 1998a).

Dados sobre a resposta a tratamentos para erradicação do *H. pylori* em países em desenvolvimento são pobres e fragmentados, sugerindo que as taxas de erradicação sejam baixas, se comparadas com as obtidas em países desenvolvidos (BUIATTI *et al.*, 1994, MUÑOZ *et al.*, 1996; SIMSEK, KADAYIFCI, TATAR, 1996).

Neste estudo, o tratamento de pacientes com o diagnóstico de doença ulcerosa péptica em atividade associada à infecção pelo *Helicobacter pylori*, feito com duas terapias altamente recomendadas - subcitrato de bismuto, furazolidona e tetraciclina, considerada altamente efetiva, taxa de erradicação de 84% como observado em um estudo brasileiro anterior (MAGALHÃES *et al.*, 1998), ou lansoprazol, associado à amoxicilina e claritromicina – resultou em taxas de erradicação muito baixas (<70%). Entretanto, taxa de 79,2% de erradicação foi encontrada na ausência de resistência tanto à claritromicina quanto à amoxicilina, e 62,2% de taxa de erradicação no Grupo B, quando na ausência de resistência à tetraciclina e furazolidona. Os dados sugerem que nenhuma das terapias acima pode ser considerada generalizadamente aceitável, devido aos resultados insatisfatórios encontrados na população estudada, porém mostram que um estudo prévio de resistência aos agentes antibióticos envolvidos em um determinado esquema, pode aumentar sua eficácia.

A resistência bacteriana é um crescente problema no tratamento da infecção pelo *Helicobacter pylori*, nos diferentes países. As taxas de resistência às medicações comumente utilizadas para a erradicação desta bactéria, nos Estados Unidos da América, por exemplo, variam entre 7 a 14% para a claritromicina. Na

Europa, para esta mesma substância, as taxas variam entre 0 a 15%. Com relação à amoxicilina, a resistência é considerada rara, embora taxas altas como 31% tenham sido encontradas (GRAHAM, 1998; MÉGRAUD, 1997; MÉGRAUD, 1998b).

A alta prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori* numa população e o uso não racional de antibióticos pela mesma, possibilitaria o achado de um maior número de cepas resistentes de *Helicobacter pylori* às medicações utilizadas nos esquemas de erradicação (ECCLISSATO *et al.*, 1999; MENDONÇA *et al.*, 2000). Cepas resistentes de *Helicobacter pylori* acompanham a baixa taxa de erradicação observada nos pacientes do Grupo A. A resistência à amoxicilina foi similar à reportada anteriormente na mesma área geográfica do presente estudo, mas aquela observada com claritromicina, aumentou dramaticamente, passando de 7% para 29,3% (MENDONÇA *et al.*, 2000). As taxas de erradicação obtidas com o esquema terapêutico do Grupo A, além dos altos custos do tratamento, associados a uma alta resistência primária e à possibilidade de resistência secundária, como observada, contra-indicariam seu uso generalizado nessa população.

A furazolidona tem sido utilizada recentemente como uma substância alternativa, em resposta a uma alta prevalência de cepas de *Helicobacter pylori* resistentes ao metronidazol (DE BOER & TYTGAT, 1995; LERANG *et al.*, 1997; SEGURA *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1998; ECCLISSATO *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 1999).

Uma baixa (e até mesmo nula, caso se considere apenas um grupo em separado) resistência primária à furazolidona e à tetraciclina foi observada, sendo este achado similar ao já anteriormente encontrado. Resistência secundária a estas substâncias foi observada em apenas um paciente, com a furazolidona. Apesar destes achados, este esquema terapêutico também falhou. Embora explicação verbal e instruções impressas tenham sido fornecidas previamente ao tratamento, e também a quantidade correta de medicamentos oferecida, a adesão

pode ter desempenhado papel importante na falha do esquema B, pois a ingestão de um grande número de comprimidos (10 no total diário), sendo dois tipos deles 4 vezes ao dia e o outro 2 vezes ao dia, facilita a ocorrência de falhas. A falha de tratamento neste grupo, pela clareza dos resultados, não se correlacionou com os dados de resistência bacteriana. Uma outra possibilidade, a qual também pode ter ocorrido com o esquema A, seria a interferência da farmacocinética das substâncias utilizadas, causando redução na disponibilidade das mesmas no sítio de ação, pois ainda não se conhece com exatidão como e quanto de interação existe num esquema constituído por múltiplos compostos (GRAHAM, 2000). Portanto, este esquema também não deve ser recomendado, comumente, para a erradicação desta infecção, especialmente na região geográfica estudada.

Caso se leve em conta que qualquer regime terapêutico baseado em compostos múltiplos apresenta os problemas já descritos, as dificuldades para se determinar qual a melhor terapia e até mesmo de se conduzir um estudo, são grandes desafios. O desenvolvimento de uma formulação em dose única, ou constituída por apenas um único princípio ativo para a erradicação do *Helicobacter pylori* poderia, talvez, contribuir para a resolução de uma parcela importante desta infecção tão particular.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados enfatizam que, antes de se sugerir uma terapia de erradicação a ser universalmente empregada, ou de se utilizar de estratégias do tipo “testar e tratar” em países em desenvolvimento, muita cautela deve ser tomada. Também subsidiam a visão de que a resistência pode encobrir um potencial, sério e não reconhecido problema em regiões geográficas diferentes. A noção de que o desenvolvimento de um “super” *Helicobacter pylori*, resistente a muitos antibióticos, é factível, e somente estará longe de acontecer quando houver aumento da conscientização tanto dos médicos quanto dos pesquisadores sobre a necessidade de uma melhor abordagem desta infecção.

7. SUMMARY

Objective: To compare the efficacy of two regimens of triple therapy in patients with *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease, and evaluate the impact of bacterial resistance to antibiotics on eradication rate. One of the regimens, consisted of lansoprazole, amoxicillin and clarithromycin, and the other consisted of bismuth, tetracycline and furazolidone.

Methods: Ninety-two consecutive *Helicobacter pylori*-positive patients with active peptic ulcer disease were randomly enrolled to receive either (A) lansoprazole (Ogastro, Abbot, Brazil) 30 mg *b.i.d.*, plus 1000 mg of amoxicillin (Amoxil, Smithkline Beecham, Brazil) *b.i.d.*, plus clarithromycin (Klaricid, Abbot, Brazil) 500 mg *b.i.d.*; or (B) bismuth subcitrate (Peptulan, Farmasa, Brazil) 120 mg *q.i.d.*, plus 500 mg of tetracycline (Terramicina, Pfizer, Brazil) *q.i.d.*, plus furazolidone (Giarlan, UCI Farma, Brazil) 200 mg *b.i.d.*. Both groups (n = 46 each) received the medication for 1 week. The *Helicobacter pylori* status was reassessed 30 days following completion of the therapy in order to evaluate eradication rates and bacterial resistance to the antibiotics was investigated using a *in vitro* assay.

Results: Five patients from each study group were lost to follow up. Side effects were considered to be mild by individuals from both groups, except by one assigned to group B who could not complete the treatment. Both treatments resulted in similar *H. pylori* eradication rate: 66% and 60% (per protocol), 59% and 52% (intention-to-treat) in group A and B, respectively ($p > 0.05$, n.s.). However, eradication improved to 79% in the absence of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin or amoxicillin. Similar healing rates were observed both groups by per protocol or intention-to-treat analysis.

Conclusions: Primary resistance to clarithromycin or amoxicillin may underscore a potentially serious problem for the eradication of *H. pylori* infection. Testing for bacterial resistance may become necessary to improve therapeutic efficacy. The results emphasise that caution must be exercised before suggesting

a general eradication therapy, which could be universally employed, or even a “test and treat” strategy in developing countries.

Key words: clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, furazolidone, bismuth subcitrate, lansoprazole, *Helicobacter pylori* therapy, antibiotic resistance in Brazil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ASSI, M.T.; RAMIREZ, F.C.; LEW, G.M.; GENTA, R.M.; GRAHAM, D.Y. Clarithromycin, tetracyclin and bismuth: A new non-metronidazole therapy for *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol.**, **89**:1203-1205,1994.

ALEMOHAMMAD, M.M.; FOLEY, T.J.; COHEN, H. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. **J. Clin. Microbiol.**, **31**:2174-2177,1993.

ALLEN, A.; NEWTON, J.; OLIVER, L.; JORDAN, N.; STRUGALA, V.; PEARSON, J.P.; DETTMAR P.W. Mucus and *H. pylori*. **J. Physiol. Pharmacol.**, **48**:297-305,1997.

AMERICAN DIGESTIVE HEALTH FOUNDATION, Mclean, Virginia, 1997. Proceedings of the American Digestive Health Foundation International Update Conference on *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol.**, **113**:S1-S169,1997.

ANDERSSON, T.; RÖHSS, K.; BREDBERG, E.; HASSAN-ALIN, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of esomeprazole, the S-isomer of omeprazole. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **15**:1563-1569,2001.

ATHERTON, J.C. Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11 (suppl 1)**:11-20,1997.

