

ANITA PAULA ORTIZ DE GODOY

**Análise dos mecanismos moleculares de
resistência de *Helicobacter pylori* à amoxicilina**

Campinas

2007

ANITA PAULA ORTIZ DE GODOY

**Análise dos mecanismos moleculares de
resistência de *Helicobacter pylori* à amoxicilina**

ORIENTADOR:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP)
para a obtenção do Título de Doutora
em Farmacologia.

Campinas

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G548a Godoy, Anita Paula Ortiz
Análise dos mecanismos moleculares de resistência de *Helicobacter pylori* à amoxicilina / Anita Paula Ortiz Godoy. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : José Pedrazzoli Júnior
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Amoxicilin. I. Pedrazzoli Júnior, José. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : RESISTANCE MOLECULAR MECHANISM ANALYSE OF *Helicobacter pylori* TO AMOXICILLIN

Keywords: • *Helicobacter pylori*
• Amoxicilin

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Profa. Dra. Alessandra Gambero

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Prof. Dr. Wanderley Dias Silveira

Data da defesa: 26 - 09 - 2007



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Junior

Membros:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Junior

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Prof. Dr. Wanderley Dias Silveira

Profa. Dra. Alessandra Gambero

Profa. Dra. Rejane Mattar

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

Data: 26/09/2007

*À minha mãe Cristina e minha avó
Ignez, que sem elas eu não teria
chegado até aqui...*

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo incentivo, amor, carinho e confiança desde meus primeiros passos até hoje. Obrigada, pois tudo isso possibilitou que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior por todo respeito e confiança em meu trabalho e pelas oportunidades dadas em minha vida profissional até agora.

Aos Profs. Dr. Sérgio de Mendonça e Dr. Marcelo Lima Ribeiro, pela enorme contribuição em minha formação científica e pelo exemplo de dedicação profissional. Sou-lhes imensamente grata pelos valiosos ensinamentos, pela convivência agradável e amizade.

À Maristela, Silvana, Patrícia, Katiane e Christina, pelos momentos de apoio e de alegria, pelos conselhos e incentivos, enfim pela amizade e momentos agradáveis compartilhados no laboratório.

À toda equipe da UNIFAG, pela ótima convivência no decorrer destes últimos anos.

À Monique Gerrits pela ajuda, durante sua estada tão agradável no Brasil, toda a colaboração e orientação dada no desenvolvimento de parte do meu trabalho. À toda equipe do Depto of Gastroenterology and Hepatology – Erasmus Medical Center – Rotterdam – Netherlands, pela colaboração.

À equipe do CBMEG - UNICAMP, em especial à Fernanda, Lúcio e Profa. Dra. Laura pela colaboração e orientação dada no desenvolvimento de toda a técnica de análise de expressão diferencial gênica.

Meu reconhecimento aos profs. Dr. Marcelo Brocck, Wanderley Silveira e Edson Antunes pela atenção e disponibilidade em participar do exame de qualificação deste trabalho, sempre com valiosas sugestões.

Às grandes amigas Mônica, Jerusa e Carla presente nos principais momentos de minha vida destes últimos anos, pela compreensão, lealdade e momentos agradáveis de convivência, pelas intermináveis e divertidas conversas. E as amigas Carina, Luciene, Katiane e Fernandinha que estiveram presentes, principalmente na parte final do desenvolvimento desta tese.

Aos meus irmãos Luis e Mariana, pela paciência, compreensão e momentos de apoio. Sem falar de minha linda sobrinha Pietra que me proporciona muita alegria.

À profa. Dra Patrícia, do laboratório de pesquisa da Universidade São Francisco- USF, que permitiu o uso de equipamentos, em especial o horizontal shaker e o fluxo laminar, em seu laboratório e também ao técnico Fabiano, que sempre me ajudou.

Sou imensamente grata a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, acreditando em minha capacidade.

Como em muitas atividades humanas, como na vida em geral, o cientista navega entre dois pólos: o desejável e o possível. Sem possível, o desejável não passa de sonho. Sem desejável, o possível não passa de tédio. Muitas vezes é difícil resistir ao sonho e à utopia.

François Jacob

Lista de Abreviaturas.....	12
Lista de Figuras.....	13
Lista de Tabelas e Gráficos.....	14
Resumo.....	17
Abstract.....	18
I – INTRODUÇÃO.....	19
1 - <i>Helicobacter pylori</i>	20
1.1-Tratamento da infecção por <i>H. pylori</i>	22
1.2 - Prevalência da resistência antimicrobiana.....	25
1.3 - Mecanismos Moleculares de resistência aos antimicrobianos..	26
1.3.1 - Claritromicina	27
1.3.2 – Furazolidona.....	30
1.3.3 – Metronidazol.....	32
1.3.4 – Tetraciclina.....	34
2 – Características da Amoxicilina.....	35
II – OBJETIVOS.....	47
III – METODOLOGIA.....	49
1 – Investigação dos mecanismos moleculares de resistência.....	50
1.1 – Linhagens.....	50
1.2 - Métodos microbiológicos.....	50

1.2.1 - Cultivo em meio sólido.....	50
1.2.2 - Identificação de linhagens de <i>H. pylori</i>	50
1.3 - Detecção de atividade β -lactamase.....	51
1.4 - Métodos Genéticos.....	51
1.4.1 - Obtenção de DNA.....	51
1.4.2 – Amplificação dos genes.....	51
1.4.3 - Transformação natural.....	52
1.4.4 Mutação Sítio Dirigida.....	52
2 – Análise da expressão gênica diferencial.....	54
2.1 – Linhagem.....	54
2.2 – Microbiologia.....	55
2.2.1 - Cultivo em meio líquido.....	55
2.3 - Métodos Genéticos.....	55
2.3.1 - Obtenção de RNA e RAP-PCR.....	55
2.3.2 - Isolamento e reamplificação dos produtos de RAP-PCR	56
2.3.3 - Clonagem e sequenciamento dos produtos diferenciais de RAP-PCR.....	57
2.3.4 - Confirmação da expressão gênica diferencial.....	58
IV – RESULTADOS.....	60
1 – Investigação dos mecanismos moleculares de resistência.....	61
1.1 - Atividade β -lactamase.....	61
1.2 - Transformação natural.....	61

1.3 – Envolvimento do gene <i>pbp1A</i> com a resistência à amoxicilina	63
1.4 - Identificação das mutações de PBP1A.....	64
1.5 - Alterações Mutacionais nos motifs conservados de PBP e suas adjacências conferem resistência a amoxicilina.....	66
2 – Analise da expressão gênica diferencial.....	68
2.1- cDNAs reprimidos ou induzidos pela amoxicilina.....	68
2.2- Confirmação da expressão gênica diferencial	79
V – DISCUSSÃO.....	83
VI – CONCLUSÕES.....	96
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
VIII – ANEXOS.....	131

Amox^R	Amoxicilina resistente
Amox^S	Amoxicilina sensível
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Unidade Formadora de Colônia
CIM	Concentração Inibitória Mínima
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
NIH	National Institutes of Health
PBP	Penicillin Binding Proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAP - PCR	RNA Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction
RND	Resistance Nodulation Division
TIGR	The Institute for Genomic Research
UNIFAG	Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia
USF	Universidade São Francisco

Figura 1: Fórmula estrutural da amoxicilina – página 35.

Figura 2: Fragmentação do gene *pbp1A* para a identificação das alterações mutacionais relacionadas com a resistência à amoxicilina – página 54.

Figura 3: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário OPL02 – página 68.

Figura 4: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário OPL16 – página 70.

Figura 5: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário P1 – página 71.

Figura 6: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário P2 – página 73.

Figura 7: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário OPF19 – página 75.

TABELA I – Oligonucleotídeos usados para a amplificação dos genes através de PCR e tamanho do fragmento obtido – página 52.

TABELA II: Três diferentes *pools* de *primers* baseados na seqüência do gene *pbp1A* da *H. pylori* linhagem 26695 para realização da técnica de mutação sítio dirigida – página 53.

TABELA III - CIM das amostras utilizadas em nosso estudo e da linhagem tipo 26695 depois de transformada com o gene *pbp1A* dos isolados clínicos (transformantes) – página 61.

TABELA IV - Diferenças entre os aminoácidos da proteína PBP1A isolada de *H. pylori* Amx^R e seus transformantes – página 62.

TABELA V: Diferenças entre os aminoácidos que tiveram alguma significância e suas posições na proteína PBP1A isolada de *H. pylori* Amx^R e seus transformantes – página 63.

TABELA VI: cDNAs com expressão diferencial identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL02 – página 68.

TABELA VII: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL02, com base no banco de dados TIGR – página 69.

TABELA VIII: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL16, com base no banco de dados TIGR – página 69.

TABELA IX: cDNAs com expressão diferencial identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL16 – página 70.

TABELA X: cDNAs com expressão diferencial (superexpressos) identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P1 – página 71.

TABELA XI: cDNAs com expressão diferencial (subexpressos) identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P1 – página 72.

TABELA XII: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P1, com base no banco de dados TIGR – página 72.

TABELA XIII: cDNAs com expressão diferencial (subexpressos) identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P2 – página 73.

TABELA XIV: cDNAs com expressão diferencial (superexpressos) identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P2 – página 74.

TABELA XV: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P2, com base no banco de dados TIGR – página 74.

TABELA XVI: cDNAs com expressão diferencial identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPF19 – página 75.

TABELA XVII: Prováveis genes e categorias funcionais dos cDNAs isolados das bandas identificadas por RAP-PCR que tiveram expressão reprimida na presença de 1mg/l de amoxicilina – página 76.

TABELA XVIII: Prováveis genes e categorias funcionais dos cDNAs isolados das bandas identificadas por RAP-PCR que tiveram expressão induzida na presença de 1mg/l de amoxicilina – página 77.

TABELA XIX: cDNAs com expressão induzida (+) ou reprimida (-) em células de *H. pylori* cultivadas em presença de amoxicilina. Genes identificados como hipotéticos com base no banco de dados e similariedades com outros seres vivos – página 78.

Gráfico 1: Expressão relativa dos cDNAs que tiveram expressão aumentada quando a bactéria *Helicobacter pylori* amox^r Hardenberg cresceu em presença de amoxicilina em concentração 0,25 mg/ml (hard 0,25), 1,0 mg/ml (hard 1,0), e 2,0 mg/ml (hard 2,0) comparada com a mesma bactéria crescida em ausência da droga (hard) — página 80

Gráfico 2: Expressão relativa dos cDNAs que tiveram expressão diminuída quando a bactéria *Helicobacter pylori* amox^r Hardenberg cresceu em presença de amoxicilina em concentração 0,25 mg/ml (hard 0,25), 1,0 mg/ml (hard 1,0), e 2,0 mg/ml (hard 2,0) comparada com a mesma bactéria crescida em ausência da droga (hard) – página 81

A maioria dos isolados de *H. pylori* é sempre susceptíveis à amoxicilina, um antibiótico comumente usado na terapia de erradicação do *H. pylori*. Entretanto, a resistência à amoxicilina é emergente nos isolados clínicos, especialmente em países onde esse antibiótico pode ser obtido sem prescrição. Assim, o mecanismo molecular de resistência a amoxicilina tem sido apenas identificada em poucas *H. pylori* Amox^R e tolerantes. Este trabalho analisou os genes que atualmente apresentam maior probabilidade de estarem envolvidos no mecanismo de resistência e também a expressão gênica diferencial de uma linhagem resistente à amoxicilina crescida em presença e ausência da droga. Depois de realizada a transformação com o DNA genômico, foi feito também a transformação natural, da linhagem susceptível 26695 com os genes, previamente amplificados por PCR, *pbp1A*, *pbp2*, *ftsI* (*pbp3*), *pbp4*, *hcpA*, *lytB*, *rodA1*, *mreC*, *mreB*, e *lhm*, dos isolados clínicos resistentes. Apenas a transformação realizada com o gene *pbp1A* resultou em colônias amox^R de todos os sete isolados clínicos estudados. A resistência foi mediada por várias alterações mutacionais no segundo e terceiro motif conservado de PBP1A e suas adjacências. Todos os 8 transformantes Amox^R analisados continham uma substituição T₅₅₅R e N₅₄₂Y, sete dos transformantes Amox^R apresentavam a substituição S₄₀₂G, E₄₀₆A, e S₄₁₇T, enquanto que um transformante tinha apenas a substituição S₄₁₄R. Entretanto não podemos excluir a relação de outros genes a essa resistência. Para avaliar se a resistência da linhagem Hardenberg apresenta uma expressão gênica diferencial quando entra em contato com a amoxicilina, foi realizada a técnica de RAP – PCR. Foram usados 5 diferentes pares de *primers* arbitrários que geraram 101 bandas com expressão diferencial. Nossos resultados mostraram que a amoxicilina altera a expressão de genes envolvidos na adaptação da bactéria a nova situação. Neste sentido, os resultados que foram obtidos com este trabalho poderão contribuir para a caracterização molecular dos mecanismos de resistência das linhagens brasileiras de *H. pylori* à amoxicilina, droga essa usada na terapia de erradicação.

Amoxicillin-based therapies are highly effective for the treatment of *Helicobacter pylori* infections, but the efficacy may decrease as the incidence of amoxicillin resistance is increasing. The extensive use and limited choice of the antibiotics have resulted in the development of antibiotic resistance in *H. pylori*. So far, the molecular mechanism underlying stable amoxicillin resistance has only been identified for a few naturally occurring amoxicillin-resistant (Amx^R) *H. pylori*. In this study, we evaluated genes were selected as potential candidates for to be responsible to amoxicillin resistance and we evaluated the gene expression pattern in response to amoxicillin. No changes of genes *ftsI*, *hcpA*, *llm*, *lytB*, *mreB*, *mreC*, *pbp2*, *pbp4*, and *rodA1*, encoding putative PBPs or involved in cell wall synthesis were found among the transformed resistant *H. pylori*. Amoxicillin resistance was mediated by various mutational changes in or adjacent to the second and third PBP-motifs of the *pbp1A* gene. All eight Amx^R transformants analyzed contained a T555S and N561Y substitution, seven of the Amx^R transformants contained a S402G, E406A, and S417T substitution, while one transformant only contained a S414R substitution. Although we cannot exclude the role of other genes in amoxicillin resistance. For to evaluate the gene expression was using RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR). In the experiments, c. 101 differentially expressed RAP-PCR products were identified using five arbitrary primers. The differential expression of the isolated cDNAs was confirmed by real-time PCR. The results showed that amoxicillin alters the expression of cDNAs. Further analysis of these cDNAs will allow a better comprehension of both the molecular mechanism(s) of amoxicillin resistance and the adaptative mechanism (s) used by *H. pylori* in the presence of this antibiotic.

I - INTRODUÇÃO



1 - *Helicobacter pylori*

O primeiro isolamento de *Helicobacter pylori* em 1982 por Marshall e Warren reconduziu a microbiologia gástrica à uma nova era, pois notaram que a infecção por *H. pylori* esta associada com o processo de ulceração duodenal (WARREN e MARSHALL, 1983). Essa observação foi rapidamente confirmada e também ampliada com a inclusão de uma associação ao desenvolvimento de úlcera gástrica (Revisado por BLASER, 1987). Em 1994 o *National Institutes of Health*, através de um consenso, concluiu que a presença de *H. pylori* é a maior causa de desenvolvimento de úlcera péptica e recomendou que indivíduos infectados e com úlceras devem ser tratados para a erradicação do microrganismo (NIH Consensus Conference, 1994).

A consequência clínica da infecção por *H. pylori* depende de uma variedade de fatores, os quais são relatados os associados ao hospedeiro (grupo sanguíneo e polimorfismo no *cluster* gênico da interleucina 1), à bactéria (genes linhagem-específicos, expressão gênica diferencial, variações alélicas) e também ao meio ambiente (tabagismo e idade) (HOCKER e HOHENBERGER, 2003).

Todos os indivíduos infectados por *H. pylori* desenvolvem uma inflamação da mucosa gástrica com formação de um infiltrado celular, o que é denominado gastrite crônica, mas essa condição geralmente é assintomática não sendo considerada como doença (BLASER, 1990, DUNN *et al.*, 1997, BLASER 1998). Evidências indicam que a gastrite crônica, assim como a gastrite atrófica, pode ter uma ligação com o

desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (BLASER, 1990, CORREA, 1992). Em 1991, foram registradas os quatro primeiros relatos que estabeleciam uma associação entre a infecção por *H. pylori* e a presença ou o desenvolvimento do câncer gástrico (FORMAN, *et al.*, 1991, NOMURA *et al.*, 1991, PARSONNET, *et al.*, 1991, TALLEY, *et al.*, 1991). Posteriormente, a Agência Internacional para o Estudo do Câncer, juntamente com a Organização Mundial da Saúde revisaram e avaliaram as evidências, declarando que o *H. pylori* é um carcinógeno humano (Anonymouns, 1994). A infecção pelo *H. pylori* também tem sido associada ao desenvolvimento de linfoma gástrico não-Hodgkin's (MALTomas) e à outras doenças linfoproliferativas como o tecido linfóide associado a mucosa gástrica (MALT) (WOTHERSPOON, *et al.*, 1991, WOTHERSPOON *et al.*, 1993, EIDT, *et al.*, 1994, PARSONNET, *et al.*, 1994).

Estudos demonstraram que a eliminação do *H. pylori* com tratamentos antimicrobianos cura as úlceras e reduz substancialmente o risco de sua recorrência, além de atenuar o curso dos linfomas (MALToma) e freqüentemente regredir o tumor (HENTSCHEL, *et al.*, 1993, WOTHERSPOON, *et al.*, 1993, BAYERDORFFER, *et al.*, 1994, WALT, 1996).

1.1 Tratamento da infecção por H. pylori

Úlcera péptica e outras doenças associadas ao *H. pylori* usualmente regridem ou são curadas completamente após a erradicação da bactéria com antibióticos (BAYERDORFFER, *et al.*, 1995, SUGIYAMA, *et al.*, 2002). *In vitro*, *H. pylori* é

susceptível a maioria dos antibióticos, mas *in vivo* a situação é diferente, pois a maioria das drogas é incapaz de curar os pacientes infectados (GRAHAM, 1998). Isso parece acontecer devido a uma combinação de fatores, incluindo (i) a inabilidade das drogas em alcançar níveis apropriados na mucosa gástrica (McNULTY *et al.*, 1988, van ZANTEN, *et al.*, 1992), (ii) inativação das drogas pelo baixo pH do estômago (GRAYSON, *et al.*, 1989; DEBETS-OSSENKOPP, *et al.*, 1995) e (iii) pela taxa de crescimento bacteriano ser muito lenta (MILLAR e PIKE, 1992).