ATHERTON, J.C.; CAO, P.; PEEK, R.M.; TUMMURU, M.K.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J. Biol. Chem.**, **270**:17771-17777,1995.

AXON, A.T.R.; IRELAND, A.; LANCASTER-SMITH, M.J.; ROOPRAM, P.D. Ranitidine bismuth citrate and clarithromycin twice daily in the eradication of *Helicobacter pylori*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11**:81-87,1997.

AXON, A.T.R. & QUINA, M. - Ten-year milestones. In: Malferttheiner, P.; Mégraud, F.; Michetti, P.; Price, A. - **The year in *Helicobacter pylori* 1994. The European *Helicobacter pylori* Study Group**, Current Science, 1994. p.1-5.

BARTOLOMÉ, O.L.; VASALLO, A.M.; ARMENGOL, J.A.R.; DE LA GARZA, J.J.P. Diagnóstico microbiológico de *Helicobacter pylori* y su resistencia a los antimicrobianos. **Rer. Clin. Esp.**, 7:420-423,1998.

BEACHEY, E.H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacterial to mucosal surface. **J. Infect. Dis.**, 143:325-345,1981.

BJÖRKHOLM, B.; ZHUKHOVITSKY, V.; LÖFMAN, C.; HULTÉN, K.; ENROTH, H.; BLOCK, M.; RIGO, R.; FALK, P.; ENGSTRAND, L. *Helicobacter pylori* entry into human gastric epithelial cells: A potential determinant of virulence, persistence and treatment failures. **Helicobacter.**, 3:148-154,2000.

BLASER, M.J. Hypothesis on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. **Gastroenterology.**, 102:720-727,1992.

BLASER, M.J. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: A key question in mucosal damage? **Ann. Med.**, 27:559-563,1995.

BLASER, M.J.; PEREZ-PEREZ, G.I.; KLEANTHOUS, H.; COVER, T.L.; PEEK, R.M.; CHYOU, P.H.; STEMMERMANN, G.N.; NOMURA, A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res.**, 55:2111-2115,1995.

BLASER, M.J. Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 10 (suppl.1):73-77,1996.

BREUER, T.; GOODMAN K.J.; MALATY, H.M.; SUDHOP, T.; GRAHAM, D.Y. How do clinicians practicing in the U.S. manage *Helicobacter pylori*-related

gastrointestinal diseases? A comparison of primary care and specialist physicians. **Am. J. Gastroenterol.**, **93**:553-561,1998.

BUIATTI, E.; MUÑOZ, N.; VIVAS, J.; CANO, E.; PERAZZA, S.; CARILLO, E.; CASTRO, D.; SANCHEZ, V.; ANDRADE, O.; BENZ, M. Difficulty in eradication *Helicobacter pylori* in a population at high risk for stomach cancer in Venezuela. **Cancer Causes Control**, **5**:249-254,1994.

CALAM, J.; GIBBONS, A.; HEALEY, Z.V.; BLISS, P.; AREBI, N. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Its effects on acid and gastrin physiology. **Gastroenterology**, **113**:S43-S49,1997.

CARVALHAES, A.; MAGALHÃES, A.F.N.; CORDEIRO, F.; ZEITUNE, J.M.R.; CASTRO, L.P.; ZATERKA, S. Terapêutica e epidemiologia da infecção por *H. pylori* - Recomendações do primeiro seminário promovido pelo Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter pylori*. **GED**, **16**:99-100,1997.

CEDERBRANT, G.; KAHLMETER, G.; LJUNGH, A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, **29**:115-120,1992.

CEDERBRANT, G.; KAHLMETER, G.; LJUNGH, A. The E test for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, **31**:65-71,1993.

CHIBA, N. & HUNT, R.H. Drug therapy of *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. In: SCARPIGNATO, C. & BIANCHI-PORRO, G. - **Clinical pharmacology and therapy of *Helicobacter pylori* infection**. Basel, Karger, vol. 111,1999. p.227-268.

CHIBA, N.; RAO, B.V.; RADEMAKER, J.W.; HUNT, R.H. Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. **Am. J. Gastroenterol.**, **87**:1716-1727,1992.

CLISSOLD, S.P. & CAMPOLI-RICHARDS, D.M. Omeprazole. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peptic ulcer disease and Zollinger-Ellison syndrome. **Drugs**, **32**:15-47,1986.

COELHO, L.G.; PASSOS, M.C.; CHAUSSON, Y.; COSTA, E.L.; MAIA, A.F.; BRANDAO, MJ.; RODRIGUES, D.C.; CASTRO, L.P. Duodenal ulcer and eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. An 18-month follow-up study. **Scand. J. Gastroenterol.**, **27**:362-366,1992.

COHEN, H. & LAINE, L. Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11 (suppl 1)**:3-9,1997.

DE BOER, W.A. & TYTGAT, N.J. The best therapy for *Helicobacter pylori* infection: Should efficacy or side-effect profile determine our choice? **Scand. J. Gastroenterol.**, **30**:401-407,1995.

DE BOER, W.A. & TYTGAT, N.J. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. **BMJ**, **320**:31-34,2000.

DEBETS-OSENKOPP, Y.J.; HERSCHEID, A.J.; POT R.J.; KUIPERS, E.J.; KUSTERS, J.G.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxycillin, tetracycline and trovafloxacin in the Netherlands. **J. Antimicrob. Chemother.**, **43**:511-515,1999.

DOOLEY, C.P.; COHEN, H.; FITZGIBBONS, P.L.; BAUER, M.; APPLEMAN, M.D.; PEREZ-PEREZ, G.I; BLASER, M.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. **N. Engl. J. Med.**, **321**:1562-1566,1989.

DORE, M.P.; PIANA, A.; CARTA, M.; ATZEI, A.; ARE, B.M.; MURA, I.; MASSARELLI, G.; MAIDA, A.; SEPULVEDA, A.R.; GRAHAM, D.Y.; REALDI, G. Amoxycillin resistance is one reason for failure of amoxycillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **12**:635-649,1998.

DORRELL, N. & WREN, B.W. From genes to genome biology: a new era in *Helicobacter pylori* research. **GUT**, **42**:451-453,1998.

DRUMM, B.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J.; SHERMAN, P.M. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. **N. Engl. J. Med.**, **322**:359-363,1990.

ECCLISSATO, C.; CARVALHO, A.F.; MENDONÇA, S.; PIOVESANA, H.; PEDRAZZOLI, J.J. *Helicobacter pylori* infection and reflux esophagitis in Brazil. **Gastroenterology**, **116**:A153,1999.

GLUPCZYNSKI, Y. The European Multicentre Study Group on antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori*: Results of a multicentre european survey in 1991 of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **11**:777-781,1992.

GOODWIN, C.S.; ARMSTRONG, J.A.; CHILVERS, T. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov, respectively. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **39**:397-405,1989.

GORBACH, S.L. Bismuth therapy in gastrointestinal disease. **Gastroenterology**, **99**:863-875,1990.

GOTOH, A.; KAWAKAMI, Y.; AKAHANE, T.; AKAMATSU, T.; SHIMIZU, T.; KIYOSAWA, K.; KATSUYAMA, T. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates

against agents commonly administered for eradication therapy and the efficacy of chemotherapy. **Microbiol. Immunol.**, **41**:7-12,1997.

GRAHAM, D.Y.; ADAM, E.; REDDY, G.T.; AGARWAL, J.P.; AGARWAL, R.; EVANS, D.J.JR.; MALATY, H.M.; EVANS, D.G. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India: comparison of developing and developed countries. **Dig. Dis. Sci.**, **36**:1084-1088,1991a.

GRAHAM, D.Y.; KLEIN, P.D.; EVANS, D.G.; EVANS, D.J.JR.; ALPERT, L.C.; OPEKUN, A.; JERDACK, G.R.; MORGAN, D.R. Simple noninvasive method to test efficacy of drugs in the eradication of *Helicobacter pylori* infection: the example of combined bismuth subsalicylate and nitrofurantoin. **Am. J. Gastroenterol.**, **89**:1158-1162,1991b.

GRAHAM, D.Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. **Gastroenterology**, **115**:1272-1277,1998.

GRAHAM, D.Y. Therapy of *Helicobacter pylori*: Current status and issues. **Gastroenterology**, **118 (suppl 1)**:S2-S8,2000.

GRAHAM, D.Y.; OSATO, M.S.; HOFFMAN, J.; OPEKUN, A.R.; ANDERSON, S.Y.; EL-ZIMAITY, H.M.T. Furazolidone combination therapies for *Helicobacter pylori* infection in the United States. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **14**:211-215,2000.

GUISSET, M.; COTON, T.; REY, P.; DEBONNE, J.M. *Helicobacter pylori* in developing countries. **Med. Trop.**, **57**: 77-82, 1997.

HAAS, C.E.; NIX, D.E.; SCHENTAG, J.J. *In vitro* selection of resistant *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **34**:1637-1641,1990.

HANSSON, L.E.; NYREN, O.; HSING, A.W.; BERGSTROM, R.; JOSEFSSON, S.; CHOW, W.H.; FRAUMENI, J.F.JR.; ADAMI, H.O. The risk of stomach cancer in

patients with gastric or duodenal ulcer disease. **N. Engl. J. Med.**, **335**:242-249,1996.