Metronidazol, claritromicina, amoxicilina e tetraciclina são as drogas antimicrobianas mais usadas para o tratamento de erradicação do *H. pylori* (MEGRAUD e LAMOULIATTE, 2003). Fluoquinolonas, nitrofuranos e rifamicinas são ocasionalmente usadas como alternativas (GOMOLLON, *et al.*, 2000, GUSLANDI, 2001, TREIBER, *et al.*, 2002, GISBERT e PAJARES, 2003, ZULLO, *et al.*, 2003). Nenhum dos antibióticos mencionados é efetivo o suficiente quando usados como monoterapia. Portanto, o sucesso da erradicação do *H. pylori* requer a combinação terapêutica, o que consiste em um ou mais antibióticos combinados com uma droga supressora de ácido e/ou um componente de bismuto (BORODY, *et al.*, 1995, van der HULST *et al.*, 1996, GRAHAM *et al.*, 2003).

A inclusão de um supressor de ácido tem mostrado um aumento da eficácia terapêutica combinada para erradicação do *H. pylori* (van der HULST *et al.*, 1996). Há uma preferência para o uso de um inibidor de bomba de prótons (IBP), como o omeprazol, lansoprazol e pantoprazol ao antagonista de receptor H₂, entretanto, os

regimes de tratamento baseados no uso de antagonista de receptor H_2 , em particular, ranitidina, mostraram ser efetivamente iguais aos regimes baseados no uso de IBP (GRAHAM *et al.*, 2003). As drogas supressoras de ácido, primeiramente aumentam o pH intragástrico, realçando assim a atividade dos antibióticos. Um benefício adicional do uso das drogas supressoras de ácido é que elas diminuem a severidade dos efeitos colaterais cedidos pelo regime (BORODY, *et al.*, 1995), resultando em um aumento do aprazimento e da chance para o sucesso terapêutico.

Os sais de bismuto já são usados pela medicina desde o século XIX, principalmente para doenças ulcerativas e também no tratamento das doenças pépticas. Subcitrato coloidal de bismuto, subclicilato de bismuto e o mais recente ranitidina citrato de bismuto (Antagonista de receptor H_2 combinado com um componente de bismuto) são comumente usados na terapia anti-*H. pylori* (CHIBA, 2000). O mecanismo de ação dos sais de bismuto sobre *H. pylori* é muito complexo, incluindo a inibição das sínteses de proteínas, de ATP e de parede celular (LAMBERT & MIDOLO, 1997). Embora a monoterapia com bismuto diminua o crescimento do *H. pylori*, as taxas de erradicação são muito baixas (GORBACH, 1990). Entretanto, quando usados em combinação com um ou dois antibióticos, são efetivos devido ao efeito sinérgico (MIDOLO, *et al.*, 1997). Mesmo sendo as terapias triplas ou quadruplas baseadas em bismuto mais efetivas no tratamento de erradicação do *H. pylori*, comparando-se às terapias baseadas em IBP, elas não são usadas como primeira opção terapêutica pelo fato de ter um programa de dosagem mais complexo e/ou

ter efeitos colaterais mais freqüentes (GISBERT & PAJARES, 2001).

No Brasil, a Federação Brasileira de Gastroenterologia e o Núcleo Brasileiro para Estudo do *Helicobacter*, em 2004, decidiram promover o II Consenso Brasileiro para Estudo do *Helicobacter pylori* (COELHO *et al.*, 2005). Os participantes optaram por recomendar, além do regime mundialmente recomendado (inibidor de bomba protônica, amoxicilina e claritromicina) e também já validado, com resultados algo inferiores aos mundiais, (PINHEIRO *et al.*, 1999, KAWAKAMI *et al.*, 2001, VIEIRA, *et al.*, 2001, COELHO *et al.*, 2004), dois outros regimes contendo furazolidona, uma medicação muito empregada no Brasil e de custo bastante acessível. A associação de furazolidona, claritromicina e IBP são particularmente úteis em pacientes com impedimento para o uso de amoxicilina, com trabalhos nacionais evidenciando excelente índice de erradicação do microrganismo (DANI, 1999). A associação de tetraciclina, furazolidona e IBP foi incluída como forma de oferecer opção terapêutica envolvendo antimicrobianos que hoje existem disponíveis para a população na rede do Sistema Único de Saúde. Tal associação foi alvo de apenas um estudo nacional, onde atingiu aproximadamente, 70% de erradicação com 15% dos pacientes apresentando efeitos adversos (SILVA *et al.*, 2002). A respeito desses resultados, as terapias nem sempre são efetivas na prática clínica devido a compreensão ineficiente do paciente, administrando as drogas de forma errada e/ ou pelo desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos (COELHO, *et al.*, 2004).

Após a falência de um dos tratamentos iniciais propostos pelo Consenso, recomendam-se mais duas tentativas de tratamento, com duração, de 10 a 14 dias, não se repetindo ou estendendo o esquema inicial. Embora a maior parte dos estudos terapêuticos para *H. pylori* empregando sais de bismuto recomenda seu uso 3 ou 4 vezes ao dia (SHERWOOD, 1990, MAGALHÃES, *et al.*, 1998, MALFERTHEINER, *et al.*, 2002, VIEIRA, 2002), o Consenso, baseado em observações recentes (GRAHAM, *et al.*, 2004), optou por regimes utilizando-o apenas 2 vezes ao dia, de forma a simplificar e aumentar a aderência ao tratamento. Baseado em vários estudos internacionais (NISTA, *et al.*, 2003, ORSI, *et al.*, 2003, ZULLO, *et al.*, 2003) e mesmo na ausência de estudos nacionais, o Consenso recomenda o emprego da associação de levofloxacina, amoxicilina, e IBP como terapêutica de retratamento de segunda opção ou de levofloxacina, furazolidona, sal de bismuto e IBP (COELHO *et al.*, 2005).

1.2 - Prevalência da resistência antimicrobiana

Como a resistência do *H. pylori* aos antimicrobianos comumente usados na terapia de erradicação parece ser a principal razão da falha terapêutica, estudos de sua incidência têm uma grande importância clínica. A susceptibilidade do *H. pylori* aos antimicrobianos é usualmente obtida por métodos de antibiograma, baseados na cultura microbiana como o E-test, a diluição em ágar e a difusão em disco. Esses métodos determinam a concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) dos antimicrobianos, porém estudos têm mostrado que os resultados nem sempre são

constantes (MEGRAUD, *et al.*, 1999, van der Wouden, *et al.*, 1999). Fatores como a viabilidade celular, tamanho do inóculo, condições de incubação e meio de crescimento podem afetar os resultados (HARTZEN, *et al.*, 1997). Métodos moleculares que são independentes desses fatores parecem ser uma alternativa atraente. Esses testes podem gerar resultados reprodutíveis e facilmente padronizáveis, além do mais, são mais rápidos do que os ensaios convencionais baseados em cultura e quando aplicados diretamente na biópsia gástrica, os resultados podem ser obtidos em poucos dias da endoscopia.

A prevalência da resistência antimicrobiana de *H. pylori* tem sido obtida em todo o mundo e parece estar crescente para algumas drogas. Para o metronidazol (CIM $\geq$ 8mg/L), que é a resistência mais comum, os índices observados em países industrializados são de aproximadamente 35%, já em países em desenvolvimento, os índices de resistência são muito comuns, chegando a atingir 90% para o metronidazol (GLUPCZYNSKI, *et al.*, 2001, MEYER, *et al.*, 2002, FRENCK e CLEMENS, 2003). Esta alta resistência pode estar associada ao fato de que o metronidazol e também os outros nitronidazóis são extensamente usados no tratamento de doenças ginecológicas, dentárias e também parasitárias (MEGRAUD, 1997).

Em comparação às taxas de resistência observadas ao metronidazol, a prevalência de resistência à claritromicina (CIM $\geq$ 2,0mg/L) é muito menor. Em países industrializados a taxa de resistência do *H. pylori* à claritromicina é de 1-10%

(MEGRAUD, *et al.*, 1999, FALLONE, 2000, GLUPCZYNSKI, *et al.*, 2001, MEYER, *et al.*, 2002). Já em países em desenvolvimento, os índices de resistência são mais altos, variando entre 16 a 50% (VASQUEZ, *et al.*, 1996, MENDONÇA, *et al.*, 2000, GODOY, *et al.*, 2003, TORRES *et al.*, 2001).

Contrastando com outras espécies bacterianas que a resistência à amoxicilina e a tetraciclina são generalizadas, até o final do século 20, era muito raro encontrar amostras de *H. pylori* resistentes a estas drogas. Entretanto, a incidência de resistência à amoxicilina (CIM $\geq$ 0,5mg/L) e à tetraciclina (CIM $\geq$ 4,0mg/L) esta aumentando, especialmente em países como o Brasil, Índia e Lituânia, onde essas drogas podem ser obtidas sem prescrição médica (DORE *et al.*, 1998, MENDONÇA *et al.*, 2000, DAILIDIENE, *et al.*, 2002, ECCLISSATO, *et al.*, 2002, GODOY, *et al.*, 2003).

1.3 - Mecanismos Moleculares de resistência aos antimicrobianos

A resistência a uma certa classe de antibióticos pode envolver diferentes mecanismos e ocorrer com todas as linhagens de uma determinada espécie bacteriana. Ao nível bioquímico existem quatro mecanismos principais de resistência a agentes antimicrobianos: impedimento da penetração do antimicrobiano, alteração molecular do alvo, efluxo ativo da droga ou inativação do composto antimicrobiano (MÉGRAUD, 1997).

Os mecanismos moleculares de resistência antimicrobiana desenvolvidos pelo *H. pylori*, descritos até o momento, são baseados em mutações pontuais localizadas no

cromossomo, contrastando com os mecanismos observados em outras bactérias, os quais são freqüentemente localizados em plasmídeos, transposons ou integrons (GOMEZ-LUZ, 1998).

1.3.1 - CLARITROMICINA

Os antibióticos macrolídeos caracterizam-se pela presença de um anel lactônico macrocíclico em sua molécula, ao qual se ligam um ou mais açúcares amino e/ou neutros. Seu espectro de ação é limitado a cocos e bacilos gram-positivos (estafilococos, streptococos, clostrídios, *Erysipelothrix*), cocos gram-negativos (gonococo, meningococo) e bactérias intracelulares (*Clamydias* sp. e *Rickettsia* sp.). Bacilos gram-negativos geralmente são resistentes à esses antibióticos, entretanto *Bordetella pertussi*, *Campylobacter* sp. e *Helicobacter* sp. são susceptíveis a esta droga (LECLERCQ, 2002).

A claritromicina é um 6-metoxi derivado da eritromicina, utilizada na terapia de erradicação da bactéria *H. pylori*. O uso indiscriminado da claritromicina tem resultado em um aumento no desenvolvimento da resistência a este antibiótico, sendo considerada como a principal causa da falha terapêutica (ALARCÓN *et al.*, 2000).

Entretanto, em alguns pacientes portadores de linhagens resistentes foi observada a completa erradicação da bactéria, sugerindo que a eficácia do antibiótico, em alguns casos, esteja relacionada a uma possível instabilidade do mecanismo de resistência *in vivo* (ALARCÓN *et al.*, 2000). Em relação à perda de resistência, os dados disponíveis em literatura são contraditórios. Para HULTÉN *et al.*, (1997) e

DEBETS-OSSENKOPP *et al.*, (1998) as linhagens estudadas permaneceram resistentes após 50 e 21 subculturas, respectivamente. Por outro lado, os dados de XIA *et al.*, (1996) mostraram que 45% (9 de 20) das linhagens estudadas foram instáveis após 2-5 subculturas. Do mesmo modo, ALARCÓN *et al.*, (2000) detectaram que 10% (3 de 30) das linhagens Clr^r perderam a resistência depois de 10-18 subculturas. Assim, parece que as taxas de resistência a claritromicina *in vitro* podem estar subestimadas devido às subculturas realizadas do momento em que se isola o microorganismo até a sua utilização na determinação da susceptibilidade.

Estudos bioquímicos demonstraram uma interação direta entre claritromicina e seu principal metabólito, a 14-hidroxi-claritromicina, com a subunidade ribossomal 50S de *H. pylori* (GOLDMAN *et al.*, 1994). Desse modo, acredita-se que o mecanismo molecular de resistência a claritromicina (Clr^r) em *H. pylori* seja causado por uma diminuição na capacidade de ligação dos macrolídeos ao ribossomo, associado a mutações no domínio V do gene 23S rRNA presente em duas cópias no genoma do *H. pylori* (VERSALOVIC *et al.*, 1996, OCCHIALINI *et al.*, 1997, TAYLOR *et al.*, 1997).

WANG e TAYLOR (1998) demonstraram, por meio da construção de mutantes, que mutações no gene 23S rRNA seriam capazes de conferir resistência à claritromicina. Nos resultados experimentais, uma variação nos valores de CIM com o tipo de mutação foi detectada, ou seja, mutantes A→G/C apresentaram CIMs mais elevados do que A→T ou A (G = C > T >> A). Embora mutações A→G/C na mesma posição confirmem um mesmo valor de CIM, os resultados obtidos por vários autores

indicam que os mutantes A2142→G/C apresentam valores mais elevados de CIM do que os A2143→G/C (DEBETS-OSSENKOPP *et al.*, 1998, WANG e TAYLOR, 1998, WANG *et al.*, 1999, van DOORN, *et al.*, 2001, RIBEIRO *et al.*, 2003, DE FRANCESCO *et al.*, 2006, YILMAZ e DEMIRAY, 2007)

1.3.2 - FURAZOLIDONA

O mecanismo de ação da furazolidona, um nitrofurano, não é bem conhecido. Aparentemente, tem sua atividade antimicrobiana baseada na interferência com o sistema enzimático da bactéria.

Os nitroheterocíclicos e componentes nitroaromáticos constituem uma variedade de agentes químicos caracterizados pela presença de um ou mais grupos nítricos em um grupo aromático ou heterocíclico. Por muitos anos, compostos que substituem grupos nítricos tem sido utilizado como agentes antimicrobianos. A atividade biológica destes compostos deve-se ao metabolismo redutor dos compostos nítricos originais, em um processo catalisado por uma série de nitroredutases. Os produtos finais do metabolismo são biologicamente inativos (WHITEWAY *et al.*, 1998).

A seqüência da proteína RdxA (oxygen-insensitive NADPH nitroreductase) de *Helicobacter pylori* possui alguns aminoácidos em alinhamento idêntico com a proteína NfsB de *E. coli*, particularmente 14 resíduos próximos a extremidade aminoterminal, provavelmente relacionados ao sítio de ligação ao flavina mononucleotídica

(WHITEWAY *et al.*, 1998). Esta observação, associada ao fato das linhagens resistentes para a furazolidona serem resistentes simultaneamente para metronidazol, levou a suposição de um mecanismo de ação e de resistência semelhante para ambos os compostos (KWONG *et al.*, 2001). Entretanto, a análise de mutantes para os genes *rdxA*, *frxA*(NADPH flavin-oxidoreductase) e *fdxB*, associados com a resistência da bactéria para o metronidazol, demonstrou que estes genes não estão diretamente envolvidos com a resistência a furazolidona para *H. pylori* (KWONG *et al.*, 2001).

Outros candidatos para a resistência a furazolidona são as proteínas piruvato-flavodoxina oxidoreductase (PorCDAB) e 2-oxoglutarato oxidoreductase (OorDABC). O efeito letal e possível atividade de nitroreductase para o metronidazol foram demonstrados para *H. pylori* (HUGHES *et al.*, 1998, KAIHOVAARA *et al.*, 1998). HUGHES *et al.*, (1995) mostraram que, ao contrário de organismos aeróbios que se utilizam do complexo piruvato desidrogenase, a principal rota para assimilação do piruvato em *H. pylori* acontece via piruvato-flavodoxina oxidoreductase (POR). Uma outra enzima, 2-oxoglutarato-acceptor oxidoreductase (OOR) também foi observada em *H. pylori* e é responsável pela descarboxilação oxidativa reversa do análogo 2-oxoglutarato, formando succinil coenzima A (succinil-COA), o principal intermediário do ácido tricarboxílico (HUGHES *et al.*, 1998). A presença destas duas oxidoreductases em *H. pylori* explica parcialmente a natureza microaerofílica estrita desta bactéria, por serem estas enzimas facilmente desnaturáveis em contato com o oxigênio (HUGHES

et al., 1998). Tanto a enzima POR quanto a OOR possuem 4 subunidades. Os genes *por* estão organizados na ordem 5'-*porC-porD-porA-porB*-3' e os genes *oor* na ordem 5'-*oorD-oorA-oorB-oorC*-3' e foram recentemente clonados e seqüenciados (HUGHES *et al.*, 1998).

Deste modo, foi sugerido que a resistência para a furazolidona pode estar relacionada com mutações nos genes *porCDAB* e/ou *oorDABC*, enquanto a resistência para metronidazol seria conferida por alterações nos genes *rdxA*, *frxA* e/ou *fdxB* (KWON *et al.*, 2001). Posteriormente, SISSON *et al.*, (2002) avaliaram os mecanismos de resistência para metronidazol e nitrofuranos, entre eles a furazolidona, e concluíram que mutações em FrxA e RdxA parecem influenciar relativamente os MIC de nitrofuranos, porém estes aumentos são pequenos e insuficientes para conferir uma resistência clinicamente significativa. Além disso, estes autores concordam com a associação de linhagens resistentes a nitrofuranos e mutações em POR.

Mais recentemente, SU *et al.*, (2006) descreveram que as mutações G353A, A356G, e C357T ocorridas no gene *porD* e A041G, A122G, C349A(G) no gene *oorD* podem estar associadas a resistência de *H. pylori* a furazolidona.

1.3.3 - METRONIDAZOL

O metronidazol foi inicialmente usado para o tratamento de infecções parasitárias ginecológicas como a infecção por *Trichomonas vaginalis*, em pouco tempo percebeu-se que esta droga também era ativa em bactérias anaeróbicas e para

algumas microaerofílicas (FREEMAN, *et al.*, 1997, MENDZ, e MEGRAUD, 2002). Como o metronidazol é ativado dentro do suco gástrico e a atividade antimicrobiana é pouco afetada pelo baixo pH, esta droga é altamente efetiva contra *H. pylori* (van ZANTEN, *et al.*, 1992, DEBETS-OSSENKOPP, *et al.*, 1995).

Essa droga, na realidade, é uma pró-droga que precisa ser ativada por um ou dois processos de redução de elétrons levando a formação de radicais nitrosos e componente hidroxilamina. A exposição desses compostos tóxicos causa danos no DNA e conseqüentemente resulta na morte da bactéria (SISSON, *et al.*, 2000).

Em *H. pylori*, acredita-se que a redução do metronidazol é mediada principalmente por uma nitroredutase RdxA (oxygen-insensitive NADPH nitroreductase) (SAMBROOK *et al.*, 1989, GOODWIN, *et al.*, 1998), mais recentemente foi mostrado que uma oxidoredutase, FrxA (NADPH flavin-oxidoreductase), também participa do processo de redução dessa droga (JEONG *et al.*, 2000).