HARRIS, A. Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Br. Med. Bull.**, **54**:195-205,1998.

HEATLEY, R.V. **The *Helicobacter pylori* Handbook**. Blackwell Science Ltd, 1995.

HENTSCHEL, E.; BRANDSTATTER, G.; DRAGOSICS, B.; HIRSCHL, A.M.; NEMEC, H.; SCHUTZE, K.; TAUFER, M.; WURZER, H. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. **N. Engl. J. Med.**, **328**:308-312,1993.

HIRAI, M.; AZUMA, T.; ITO, S.; KATO, T.; KOHLI, Y. A proton pump inhibitor, E3810, has antibacterial activity through binding to *Helicobacter pylori*. **J. Gastroenterol.**, **30**:461-464,1995.

HOWDEN, C.W.; FORREST, J.A.; REID, J.L. Effects of single and repeated doses of omeprazole on gastric and pepsin secretion in man. **Gut**, **25**:707-710,1984.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, Lyon, 1994. World Health Organization. Infection with *Helicobacter pylori*. **IARC**,:177-202,1994.

KATOH, M.; SAITO, D.; NODA, T.; YOSHIDA, S.; OGURO, Y.; YAZAKI, Y.; SUGIMURA, T.; TERADA M. *Helicobacter pylori* may be transmitted through gastrofiberscope even after manual Hyamine washing. **Jpn. J. Cancer Res.**, **84**:117-119,1993.

KLIEN, P.D.; GRAHAM, D.Y.; GAILLOUR, A.; OPENKUN, A.R.; SMITH, E.O. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. **Lancet**, **337**:1503-1506,1991.

KUIPERS, E.J.; UYTERLINDE, A.M.; PENA, A.S.; ROOSENDAAL, R.; PALS, G.; NELIS, G.F.; FESTEN, H.P.; MEUWISSEN, S.G. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. **Lancet**, **345**:1525-1528,1995.

KUIPERS, E.J. *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11 (suppl 1)**:71-78,1997.

KWON, D.H.; LEE, M.; KIM, J.J.; KIM, J.G.; EL-ZAATARI, F.A.K.; OSATO, M.S.; GRAHAM, D.Y. Furazolidone- and nitrofurantoin- resistant *Helicobacter pylori*: Prevalence and role of genes involved in metronidazole resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, **45**:306-308,2001.

LAHEIJ, R.J.F.; VAN ROSSUM, L.G.M.; JANSEN, J.B.M.J.; STRAATMAN, H.; VERBEEK, A.L.M. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection-a meta-analysis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **13**:857-864,1999.

LAMBERT, J.R. & MIDOLO, P. The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11 (suppl 1)**:27-33,1997.

LEE, A. The evangelism of *Helicobacter pylori*: How to convince the non-believers and curb the believers. **Zentralbl. Bakt.**, **280**:7-10,1993.

LEE, J.; O'MORAIN, C. Who should be treated for *Helicobacter pylori* infection? A review of consensus conferences and guidelines. **Gastroenterology**, **113**:S99-S106,1997.

LERANG, F.; MOUM, B.; RAGNHILDSTVEIT, E.; HAUG, J.B.; HAUGE, T.; TOLÅS, P.; AUBERT, E.; HENRIKSEN, M.; EFSKIND, P.S.; NICOLAYSEN, K.; SØBERG, T.; ØDEGAARD, A.; BERGE, T. A comparison between omeprazole-based triple therapy and bismuth-based tripple therapy for the treatment of

Helicobacter pylori infection: A prospective randomized 1-yr follow-up study. **Am. J. Gastroenterol.**, **92**:653-658,1997.

LEUNK, R.D.; JOHNSON, P.T.; DAVID, B.C.; KRAFT, W.G.; MORGAN, D.R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.**, **26**:93-99. 1988.

LIND, T.; MÉGRAUD, F.; UNGE,P.; BAYERDÖRFFER, E.; O'MORAIN, C.; SPILLER, R.; VAN ZANTEN, S.V.; BARDHAN, K.D.; HELLBLOM, M.; WRANGSTADH,M.; ZEIJLON, L.; CEDERBERG, C. The MACH2 study: Role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. **Gastroenterol.**, **116**:248-253,1999.

LINGWOOD, C.A.; WOODS, D.E.; KRIVAN, H.C. *Helicobacter pylori*: its lipids receptors and adhesion. **Microbial Ecology in Health and Disease**, **4**:S123. 1991.

LIU, W.Z.; XIAO, S.D.; SHI, Y.; WU, S.M.; ZHANG, D.Z.; XU, W.W.; TYTGAT, G.N. Furazolidone-containing short-term triple therapies are effective in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **13**:317-322,1999.

LONDONG, W.; LONDONG, V.; CEDERBERG, C.; STEFFEN, H. Dose-response study of omeprazole on meal-stimulated gastric acid secretion and gastrin release. **Gastroenterology**, **85**:1373-1378,1983.

LUZZA, F.; MALETTA, M.; IMENEO, M.; MARCHEGGIANO, A.; IANNONI, C.; BIANCONE, L.; PALLONE, F. Salivary specific immunoglobulin G in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. **Am. J. Gastroenterol.**, **90**:1820-1823,1995.

MAGALHÃES, A.F.N.; MACEDO, C.; HAUCK, J.R.; CARVALHAES, A.; DE NUCCI, G.; MAGNA, L.A.; PEDRAZZOLI, JJ. Acid suppression with ranitidine plus

oral triple therapy improve ulcer healing but not *Helicobacter pylori* eradication. **Hepato-Gastroenterology**, **45**:2161-2164,1998.

MALATY, H.M.; GRAHAM, D.Y.; KLIEN, P.D.; EVANS, D.G.; ADAM, E.; EVANS, D.J. Transmission of *Helicobacter pylori* infection: Studies in families of healthy individuals. **Scand. J. Gastroenterol.**, **9**: 927-932,1991.

MALFERTHEINER, P. & HALTER, F. Peptic ulcer pathogenesis. In: MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; MICHETTI, P.; PRICE, A. - **The year in *Helicobacter pylori* 1994. The European *Helicobacter pylori* Study Group**, Current Science, 1994. p.30-34.

MARCHILDON, P.A.; CIOTA, L.M.; ZAMANIYAN, F.Z.; PEACOCK, J.S.; GRAHAM, D.Y. Evaluation of three commercial immunoassays compared with the ¹³C urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infection. **J. Clin. Microbiol.**, **34**:1147-1152,1996.

MARSHALL, B.J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, **1**:1273-1275,1983.

MARSHALL, B.J. & WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, **16**:1311-1314,1984.

MARSHALL, B.J.; DUNDON, W.G.; BEESLEY, S.M.; SMYTH, C.J. *Helicobacter pylori*: A conundrum of genetic diversity. **Microbiology**, **144**:2925-2939,1998.

MCGOWAN, C.C.; COVER, T.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic implications. **Gastroenterology**, **110**:926-938,1996.

MCCOLL, K.E.L. & DELTENRE, M. Gastric Physiology. In: MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; MICHETTI, P.; PRICE, A. - **The year in *Helicobacter pylori* 1994.**

The European *Helicobacter pylori* Study Group, Current Science, 1994. p.22-26.

MÉGRAUD, F. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. **British Medical Bulletin**, **54**:207-215,1998.

MÉGRAUD, F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, **115**:1278-82,1998.

MÉGRAUD, F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11 (suppl. 1)**:43-53,1997.

MENDALL, M.A.; GOGGIN, P.M.; MOLINEAUX, N.; LEVY, J.; TOOSY, T.; STRACHAN, D.; NORTHFIELD, T.C. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. **Lancet**, **339**:896-897,1992.

MENDONÇA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M.S.; GODOY, A.P.O.; GUERZONI, R.A.; DEGGER, M.; PEDRAZZOLI, J.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxycillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, **5**:79-83,2000.

MITCHELL, H.M.; LI, Y.Y.; HU, P.J.; LIU, Q.; CHEN, M.; DU, G.G.; WANG, Z.J.; LEE, A.; HAZELL, S.L. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: Identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J. Infect. Dis.**, **166**:149-153,1992.

MORAN, A.P. & WADSTRÖM, T. Bacterial pathogenic factors. In: MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; MICHETTI, P.; PRICE, A. - **The year in *Helicobacter pylori* 1994**. The European *Helicobacter pylori* Study Group, Current Science, 1994. p.17-21.

MUÑOZ, N.; VIVAS, J.; BUIATTI, E.; KATO, I.; OLIVER, W. Chemoprevention trial on precancerous lesions of the stomach in Venezuela: Summary of study design and baseline data. **IARC Sci. Publ.**, **139**:125-133,1996.

NIH CONSENSUS CONFERENCE. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, **272**:65-69,1994.

PAJARES, J.M. *H. pylori* infection: Its role in chronic gastritis, carcinoma and peptic ulcer. **Hepato-Gastroenterology**, **42**:827-841,1995.

PARSONNET, J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **9**:45-51,1995.