A resistência de *H. pylori* ao metronidazol foi primeiramente associada com a inativação mutacional do gene *rdxA* (GOODWIN, *et al.*, 1998, DEBETS-OSSENKOPP, *et al.*, 1999, JENKS, *et al.*, 1999). Entretanto, foi demonstrado que a inativação do gene *frxA* também confere resistência ao metronidazol, tanto sozinho quanto em associação as mutações no gene *rdxA* (JEONG *et al.*, 2000, KWON *et al.*, 2000, 2000 e 2001). Se a inativação mutacional dessas duas enzimas resultasse na resistência ao metronidazol em todos os isolados clínicos seria fácil de concluir, porém esses fatores

são apenas considerados os maiores contribuintes para a resistência (BERESWILL, *et al.*, 2003, CHISHOLM & OWEN, 2004, KWON, *et al.*, 2000, GERRITS *et al.*, 2004).

1.3.4 - TETRACICLINA

As tetraciclina são derivadas de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, compostos por um núcleo tetracíclico linear aos quais uma variedade de grupos funcionais está ligada.

São antibióticos de amplo espectro de ação, ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Além disso, também são adicionadas em doses sub-terapêuticas na alimentação de animais como promotores do crescimento (CHOPRA e ROBERTS, 2001). Sem dúvida, devido às suas propriedades antimicrobianas e a ausência de efeitos colaterais mais graves, as tetraciclina têm sido extensivamente usadas na terapia humana e veterinária, levando a um conseqüente aumento no número de microrganismos resistentes a estes antibióticos (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

GERRITS *et al.*, (2002) e TRIEBER e TAYLOR, (2002), em dois estudos independentes observaram que a resistência a tetraciclina em ambos os casos foi mediada por uma substituição de três pares de base AGA₉₂₆₋₉₂₈→TTC (baseando-se na seqüência do gene 16S *rnaA* da linhagem 26695), nas duas cópias do gene 16S rRNA. Esta substituição está localizada na hélice 31 (H31) no sítio primário de ligação a

tetraciclina e, desse modo, acredita-se que diminua a afinidade droga-ribossomo afetando a eficácia da tetraciclina. Além disso, esses autores verificaram que as linhagens com essa substituição apresentavam taxas de crescimento bacteriano muito semelhantes às detectadas em linhagens selvagens, sugerindo que a substituição AGA₉₂₆₋₉₂₈→TTC não afetava a síntese protéica. Subseqüentemente, DAILIDIENE *et al.*, (2002), estudando algumas amostras que apresentavam valores de CIM abaixo do *breakpoint*, observaram que em todas as linhagens a resistência estava relacionada a uma substituição de um ou dois nucleotídeos exatamente na mesma posição mencionada.

2 – Características da Amoxicilina

Amoxicilina é um β-lactâmico semi-sintético da classe das penicilinas, que apresenta um núcleo básico 6 – aminopenicilâmico, que consiste em um anel tiazolidínico vinculado a um anel beta lactâmico que comporta um grupamento amino secundário (**Figura 1**). A estrutura da amoxicilina é quase igual a da ampicilina, dela divergindo por apresentar um grupo hidroxila em vez de um hidrogênio. Porém, a amoxicilina é melhor absorvida pelo trato gastrointestinal e a presença de alimentos não influencia em sua absorção. Por apresentar o grupo amino, ionizável, seu espectro de ação é amplo, por ser estável em meio ácido, foi projetado para uso oral (SWEETMAN, 2002).

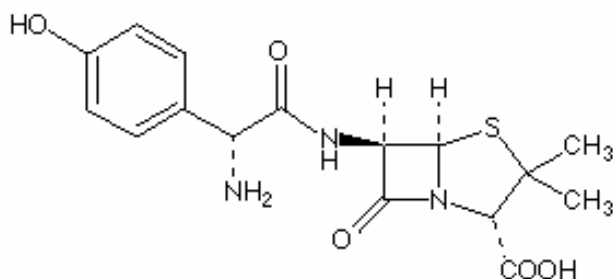


Figura 1: Fórmula estrutural da amoxicilina

As penicilinas, de modo geral, afetam a síntese dos componentes da parede celular bacteriana. Esta estrutura lhe dá a forma e rigidez, e, mais importante que isto, mantém a hipertonicidade do meio interno. A parede celular das bactérias é essencial para o seu crescimento e desenvolvimento normal. O peptidoglicano é um componente heteropolimérico da parede celular que lhe dá estabilidade mecânica rígida em virtude de sua estrutura altamente cruzada. É formado de cadeias de glicano que consistem em bandas lineares de 2 aminoaçúcares alternados (N-acetilglicosamida e ácido N-acetilmurânico), que apresentam ligações cruzadas com cadeias peptídicas (SWEETMAN, 2002).

A biossíntese do peptidoglicano envolve cerca de 30 enzimas bacterianas e pode ser dividida em 3 etapas:

- A primeira realiza-se no citoplasma bacteriano, resultando na formação de monômeros compostos de um dissacarídeo formado pelo ácido murâmico e a N-acetilglicosamina ligado a um pentapeptídeo;

- A segunda ocorre na membrana citoplasmática, onde, graças a um transportador fosfolipídico, as moléculas de aminoácidos-pentapeptídeos são transportados para o meio externo;
- e a terceira realiza-se no espaço periplasmático (no caso de Gram negativas) sucedendo a polimerização das subunidades dissacarídicos-pentapeptídicas originando longas cadeias polissacarídeas. A biossíntese de peptídeoglicano se completa pela união das cadeias polissacarídeas através da ligação entrecruzada pentapeptídicas de uma molécula com a de outra, esta reação é chamada transpeptidação.

A reação de transpeptidação é catalisada por transpeptidases, havendo também a participação de carboxipeptidases que se encarregam da retirada de resíduos de D-alanina, e de endopeptidases, que provocam o rompimento de cadeias peptídeas. É nesta terceira fase que atuam os antibióticos β -lactâmicos, ao se ligarem de maneira irreversíveis a estas enzimas, responsáveis pela finalização do processo de síntese de peptídeoglicano, inibindo sua ação. Por serem o sítio de ação dos β -lactâmicos estas enzimas foram chamadas de proteínas de ligação às penicilinas ou PBPs, (TAVARES, 1996).

Outro mecanismo de ação das penicilinas baseia-se no fato de que as paredes celulares das bactérias contêm enzimas autolíticas, as autolisinas ou hidrolases mureínicas, que podem destruir o peptídeoglicano. Isto se dá em função da necessidade de algumas vezes ocorrer quebra do peptídeoglicano para permitir a

adição de novos polímeros à parede da célula em crescimento. Normalmente essas enzimas degradadoras são controladas por inibidores naturais que também estão na parede celular. Entretanto, em algumas bactérias a exposição à antibióticos β -lactâmicos promove a perda desses inibidores, permitindo dessa forma que as enzimas, autolisinas, quebrem o peptidoglicano (TAVARES, 1996).

Habitualmente, as bactérias possuem estas mureínas hidrolases que degradam ou remodelam parte da parede celular. Estas enzimas são classificadas como muramidases (lisozimas), glucosaminidases, amidases, endopeptidases e transglicosilases de acordo com sua função específica no processo final da divisão celular (RIVAS *et al.*, 2002).

Por ser um β -lactâmico de amplo espectro de ação, a amoxicilina tem se mostrado eficiente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae*; *Haemophilus influenzae*; *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*; *Proteus mirabilis*; *Salmonella* e também algumas Gram-positivas: *Streptococcus pneumoniae*; Enterococos; Estafilococos não produtores de penicilases; *Listeria*. (SWEETMAN, 2002). O uso indiscriminado desta droga tem aumentado as taxas de resistência bacteriana, comprometendo a eficácia terapêutica (DORE *et al.*, 1999).

Um fenômeno que tem sido observado em algumas bactérias é a tolerância para alguns antimicrobianos, especialmente os β -lactâmicos. Este fenômeno resulta da deficiência, da atividade das enzimas autolíticas envolvidas na divisão celular.

Desta maneira, embora a bactéria não forme nova parede celular por ação dos antibióticos em seu receptor, a lise osmótica não ocorre de maneira rápida, porque a bactéria não se divide, devido a continuidade da existência da parede celular da bactéria primitiva. Ocorre bacteriostase (não se divide), mas não ocorre bacteriolise (não sofre lise osmótica). A deficiência das autolisinas observada nas bactérias tolerantes (amidases, N-acetil-glucosaminidases, endopeptidases) resulta da ação de inibidores destas enzimas aulíticas presentes da bactéria (RAYNOR *et al.*, 1979). Normalmente é aceito que uma linhagem bacteriana apresenta tolerância para um antibiótico β -lactâmico se a razão MBC/MIC for superior a 32, ou seja, uma diferença significativa entre as concentrações inibitórias e bactericidas (DORE *et al.*, 1999).

A resistência a amoxicilina, em bactérias Gram-negativas deve-se principalmente à sua hidrólise por β -lactamase, que levam a uma diminuição na quantidade de antibiótico ativo na bactéria (LIVERMORE, 1995), ou por alterações em proteínas de ligação à penicilina (PBP - *penicillin binding proteins*), que afetam a capacidade de ligação, não alterando a formação de peptideoglicano (KELLY *et al.*, 1986, MALOUIN e BRYAN, 1986). PBPs e β -lactamases são enzimas que pertencem a mesma superfamília de proteínas, e são classificadas de acordo com sua similaridade de seqüência ou especificidade de substrato. Ambas se ligam covalentemente às penicilinas, mas as suas funções biológicas são diferentes. Enquanto as PBPs possuem atividade de carboxipeptidase, transpeptidase e transglicosilase,

as β -lactamases hidrolisam os antibióticos β -lactâmicos. (KELLY *et al.*, 1986). Quaisquer destas alterações interferem na susceptibilidade de todos os β -lactâmicos. Assim a substituição da amoxicilina por outro medicamento pertencente a mesma classe não é recomendada devido a essa resistência cruzada. (DORE *et al.*, 1999).

DeLONEY e SCHILLER (1999) sugeriram que a enzima PBP1 seria o alvo principal de ligação dos antibióticos β -lactâmicos em *H. pylori*. Posteriormente os mesmos autores, após exposição prolongada de uma linhagem Amox^S (ATCC 43579) a amoxicilina, mostraram-se capazes de isolar linhagens Amox^R obtidas a partir dessas, indicando que isso se deva a uma diminuição na afinidade da droga com a enzima PBP1 nas linhagens Amox^R. Também foi observado que alterações na permeabilidade da parede celular podem ser responsáveis pela resistência a amoxicilina devido a um aumento na barreira difusional aos β -lactâmicos em linhagens Amox^r (DeLONEY e SCHILLER, 2000).

Recentemente PAUL *et al.*, (2001) estudaram os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na resistência a amoxicilina em *H. pylori* e detectaram algumas mutações nos genes *pbp1* e *pbp2* de linhagens Amox^R associadas com alterações de aminoácidos (*pbp1* - S414R, Y484C, T541I e P600T; *pbp2* - T498I) em porções conservadas das linhagens Amox^S 26695 (TOMB *et al.*, 1997) e J99 (ALM *et al.*, 1999), que estão localizadas em possíveis domínios protéicos da transpeptidase (GOFFIN e GHUYSEN, 1998). Após análise de expressão, PAUL *et al.*, (2001) concluíram que somente as mutações no gene *pbp1* estão relacionadas à resistência a amoxicilina e,

além disso, sugeriram que mutações em outros genes poderiam estar envolvidas nesse processo. Posteriormente, OKAMOTO *et al.*, (2002) descreveram que a transformação de uma linhagem sensível a amoxicilina em resistente estava associada a mutações na região C-terminal do sítio de ligação a penicilina da proteína PBP1. Em outro estudo, GERRITS *et al.*, (2002) descreveram que uma substituição (ser414→arg) no gene que codifica a proteína PBP1A esta associada com a resistência a amoxicilina, embora não fosse excluída a possibilidade de mutações em outros genes, uma vez que a linhagem transformante não apresentou o mesmo índice de resistência que a linhagem selvagem.

Por outro lado, estudos envolvendo a resistência a amoxicilina devido a alterações nos genes que codificam PBPs em *Streptococcus pneumoniae* têm demonstrado que os valores mais elevados de CIM estão associados a mutações em diversos genes. DU PLESSIS *et al.*, (2002) sugerem que a resistência a amoxicilina, neste caso, é mediada por alterações em múltiplos *PBPs* em associação com uma proteína diferente ainda não identificada.

Em 1999 KRISHNAMURTHY *et al.*, descreveram uma nova *PBP* de *H. pylori*, que foi chamada de PBP4, esta codifica uma proteína de 306 aminoácidos, rica em cisteína. A seqüência de PBP4 não mostra homologia com nenhuma *PBP* conhecida, ou com proteínas de outras bactérias. Análises genômicas indicaram que *PBP4* pertence à mesma família da proteína *HcpA* (*Helicobacter cysteine-rich protein A*), descrita por CAO *et al.*, (1998). Posteriormente DORE *et al.*, (1999) sugeriram que a

ausência de *PBP4* seria responsável pela resistência a amoxicilina em linhagens resistentes.

MITTL *et al.*, (2000) estudaram a expressão do gene *hcpA*, responsável pela codificação de uma proteína que se liga e hidrolisa derivados da penicilina, e poderia estar envolvida na resistência a amoxicilina em *H. pylori*. Estes autores sugeriram que este gene pertença a uma nova classe de β -lactamases, chamada classe E. Posteriormente LÜTHY *et al.*, (2002) descreveram uma nova proteína, chamada *Helicobacter cysteine-rich protein B*, que é codificada pelo gene *hcpB* e também possui a capacidade de se ligar à penicilinas. Esses autores mostraram que essa proteína hidrolisa a amoxicilina três vezes mais rápido do que a moderada atividade de β -lactamase apresentada pela *HcpA*. Estes resultados indicam a possibilidade de que alterações em *HcpB* poderiam ser responsáveis pela resistência a amoxicilina.

A perda de equilíbrio entre a produção e a destruição da parede celular durante o crescimento, como já foi dito, também é considerado como um fator de resistência ou tolerância bacteriana. *LytA* amidase (*Lysis Tolerance Protein*), a maior mureína hidrolase do *S. pneumoniae* codificado pelo gene *lytA*, tem sido associada a lise parcial do peptidoglicano promovendo a destruição osmótica da bactéria que entra em contato com antibióticos β -lactâmicos. Assim, mutações no gene *lytA* poderiam alterar a suscetibilidade da bactéria frente à estas drogas (RIVAS, *et al.*, 2002). Outra mureína hidrolase recentemente conhecida é a *LytB* uma glucosaminidase responsável pelo evento final da divisão celular, a separação física entre a célula mãe e a filha

(SANCHEZ-PUELLES, *et al.*, 1986, GARCIA, *et al.*, 1999). POTTER *et al.*, (1998) demonstraram em um estudo realizado com *E. coli* que mutações ocorridas no gene *lytB* podem inibir o crescimento bacteriano, fazendo com que os β -lactâmicos não consigam provocar lise osmótica, sendo assim, tolerantes.

MAKI, *et al.*, (1994) descreveram um gene (*llm* – *Low Level Methicillin-resistant*) que altera o nível de resistência antimicrobiana e também afeta a taxa de autólise celular. Este pode estar envolvido no metabolismo do peptídeoglicano, sendo considerado também um gene codificador de uma mureína hidrolase (KOMATSUZAWA H. *et al.*, 1997). MAKI e MURAKAMI (1997) demonstraram que o *llm* mutante promove a elevação das taxas de resistência do *Staphilococcus aureus* à meticilina, sugerindo assim que este gene seja um dos responsáveis por esta resistência.

Modificações nas proteínas responsáveis pelo alongamento celular, chamado de *rod-shape determining protein*, podem também estar associadas à resistência bacteriana aos β -lactâmicos. A morfologia bacteriana é regulada pelo balanceamento entre dois sistemas, o responsável pelo alongamento da parede celular no eixo longitudinal, e não na lateral; e o responsável pela formação de séptos no peptídeoglicano que proporcionará divisão celular (LLEO, *et al.*, 1990). Alterações no operon *mre* e no gene *rodA* de *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus thermophilus* resultaram em modificações da morfologia celular sendo este associado com o alongamento bacteriano devido a produção de *rod-shape determining protein* (DOI, *et al.*, 1988, COSTA e ANTON, 1993, HENRIQUES, *et al.*,

1998, THIBESSARD, *et al.*, 2002, LEE, *et al.*, 2003). Este operon, composto de cinco genes: *merB*, *merC*, *mreD*, *orfE* e *cafA*, juntamente com o *rodA* têm sido associado com a sensibilidade bacteriana à mecilinama, um β -lactâmico da classe das penicilinas (WACHI, *et al.*, 1987, COSTA e ANTON, 1993, LEE, *et al.*, 2003). O *FtsI* (também chamado PBP3) é uma transpeptidase responsável pela formação de séptos no peptídeoglicano, durante a divisão celular. Como o próprio nome propõe (PBP3), esta proteína constitui um dos sites de ligação dos β -lactâmicos e está sendo associada também à resistência de certas bactérias como *E. coli*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *H. influenzae*, às penicilinas (KRAUSS e HAKENBECK 1997, LIÃO e HANCOCK, 1997, YAMAMOTO e UBUKATA 2001, EBERHARDT, *et al.*, 2003).

As bactérias Gram negativas apresentam uma membrana externa responsável, dentre outras atividades, pela penetração de nutrientes e antibióticos do meio externo até seu destino final (NIKAIDO, *et al.*, 1983). Nesta membrana externa existe um grande grupo de proteínas, chamadas porinas, que formam canais dependentes de água o qual são responsáveis pela difusão de substâncias hidrofílicas (NIKAIDO e NAKAE, 1979, MURAKAMI e YOSHIDA, 1982). A maioria dos β -lactâmicos, incluindo a amoxicilina, atinge seu alvo no espaço periplasmático, através dos canais formados pelas porinas (MURAKAMI e YOSHIDA, 1982, YOSHIMURA e NIKAIDO, 1985). Vários autores têm sugerido que o mecanismo de resistência bacteriana a certas classes de antibióticos é resultante da impermeabilidade da parede celular, fazendo com que a droga não consiga atingir seu alvo. Isto se dá através de alterações de tamanho e

funcionais das porinas (RICHMOND, e SYKES, 1973, NIKAIDO e NAKAE, 1979, SUGINAKA, *et al.*, 1979, ANGUS, *et al.*, 1982, YOSHIDA e MURAKAMI, 1982, YOSHIMURA e NIKAIDO, 1985, entre outros).

Outro sistema de barreira para antibióticos tem sido reportado, o sistema de bomba de efluxo, o qual expelle alguns antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas, β -lactâmicos, macrolídeos e trimetropina (GOTOH, *et al.*, 1995, LI, *et al.*, 1995, KOEHLER, *et al.*, 1996, LI, *et al.*, 1998). Há, pelo menos, quatro famílias conservadas de sistema de efluxo associado a resistência bacteriana a antibióticos (PAULSEN, *et al.*, 1996). Uma dessas famílias, generalizada entre as Gram negativas, é a família de efluxo *resistance-nodulation-division* (RND) (SAIER, *et al.*, 1994, MOORE, *et al.*, 1995). Tal família inclui o sistema AcrAB-TolC em *E. coli* (MA, *et al.*, 1995), o sistema AcrAB em *Haemophilus influenzae* (SANCHEZ, *et al.*, 1997), o MexAB-OprM em *P. aeruginosa* (LI, *et al.*, 1995), e o MtrCDE para *Neisseria gonorrhoeae* (HAMAN, *et al.*, 1995), onde são responsáveis pela resistência intrínseca à antibióticos e também ao efluxo de uma ampla variabilidade química e estrutural de compostos não antimicrobianos. A inativação dos sistemas RND proporcionam uma hipersusceptibilidade a várias classes antimicrobianas, enquanto que o aumento da regulação deste sistema leva a uma resistência múltipla (LI, *et al.*, 1995, MOORE, *et al.*, 1995, PAULSEN, *et al.*, 1996, KOHLER, *et al.*, 1997). BINA, *et al.*, (2000) confirmaram que *H. pylori* possui três prováveis sistemas de efluxo RND chamados de

hefABC, *hefDEF* e *hefGHI*. Neste estudo, foi observado que estes não proporcionam efluxo para tetraciclina e cloranfenicol (BINA, *et al.*, 2000).

Este trabalho analisou os genes que atualmente apresentam maior probabilidade de estarem envolvidos no mecanismo de resistência e também a expressão gênica diferencial de uma linhagem resistente à amoxicilina crescida em presença e ausência da droga. Neste sentido, os resultados que foram obtidos com este trabalho poderão contribuir para a caracterização molecular dos mecanismos de resistência das linhagens brasileiras de *H. pylori* à amoxicilina, droga essa usada na terapia de erradicação.

II - OBJETIVOS



1 - Objetivo geral

Investigar dos possíveis mecanismos moleculares de resistência a amoxicilina da bactéria *Helicobacter pylori*.

2 - Objetivos específicos

Avaliar a atividade de enzimas β -lactâmases nos isolados clínicos resistentes a amoxicilina.

Confirmar a associação do gene *pbp1A* com parte da resistência do *H. pylori* a amoxicilina.

Avaliar a associação entre os genes *pbp2*, *ftsI* (*pbp3*), *pbp4*, *hcpA*, *lytB*, *rodA1*, *mreC*, *mreB*, e *lhm* com a resistência do *H. pylori* à amoxicilina.

Observar a expressão gênica diferencial de *H. pylori* crescida na ausência e presença da amoxicilina.

III - METODOLOGIA



1 – Investigação dos mecanismos moleculares de resistência.

1.1 - Linhagens

Foram incluídos neste estudo, quatro isolados clínicos de *H. pylori*, provenientes do banco de linhagens da UNIFAG-USF de Bragança Paulista, SP, e três isolados clínicos provenientes de Rotterdam, Holanda. Ambos resistentes a amoxicilina apresentando CIM entre 2 mg/L e 16 mg/L.

A linhagem tipo 26695 (The Institute for Genomic Research), foi usada com controle sensível à droga, e como controle resistente à amoxicilina foi usado a linhagem Hardenberg da Holanda.

1.2 - Métodos microbiológicos

1.2.1 - Cultivo em meio sólido

Os isolados clínicos, que estavam armazenados à -70°C, foram reativados através de cultivo em meio sólido seletivo para *H. pylori* como descrito por MENDONÇA, *et al.*, 2000.

1.2.2 - Identificação de linhagens de *H. pylori*

A morfologia das bactérias obtidas em cultura foi observada ao microscópio óptico após coloração de Gram, e as amostras que apresentaram forma característica de *H. pylori* foram confirmadas pela produção de urease, catalase e oxidase e pela amplificação dos genes específicos *glmM* e *16s rRNA*.

1.3 - Detecção de atividade β -lactamase

A produção de β -lactamase foi testada usando Nitrocefin BBL™ DrySlide™ (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). O crescimento bacteriano foi espalhado na zona reativa do DrySlide de nitrocerafina previamente umedecido. A leitura do resultado foi feita após 60min., na área reativa onde permaneceu amarela não houve detecção de β -lactamase, já a área que tornou-se rosa apresentou quantidade significativa de produção da enzima. Foi usado como controle positivo para a produção de β -lactamase a bactéria *Haemophilus influenzae* e como controle negativo *Staphylococcus aureus* de acordo com as instruções do fabricante.

1.4 - Métodos Genéticos

1.4.1 - Obtenção de DNA

Após a identificação das linhagens, o DNA genômico foi extraído, a partir do material obtido em meio sólido, utilizando-se o *DNeasy® Tissue System* (QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante.

1.4.2 – Amplificação dos genes

Os genes *pbp1A*, *pbp2*, *ftsI* (*pbp3*), *pbp4*, *hcpA*, *lytB*, *rodA1*, *mreC*, *mreB*, e *lhm* foram amplificados em amostras de DNA genômico por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR - SAIKI *et al.*, 1989), com 50 μ l de volume final contendo 20 μ mol de cada *primer* específicos (**Tabela I**), 200 μ M de cada dNTP (0,2mM dATP, 0,2mM dCTP,

0,2mM dGTP, 0,2mM dTTP), 1,5% de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase e tampão de reação para a enzima. Os produtos de PCR foram purificados com o Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, WI) seguindo as recomendações do fabricante.

1.4.3 - Transformação natural

A linhagem referência Amox^S 26695 foi transformada com ~ 1,0 µg de DNA genômico de uma linhagem Amox^R, ou 150 – 250 ng de produto amplificado e purificado de algum dos genes estudados. Os transformantes Amox^R foram selecionados em placas de Columbia ágar contendo sangue de carneiro desfibrinado e 0,25 mg/L de amoxicilina. Como controle, a bactéria foi transformada com ambos, DNA Hardenberg (Amox^R), DNA de 26695 (Amox^S) ou TE (1mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1mM EDTA) sem DNA. O CIM dessas amostras transformadas foi determinado, o DNA extraído como descrito anteriormente e o gene amplificado através de PCR usando o *primer* correspondente ao da primeira amplificação e submetido ao sequenciamento.

1.4.4 Mutação Sítio Dirigida

Três diferentes *pools* de *primers* foram produzidos baseados na sequência do gene *pbp1A* da *H. pylori* linhagem 26695 (**Tabela II**). O primeiro *pool* (espaçamento de nucleotídeos 953-1098, numerados de acordo com o gene *pbp1A* da linhagem 26695), consistindo de uma mistura de oligonucleotídeos contendo as alterações A₁₀₀₉R (A/G),

A₁₀₁₅R, G₁₀₁₉R e/ou T₁₀₂₀N (A/C/G/T), foi usado para substituição de aminoácidos do primeiro PBP motif conservado e suas adjacências STGK₃₃₈₋₃₄₁.

TABELA I – Oligonucleotídeos usados para a amplificação dos genes através de PCR e tamanho do fragmento obtido.

Oligonucleotídeo	5' → 3'	Produto (pb)
<i>pbp1A-sense</i>	AGTTTGGGTAACACGGATA	1977
<i>pbp1A-antisense</i>	CGCATGAAATACGAATACAC	
<i>pbp2-sense</i>	ATTGGCTGAACGAAACATGA	1764
<i>pbp2-antisense</i>	AAGATAGCCAAGCTCATAGA	
<i>ftsI (pbp3) - sense</i>	ACTTCAACCCAGAGCAATTT	1845
<i>ftsI (pbp3) - antisense</i>	AGAGGGCGATAGATAATTGT	
<i>pbp4-sense</i>	CCTCATTTCATAACGCTAAAG	918
<i>pbp4-antisense</i>	GTTTGGTGTTTGAAGAAGTC	
<i>hcpA-sense</i>	GTGTTTGGGCACGTTGTGTT	750
<i>hcpA-antisense</i>	AGAGCGTCGCATGCTTCTTT	
<i>lytB-sense</i>	TTGGATCGCTCATTTCATAAC	822
<i>lytB-antisense</i>	GCTGTCTTTGCAATGCTGTT	
<i>rodA1-sense</i>	ATTCCCTTGTTGGTGGTTTC	1143
<i>rodA1-antisense</i>	TGAGCCGAGTGCTCTGACCA	
<i>mreC-sense</i>	CTTCTTATATCAGCGACAGG	744
<i>mreC-antisense</i>	CTTGAACTTCGCCCCACAAA	
<i>mreB-sense</i>	TTCGCATGATATTGCCATAG	1041
<i>mreB-antisense</i>	AAACCCACACGGCTGAGTAA	
<i>llm-sense</i>	GTGTTGTGGGTGCTATTT	1008
<i>llm-antisense</i>	ACTAGGCTAATGGCAATGAG	

Entretanto os aminoácidos do segundo PBP motif conservado e seus arredores, SKN₄₀₂₋₄₀₄, foram adicionados em um segundo *pool* de oligonucleotídeos (espaçamento de nucleotídeos 1140-1313) contendo as seguintes alterações A₁₂₀₅R, T₁₂₀₇W (A/T), A₁₂₀₉M (A/C), T₁₂₁₆W, A₁₂₁₈M, C₁₂₄₃M, e/ou T₁₂₅₀W. Os aminoácidos da região do terceiro PBP motif (KTG₅₅₅₋₅₅₇) foram constituídos por uma mistura de oligonucleotídeos

(espaçamento de nucleotídeos 1575-1741) contendo as substituições C₁₆₂₂Y (C/T), A₁₆₂₇M, A₁₆₆₆N, A₁₆₇₂R, A₁₆₈₄W, e/ou A₁₆₈₇R. Os diferentes pools de oligonucleotídeos foram amplificados separadamente usando 5pmol da mistura como modelo, juntamente com 25pmol de dois primers que iniciavam as extremidades externas do fragmento. Após a amplificação, os fragmentos obtidos foram purificados e transformados na linhagem de *H. pylori* 26695 Amox^S, com a finalidade de estabelecer qual região responsável pela resistência à amoxicilina.

TABELA II: Três diferentes *pools* de *primers* desenhados baseados na sequência do gene *pbp1A* da *H. pylori* linhagem 26695 para realização da mutação sítio dirigida.

PBP-motif	Mutações	Localização do fragmento
STGK ₃₃₈₋₃₄₁	A ₁₀₀₉ R; A ₁₀₁₅ R; G ₁₀₁₉ R e T ₁₀₂₀ N	953-1098
SKN ₄₀₂₋₄₀₄	A ₁₂₀₅ R; T ₁₂₀₇ W; A ₁₂₀₉ M; T ₁₂₁₆ W; A ₁₂₁₈ M; C ₁₂₄₃ M e T ₁₂₅₀ W	1140-1313
KTG ₅₅₅₋₅₅₇	C ₁₆₂₂ Y; A ₁₆₂₇ M; A ₁₆₆₆ N; A ₁₆₇₂ R; A ₁₆₈₄ W; e A ₁₆₈₇ R	1575-1741

2 – Análise da expressão gênica diferencial

2.1 Linhagem

A linhagem Hardenberg Amox^R de origem holandesa foi usada para a execução deste experimento.

2.2 Microbiologia

2.2.1 - Cultivo em meio líquido

A bactéria pré-inoculada em meio sólido seletivo foi transferida para caldo BHI ("Brain Heart Infusion", Difco) acrescido de 10% de soro fetal bovino, cultivada a 37°C em condições de microaerofilia (Microaerobac-Probac do Brasil), com agitação orbital de 100 rpm por 48h. Após este pré-crescimento, a amostra foi dividida e transferida para caldos sem nenhuma droga e contendo 1,0 mg/L de amoxicilina. Foi incubada nas mesmas condições descritas acima, diferenciando apenas o tempo de crescimento que foi de 24h.

2.3 - Métodos Genéticos

2.3.1 - Obtenção de RNA e RAP-PCR

O RNA total das amostras crescidas na presença ou ausência de amoxicilina foi extraído de acordo com WINDERICKX E CASTRO (1994). O RAP-PCR (RNA Arbitrarily Primed PCR) foi feito de acordo com PAULINO *et al.*, (2002) com algumas modificações. Os primers arbitrários usados foram: P1 e P2 (WILLIAMS *et al.*, 1990), OPF19, OPL02, OPL16 (Operon Technologies). Os primeiros cDNAs foram sintetizados usando ready-to-go RT-PCR beads (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Para a segunda síntese, 4 µL da primeira reação foi misturado em 20 µL de uma solução contendo 1X PCR buffer, 1.25 mM, MgCl₂, 2 µM de um dos pares de primers arbitrários usado na primeira reação de síntese de cDNA, 2 µM de cada deoxynucleoside triphosphate (Gibco BRL, Grand Island),

1 μCi de [α - ^{32}P] dCTP (Amersham Biosciences) e 1.5 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer 2400 com 40 ciclos programados de 94°C por 30s, 40°C por 2 min e 72°C por 30s.

Sete microlitros de cada reação foi misturado com 5 μL de uma solução contendo 80% de formamida deionizada, 0,01% azul de bromofenol e 0,01 % de xileno cianol. As amostras foram incubadas à 80°C por 4 min e 10 μL foi aplicado em gel de 5% de poliacrilamida contendo 50% de urea. Para a corrida eletroforética, o gel foi submetido a 1320 V e 35 mA por 5 horas e depois, transferido para um papel Whatman de 3 mm e exposto a filme de raio X (Kodak).

2.3.2 - Isolamento e reamplificação dos produtos de RAP-PCR

Os produtos do RAP-PCR expressos diferencialmente foram recortados do gel e o DNA foi eluído por incubação a 95°C por 20 min em 200 μL de água milliQ. A precipitação do material genético foi feita através da adição de 3 M de acetato de sódio com 2 volumes de etanol e finalmente resuspendido em 10 μL de água milliQ. Quatro microlitros do DNA eluido foi reamplificado através de uma reação de PCR contendo 1x PCR buffer, 1.25 mM MgCl_2 , 1 μM do primer arbitrário usado na síntese de cDNA, 20 μM de todos os deoxynucleoside triphosphate (Gibco BRL) e 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen).

2.3.3 - Clonagem e sequenciamento dos produtos diferenciais de RAP-PCR

Os produtos de RAP-PCR diferencialmente expressos com alto nível de indução ou repressão foram selecionados para serem clonados e sequenciados. As amostras foram clonadas dentro do plasmídeo pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Foram selecionados randomicamente três clones de cada banda, feito a extração plasmidial e submetidos ao seqüenciamento (ABI Prism 3700 DNA Analyser, Applied Biosystems, Hitachi).

As seqüências obtidas foram comparadas com o banco de dados “The Institute for Genomic Research” - TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/cmr-blast>), e deste modo, foi identificado a localização do fragmento na linhagem 26695. Com essa localização e através do TIGR (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared>), foi possível obter a seqüência de aproximadamente 2500 nucleotídeos com o fragmento inserido. Essa seqüência foi comparada no GenBank databases usando o algoritmo ORF Finder (Open Reading Frame Finder) e também Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Ambas as funções, BLASTN e BLASTX foram usadas. Com isso, foram identificados os possíveis genes localizados nas bandas isoladas no experimento anterior.

2.3.4 - Confirmação da expressão genica diferencial

Para a confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados, foram feitas aliquotas de crescimento bacteriano, após 24 horas do inóculo. Foi usado a linhagem tipo sensível a amoxicilina 26695 e também a linhagem resistente a esta droga,

Hardenberg. Para a amox^R foi criada 4 situações diferentes: crescimento em ausência de amoxicilina e em presença de 0,25 mg/ml, 1,0 mg/ml e 2,0 mg/ml da droga. Os mRNAs foram extraídos como anteriormente, WINDERICKX E CASTRO (1994) e foi feito uma reação de transcrição reversa para síntese de cDNA. A quantificação da expressão dos genes HUNADC, *pbp1A*, *omp4*, *omp25*, *omp30*, *omp32*, *ceuE*, *ftsA*, *corA*, *rp19*, *napA*, *pepF*, *fecA*, *flg*, *copA*, *pflA*, dos hipotéticos HP1326, HP1057, HP0710, HP0178, HP1184 e do gene constitutivo *gap* foi feita por meio de PCR em tempo real. A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento iCycler IQTM (Bio-Rad) e o C_t (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do *Real-Time Detection System Software*, versão 3.0 (Bio-Rad). O C_t de uma reação é determinado, principalmente, pela quantidade de cDNA molde presente no começo da reação de amplificação.

Para um volume final de 50 µl a reação foi preparada como descrito a seguir: 25 µl de *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 10 µM de cada *primer* e 10 µl de cDNA total (100 ng). Todos os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), utilizando como molde a seqüência genômica tigr 26695.

Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 59°C por 15 s, e uma

extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95 °C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t usada para avaliação da expressão gênica. Os genes foram analisados e sua expressão normalizada de acordo com a expressão do gene constitutivo *gap*, e a expressão relativa calculada de acordo com a formula $2^{-(E_n - R_n)}$, sendo que E_n corresponde ao valor do C_t do gene estudado e R_n o valor do C_t do gene constitutivo.

IV - RESULTADOS



1 – Investigação dos mecanismos moleculares de resistência.

1.1 - Atividade β -lactamase

Em nenhum dos isolados clínicos foi detectada atividade de β -lactamase quando usado Nitrocefin BBL™ DrySlide™ (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA).

1.2 - Transformação natural

Para avaliar se a resistência à amoxicilina nos sete isolados poderiam ser transferida a uma linhagem sensível, (26695; Amox^S) usou-se a transformação natural. Para tal o DNA genômico dos isolados Amox^R foram transferidos à linhagem sensível. Colônias Amox^R foram consistentemente obtidas após a transformação com DNA genômico dos sete isolados e da linhagem controle Amox^R Hardenberg, porém não houveram colônias resistentes quando o DNA genômico da linhagem 26695 ou com TE foram utilizados. A frequência de transformação ($\sim 10^{-5}$ CFU/ μ gDNA) com DNA de isolados Amox^R foi similar à obtida com o controle positivo (Hard). Os CIMs para amoxicilina das bactérias 26695 transformadas, que se tornaram amox^R (dois transformantes de dois experimentos independentes foram testados) foram determinados por diluição em ágar e variou entre 0,5 a 1,0 mg/l (**Tabela III**).

Além da transformação com DNA genômico, realizou-se também a transformação natural, da linhagem susceptível 26695 com os genes, previamente amplificados por PCR e purificados (*pbp1A*, *pbp2*, *ftsI* (*pbp3*), *pbp4*, *hcpA*, *lytB*, *rodA1*, *mreC*, *mreB*, e *llym*). Os resultados indicam que as transformações realizadas com o

gene *pbp1A*, nos sete isolados clínicos estudados, resultaram em colônias amox^R. As frequências de transformação para o gene *pbp1A* foram idênticas às obtidas com o controle positivo (DNA de Hardemberg amox^R com 26695 amox^S) oscilando entre 10⁻⁴ à 10⁻⁷ CFU/μg DNA. Foi determinado o CIM dos transformantes *pbp1A* através do teste de diluição em ágar (MENDONÇA, *et al.*, 2000) e estes apresentaram taxas similares às encontradas nos transformantes com DNA genômico (0,5mg/L à 1,0mg/L) como mostra a **Tabela III**.