PARSONNET, J. *Helicobacter pylori* in the stomach- a paradox unmasked. **N. Engl. J. Med.**, **335**:278-280,1996.

PATHAK, C.M.; BHASIN, D.K.; PANIGRAHI, D.; GOEL, R.C. Evaluation of ¹⁴C-urinary excretion and its comparison with (¹⁴C) in breath after ¹⁴C-urea administration in *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol.**, **89**:734-738,1994.

PEEK, R.M.; THOMPSON, S.A.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; MILLER, G.G. Expression of a novel ulcer-associated *H. pylori* gene, *iceA*, following adherence to gastric epithelial cells. **Gastroenterology**, **110** (suppl): A225,1996.

PEEK, R.M.; THOMPSON, S.A.; DONAHUE, J.P.; THAM, T.K.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; MILLER, G.G. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. **Proc. Assoc. Am. Phys.**, **110**:531-544,1998.

PENSTON, J.G. Review article: clinical aspects of *Helicobacter pylori* eradication therapy in peptic ulcer disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **10**:469-86,1996.

PETERSON, W.L. & GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori*. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B.F.; SLEISENGER, M.H. - **Gastrointestinal and liver disease**. 6th ed., Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A., WB Saunders Co., 1998. p.604-619.

PEURA, D.A. & GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori*: consensus reached: Peptic ulcer is on the way to becoming an historic disease. **Am. J. Gastroenterol.**, **89**:1137-1139, 1994.

POUNDER, R.E. & WILLIAMS, M.P. The treatment of *Helicobacter pylori*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11 (suppl 1)**:35-41, 1997.

QUEIROZ, D.M.; COIMBRA, R.S.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; ALVES, V.M.; OLIVEIRA, C.A.; LIMA JUNIOR, G.F. Metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in a developing country. **Am. J. Gastroenterol.**, **88**:322-333, 1993.

ROBINSON, M. Review article: Current perspectives on hypergastrinaemia and enterochromaffin-like-cell hyperplasia. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **13 (suppl 5)**:5-10, 1999.

ROLLAN, A.; GIANCASPERO, R.; FUSTER, F.; ACEVEDO, C.; FIGUEROA, C.; HOLA, K.; SCHULZ, M.; DUARTE, I. The long-term reinfection rate and the course of duodenal ulcer disease after eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. **Am. J. Gastroenterol.**, **1**:50-56, 2000.

SACK, R.B. & GYR, K. *Helicobacter pylori* in developing world. **Lancet**, **341**:1274-1275, 1993.

SCHEYNIUS, A. & ENGSTRAND, L. Gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori*-associates gastritis express HLA-DR but not ICAM I. **Scand. J. Immunol.**, **33**:237, 1991.

SEGURA, A.M.; GUTIÉRREZ, O.; OTERO, W.; ANGEL, A.; GENTA, R.M.; GRAHAM, D.Y. Furazolidone, amoxycillin, bismuth triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11**:529-532,1997.

SIMSEK, H.; KADAYIFCI, A.; TATAR, G. Low eradication rates of *Helicobacter pylori* with omeprazole plus amoxycillin combination in a Turkish population. **Am. J. Gastroenterol.**, **91**:1062,1996.

SITAS, R.; FORMAN, D.; YARNELL, J.W.; BURR, M.L.; ELWOOD, P.C.; PEDLEY, S.; MARKS, K.J. *Helicobacter pylori* infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. **Gut**, **32**:25-28,1991.

SMITH, M.A. & EDWARDS, D.I. Redox potencial and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* nitroheterocyclic drugs. **J. Antimicrob. Chemoter.**, **35**:751-764,1995.

TAKATA, T.; FUJIMOTO, S.; ANZAI, K.; SHIROTANI, T.; OKADA, M.; SAWAE, Y.; ONO, J. Analysis of the expression of CagA and VacA and the vacuolating activity in 167 isolates from patients with either peptic ulcers or non-ulcer dyspepsia. **Am. J. Gastroenterology**, **93**: 30-34,1998.

TAYLOR, D.N. & BLASER, M.J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol. Rev.**, **13**:42-59,1991.

TELFORD, J.L.; GHIARA, P.; DELL'ORCO, M.; COMANDUCCI, M.; BURRONI, D.; BUGNOLI, M.; TECCE, M.F.; CENSINI, S.; COVACCI, A.; XIANG, Z. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. **J. Exp. Med.**, **179**:1653-1658,1994.

THE MAASTRICH CONSENSUS REPORT, 1997, Maastricht. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, **41**:8-13,1997.

THOMAS, J.E. & PRETOLANI, S. Epidemiology of infection. In: MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; MICHETTI, P.; PRICE, A. - **The year in *Helicobacter pylori* 1994. The European *Helicobacter pylori* Study Group**, Current Science, 1994. p.6-11.

TOMB, J.F.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A.R.; CLAYTON, R.A.; SUTTON, G.G.; FLEISCHMANN, R.D.; KETCHUM, K.A.; KLENK, H.P.; GILL, S.; DOUGHERTY, B.A.; NELSON, K.; QUACKENBUSH, J.; ZHOU, L.; KIRKNESS, E.F.; PETERSON, S.; LOFTUS, B.; RICHARDSON, D.; DODSON, R.; KHALAK, H.G.; GLODEK, A.; MCKENNEY, K.; FITZGERALD, L.M.; LEE, N.; ADAMS, M.D.; VENTER, J.C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, **388**:539-547,1997.

TUMMURU, M.K.; SHARMA, S.A.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, **18**:867-876,1995.

TYTGAT, G.N.J. & NOACH, L.A. *H. pylori* eradication. In: ***Helicobacter pylori*, basic mechanisms to clinical cure**. Kluwer Academic Publishers, 1993.

VAN DER ENDE, A.; VAN DER HULST, R.W.M.; DANKERT, J.; TYTGAT, G.N.J. Reinfection versus recrudescence in *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11 (suppl 1)**:55-61,1997.

VAN DER HULST, R.W.M.; RAUWS, E.A.J.; KÖYÜ, B. *H. pylori* reinfection after successful eradication analysed by RAPD or RFLP. **Gastroenterology**, **110**:A204,1996.

VAN DER MEER, S.B.; FORGET, P.P.; LOFFELD, R.J.; STOBBERINGH, E.; KUIJTEN, R.H.; ARENDS J.W. The prevalence of *Helicobacter pylori* serum antibodies in children with recurrent abdominal pain. **Eur. J. Pediatr.**, **151**:799-801,1992.

VAN ZWET, A.A.; THIJS, J.C.; KOOISTRA-SMID, A.M.; SCHIRM, J.; SNIJDER, J.A. Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. **J. Clin. Microbiol.**, **32**:1346-1348,1994.

VAN ZWET, A.A.; THIJS, J.C.; DE GRAAF, B. Explanations for high rates of eradication with triple therapy using metronidazole in patients harboring metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* strains. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, **39**:250-252,1995.

VERDU, E.F.; FRASER, R.; ARMSTRONG, D.; BLUM, A.L. Effects of omeprazole and lansoprazole on 24-hour intragastric pH in *Helicobacter pylori*-positive volunteers. **Scand. J. Gastroenterol.**, **29**:1065-1069,1994.

WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, i:1273,1983.

WEEL, J.F.L.; VAN DER HULST, R.W.; GERRITS, Y.; ROORDA, P.; FELLER, M.; DANKERT, J.; TYTGAT, G.N.; VAN DER ENDE, A. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. **J. Infect. Dis.**, **173**:1171-1175,1996.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39**:577-585,1995.

WESTON, A.P.; CAMPBELL, D.R.; BARTHOLOMEW, W. Urine IgG serology to detect gastric *Helicobacter pylori* comparison to serum IgG and IgA serology and Giemsa stained gastric biopsies. **Gastroenterol.**, **108**:A257,1995.

WYETH, J.W.; POUNDER, R.E.; DUGGAN, A.E.; O'MORAIN, C.A.; SCHAUFELBERGER, H.D.; DE KOSTER, E.H.; RAUWS, E.A.; BARDAHAN, K.D.; GILVARRY, J.; BUCKLEY, M.J.; GUMMETT, P.A.; LOGAN, R.P. The safety and

efficacy of ranitidine bismuth citrate in combination with antibiotics for the eradication of *Helicobacter pylori*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **10**:623- 630,1996.

XIAO, S.D.; LIU, W.Z.; HU, P.J.; XIA, D.H.; TYTGAT, G.N. High cure rate of *Helicobacter pylori* infection using tripotassium dicitrate bismuthate, furazolidone and clarithromycin triple therapy for 1 week. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **13**:311-315,1999.

ZHENG, Z.T. & WANG, Y.B. Treatment of peptic ulcer disease with furazolidone. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, **7**:533-537,1992.