Para avaliar a estabilidade da resistência, foi extraído o DNA dos transformantes, amplificado o gene *pbp1A* e realizado uma nova transformação natural. A frequência de transformação e o CIM se mantiveram, o que nos faz classificar esta resistência como estável.

TABELA III - CIM das amostras utilizadas em nosso estudo e da linhagem tipo 26695 depois de transformada com o gene *pbp1A* dos isolados clínicos (transformantes).

Isolados	Origem	CIM original (mg/L)	CIM 26695 transformada (mg/L)
BH13	Brasil	4,0	0,5
13c	Brasil	2,0	0,5
60	Brasil	4,0	0,5
219	Brasil	8,0	1,0
SZ79	Holanda	4,0	1,0
H – I	Holanda	16,0	0,5
H – II	Holanda	16,0	0,5
26695	TIGR	>0,125	--
Hardenberg	Holanda	8,0	1,0

1.3 – Envolvimento do gene *pbp1A* com a resistência à amoxicilina

Foi realizado a análise da seqüência do gene *pbp1A* da linhagem amox^S usada como referencia (26695), dos sete isolados clínicos amox^R bem como de seus transformantes, revelando múltiplas diferenças entre sua seqüência de aminoácidos (**Tabela IV**). A maioria destas alterações foi localizada na região C-terminal da proteína PBP1A (codificada pelos nucleotídeos 960-1980).

TABELA IV - Diferenças entre os aminoácidos da proteína PBP1A isolada de *H. pylori* Amx^R e seus transformantes.

Isolados clínicos	Posição dos aminoácidos																											
	44	70	79	101	125	138	141	148	207	242	250	269	310	315	317	318	322	324	325	336	366	374	402	406	414			
26695	G	R	I	I	F	T	L	I	S	G	V	K	K	K	K	T	D	D	E	D	F	V	S	E	S			
BH13	S	H	V	V	L	I		L		S	I											G	A	A				
13	S		V		L			L														G	A	A				
60	S			V	L			L		S							D			E			V					
219					L			L				R		E	E	A			N	K								
SZ79					L		I														L							
H-I					L				N				Q									L	A	A	R			
H-II	S				L				N				Q									L	A	A	R			
	417	450	469	473	479	480	491	504	508	509	511	515	518	530	532	535	543	558	562	563	589	591	593	595				
26695	S	I	V	F	D	A	T	N	D	V	T	M	K	L	V	D	S	T	N	I	S	G	T	G				
BH13	T							D	N	I	V	I			A													
13	T							D	N	I	V	I			A	N	R											
60	T							D	N	I	V				A													
219		V			E			D		I			R			N	R			V	G	K	A	S				
SZ79														I														
H-I			M	L		V	S	D	N	I		I				N		S	Y		G		A					
H-II						V	S	D	N	I		I				N		S	Y		G		A					

Vermelho representa as trocas de aminoácidos que tiveram alguma significância e suas posições;

Verde representa os aminoácidos dos transformantes diferentes do isolado original;

Amarelo representa troca de aminoácidos que não apresentaram nenhuma significância por estar presentes tanto em *H. pylori* Amx^R quanto Amx^S.

Foram encontrados 52 aminoácidos diferentes da linhagem referência, sendo que 38 destes foram excluídos, por estarem presentes em ambas linhagens, amox^R e amox^S, ou por ter aparecido apenas após a transformação natural (**Tabela IV**). Apenas

14 trocas de aminoácidos podem ter algum papel na resistência da bactéria à amoxilina como mostra a **Tabela V**.

TABELA V: Diferenças entre os aminoácidos que tiveram alguma significância e suas posições na proteína PBP1A isolada de *H. pylori* Amx^R e seus transformantes.

Isolado clínico	Posição dos aminoácidos										
	366	402	406	414	417	467	543	589	591	593	595
26695	F	S	E	S	S	S	S	S	G	T	G
BH13		G	A		T			G		P	
13		G	A		T						
60						T					
219							R	G	K	A	S
SZ79	L			R							
H-I				R							
H-II				R							

1.4 - Identificação das mutações de PBP1A

Para identificar quais as substituições de aminoácidos do PBP1A que poderiam mediar a resistência à amoxicilina nos sete isolados clínicos dois fragmentos interpostos de *pbp1A* foram amplificados nos 7 isolados Amox^R e transformados na linhagem amox^S. O primeiro fragmento de PCR, Fragmento A (Figura 1) corresponde aos aminoácidos 26-342 (numerados de acordo com a seqüência *pbp1A*, Swissprot número de acesso 025319). Enquanto que o segundo fragmento de PCR, Fragmento B tem os aminoácidos 318-606. Colônias Amox^R foram observadas apenas depois da transformação com o tragmento B (frequência de transformação de $\sim 10^{-6}$ CFU/ μ g DNA). O CIM para amoxicilina de quatro transformantes selecionados randomicamente

(obtidos em duas transformações independentes), variou entre 0,5 e 1,0 mg/l.

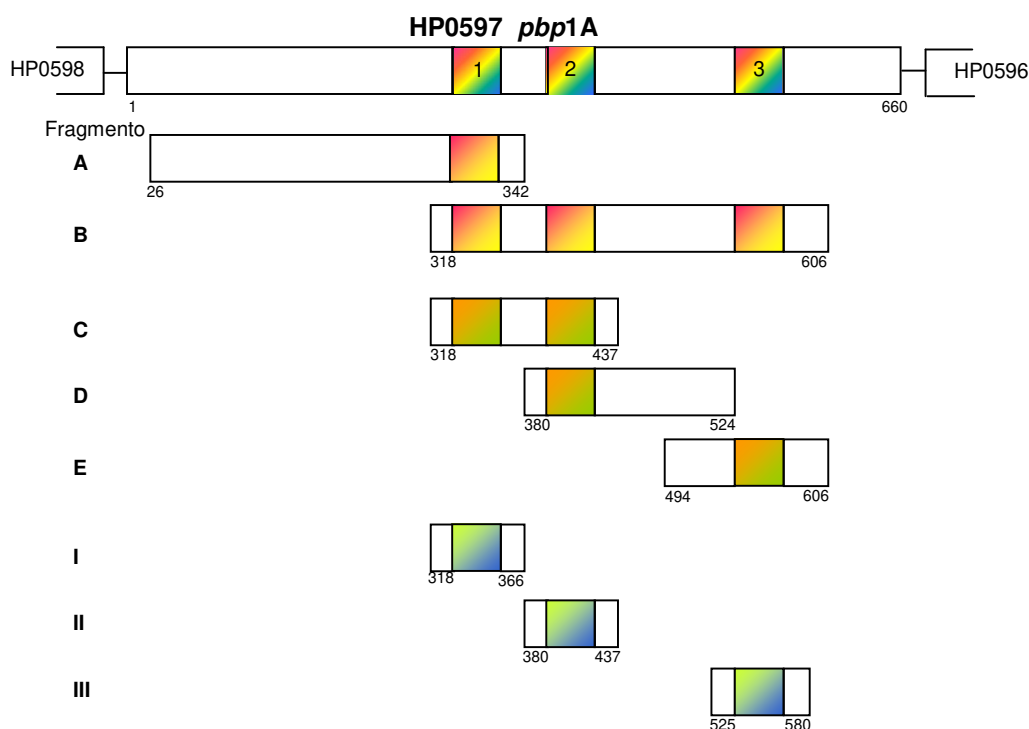


Figura 2: Localização do gene *pbp1A* no genoma da bactéria *H. pylori* linhagem 26695. Fragmentação do mesmo, para a identificação das alterações mutacionais relacionadas com a resistência a amoxicilina. Fragmentos A-E foram amplificados por PCR e usados para identificar a região que confere resistência de *H. pylori* à amoxicilina, através de transformação natural. Os fragmentos I-III foram usados para confirmação das mutações relacionadas à resistência, através de mutação sitio-dirigida. Regiões coloridas representadas por 1, 2 e 3 representam os PBP *motif* conservados STGK₃₃₈₋₃₄₁, SKN₄₀₂₋₄₀₄ e KTG₅₅₅₋₅₅₇, respectivamente.

Subseqüentemente, três fragmentos menores, C, D e E (figura 1) sobrepostos ao fragmento B, foram amplificados nas linhagens Amox^R e transformados. Para as linhagens 13, SZ79, H-I e H-II, colônias Amox^R foram apenas observadas na transformação com o fragmento C (frequência de transformação de $\sim 10^{-6}$ CFU/ μ g DNA) enquanto que para as amostras 60 e 219 os fragmentos D e E revelaram colônias Amox^R respectivamente (frequência de transformação de $\sim 10^{-7}$ CFU/ μ g DNA). Para o isolado BH13, não foram obtidas transformantes Amox^R usando esses fragmentos menores. Os CIMs para amoxicilina dos transformantes obtidos foram similares aos valores de CIMs dos transformantes obtidos com o fragmento B.

Análise das seqüências dos fragmentos menores de *pbp1A* que transferiram a resistência à amoxicilina revelaram múltiplas alterações de aminoácidos presentes nos isolados Amox^R e em seus transformantes obtidos, os quais não ocorrem na linhagem referência amox^S (**Tabela III**). Todas as alterações foram localizadas na região C-terminal da proteína PBP1A codificado pelos aminoácidos 320-660, numerados de acordo com a sequência PBP1A da linhagem 26695 de *H. pylori*, no segundo (SKN₄₀₂₋₄₀₄) ou terceiro (KTG₅₅₅₋₅₅₇) *motif* conservado de PBP e suas adjacências (**Tabela III**).

1.5 - Alterações Mutacionais nos *motifs* conservados de PBP e suas adjacências conferem resistência à amoxicilina

Para confirmar que apenas as mutações no segundo e terceiro *motif* conservado de PBP e suas adjacências, mediavam a resistência à amoxicilina em *H. pylori*, a

linhagem 26695 foi transformada com 3 diferentes *pools* de fragmentos de PCR, os quais continham algumas alterações nas região de em 1 dos três *motifs* conservados. Colônias Amox^R foram observados após a transformação com os *pools* de fragmentos II e III (**Figura 2**) (frequência de transformação de $\sim 10^{-6}$ CFU/ μ g DNA) que continham mutações no segundo (SKN₄₀₂₋₄₀₄) ou terceiro (KTG₅₅₅₋₅₅₇) *Motifs* conservado de PBP e suas adjacências. Não foram observadas colônias Amox^R após a transformação com o fragmento I, que continha mutações no primeiro *motif* conservado de PBP STGK₃₃₈₋₃₄₁ e suas adjacências. Os CIMs para amoxicilina dos transformantes obtidos foram similares aos valores dos CIMs dos transformantes obtidos após a transformação com o fragmento B. A análise da seqüência da região do segundo e terceiro *motif* conservado de PBP de 16 transformantes Amox^R selecionados randomicamente, obtidos de quatro experimentos independentes usando ambos fragmentos II e III, revelaram algumas substituições de aminoácidos em um dos dois PBPs motifs ou nas suas adjacências.

Sete dos transformantes Amox^R continham a substituição S₄₀₂G, E₄₀₆A, and S₄₁₇T, enquanto que um transformante apenas a substituição S₄₁₄R. Para o fragmento III, todos os 8 transformantes Amox^R analisados continham uma substituição T₅₅₅R e N₅₄₂Y. Adicionalmente, outros diferentes aminoácidos foram detectados, seis transformantes Amox^R continham a substituição S₅₄₂R, uma substituição, enquanto que três tinham a substituição T₅₄₂I e uma substituição adicional I₅₆₂V foi observada. Fora

às mutações já mencionadas, não foram detectadas alterações na sequência da parte C-terminal da proteína PBP 1A.

2 – Análise da expressão gênica diferencial

2.1- cDNAs reprimidos ou induzidos pela amoxicilina

Para avaliar o efeito da amoxicilina na expressão gênica global da linhagem Hardenberg foi usado a RAP-PCR. Foram usados 5 diferentes pares de *primers* arbitrários que geraram 101 bandas com expressão diferencial. Com o *primer* OPL02 foram identificados 11 fragmentos de cDNAs com sua expressão reduzida e 6 com a expressão aumentada. O *primer* OPL16 identificou um número maior de bandas com expressão diferencial, apresentando 16 cDNAs com expressão diminuída e 9 aumentada. O *primer* que apresentou maior quantidade de bandas diferencialmente expressas foi o P1, neste obtivem 19 cDNAs com expressão reprimida e 12 com expressão aumentada. O *primer* OPF19 gerou apenas 6 bandas com expressão gênica diferenciada (4 reduzidas e 2 aumentadas).

As tabelas e figuras a seguir mostram os genes identificados, por sequenciamento, para cada banda selecionada e suas possíveis funções moleculares. Os genes que foram identificados como induzidos e reprimidos foram excluídos.

TABELA VI: cDNAs com expressão diferencial identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL02.

Banda	Genes Identificados
A-1	Não reamplificado
A-2	Não reamplificado
A-3	iron(III) dicitrate transport protein (<i>fecA</i>)
A-4	penicillin-binding protein 1A (<i>pbp-1A</i>)
A-5	hydantoin utilization protein A (<i>hyuA</i>)
A-6	iron(III) dicitrate transport protein (<i>fecA</i>)
A-7	60 kDa chaperonin (<i>groEL</i> protein)
	penicillin-binding protein 1A (<i>pbp-1A</i>)
	hydantoin utilization protein A (<i>hyuA</i>)
A-8	hypothetical protein HP1411
A-9	hypothetical protein HP0453
	outer membrane protein (<i>omp32</i>)
A-10	outer membrane protein (<i>omp32</i>)
	anthranilate isomerase (<i>trpC</i>)
A-11	conserved hypothetical secreted protein
	cell division protein (<i>ftsA</i>) protein
A+1	Não reamplificado
A+2	Não reamplificado
A+3	flagellar basal-body rod protein (<i>flgG</i>)
	hypothetical protein HP1586
A+4	paralysed flagella protein (<i>pflA</i>)
	molecular chaperone (<i>dnaK</i>)
A+5	aspartokinase (<i>lysC</i>)
A+6	iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-binding protein (<i>ceuE</i>)

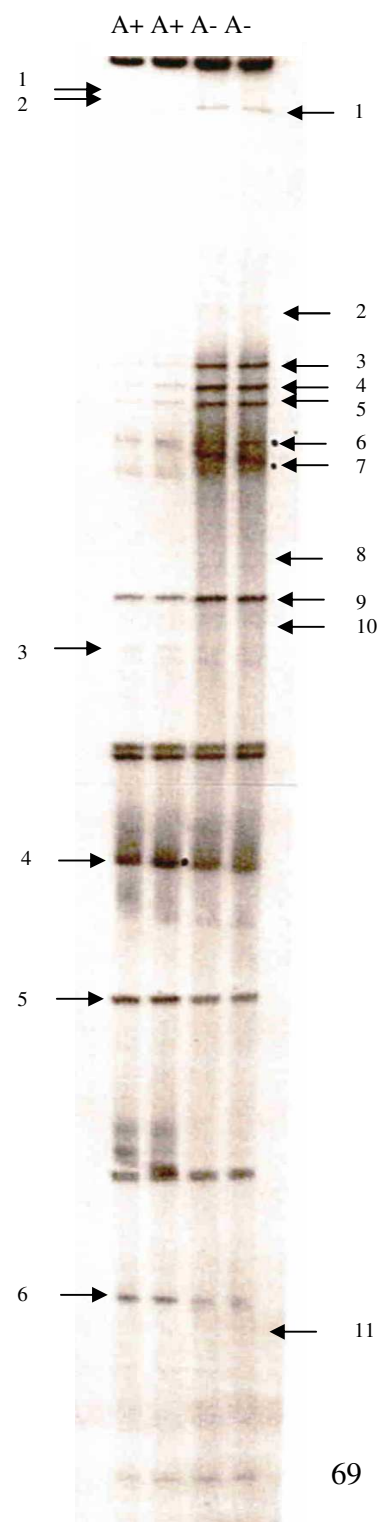


Figura 3: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário OPL02. Os cDNAs foram amplificados em duplicata com radioatividade e os resultados observados através de exposição do gel a filme de raio X.

TABELA VII: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL02, com base no banco de dados TIGR.

cDNA	Localização	Gene	Função genica
Reprimido	HP0686	<i>fecA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
	HP0597	<i>pbp-1A</i>	Envelope: Síntese e degradação de mureína e peptidoglicano
	HP0695	<i>hyuA</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
	HP0010	<i>groEL</i>	Proteína controladora: dobra e estabilização proteica
	HP1501	<i>omp32</i>	Envelope celular: Outros
	HP1279	<i>trpC</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
	HP0978	<i>ftsA</i>	Processo celular: Divisão celular
Induzido	HP1092	<i>flgG</i>	Processo celular: motilidade e quimiotaxia
	HP1274	<i>pflA</i>	Processo celular: motilidade e quimiotaxia
	HP0109	<i>dnaK</i>	Proteína controladora: dobra e estabilização proteica
	HP1229	<i>lysC</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
	HP1561	<i>ceuE</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores

TABELA VIII: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL16, com base no banco de dados TIGR.

cDNA	Localização	Gene	Função genica
Reprimido	HP0686	<i>fecA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
	HP0538	<i>cag17</i>	Processo celular: patogênese
	HP0509	<i>glcD</i>	Metabolismo energético: ciclo TCA
	HP0144	<i>fixN</i>	Metabolismo energético: transporte de eletrons
	HP1345		Metabolismo energético: glicólise/gliconeogênese
Induzido	HP0109	<i>dnaK</i>	Proteína controladora: dobra e estabilização proteica
	HP0590		Metabolismo energético: Anaerobico
	HP0376	<i>hemH</i>	Biossíntese: porfirina, cobalamina e hemoglobina
	HP0514	<i>rpI9</i>	Envelope celular: Outros
	HP0214	<i>huNaDC-1</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores

TABELA IX: cDNAs com expressão diferencial identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPL16.

Banda	Genes Identificados
A-1-4	Não reamplificado
A-5	conserved hypothetical ATP-binding protein
A-6	Não reamplificado
A-7	hypothetical protein HP0710
A-8	iron(III) dicitrate transport protein (<i>fecA</i>) cag pathogenicity island protein (<i>cag17</i>) hypothetical protein HP0710
A-9	cag pathogenicity island protein (<i>cag17</i>) hypothetical protein HP0710
A-10	Não reamplificado
A-11	Phosphoglycerate kinase
A-12	No significant similarity found.
A-13	glycolate oxidase subunit (<i>glcD</i>) hypothetical protein HP1175
A-14	hypothetical protein HP1175
A-15	cytochrome c oxidase, heme b and copper-binding subunit, membrane-bound (<i>fixN</i>)
A-16	Não reamplificado
A+1	Não reamplificado
A+2	molecular chaperone (<i>dnaK</i>)
A+3	molecular chaperone (<i>dnaK</i>) ferredoxin oxidoreductase beta subunit
A+4	No significant similarity found
A+5	hypothetical protein HP1396
A+6	No significant similarity found.
A+7	No significant similarity found.
A+8	No significant similarity found.
A+9	ferrochelataase (hemH) 50S ribosomal protein L9 (<i>rpL9</i>) sodium-dependent transporter (huNaDC-1)

Figura 4: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário OPL16. Os cDNAs foram amplificados em duplicata com radioatividade e os resultados observados através de exposição do gel a filme de raio X.