9. ANEXOS

ANEXO 1 – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *Helicobacter*

**INCREASED PRIMARY RESISTANCE TO RECOMMENDED ANTIBIOTICS
NEGATIVELY AFFECTS *Helicobacter pylori* ERADICATION**

*Ecclissato C, Marchioretto MAM, Mendonça S, Godoy APO,
Guersoni RA, Deguer M, Piovesan H, Ferraz JGP*, Pedrazzoli Jr J*

Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit,
São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil,
*Discipline of Gastroenterology and Gastrocentro, Department of Internal Medicine,
Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Running Title: *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics

Acknowledgements: This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (to J.P.Jr). Dr. Ecclissato and Dr. Marchioretto are supported by a fellowship from FAPESP. Lansoprazole/clarithromycin and bismuth subcitrate were a generous gift from Abbott, Brazil and Farmasa, Brazil, respectively.

Correspondence: Dr. José Pedrazzoli Júnior
Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit
São Francisco University Medical School
Av. São Francisco de Assis 218
12916-900, Bragança Paulista, SP, Brazil
Fax: 55-11-40341825
E-mail: pedrazz@dglnet.com.br

ABSTRACT

Objective: To evaluate the efficacy of two commonly employed treatments for *Helicobacter pylori* infection and the impact of bacterial resistance to antibiotics on eradication rate. **Methods:** Ninety-two consecutive *Helicobacter pylori*-positive patients with active peptic ulcer disease were randomly enrolled to receive a 7-day treatment with either lansoprazole 30mg plus amoxicillin 1g and clarithromycin 500mg (all b.i.d., Group A, n=46); or bismuth subcitrate 125mg q.i.d. plus tetracycline 500mg q.i.d and furazolidone 200mg b.i.d. (Group B, n=46) *Helicobacter pylori* status was reassessed 30 days following completion of the therapy and bacterial resistance to the antibiotics was investigated using an *in vitro* assay. **Results:** Five patients from each study group were lost to follow up. Both treatments resulted in similar *Helicobacter pylori* eradication rate: 66% - 60% (per protocol), 59% - 52% (intention-to-treat) in Group A and B, respectively (N.S.). However, eradication improved to 79% in the absence of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin or amoxicillin. **Conclusion:** Primary resistance to clarithromycin or amoxicillin may underscore a potentially serious problem for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. Testing for bacterial resistance may become necessary to improve therapeutic efficacy.

Key words: clarithromycin, amoxicillin, furazolidone, *Helicobacter pylori*, eradication, antibiotic resistance.

Helicobacter pylori colonization of the gastric mucosa has been considered the most common chronic bacterial infection in humans. It has been reported that over 50% of the world's population is infected. It produces progressive gastric damage and it has been associated with gastroduodenal ulcers, adenocarcinoma and lymphoma of the stomach. Most importantly, *Helicobacter pylori* eradication modifies the natural history of peptic ulcer disease, and the bacteria is considered a type I carcinogen (1,2).

Helicobacter pylori eradication has proved to be a challenge to physicians and scientists. Despite colonizing an organ with a hostile pH, it protects itself by, among several mechanisms, attaching to the surface of gastric epithelial cells within the mucous layer where a higher pH is found. Moreover, its urease activity can augment local pH, creating a suitable microenvironment for survival. Access of antimicrobials to this site is not fully explored, and the pharmacological properties of these drugs regarding their effects on *Helicobacter pylori* are not completely understood. It may be restricted (3-4) or affected by acid blockade, or even by the bacteria's presence itself (5-6). Eradication failure has been associated with several reasons, including inadequate choice of drugs – most regimens are based on trial and error, lack of adequate knowledge of best therapeutic options, poor patient's adherence to treatment and primary *Helicobacter pylori* resistance to the most commonly employed antibiotics – a major concern (7-11).

Variability of *Helicobacter pylori* resistance to several antibiotics including metronidazole, amoxicillin and others has been reported. It may be dependent on

the geographic areas studied (developed vs. underdeveloped regions or countries) where sanitary conditions, access to health care, education and information are not uniform. Abusive use of antibiotics for the treatment of several conditions, a widespread issue, may also play a role, as well as a general lack of patient's perception of the importance of compliance for a successful eradication (12-20).

The estimated rate of *Helicobacter pylori* infection among the general population is higher in developing countries compared to a lower prevalence in countries such as United States (21-22). However, most therapeutic schedules have been proposed and evaluated in developed countries (7-8-23), which may not reflect several local differences that may be potentially important for the successful eradication of the bacteria. Therefore, the aim of this study was to asses the efficacy of two currently accepted and recommended therapeutic regimens aiming eradication of *Helicobacter pylori* infection for the treatment of active peptic ulcer disease, and to focus on one of the aspects of treatment failure: primary *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics.

METHODS

Ninety-two consecutive individuals with *Helicobacter pylori* infection and active gastroduodenal ulcer disease were included in this study. Peptic ulcers were detected during upper gastrointestinal endoscopy and *Helicobacter pylori* infection was determined using rapid urease test in one antral biopsy (Probac, São Paulo, Brazil), histological evaluation (H&E and Giemsa staining) and culture using two samples (one for each method) from antrum, corpus and fundus. Exclusion criteria were presence of malignancy at endoscopy, prior gastroduodenal surgery or *Helicobacter pylori* treatment, use of antibiotics or gastric acid suppression drugs in the previous month, and pregnancy or lactation. Patients who did not return to follow-up were also excluded from the study. They were randomly assigned to two treatment groups: (A) lansoprazole 30 mg b.i.d. (Ogastro[®], Abbott, Brazil), plus amoxicillin 1000 mg b.i.d. (Amoxil[®], Smith Kline Beecham, Brazil) and clarithromycin 500 mg b.i.d. (Klaricid[®], Abbott, Brazil); and (B) bismuth subcitrate 125 mg q.i.d. (Peptulan[®], Farmasa, Brazil) plus tetracycline 500 q.i.d. (Terramicina[®], Pfizer, Brazil) and furazolidone 200 mg b.i.d. (Giarlan[®], UCI Farma, Brazil). The treatment period consisted of 7 days for both groups. All medications were given to the patients and no other ulcer healing drugs were allowed during the study. Patients were informed in detail about the necessity of the treatment aiming *Helicobacter pylori* eradication, the importance of compliance and the side effects expected. Verbal explanation and printed instructions were given to the patients to assist them in taking the drugs properly. Each patient signed a written informed consent prior to entering the study. The protocol was approved by the

local Ethics Committee and was conducted in accordance to the Declaration of Helsinki.

Follow-up

The patients were re-evaluated at the end of therapy. Compliance was assessed by interview at the end of the treatment, when patients were asked if all medication was used. They were subjected to a second endoscopic examination 30 days following successful completion of the therapy in order to assess *Helicobacter pylori* eradication and ulcer healing. Healing of peptic lesions was considered as absence of ulcers in previously injured mucosa, or the presence of a definite scar. Biopsies from antrum, corpus and fundus were taken to determine the presence of *Helicobacter pylori* as previously described. Eradication was defined by a negative culture, histology and urease test. The endoscopist, pathologist and microbiologist involved in the study were blinded to the treatment the patients had received.

Bacterial strains and determination of antimicrobial susceptibility

Biopsy specimens obtained during endoscopy were immediately transported in transport medium [brain heart infusion (BHI)-glycerol] to our microbiology laboratory. *Helicobacter pylori* isolates were obtained by inoculating the specimens into selective (BHI agar, 10% sheep blood, 10 mg/L vancomycin, 20mg/L nalidixic acid, 2mg/L amphoterycin B, 40 mg/L 2,3,5, triphenyl-tetrazolium chloride – TTC) and non-selective (BHI agar) media and incubated for 3-7 days at 37°C under microaerophilic conditions (8-10% CO₂, 5-6% O₂, 80-85% N₂, at 98% humidity). The identity of the colonies was confirmed by Gram staining, oxidase,

catalase and urease production. The *Helicobacter pylori* strains were stored at -80°C in BHI broth containing 30% glycerol.

Determination of antimicrobial susceptibility

Thawed isolates were sub-cultured in 10% sheep blood-BHI agar and incubated at 37°C under microaerophilic conditions. The isolates were selected from the best growing strain from each positive patient. They were suspended in BHI broth (pH 7.2) and adjusted to turbidity equivalent to that of a 0.5 McFarland standard (approximately $1,5 \times 10^8$ cfu/ml). The bacteria were then inoculated on to the agar plates with a microplate replicator device (Boekel, Pennsylvania, USA) delivering 1 µl samples for a final inoculum of 10^5 cfu. The minimum inhibitory concentration (MIC) for clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and furazolidone was defined as the lowest antimicrobial concentration preventing visible bacterial growth and determined by agar dilution method with final concentration ranging from 64 to 0.125 µg/ml. The agar plates were incubated at 37°C under microaerophilic conditions for 72 h. Primary resistance of *Helicobacter pylori* isolates from gastric samples of untreated patients was defined according to the observed growing curves from strains obtained from all patients. All tests were performed in duplicate. Secondary resistance was defined when *Helicobacter pylori* isolates obtained from unsuccessfully eradicated patients had higher levels of MIC for each antibiotic than those previously described.

Statistical analysis

Eradication of *Helicobacter pylori* was the primary measure of efficacy. Eradication rate was assessed according to intention-to-treat and per protocol

analysis. The data was analysed using Student's "*t*" test. A *p* value of less than 0.05 was taken to indicate statistical significance.

Reagents

2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride, amphoterycin B, vancomycin, nalidixic acid, amoxicillin, tetracycline, furazolidone, and clarithromycin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Brain heart infusion – BHI agar was purchased from DIFCO (Maryland, USA). All other reagents employed in this study were of analytical grade.

RESULTS

There were no differences between the groups with respect to age [42 yr (23-73) in group A vs. 41 yr (20-70) in group B], sex (27 males in group A vs. 35 males in group B) and smoking (17 smokers in group A vs. 18 smokers in group B). The majority of patients from both groups belong to a low economic stratum. Compliance assessed by post-therapy interview was considered to be good, as determined by a positive response by the patients to the use of over 80% of the medication supplied. Five patients from each study group were lost to follow up. Side effects were considered to be mild by individuals from both groups, except by one assigned to Group B that could not complete the treatment. This patient was also excluded from the per protocol analysis. A positive detection of *Helicobacter pylori* was obtained in 82% of antrum biopsies, 92% in antrum plus corpus biopsies and 100% of antrum plus corpus and fundus biopsies, with 87%, 90% and 94% sensitivity for rapid urease, histology and culture methods, respectively.

Helicobacter pylori was not eradicated in 30 of the 81 patients included in the per protocol analysis. In this particular set of patients, a 53%, 86% and 90% sensitivity for the urease test, histology and culture was determined, respectively. It is of note that 76.6% of patients were *Helicobacter pylori*-positive using antral biopsies only, compared to 100% when antral, corpus plus fundus samples were analyzed. A 66% (27/41) and 60% (24/40) *Helicobacter pylori* eradication was observed in Group A and B patients, respectively ($p>0.05$, N.S.). Similarly, there were no differences among the treatment groups when the patients were assessed on an intention-to-treat basis, with 59% eradication (27/46) in Group A and 52%

(24/46) in Group B, ($p>0.05$, N.S.). Healing rates were comparable among groups A and B by per protocol (90% and 87%) or intention-to-treat analysis (80% and 76%). Ulcer healing was observed in all patients with successful *Helicobacter pylori* eradication.

Successful eradication in Group A patients was markedly dependent on bacterial resistance to antibiotics. Isolates were considered to be resistant when MIC was $>2\mu\text{g/ml}$ (tetracycline), $>16\mu\text{g/ml}$ (amoxicillin), $>2\mu\text{g/ml}$ (clarithromycin) and $>2\mu\text{g/ml}$ (furazolidone, Figure 1). *Helicobacter pylori* resistant strains to amoxicillin or clarithromycin were detected in 8 (19.5%) and 12 (29.3%) patients, with combined resistance to both drugs being detected in 3 patients (7.3%, Tables 1-2). A 79% (19/24) *Helicobacter pylori* eradication rate could be observed in the absence of resistance to these antibiotics (Figure 2). However, eradication rate was reduced by half when resistance to at least one antibiotic was detected (Table 2, Figure 2).

Primary *Helicobacter pylori* resistance to furazolidone was detected in 3 (7.5%) Group B patients. Resistance to tetracycline was not detected (Tables 1-2). Despite the low number of patients, eradication was reduced by half when resistance to furazolidone was found (Table 2, Figure 2). Secondary *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and amoxicillin developed in 3 and 1 subjects in Group A, respectively. One Group B patient developed secondary resistance to furazolidone. No secondary resistance to tetracycline was observed (Table 1).

DISCUSSION

The increasing knowledge on the impact of *Helicobacter pylori* infection on human disease resulted in several treatment guidelines. For example, *Helicobacter pylori* eradication is strongly recommended for the treatment of peptic ulcer disease, bleeding peptic ulcer, low-grade gastric lymphoma, severe gastritis and following resection of early gastric cancer (9). Recently, prescription of antibiotics to all dyspeptic patients tested positive for *Helicobacter pylori* in areas with high incidence of peptic ulcer was considered to be cost-effective compared to investigating all dyspeptic patients in order to identify those with ulcers (7). The most critical variables predicting increased prevalence are low socio-economic strata, substandard sanitary and/or living conditions, consumption of untreated/contaminated water and presence of children in the family. These conditions are ordinarily found in developing countries, including Brazil, resulting in high prevalence of *Helicobacter pylori* infection (22, 24-34).

The selection of an adequate eradication regimen should consider simplicity, adverse effects, antimicrobial sensitivity and cost (3,22). Since the ideal treatment is still lacking, many different therapies have been proposed, and ~90% eradication effectiveness is desirable. The best suggested therapies currently available consist of proton pump inhibitor- or bismuth-based regimen associated with two antibiotics (3,7,36,37). Bismuth-based triple therapy is not expensive and delivers high cure rates, being used worldwide (7-10). However, the large number of pills taken daily limits its use, with substantial side effects that may reduce compliance and tolerability (38). As result, several guidelines recommend proton pump

inhibitor triple therapy as first line treatment (37,39,40), offering convenience and tolerability, but at a higher cost and with potentially increasing antibiotic resistance (11,41,42).

In this study, we found that treatment of patients diagnosed with active peptic ulcer disease associated with *Helicobacter pylori* infection with two highly recommended therapies such as lansoprazole plus amoxicillin and clarithromycin (LAC), or bismuth subcitrate plus tetracycline and furazolidone (BTF), considered to be effective in a prior Brazilian study (43), resulted in very low eradication success (<70%). However, 79% *Helicobacter pylori* eradication was observed in the absence of bacterial resistance to either clarithromycin or amoxicillin. More importantly, our results indicate that bacterial resistance to these antibiotics can reduce *Helicobacter pylori* eradication by ~50%. Moreover, primary resistance to either amoxicillin or clarithromycin was observed in 48.7% of LAC-treated patients, of whom successful eradication was obtained in only 40%. A Type II error resulting from the analysis of this reduced subset of patients cannot be ruled out, but one must consider that this data suggests that detection of bacterial resistance prior to starting therapy could significantly improve eradication rates.

Resistance to amoxicillin was comparable to that reported previously by our group (29%) in dyspeptic patients (19). On the other hand, clarithromycin resistance increased dramatically from 7% to 29.3%. Differences among groups studied (peptic ulcer vs. non-ulcer dyspepsia), high prevalence of *Helicobacter pylori* infection among the subjects, and the probable widespread use of antibiotics could account for this observation. Whether the patients included in this study had

or not increased prior exposure to antibiotics remains to be an important question, and difficult to be assessed.

Furazolidone has been used recently as an alternative drug in response to a high prevalence of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* strains (34,43-47). Magalhães et. al reported an 84% eradication rate using bismuth, tetracycline and furazolidone (43). Low bacterial resistance to furazolidone was observed in the present study, as was determined to tetracycline, being similar to that reported earlier (19). Secondary resistance to the drugs was observed in one patient only. Despite these findings, this therapeutic schedule failed in our hands. Contrary to the findings of LAC-treated patients, compliance was likely the major factor involved, despite the verbal explanation and printed instructions given prior to treatment, and the over 80% use of the medication supplied reported by the patients. One could argue that interview assessment for adherence to the therapy could be inadequate. However, pill counts at the end of treatment can also be a source of error, and the only truly reliable method would be the administration of the drug by the study personnell. The development of a single drug for *Helicobacter pylori* eradication could possibly resolve this situation.

The lack of comparative data on eradication therapies from developed and developing regions representative of low and high prevalence of infection may result in increasing treatment failure. Our results emphasize that caution should be exercised before suggesting an eradication therapy to be universally employed, or even a “test and treat” strategy. They also support the view that resistance may underscore a potentially serious, unrecognised problem in different geographical

regions. Moreover, detection of bacterial resistance to antibiotics prior to commencing therapy could improve therapeutic success. The notion of the development of a “super” *Helicobacter pylori*, resistant to most antibiotics, should increase the awareness of physicians and scientists on the need for a rational approach to this particular infection.

REFERENCES

1. American Digestive Health Foundation. The report of the Digestive Health Initiative International Update Conference on *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1997; 113: S4-S8.
2. Graham DY. Editorial: Can therapy ever be denied for *Helicobacter pylori* infection? Gastroenterology 1997; 113: S113-S117.
3. Harris A. Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori* infection. Br Med Bull 1998; 54: 195-205.
4. Graham DY. Therapy of *Helicobacter pylori*: Current status and issues. Gastroenterology 2000; 118: S2-S8.
5. Calafatti AS, Santos A, Da Silva CMF, et al. Transfer of metronidazole to gastric juice: impact of *Helicobacter pylori* infection and omeprazole. Scand J Gastroenterol, in press.
6. Pedrazzoli JJ, Calafatti SA, Ortiz RAM, et al. Scand J Gastroenterol Transfer of clarithromycin to gastric juice is enhanced by omeprazole in *Helicobacter pylori*-infected individuals. Gastroenterology 2000; 118 (suppl 2):A500.
7. de Boer WA, Tytgat NJ. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. BMJ 2000; 320: 31-34.
8. Laheij RJF, Van Rossum LGM, Jansen JBMJ, Straatman H, Verbeek ALM. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection-a meta-analysis. Aliment Pharmacol Ther 1999; 13:857-864.
9. Lee J, O'Morain C. Who should be treated for *Helicobacter pylori* infection? A review of Consensus Conferences and guidelines. Gastroenterology 1997; 113: S99-S106.