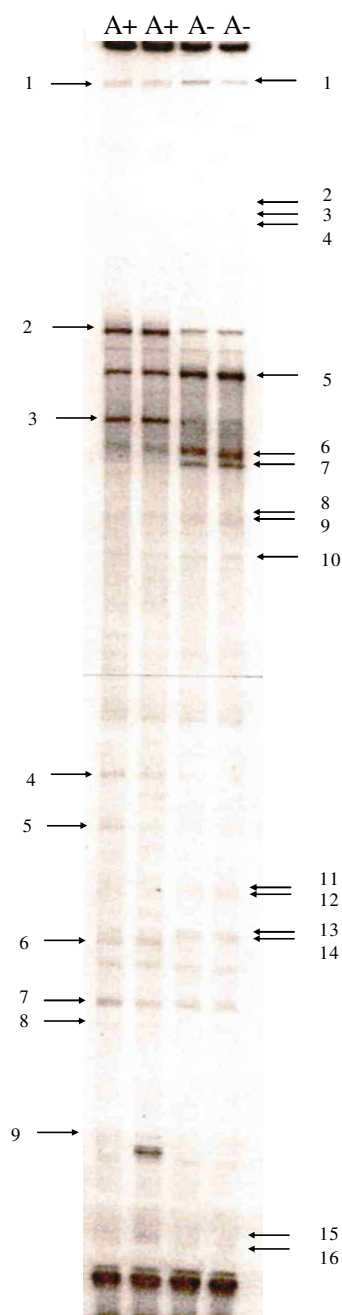


TABELA X: cDNAs com expressão diferencial (subexpress: identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P1

Banda	Genes Identificados
A-1 a -4	Não reamplificado
A-5	anaerobic dehydrogenase (<i>glpC</i>) hypothetical protein HP0668 – HP0667
A-6	heat shock protein (<i>hsjU</i>) ORF1 GTP-binding protein (<i>era</i>)
A-7	hypothetical protein HP0668 threonyl-tRNA synthetase (<i>thrS</i>)
A-8	heat shock protein (<i>hsjU</i>) ORF1 GTP-binding protein (<i>era</i>)
A-9	threonyl-tRNA synthetase (<i>thrS</i>)
A-10	molecular chaperone (<i>dnaK</i>)
A-11	ATP-dependent protease (<i>lon</i>)
A-12 e 13	threonyl-tRNA synthetase (<i>thrS</i>) heat shock protein (<i>hsjU</i>) ORF1
	GTP-binding protein (<i>era</i>)
A-14	galactosidase acetyltransferase (<i>lacA</i>) GTP-binding protein (<i>era</i>)
A-15	conserved hypt ATP-binding protein hypothetical protein HP0060
A-16	GTP-binding protein (<i>era</i>) heat shock protein (<i>hsjU</i>) ORF1
A-17	3-deoxy- phosphate synthase (<i>dhs1</i>)
A-18	flagellar hook protein (<i>flgE</i>)
A-19	hypothetical protein HP0771 aspartate transcarbamoylase (<i>pyrB</i>)

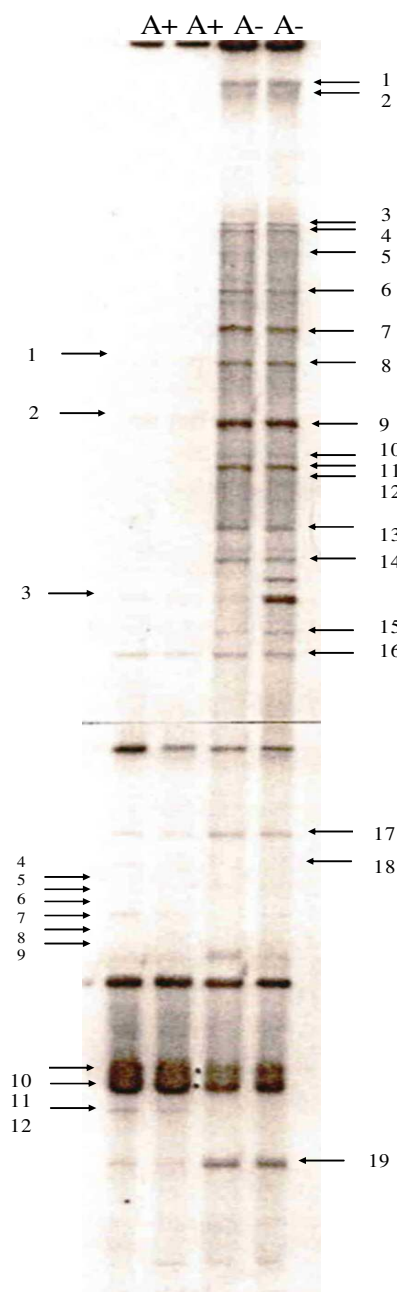


Figura 5: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário P1. Os cDNAs foram amplificados em duplicata com radioatividade e os resultados observados através de exposição do gel a filme de raio X.

TABELA XI: cDNAs com expressão diferencial (superexpressos)

identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P1.

Banda	Genes Identificados
A+1	GTP-binding protein (<i>era</i>) heat shock protein (<i>hsIU</i>) ORF1
A+2	Não reamplificado
A+3	GTP-binding protein (<i>era</i>) heat shock protein (<i>hsIU</i>) ORF1
A+4	DNA polymerase III subunit beta (<i>dnaN</i>) DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)
A+5 à +7	oligoendopeptidase F (<i>pepF</i>)
A+8 e 10	Não reamplificado
A+9	oligoendopeptidase F (<i>pepF</i>)
A+11	guanosine phosphohydrolase (<i>gppA</i>) hypothetical protein HP0745
A+12	carbamoyl-phosphate synthase (<i>pyrAB</i>)

TABELA XII: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P1, com base no banco de dados TIGR.

cDNA	Localização	Gene	Função genica
Reprimido	HP0666	<i>glpC</i>	Metabolismo energético: Anaeróbico
	HP0516	<i>hsIU</i>	Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptídeos, and glicopeptídeos
	HP0517	<i>era</i>	Processo celular: outros
	HP0123	<i>thrS</i>	Biossíntese: Síntese proteica
	HP0109	<i>dnaK</i>	Proteína controladora: dobra e estabilização proteica
	HP1379	<i>lon</i>	Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptídeos, and glicopeptídeos
	HP0908	<i>flgE</i>	Processo celular: motilidade e quimiotaxia
	HP1084	<i>pyrB</i>	Biossíntese: Purina, pirimidina, nucleotídeo, nucleosídeo
	HP0134	<i>dhs1</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
	HP0574	<i>lacA</i>	Metabolismo energético: caminho da fosfato pentose
Induzido	HP0517	<i>era</i>	Processo celular: outros
	HP0516	<i>hsIU</i>	Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptídeos, and glicopeptídeos
	HP0500	<i>dnaN</i>	Metabolismo DNA: replicação, recombinação e reparo do DNA
	HP0501	<i>gyrB</i>	Metabolismo DNA: replicação, recombinação e reparo do DNA
	HP0470	<i>pepF</i>	Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptídeos, and glicopeptídeos
	HP0278	<i>gppA</i>	Proteína controladora: Outros
	HP0919	<i>pyrAB</i>	Biossíntese: Purina, pirimidina, nucleotídeo, nucleosídeo

TABELA XIII: cDNAs com expressão diferencial (subexpressos) identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P2.

Banda	Genes Identificados
A-1	Não reamplificado
A-2	magnesium cobalt transport protein (corA)
A-3	NA ⁺ /H ⁺ antiporter (napA)
A-4	spore coat polysac biosynthesis protein E
A-5	ABC transporter, ATP-binding protein (secA)
A-6 e A-7	spore coat polysac biosynthesis protein E
A-8	ABC transporter, ATP-binding protein (secA)
A-9	NA ⁺ /H ⁺ antiporter (napA)
A-10	hypothetical protein HP1184
A-11	NA ⁺ /H ⁺ antiporter (napA)
A-12	hypothetical protein HP1184
A-13	spore coat polysac biosynthesis protein E
A-14	ABC transporter, ATP-binding protein (secA)
A-15	glycinamide ribonucleotide synthetase (purD)
A-16	iron(III) dicitrate transport protein (fecA)
A-17	outer membrane protein (omp30)
A-18	NA ⁺ /H ⁺ antiporter (napA)
A-19	hypothetical protein HP1184
A-20	preprotein translocase subunit (secA)
A-21	outer membrane protein (omp4)
A-22	hypothetical protein HP0120
A-23	phosphoenolpyruvate synthase (ppsA)
A-24	hypothetical protein HP0453
A-25	methionyl-tRNA synthetase (metS)
A-26	site-specific DNA-methyltransferase
A-27	hypothetical protein HP1587
A-28	glycinamide ribonucleotide synthetase (purD)
A-29	urease B
A-30	glycinamide ribonucleotide synthetase (purD)

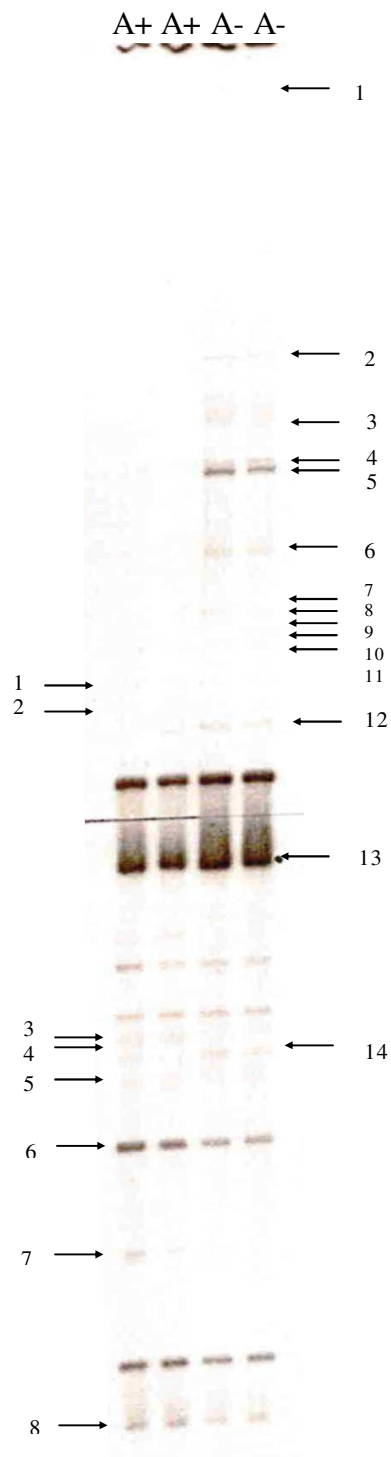


Figura 6: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário P2. Os cDNAs foram amplificados em duplicata com radioatividade e os resultados observados através de exposição do gel a filme de raio X.

TABELA XIV: cDNAs com expressão diferencial (superexpressos) identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P2.

Banda	Genes Identificados
A+1	hypothetical protein HP1327 hypothetical protein HP1326
A+2	glycinamide ribonucleotide synthetase (<i>purD</i>) cag pathogenicity island protein (<i>cag7</i>)
A+3	class C acid phosphatase
A+4	hypothetical protein HP0129
A+5	phosphoglycerate dehydrogenase (<i>serA</i>) outer membrane protein (<i>omp25</i>)
A+6	cag pathogenicity island protein (<i>cag7</i>) GTP-binding protein (<i>era</i>)
A+7	GTP-binding protein (<i>era</i>)
A+8	cag pathogenicity island protein (<i>cag23</i>) cation-transporting ATPase, P-type (<i>copA</i>)

TABELA XV: Prováveis funções e categorias funcionais dos cDNAs identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário P2, com base no banco de dados TIGR.

cDNA	Localização	gene	Função genica
Reprimido	HP1344	<i>corA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
	HP1183	<i>napA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
	HP0417	<i>metS</i>	Biossíntese: Síntese proteica
	HP1522	<i>mod</i>	Metabolismo DNA: restrição e/ou modificação
	HP0178		Envelope: Síntese e degradação de polissacarídeos e lipossacarídeos da superfície
	HP0072	<i>ureB</i>	Metabolismo central: Outros
	HP0179	<i>secA</i>	Proteína controladora: secreção e movimentação de proteínas e peptídeos
	HP1218	<i>purD</i>	Biossíntese: Purina, pirimidina, nucleotídeo, nucleosídeo
	HP0686	<i>fecA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
	HP0121	<i>ppsA</i>	Metabolismo energético: glicólise/gliconeogênese
	HP0127	<i>omp4</i>	Envelope celular: Outros
	HP1395	<i>omp30</i>	Envelope celular: Outros
	HP1218	<i>purD</i>	Biossíntese: Purina, pirimidina, nucleotídeo, nucleosídeo
	HP0527	<i>cag7</i>	Processo celular: patogênese
	HP0517	<i>era</i>	Processo celular: outros
Induzido	HP0544	<i>cag23</i>	Processo celular: patogênese
	HP1503	<i>copA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores

TABELA XVI: cDNAs com expressão diferencial identificados por RAP-PCR a partir do *primer* arbitrário OPF19

Banda	Genes Identificados
A-1	Não reamplificado
A-2	No putative conserved domains have been detected
A-3	No putative conserved domains have been detected
A-4	hypothetical protein HP1057
A+1	hypothetical protein HP1057 outer membrane protein (<i>omp25</i>)
A+2	hypothetical protein HP 1057

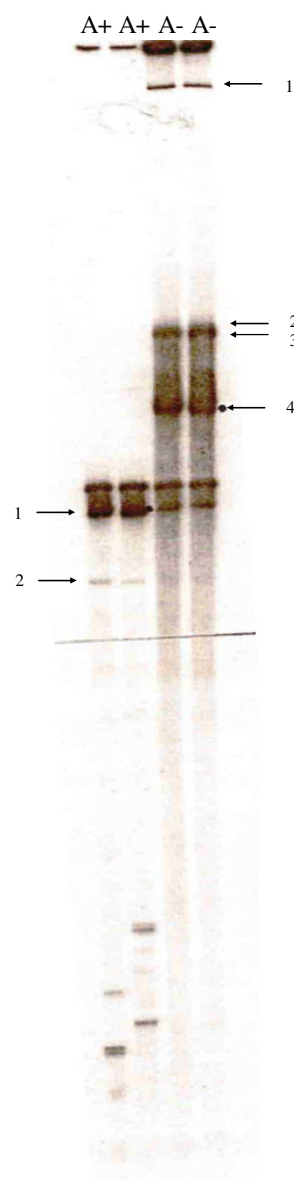


Figura 7: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *H. pylori* cultivada na presença e ausência de amoxicilina. Como exemplo é mostrado o gel obtido com o *primer* arbitrário OPF19. Os cDNAs foram amplificados em duplicata com radioatividade e os resultados observados através de exposição do gel a filme de raio X.

TABELA XVII: Prováveis genes e categorias funcionais dos cDNAs isolados das bandas identificadas por RAP-PCR que tiveram expressão reprimida na presença de 1mg/l de amoxicilina.

Localização	Gene	Função genica
HP0134	<i>dhs1</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
HP0695	<i>hyuA</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
HP1279	<i>trpC</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
HP1084	<i>pyrB</i>	Biossíntese: Purina, pirimidina, nucleotídeo, nucleosídeo
HP0123	<i>thrS</i>	Biossíntese: Síntese proteica
HP0417	<i>metS</i>	Biossíntese: Síntese proteica
HP1395	<i>omp30</i>	Envelope celular: Outros
HP1501	<i>omp32</i>	Envelope celular: Outros
HP0127	<i>omp4</i>	Envelope celular: Outros
HP0597	<i>bbp-1A</i>	Envelope: Síntese e degradação de mureína e peptideoglicano
HP0178		Envelope: Síntese e degradação de polissacarídeos e lipossacarídeos da superfície
HP0072	<i>ureB</i>	Metabolismo central: Outros
HP1522	<i>mod</i>	Metabolismo DNA: restrição e/ou modificação
HP0666	<i>glpC</i>	Metabolismo energético: Anaeróbico
HP0574	<i>lacA</i>	Metabolismo energético: caminho da fosfato pentose
HP0509	<i>glcD</i>	Metabolismo energético: ciclo TCA
HP1345		Metabolismo energético: glicólise/gliconeogênese
HP0121	<i>ppsA</i>	Metabolismo energético: glicólise/gliconeogênese
HP0144	<i>fixN</i>	Metabolismo energético: transporte de elétrons
HP0978	<i>ftsA</i>	Processo celular: Divisão celular
HP0908	<i>flgE</i>	Processo celular: motilidade e quimiotaxia
HP0538	<i>cag17</i>	Processo celular: patogênese
HP1379	<i>lon</i>	Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptídeos, and glicopeptídeos
HP0010	<i>groEL</i>	Proteína controladora: dobra e estabilização proteica
HP0179	<i>secA</i>	Proteína controladora: secreção e movimentação de proteínas e peptídeos
HP1344	<i>corA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
HP0686	<i>fecA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
HP1183	<i>napA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores

TABELA XVIII: Prováveis genes e categorias funcionais dos cDNAs isolados das bandas identificadas por RAP-PCR que tiveram expressão induzida na presença de 1mg/l de amoxicilina.

Localização	Gene	Função genica
HP1229	<i>lysC</i>	Biossíntese: biossíntese de aminoácido
HP0919	<i>pyrAB</i>	
HP0376	<i>hemH</i>	
HP0514	<i>rpI9</i>	Biossíntese: porfirina, cobalamina e hemoglobina
HP0501	<i>gyrB</i>	Envelope celular: Outros
HP0500	<i>dnaN</i>	Metabolismo DNA: replicação, recombinação e reparo do DNA
HP0590		
HP1092	<i>flgG</i>	Metabolismo energético: Anaeróbico
HP1274	<i>pflA</i>	Processo celular: motilidade e quimiotaxia
HP0544	<i>cag23</i>	
HP0527	<i>cag7</i>	Processo celular: patogênese
HP0470	<i>pepF</i>	Processo celular: patogênese
HP0278	<i>gppA</i>	Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptídeos, and glicopeptídeos
HP0214	<i>huNaDC-1</i>	
HP1561	<i>ceuE</i>	Proteína controladora: Outros
HP1503	<i>copA</i>	Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
		Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores
		Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores

Dentre os cDNAs com expressão diferencial identificados a partir de RAP-PCR usando os 5 pares de primers arbitrários, 6 cDNAs com expressão induzida foram identificados como genes que codificam proteínas hipotéticas e 10 cDNAs com expressão reprimidas também foram classificadas desta forma. Estas proteínas hipotéticas apresentaram similaridades com proteínas descritas em outros seres vivos exceto as codificadas pelos genes HP1396 e HP1586 que não tem funções conhecidas, como mostra a **Tabela XIX**.