10. Breuer T, Goodman KJ, Malaty HM, Sudhop T, Graham DY. How do clinicians practicing in the US manage *Helicobacter pylori* infection. Am J gastroenterol 1998; 93: 553-556.
11. Graham DY. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. Gastroenterology 1998; 115: 1272-1277.
12. Siehoff TB, Pietz SB, Boersch U, Labenz J. *Helicobacter pylori*: Praetherapeutische resistanzlage in Deutschland (Ruhrgebiet). Z Gastroenterologie 1997; 35: 165-169.
13. Gotoh A, Kawakami Y, Akahane T, et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates against agents commonly administered for eradication therapy and efficacy of chemotherapy. Microbiol Immunol 1997; 41: 7-12.
14. Bartolomé OL, Vasallo AM, Armengol JAR, de la Garza JJP. Diagnóstico microbiológico de *Helicobacter pylori* y su resistencia a los antimicrobianos. Rev Clin Esp 1998; 7: 420-423.
15. Rosário M, Caetano JM, Pessanha MA, Marote G, da Silva JÁ, Caetano JAM. Perfil de resistência aos macrolídeos imidazóis do *Helicobacter pylori* numa amostra da população portuguesa. Acta Med Port 1998; 11: 1089-1072.
16. Loo VG, Fallone CA, De Souza ED, Lavalée J, Barkun NA. In-vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to ampicillin, clarithromycin, metronidazole and omeprazole. JAC 1997; 40: 881-883.
17. Debets-Ossenkopp YJ, Herscheid, Pot GJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Vanderbroucke-Grauls MJE. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in the Netherlands. JAC 1999; 43: 511-515.

18. Queiroz DMM, Coimbra RS, Mendes EN, et al. Metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in a developing country. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 322-333.
19. Mendonça S, Ecclissato C, Sartori MS, Godoy APO, Guerzoni RA, Degger M, Pedrazzoli JJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter* 2000;5:79-83.
20. Dore MP, Piana A, Carta M, et al. Amoxicillin resistance is one reason for failure of amoxicillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 635-649.
21. Cave RD. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* 1997; 113: S9-S14.
22. Go MF, Vakil N. *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Perspectives in Gastroenterology* 1999; 2: 141-153.
23. Lind T, Mégraud F, Unge P, Bayerdoerffer E, O'Morain C, Spiller R, Van Zanten SJV, Bardhan KD, Hellblom M, Wrangstadh M, Zeijlon L, Cederberg C. The MACH 2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology* 1999; 116: 248-254.
24. Graham DY, Adam E, Reddy GT, et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India: comparison of developing and developed countries. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1084-1088.
25. Sitas R, Forman D, Yarnell JW, et al. *Helicobacter pylori* infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. *Gut* 1991; 32: 25-28.

26. Nowotny U, Heilmann KI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Leber Magen Darm 1990; 20: 183-186.
27. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, et al. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. Lancet 1992; 339: 896-897.
28. Mitchell HM, Li YY, Hu PJ, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: Identification of early childhood as the critical period for acquisition. J Infect Dis 1992; 166: 149-153.
29. Teh BH, Lin JT, Pan WH, et al. Seroprevalence and associated risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Taiwan. Anticancer Res 1994; 14: 1389-1392.
30. Drumm B, PerezPerez GI, Blaser MJ, Sherman PM. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. N Engl Med J 1990; 322: 359-363.
31. Malaty HM, Graham DY, Klien PD, Evans DG, Adam E, Evans DJ Jr. Transmission of *Helicobacter pylori* infection: studies in families of healthy individuals. Scand J Gastroenterol 1991; 9: 927-932.
32. Patel P, Mendall MA, Khulusi S, Northfield TC, Strachan DP. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. Br Med J 1994; 309: 1119-1123.
33. Klien PD, Graham DY, Gaillour A, Openkun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Lancet 1991; 337: 1503-1506.
34. Ecclissato C, Carvalho AF, Mendonça S, Piovesana H, Pedrazzoli JJ. *Helicobacter pylori* infection and reflux esophagitis in Brazil. Gastroenterology 1999; 116: A153.

35. Penston JG, Mistry KR. Eradication of *Helicobacter pylori* in general practice. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 139-145.
36. Graham DY, Osato MS, Hoffman J, et al. Furazolidone combination therapies for *Helicobacter pylori* infection in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 211-215.
37. Carvalhaes A, Magalhães AFN, Cordeiro F, et al. Terapêutica e epidemiologia da infecção por "*H. pylori*": recomendações do primeiro seminário promovido pelo Núcleo Brasileiro para o Estudo do "*Helicobacter pylori*". *GED* 1997; 99-100.
38. Chiba N, Hunt RH. Drug therapy of *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. In Scarpignato C, Bianchi-Porro G (eds). *Clinical pharmacology and therapy of Helicobacter pylori* infection. *Prog Basic Clin Pharmacol*. Basel, Karger, 1999, vol 111, 227-268.
39. Penston JG. Review article: clinical aspects of *Helicobacter pylori* eradication therapy in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 469-86.
40. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastrich consensus report. *Gut* 1997; 41: 8-13.
41. Megraud F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 1278-82.
42. Al-Assi MT, Ramirez FC, Lew GM, Genta RM, Graham DY. Clarithromycin, tetracyclin and bismuth: a new non-metronidazole therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1994, 89: 1203-1205.

43. Magalhães AFN, Macedo C, Hauck JR, et al. Acid suppression with ranitidine plus oral triple therapy improve ulcer healing but not *Helicobacter pylori* eradication. Hepato-Gastroenterology 1998; 45: 2161-2164.
44. Xiao SD, Liu WZ, Hu PJ, et al. High cure rate of *Helicobacter pylori* infection using tripotassium dicitrate bismuthate, furazolidone and clarithromycin triple therapy for 1 week. Aliment Pharmacol Ther 1999; 13: 311-315.
45. Liu WZ, Xiao SD, Shi Y, et al. Furazolidone-containing short-term triple therapies are effective in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 1999; 13: 317-322.
46. de Boer WA, Tytgat NJ. The best therapy for *Helicobacter pylori* infection: should efficacy or side-effect profile determine our choice? Scand J Gastroenterol 1995; 30: 401-407.
47. Lerang F, Moum B, Ragnhildstveit E, et al. A comparison between omeprazole-based tripple therapy and bismuth-based tripple therapy for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: a propsective randomized 1-year follow-up study. Am J Gastroenterol 1997; 92: 653-658.
48. W. A. de Boer, R. J. X. M. van Etten, P. M. Schneeberger, and G. N. J. Tytgat. A Single Drug for *Helicobacter pylori* Infection: First Results With a New Bismuth Triple Monocapsule. Amer J Gastroenterol 2000; 95: 641-645

Figure Legends

Figure 1: Distribution of minimum inhibitory concentration - MIC ($\mu\text{g/ml}$) to amoxicillin (AMO), clarithromycin (CLA), tetracycline (TET) and furazolidone (FUR) among *Helicobacter pylori* strains isolated from all patients included in the study before treatment.

Figure 2: Effect of bacterial resistance to clarithromycin (CLA), amoxicillin (AMO) and furazolidone (FUR) on *Helicobacter pylori* eradication rate in lansoprazole/CLA/AMO- and bismuth/tetracycline/FUR-treated patients (Group A and B, respectively).

Table 1: Primary and secondary *H. pylori* resistance to antibiotics according to therapeutic groups

ANTIMICROBIAL AGENTS	<i>H. pylori</i> RESISTANCE (NUMBER OF PATIENTS)	
	Primary	Secondary
Amoxicillin	8	1
Clarithromycin	12	3
Amoxicillin + clarithromycin	3	0
Tetracycline	0	0
Furazolidone	3	1
Tetracycline + furazolidone	0	0

Table 2: Effect of eradication therapy on according to *Helicobacter pylori* resistance pattern in Group A and B.