TABELA XIX: cDNAs com expressão induzida (+) ou reprimida (-) em células de *H. pylori* cultivadas em presença de amoxicilina. Genes identificados como hipotéticos com base no banco de dados e similaridades com outros seres vivos.

cDNA	Gene hipotético localização	Similaridades	Organismo	E-value
+	HP1327	outer membrane efflux protein	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	2e-08
+	HP1326	cation efflux system	<i>Aquifex aeolicus</i>	2e-05
+	HP0745	pseudouridine synthase	<i>Helicobacter acinonychis</i>	3e-162
+	HP1586	proteínas hipotéticas		
+	HP0129	DNA mismatch repair protein	<i>Bacteroides fragilis</i>	0.041
+	HP1396	proteínas hipotéticas		
-	HP1184	multi antimicrobial extrusion protein	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	1e-62
-	HP0120	viral A-type inclusion protein, putative	<i>Trichomonas vaginalis</i>	2e-09
-	HP0453	normocyte binding protein 2b	<i>Plasmodium falciparum</i>	1e-05
-	HP1587	small GTP-binding protein	<i>Shewanella sp</i>	3e-09
-	HP1175	inner membrane protein	<i>Campylobacter curvus</i>	1e-153
-	HP0060	viral A-type inclusion protein, putative	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1e-04
-	HP0771	putative ABC transporter, permease protein	<i>Clostridium difficile</i>	0.005
-	HP0668	type III restriction enzyme, res subunit	<i>Acidovorax avenae subsp.</i>	1e-119
-	HP1411	myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	<i>Aedes aegypti</i>	0.025
-	HP0710	hom-family outer membrane protein fragment 2	<i>Helicobacter acinonychis</i>	4e-63

2.2- Confirmação da expressão gênica diferencial

Para a confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados foi realizado PCR em tempo real, usando diferentes preparações de cDNA. A PCR em tempo real foi feita com *primers* específicos dos genes identificados que, de alguma forma, poderiam estar associados à resistência da bactéria à amoxicilina. Os genes selecionados foram: HUNADC, *pbp1A*, *omp4*, *omp25*, *omp30*, *omp32*, *ceuE*, *ftsA*, *corA*, *rpI9*, *napA*, *pepF*, *fecA*, *flg*, *copA*, *pflA* e os hipotéticos HP1326, HP1057, HP0710, HP0178, HP1184.

Apenas o gene *pepF*-oligoendopeptidase F (Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptídeos, and glicopeptídeos) e o gene hipotético HP1326 (sistema de efluxo de cátions-*Aquifex aeolicus*) tiveram sua superexpressão confirmada (**Gráfico 1**). Já os genes com expressão reprimida, foi confirmado a diminuição da expressão em presença de amoxicilina nos genes *pbp1A*- *penicillin-binding protein* 1A (Envelope: Síntese e degradação de mureína e peptídeoglicano), *omp30*- outer membrane protein 30, (envelope celular) *omp32*- outer membrane protein 32 (envelope celular), *ftsA*-cell division protein (Processo celular: Divisão celular), *napA*-NA⁺/H⁺ antiporter (Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores) e HP0178 - spore coat polysac biosynthesis protein E (Envelope: Síntese e degradação de polissacarídeos e lipossacarídeos da superfície) (**Gráfico 2**).

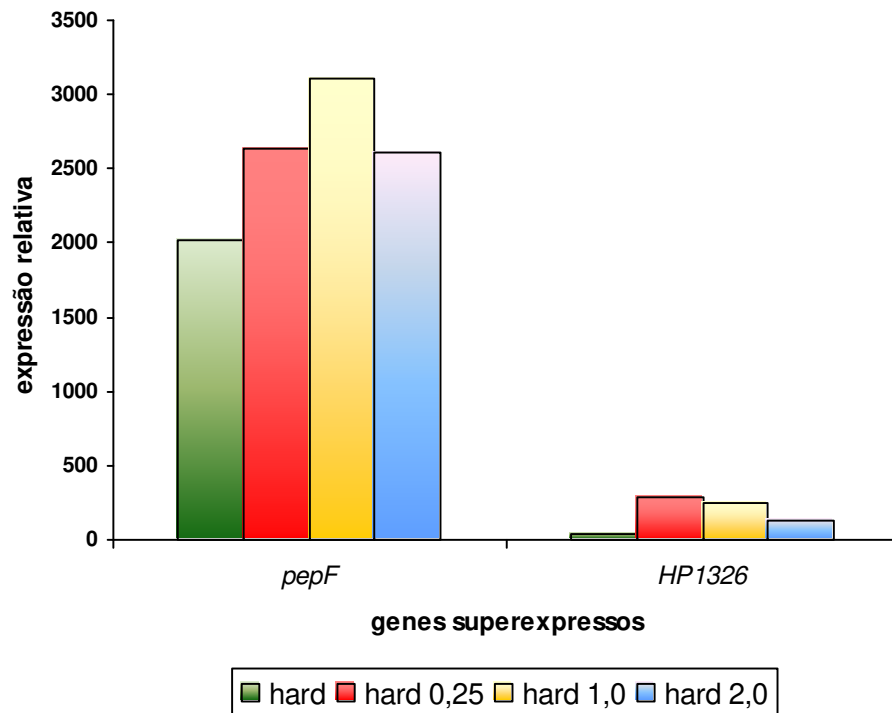


Gráfico 1: Expressão relativa dos cDNAs que tiveram expressão aumentada quando a bactéria *Helicobacter pylori* amox^r Hardenberg cresceu em presença de amoxicilina em concentração 0,25 mg/l (hard 0,25), 1,0 mg/l (hard 1,0), e 2,0 mg/l (hard 2,0) comparada com a mesma bactéria crescida em ausência da droga (hard).

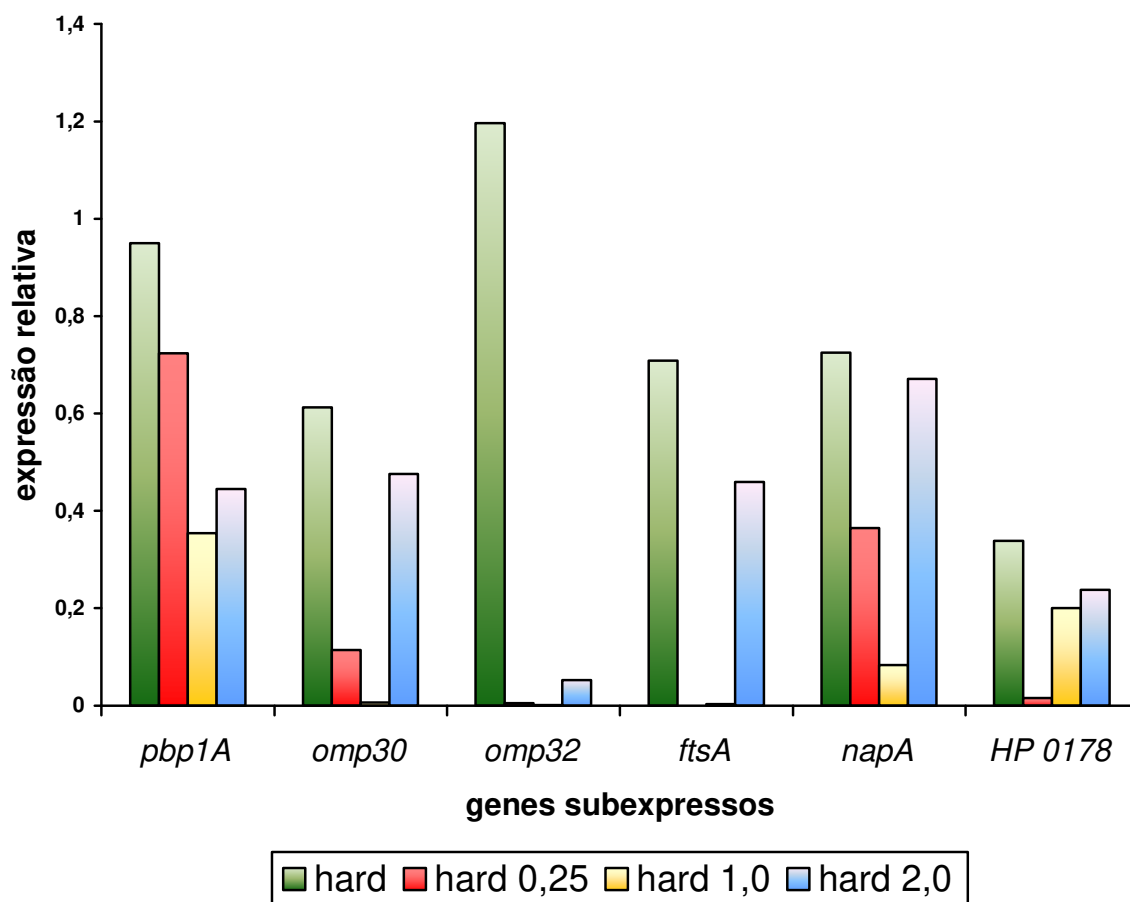


Gráfico 2: Expressão relativa dos cDNAs que tiveram expressão diminuída quando a bactéria *Helicobacter pylori* amox^r Hardenberg cresceu em presença de amoxicilina em concentração 0,25 mg/l (hard 0,25), 1,0 mg/l (hard 1,0), e 2,0 mg/l (hard 2,0) comparada com a mesma bactéria crescida em ausência da droga (hard).

V - DISCUSSÃO



A maioria dos isolados de *H. pylori* é sempre susceptível à amoxicilina, um antibiótico comumente usado na terapia de erradicação do *H. pylori*. O primeiro isolado clínico de *H. pylori* amox^R estável descrita foi a Hardenberg, a qual foi isolada de um paciente holandês dispéptico com 82 anos de idade (van ZWET *et al.*, 1998). Em comparação aos outros antibióticos usados na terapia de erradicação de *H. pylori*, a linhagem Hardenberg mostrou ser sensível a tetraciclina, claritromicina e metronidazol (GERRITS *et al.*, 2002).

A resistência a amoxicilina é emergente nos isolados clínicos, especialmente em países onde esse antibiótico pode ser obtido sem prescrição. Assim, o mecanismo molecular de resistência a amoxicilina tem sido apenas identificada em poucas linhagens *H. pylori* resistentes e tolerantes (DORE, *et al.*, 1999, GERRITS *et al.*, 2002, KWON, *et al.*, 2003, OKAMOTO, *et al.*, 2002, CO, *et al.*, 2004).

A maioria das bactérias Gram negativa resistentes à β -lactâmicos possuem em seu espaço periplasmático, substâncias que hidrolizam estas drogas, as chamadas β -lactamases. Em bactérias Gram negativas, a resistência à β -lactâmicos é na maioria das vezes, devido à produção dessas β -lactamases, codificadas cromossomicamente ou por plasmídeos (BUSH, 2001). Foi realizado um ensaio para avaliar uma possível produção desta enzima, que não foi detectada em nenhum dos isolados clínicos estudados. Consistente com outros estudos em *H. pylori*, a resistência à amoxicilina de todos os sete isolados clínicos resistentes não foi mediado pela atividade de

β -lactamases, podendo assim excluir-se a relação entre a presença de β -lactamase e a resistência à amoxicilina em *H. pylori* (VAN ZWET, *et al.*, 1998, DORE, *et al.*, 1999, GERRITS *et al.*, 2002, ROOP, *et al.*, 2002, KWON, *et al.*, 2003, OKAMOTO, *et al.*, 2002,).

Alterações em proteínas de ligação à penicilina (PBP - *penicillin binding proteins*), afetam a capacidade de ligação a droga, não alterando a formação de peptideoglicano, tornando assim, a bactéria resistente (KELLY *et al.*, 1986, MALOUIN e BRYAN, 1986). Essas alterações em PBPs também tem sido descritas como o mecanismo molecular de resistência de bactérias Gram positivas aos β -lactâmicos.

Para avaliar se a resistência a amoxicilina nos sete isolados poderia ser transferida para uma bactéria sensível, a linhagem 26695 (Amox^S) foi transformada. Apenas a transformação realizada com o gene *pbp1A* resultou em colônias amox^R em todos os isolados estudados. GERRITS, *et al.*, (2002) e KWON, *et al.*, (2003) estudaram os mesmos dez genes em amostras de *H. pylori* isoladas de pacientes da Holanda, Itália, Coréia e Japão. Em ambos os trabalhos, o resultado foi equivalente ao nosso, na qual o gene *pbp1A* estaria associada com uma parte da resistência da bactéria à amoxicilina. Concomitantemente, estudos envolvendo resistência a amoxicilina em *Streptococcus pneumoniae* têm demonstrado que os altos índices de resistência estão associados com mutações em diversos genes (PLESSIS *et al.*, 2002), nossos resultados não permitiram a exclusão de que mutações em outros genes

poderiam conferir tal resistência, uma vez que as linhagens transformantes não apresentaram o mesmo índice de resistência que a linhagem original.

Neste estudo demonstramos que a resistência à amoxicilina em todos os isolados de *H. pylori*, são estáveis e mediados por varias alterações mutacionais no gene que codifica a proteína PBP1A. A maioria destas mutações está localizada na região C-terminal da proteína (codificada pelos nucleotídeos 960-1980) (GOFFIN e GHUYSEN, 1998). Esta região, também chamada de domínio transpeptidase da PBP1A, contém três *motifs* conservados de PBP: SXXK, SXN e KTG (GOFFIN e GHUYSEN, 1998, HARRIS, *et al.*, 2000). HARRIS, *et al.*, (2000) demonstraram que os *motifs* SXN (402-404) e KTG (555-557) podem estar envolvidos na formação e estabilização de fendas ativas na camada de peptídeoglicano. Foram encontrados 52 aminoácidos diferentes da linhagem referencia, o qual 24 deles foram excluídos, sendo 19 por estar presentes em ambos amox^R e amox^S e os outros cinco por ter aparecido apenas após a transformação natural, não estando presente na amostra original. Como foi usado na PCR, taq DNA polimerase de baixa fidelidade estas alterações podem ter sido criadas na reação sendo assim excluídas.

A PBP1A tem sido caracterizada bioquimicamente como uma bifuncional *glycosyl transferase-acyl transpeptidase* (ISHINO, *et al.*, 1980, NAKAGAWA, *et al.*, 1984). O domínio *acyl traspeptidase*, localizado na região C terminal de PBP1A, contém 3 possíveis *motifis penicillin-binding*: STGK 338-341 (onde S é o resíduo de serina essencial) ocupa a posição central no centro catalítico da fenda ativa, ao passo

que o motif 2 SKN 402-403 e o motif 3, KTG 402-404 estão localizados no exterior (GOFFIN e GHUYSEN, 1998, HARRIS, *et al.*, 2000). Em *H. pylori*, a ligação primária da amoxicilina à fenda ativa do PBP1A interfere no crescimento bacteriano (DeLONEY, *et al.*, 1999, HARRIS, *et al.*, 2000). As mutações observadas nos isolados Amox^R (**Tabela 5**) confirma a importância desta região para a resistência de *H. pylori* à amoxicilina. A técnica de mutação sítio dirigida usando oligonucleotídeos definiu a localização das mutações em um dos *motifs* de PBP ou suas adjacências, comprovando que alterações mutacionais no segundo e terceiro PBP *motif* e seus arredores conferem resistência a amoxicilina. Foi observado que em *H. pylori*, as substituições S₄₀₂G (localizado no segundo PBP motif), E₄₀₆A, S₄₁₇T, S₄₁₄R, T₅₅₅S (localizados no terceiro PBP motif) e N₅₆₁Y representam os maiores fatores relacionados à resistência. Os CIMs para amoxicilina para os transformantes Amox^R obtidos foram de 5 -10 vezes mais baixo que os CIMs dos sete isolados naturalmente resistentes à amoxicilina. A re-transformação dos transformantes com DNA total da Hardenberg ou de um dos sete isolados estudados não resultaram em um aumento de CIM para a esta droga o que sugere que além das mutações em múltiplos *loci*, alterações de permeabilidade e mecanismos de efluxo poderiam contribuir para o alto nível de resistência do *H. pylori* à amoxicilina.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados em outras espécies bacterianas resistentes à β -lactâmicos, os quais observaram alterações em um ou dois *motifs* conservados. ASAH I e UBUKATA (1998) associaram a substituição na Thr₃₇₁ em PBP1A com a resistência de *Streptococcus pneumoniae* à penicilina e outros estudos

observaram também que algumas trocas de aminoácidos no PBP1A em que reduziam a atividade de cefalexina em *E. coli* (HEDGE e SPRATT, 1985), e da ampicilina em *Haemophilus influenzae* (UBUKATA, *et al.*, 2001).

Em resumo, nos isolados de *H. pylori* naturalmente resistentes à amoxicilina a resistência é mediada por várias alterações mutacionais no segundo e terceiro *motifs* conservado de PBP1A e suas adjacências. Entretanto não podemos excluir a relação de outros genes com essa resistência. Contrariamente ao observado para a claritromicina e tetraciclina (VERSALOVIC, *et al.*, 1996, RIBEIRO, *et al.*, 2004), a rápida detecção de resistência à amoxicilina por testes moleculares é inviável devido ao grande número de mutações observadas em *pbp 1A* associadas com a resistência à amoxicilina.

Podemos sugerir que a diminuição na produção da proteína alvo da amoxicilina, PBP1A no caso da *H. pylori*, resulte em um aumento no índice de resistência à droga. Outro fator que devemos levar em consideração é o fato de que as bactérias Gram negativas apresentam membranas externas, responsáveis dentre outras atividades, pela penetração de nutrientes e antibióticos do meio externo até seu destino final (NIKAIDO, *et al.*, 1983). Nesta membrana externa existe um grande grupo de proteínas, as porinas, que formam canais dependentes de água o qual são responsáveis pela difusão de substâncias hidrofílicas como os β -lactâmicos (NIKAIDO e NAKAE, 1979, MURAKAMI e YOSHIDA, 1982, YOSHIMURA e NIKAIDO, 1985). Vários autores têm sugerido que o mecanismo de resistência bacteriana a certas

classes de antibióticos é resultante da impermeabilidade da parede celular, fazendo com que a droga não consiga atingir seu alvo. Isto se dá através de alterações de tamanho e funcionais das porinas (RICHMOND, e SYKES, 1973, NIKAIDO e NAKAE, 1979, SUGINAKA, *et al.*, 1979, ANGUS, *et al.*, 1982, YOSHIDA e MURAKAMI, 1982, YOSHIMURA e NIKAIDO, 1985, entre outros). Essas alterações podem ocorrer devido a mutações no gene codificador da porina ou a sua produção alterada.

Outro sistema de barreira para antibióticos tem sido reportado, o sistema de bomba de efluxo, o qual expelle alguns antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas, β -lactâmicos, macrolídeos e trimetropina (GOTOH, *et al.*, 1995, LI, *et al.*, 1995, KOEHLER, *et al.*, 1996, LI, *et al.*, 1998). Há, pelo menos, quatro famílias conservadas de sistema de efluxo associado à resistência bacteriana a antibióticos (PAULSEN, *et al.*, 1996). A inativação desses sistemas proporciona uma hipersusceptibilidade a várias classes antimicrobianas, enquanto que o aumento da regulação deste sistema leva a uma resistência múltipla (LI, *et al.*, 1995, MOORE, *et al.*, 1995, PAULSEN, *et al.*, 1996, KOHLER, *et al.*, 1997).