Group	Primary Resistance	Patients (n)	Eradicated (n)	Not Eradicated (n)	p*
A	None	24	19	5	
	CLA	12	5	7	0.056
	AMO	8	3	5	0.07
	CLA and AMO	3	0	3	0.001
	CLA or AMO	17	8	9	0.04
B	None	37	23	14	
	FUR	3	1	2	0.5

* comparison vs. no resistance group

CLA (clarithromycin), AMO (amoxicillin), FUR (furazolidone)

Figure 1 (↑)

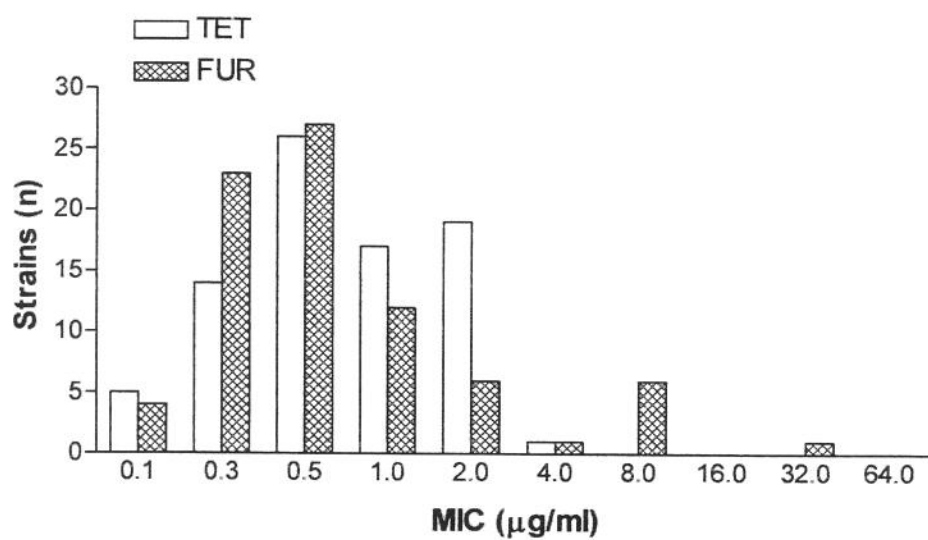
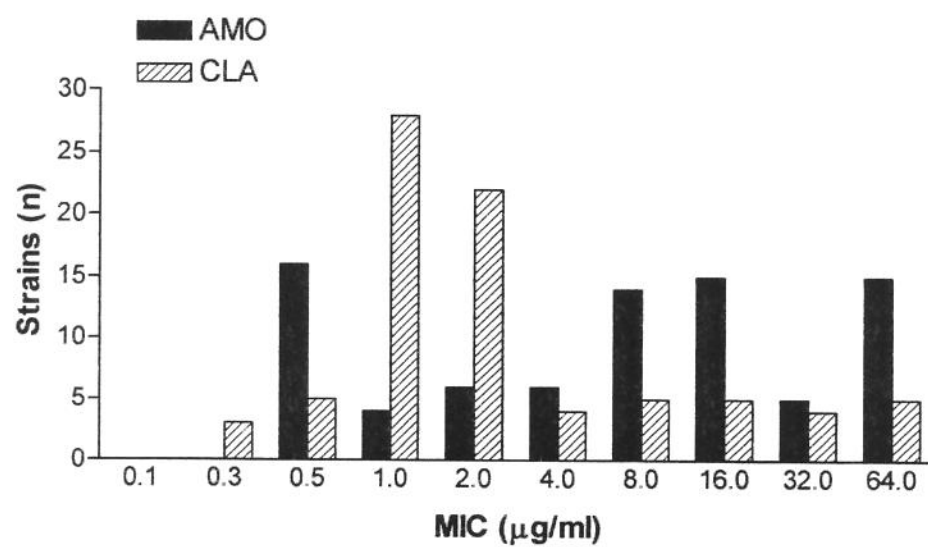
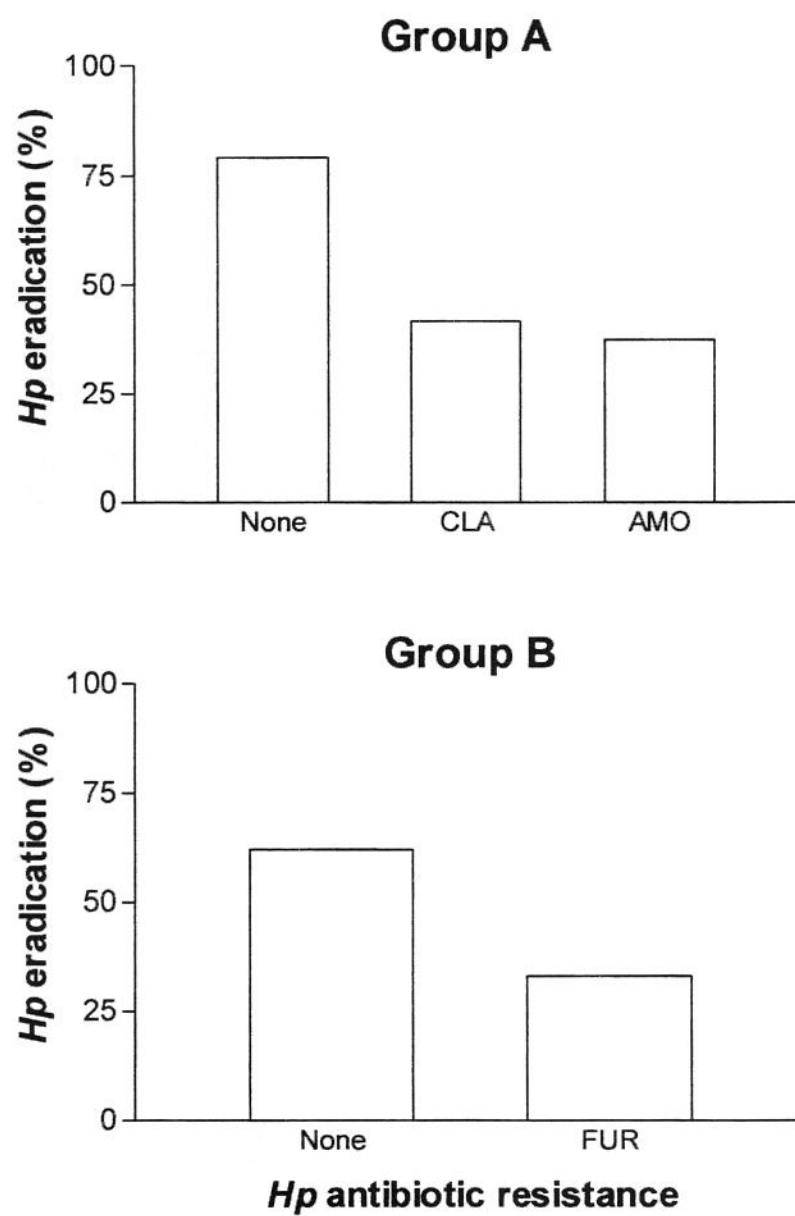


Figure 2 (↑)



ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - USF

Bragança Paulista, 20 de outubro de 1997

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -USF

Bragança Paulista, 20 de outubro de 1997

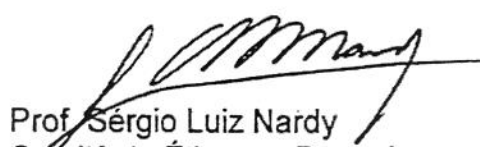
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -USF

Estudo: Avaliação da resistência a antimicrobianos em linhagens de *Helicobacter pylori*, isoladas de pacientes da região de Bragança Paulista.

Autores: Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

O CEP-USF, em sua reunião ordinária realizada em 17 de outubro de 1997, analisou o projeto supra-citado, não encontrando nele qualquer infração dos códigos de ética em pesquisa

Parecer: o referido projeto está de acordo com as normas que regem a ética em pesquisa



Prof. Sérgio Luiz Nardy
Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade São Francisco

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA A ANTIMICROBIANOS EM LINHAGENS DE *Helicobacter pylori*, ISOLADAS DE PACIENTES DA REGIÃO DE BRAGANÇA PAULISTA

Responsável: Dr. José Pedrazzoli Júnior

CPF 059163468-67 RG 7631665

FCM-USF

Av. S. Francisco de Assis 218

O abaixo assinado (nome, idade, RG, endereço e HC) declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico José Pedrazzoli Júnior do HUSF. O abaixo-assinado está ciente que:

- i- O objetivo da pesquisa é verificar a erradicação da bactéria *Helicobacter pylori* (bactéria responsável pelo surgimento de gastrite e úlceras) com os antibióticos normalmente utilizados na sua erradicação.
- ii- A participação neste estudo poderá lhe acarretar benefício terapêutico.
- iii- Deverá ser submetido a duas endoscopias, uma antes e outra 60 dias após o término do tratamento. Nas endoscopias receberá medicamentos que tornam o exame endoscópico menos desconfortável. E que a administração de emdicamentos pode causar efeitos colaterais imprevisíveis. Durante a realização de endoscopia serão colhidos 7 fragmentos de mucosa gástrica para pesquisa da bactéria. Que apesar de raras, complicações podem ocorrer durante a sua realização (sangramentos ocorrem em cerca de 0,01%).
- iv- Deverá fazer uso de um dos esquemas terapêuticos propostos para a erradicação da bactéria pelo período de 7 dias. Estes esquemas utilizam bloqueador de secreção de ácido e os antibióticos claritromicina e amoxicilina, ou então bismuto, furazolidona e tetraciclina. A administração de quaisquer medicamentos poderá causar efeitos colaterais imprevisíveis.
- v- Toda medicação será fornecida gratuitamente.
- vi- Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.
- vii- Está livre para não participar do estudo.
- viii- A não participação não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do HUSF.
- ix- Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e o HUSF não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

- x- Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do HUSF e solicitar que o mesmo contate o médico responsável pelo estudo.
- xi- Poderá contatar a Secretaria da Comissão de Ética para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Bragança Paulista, de de .

Nome do Voluntário

Dr. José Pedrazzoli Júnior