Os genes de *H. pylori* induzidos e reprimidos pela presença de amoxicilina ainda não são bem conhecidos. No presente estudo, cinco primers arbitrários foram usados para avaliar a expressão gênica diferencial da linhagem Hardenberg de *H. pylori* frente a esta droga. Para isso, o *fingerprint* obtido de células bacterianas crescidas na presença de amoxicilina foi comparado ao obtido a partir das mesmas células crescidas em ausência do antibiótico. A técnica usada, RAP – PCR, foi feita em duplicata, sendo

que esta se mostrou muito eficiente para a caracterização de expressão gênica do *H. pylori* em resposta a amoxicilina, com grande número de produtos de RAP – PCR diferencialmente expressos. Esses resultados estão de acordo com a literatura, sendo que outros autores tiveram sucesso no uso de RAP – PCR para a identificação de genes expressos diferencialmente em procariontes (PAULINO *et al.*, 2002, FRIAS-LOPEZ *et al.*, 2004, LI *et al.*, 2006).

GOH *et al.*, (2002) reportou que baixas concentrações de eritromicina e rifampicina alteram a transcrição padrão de *Salmonella typhimurium*. No nosso estudo, o isolamento de 101 cDNAs diferencialmente expressos, com cinco primers arbitrários, indicou que 1mg/L de amoxicilina altera a transcrição da linhagem de *H. pylori* amox^R, Hardenberg.

É interessante notar que dentre os 101 produtos de RAP – PCR identificados, 64 foram reprimidos e 37 induzidos pela droga. Assim, ainda que seja necessários mais estudos para dar suporte a essa hipótese, podemos concluir que a amoxicilina preferencialmente reprime o perfil de transcrição gênica, com 63% de cDNAs diferencialmente expressos, na linhagem Amox^R Hardenberg.

Os produtos da RAP – PCR foram reamplificados, clonados e três clones de cada banda selecionada foram seqüenciados. Nossos resultados mostraram que a amoxicilina altera a expressão de genes envolvidos com biosínteses, patogenicidade, processos celulares, metabolismo energético, proteína de degradação, proteínas de transporte e ligação, proteínas hipotéticas e, o mais importante, as relacionadas com

formação do envelope celular, já que é o alvo da amoxicilina. Sabe-se que a expressão gênica das bactérias é dependente da adaptação e sobrevivência em condições de estresse encontradas em seu hospedeiro (McGEE e MOBLEY, 1999). Sendo assim, é normal a alteração na expressão de vários genes ligados ao metabolismo celular. Nesse sentido, os resultados apresentados por este estudo, mostraram que a presença de amoxicilina aumenta a expressão de genes relacionados com a manutenção da homeostase dos metais (HP0214, PH1326, HP1503, HP1561, **Tabelas XVII e XVIII**). Em *H. pylori*, a expressão de genes que codificam proteínas de efluxo e armazenamento de metais não tem sido, até agora, associados com resistência a antimicrobianos. Entretanto, PRAMANIK e BRAUN, (2006) mostraram que mutações no operon ABC Transporter inativavam o transporte e era relacionado com a resistência de *Streptococcus pneumoniae* à albomicina. Embora a amox^R afete a taxa de crescimento, e esta é alterada pela composição da parede celular, por consequência, afeta as proteínas de importação/exportação/ligação de metais, sugerimos que os genes relacionados a transporte de metais, os quais tiveram a expressão alterada pela amoxicilina, podem possivelmente estar envolvidos com o efluxo de amoxicilina pela linhagem Hardenberg.

Nenhuma β -lactamase foi identificada entre os produtos diferencialmente expressos. Entretanto, dentre os produtos do RAP – PCR dois genes que codificam proteínas da membrana externa, *omp4* (HP0127) *omp25* (HP1156), *omp30* (HP1395) e *omp32* (HP1501) tiveram a expressão alterada na presença de amoxicilina. Outros

genes associados ao processo de divisão celular tiveram similariedade com as seqüências das bandas selecionadas (HP0178 e HP0978), inclusive o gene codificador da proteína PBP1A, além de genes relacionados com envelope celular e motilidade.

Para os genes que, de alguma forma, poderiam estar associados com o mecanismo molecular de resistência de *H. pylori* à amoxicilina, foram desenhados primers específicos para confirmar a expressão diferencial através de PCR em tempo real. Para isso foi usando diferentes preparações de mRNA da bactéria amox^R em 4 situações diferentes: crescimento em ausência de amoxicilina e em presença de 0,25mg/ml, 1,0mg/ml e 2,0mg/ml da droga.

Apenas o gene *pepF* e o gene hipotético HP1326 tiveram sua superexpressão confirmada (**Gráfico 1**). Já os genes com expressão reprimida, foi confirmado a diminuição da expressão em presença de amoxicilina nos genes *pbp1A*, *omp30*, *omp32*, *ftsA*, *napA* (**Gráfico 2**). Como os genes identificados primeiramente tiveram origem do sequenciamento de três clones obtidos de cada banda selecionada, era esperado que não se confirmassem a expressão diferencial de todos os genes escolhidos para a realização do RT-PCR quantitativo.

O gene *pepF* encontrado em muitas espécies bactérias ainda não tem uma função específica. Foi associada com a codificação de uma endopeptidase ou uma transpeptidase com funções auxiliares no processo de esporulação em *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* e também como uma proteinase do envelope celular associada ao uso de substratos do leite para o crescimento de *Lactococcus*

lactis (NARDI, *et al.*, 1997, KANAMARU, *et al.*, 2002, CHAO, *et al.*, 2006). Não há registros de que este gene possa estar associado com a resistência bacteriana a alguma droga, a não ser que a bactéria tenha a capacidade de esporulação como um mecanismo de defesa à droga.

O gene hipotético HP1326 apresenta similariedade com o gene codificador do sistema de efluxo de cátions (*czcB*) de *Aquifex aeolicus*. Esse gene é responsável a resistência que muitas bactérias têm a metais pesados (CANOVAS, *et al.*, 2003, ABOU-SHANAB *et al.*, 2007). Em *H. pylori*, esse gene provavelmente age na manutenção da quantidade de íons cobre no citoplasma da célula (WAIDNER, *et al.*, 2002). Sendo um gene que codifica uma proteína de membrana responsável por efluxo com expressão aumentada quando a bactéria entra em contato com a amoxicilina, este gene poderia estar relacionado ao mecanismo de resistência da bactéria frente à droga estudada. Já o gene *napA-NA⁺/H⁺ antiporter* responsável pelo transporte de sais, teve sua expressão diminuída. Este gene foi associado com modulação e resistência de pH do ambiente externo e também a resistência bacteriana a grandes quantidades de sais (HELLMER, *et al.*, 2002, WUTIPRADITKUL, *et al.*, 2005, FURRER, *et al.*, 2007), porém não há relatos associando esta proteína a transporte de outras substâncias.

A *Omp30* é uma proteína caracterizada como uma porina, de função não muito bem entendida em *H. pylori*. CARLSOHN, *et al.*, 2006 sugere que esta proteína possa estar associada à entrada de substâncias incluindo drogas na célula bacteriana, mas isso ainda não foi confirmado. Entretanto a *Omp32* foi caracterizada como uma porina

anion-seletiva (ZETH *et al.*, 2000, COTRERAS *et al.*, 2003), esses genes foram reprimidos pela amoxicilina, podendo assim, diminuir a entrada de droga no espaço periplasmático, local onde a amoxicilina age. É interessante notar que cDNA que codifica a PBP1A foi identificada neste experimento. A expressão desse foi diminuída na presença de 1mg/L de amoxicilina. DeLONEY e SCHILLER (1999) sugeriram que a enzima PBP1 seria o alvo principal de ligação dos antibióticos β -lactâmicos em *H. pylori*, o gene *ftsA* que também teve a expressão diminuída em presença da droga estudada, que é um modulador da divisão celular da mesma família que as PBPs (BERNARD, *et al.*, 2007, PICHOFF e LUTKENHAUS, 2007). Outro gene subexpresso associado à divisão celular é o HP0178 - *spore coat polysac biosynthesis protein E* que tem como função a síntese e degradação de polissacarídeos e lipossacarídeos da superfície (Schirm *et al.*, 2003). Sendo assim, a diminuição na expressão desses genes poderia ser responsável pelo aumento do índice de resistência à amoxicilina.

Análises futuras de cDNAs diferencialmente expressas na presença de amoxicilina permitirá uma melhor compreensão de ambos, (1) mecanismos moleculares de resistência e (2) mecanismos de adaptação usados por *H. pylori* na presença deste antibiótico.

Nossos resultados sugerem que a resistência de *Helicobacter pylori* à amoxicilina é multifatorial, podendo ser uma combinação de fatores como as mutações identificadas no gene *pbp1A*, e a alteração da expressão de alguns genes como *pbp1A*- *penicillin-binding protein 1A* (Envelope: Síntese e degradação de mureína e

peptideoglicano), *omp30*- outer membrane protein 30, (envelope celular) *omp32*- outer membrane protein 32 (envelope celular), *ftsA*-cell division protein (Processo celular: Divisão celular), *napA*-NA⁺/H⁺ antiporter (Transporte e ligação proteica: Cations e ions carregadores) , HP0178 - spore coat polysac biosynthesis protein E (Envelope: Síntese e degradação de polissacaródeos e lipossacarídeos da superfície), *pepF* - oligoendopeptidase F (Proteína controladora: Degradação de proteínas, peptideos, and glicopeptideos) e o gene hipotético HP1326 (sistema de efluxo de cátions-*Aquifex aeolicus*).

VI - CONCLUSÕES



-
- Nossos resultados excluem a relação entre β -lactamase e resistência de *H.pylori* à amoxicilina.
 - Os genes *pbp2*, *ftsI* (*pbp3*), *pbp4*, *hcpA*, *lytB*, *rodA1*, *mreC*, *mreB*, e *lhm* não transferem resistência a amoxicilina.
 - Nos sete isolados clínicos resistentes à amoxicilina, a resistência é mediada por varias mutações localizadas no segundo e terceiro *motif* conservado de PBP e suas adjacências do gene *pbp1A*.
 - As substituições responsáveis pela resistência foram S₄₀₂G, E₄₀₆A, S₄₁₇T, S₄₁₄R, T₅₅₅R e N₅₄₂Y.
 - A presença de amoxicilina altera a expressão gênica na Linhagem Hardenberg da *H. pylori*, observado através da técnica de RAP-PCR.
 - Os cDNAs induzidos ou reprimidos a presença de amoxicilina, estão envolvidos de forma geral, na adaptação da bactéria a nova situação, visto o grande número de cDNAs envolvidos com o metabolismo.
 - Sugerimos uma possível associação entre os genes diferentemente expressos e a resistência do *H. pylori* a amoxicilina.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ABOU-SHANAB, R.A.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J.S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere. Jun; 68(2): 360-7, 2007.**
- ALARCÓN, T.; DOMINGO, D.; PRIETO, N.; and LOPEZ-BREA, M. Clarithromycin resistance stability in *Helicobacter pylori*: influence of the MIC and type of mutation in the 23S rRNA. **J. Antimicrob. Chemother. 46:613-616, 2000.**
- ALM, R.A.; LING, L.S.; MOIR, D.T.; KING, B.L.; BROWN, E.D.; DOIG, P.C.; SMITH, D.R.; NOONAN, B.; GUILD, B.C.; DEJONGE, B.L.; CARMEL, G.; TUMMINO, P.J.; CARUSO, A.; URIA-NICKELSEN, M.; MILLS, D.M.; IVES, C.; GIBSON, R.; MERBERG, D.; MILLS, S.D.; JIANG, Q.; TAYLOR, D.E.; VOVIS, G.F.; and TRUST, T.J. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature 397:176-180, 1999.**
- ANGUS, B.L.; CAREY, A.M.; CARON, D.A.; KROPINSKI, A.M.B.; and HANCOCK, R.E.W. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. **Antimicrob. Agents Chemother. 21:299-309, 1982.**
- ANONYMOUS. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC, **Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 61:1-241, 1994.**

- ASAHI, Y.; and UBUKATA, K. Association of a thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** **42**(9):2267-73, 1998.
- BAYERDORFFER, E.; NEUBAUER, A.; RUDOLPH, B.; THIEDE, C.; LEHN, N.; EIDT, S.; and STOLTE M. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. **Lancet**. **345**:1591-4, 1995.
- BAYERDORFFER, E.; RITTER, M.M.; HATZ, R.; BROOKS, W.; RUCKDESCHEL, G.; and STOLTE, M. Healing of protein losing hypertrophic gastropathy by eradication of *Helicobacter pylori*—is *Helicobacter pylori* a pathogenic factor in Menetrier's disease? **Gut** **35**:701–704, 1994.
- BERESWILL, S.; KRAINICK, C.; STAHLER, F.; HERRMANN, L.; and KIST, M. Analysis of the *rdxA* gene in high-level metronidazole-resistant clinical isolates confirms a limited use of *rdxA* mutations as a marker for prediction of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **36**:193-198, 2003.
- BERNARD, C.S.; SADASIVAM, M.; SHIOMI, D.; MARGOLIN, W. An altered FtsA can compensate for the loss of essential cell division protein FtsN in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol. Jun**; **64**(5): 1289-305, 2007.
- BINA, J.E.; ALM, R.A.; URIA-NICKELSEN, M.; THOMAS, S.R.; TRUST, T.J.; and HANCOCK, R.E. *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **44**:248-254, 2000.

BLASER, M.J. Gastric campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease.

Gastroenterology **93**:371-383, 1987.

BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **J. Infect. Dis.** **161**:626-633, 1990.

BLASER, M.J. Science, medicine, and the future: *Helicobacter pylori* and gastric diseases. **BMJ** **316**:1507-1510, 1998.

BOIGEGRAIN, R.A.; SALHIM, I.; ALVAREZ-MARTINEZ, M.T.; MACHOLD, J.; FEDON, Y.; ARPAGAU, M.; WEISE, C.; RITTIG, M.; and ROUOT, B. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. **Infect. Immun.** **72**:5693-703, 2004.

BORODY, T.J.; ANDREWS, P.; FRACCHIA, G.; BRANDL, S.; SHORTIS, N.P.; and BAE, H. Omeprazole enhances efficacy of triple therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. **Gut.** **37**:477-81, 1995.

BUSH, K. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.** **32**:1085–9, 2001.

CANOVAS, D.; CASES, I.; DE LORENZO, V. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. **Environ Microbiol. Dec**; **5**(12): 1242-56, 2003.

CARLSOHN, E.; NYSTRÖM, J.; KARLSSON, H.; SVENNERHOLM, A.M.; NILSSON, C.L. Characterization of the outer membrane protein profile from disease-related

Helicobacter pylori isolates by subcellular fractionation and nano-LC FT-ICR MS analysis. **J Proteome Res. Nov; 5(11):3197-204**, 2006.

CHAO, S.H.; CHENG, T.H.; SHAW, C.Y.; LEE, M.H.; HSU, Y.H.; TSAI, Y.C. Characterization of a novel PepF-like oligopeptidase secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A. **Appl Environ Microbiol. Jan; 72(1): 968-71**, 2006.

CHIBA, N. Effects of *in vitro* antibiotic resistance on treatment: bismuth-containing regimens. **Can. J. Gastroenterol. 14:885-9**, 2000.

CHISHOLM, S. A.; and OWEN, R. J. Frameshift mutations in *frxA* occur frequently and do not provide a reliable marker for metronidazole resistance in UK isolates of *Helicobacter pylori*. **J. Med. Microbiol. 53: 135-40**, 2004.

CHOPRA, I.; and ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews 65:232-260**, 2001.

CO EMZ, G.M.; Harrington, J.M.; Lopez-Vidal, Y.; Schiller, N.L. Characterization of amoxicillin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. **ASM A-089**, 2004.

COELHO, L.G.V.; MATTOS, A.A.; FRANCISCONI, C.F.M.; CASTRO, L.P.; ANDRÉ S.B. Eficácia do regime terapêutico empregando a associação de pantoprazol, claritromicina e amoxicilina, durante uma semana, na erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera péptica. **Arq. Gastroenterol. 41:71-6**, 2004.

COELHO, L.G.V.; ZATERKA S., Representantes indicados pela Federação Brasileira de Gastroenterologia e Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter*. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arq. Gastroenterol.** **42**:128-132, 2005.

CONTRERAS, M.; THIBERGE, J.M.; MANDRAND-BERTHELOT, M.A.; and LABIGNE, A. Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol.** **49**:947-63, 2003.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-first American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. **Cancer Res.** **52**: 6735-6740, 1992.

COSTA, C.S.; and ANTON D.N. Round-cell mutants of *Salmonella typhimurium* produced by transposition mutagenesis: lethality of *rodA* and *mre* mutations. **Mol Gen Genet.** **236**(2-3): 387-94, 1993.

DAILIDIENE, D.; BERTOLI, M.T.; MICIULEVICIENE, J.; MUKHOPADHYAY, A.K.; DAILIDE, G.; PASCASIO, M.A.; KUPCINSKAS, L.; and BERG, D.E. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. **Antimicrob. Agents Chemother.** **46**:3940-6, 2002.

DANI, R.; QUEIROZ, D.M.; DIAS, M.G.; FRANCO, J.M.; MAGALHÃES, L.C.; MENDES, G.S.; MOREIRA, L.S.; DE CASTRO, L.P.; TOPPA, N.H.; ROCHA, G.A.; CABRAL M.M.; and SALLES, P.G. Omeprazole, clarithromycin and furazolidone for the eradication of

Helicobacter pylori in patients with duodenal ulcer. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **13**:647-52, 1999.

DE FRANCESCO, V.; MARGIOTTA, M.; ZULLO, A.; HASSAN, C.; VALLE, N.D.; BURATTIN, I. O.; D'ANGELO, R.; STOPPINO, G.; CEA, U.; GIORGIO, F.; MONNO, R.; MORINI, S.; PANELLA, C.; and IERARDI, E. Claritromycin resistance and *Helicobacter pylori* genotypes in Italy. **J. Microbiol.** **44**:660-4, 2006.

DEBETS-OSSENKOPP, Y.J.; BRINKMAN, A.B.; KUIPERS, E.J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; and KUSTERS, J.G. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **42**:2749-2751, 1998.

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

DEBETS-OSSENKOPP, Y.J.; NAMAVAR, F.; and MACLAREN, D.M. Effect of an acidic environment on the susceptibility of *Helicobacter pylori* to trospectomycin and other antimicrobial agents. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **14**:353-5, 1995.

DeLONEY C.R.; and SCHILLER N.L. Characterization of an In vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **44**(12):3368-73, 2000.

DELONEY, C.R.; and SCHILLER, N.L. Competition of various beta-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology. **Antimicrob. Agents Chemother.** **43**(11):2702-9, 1999.

DOI, M.; WACHI, M.; ISHINO, F.; TOMIOKA, S.; ITO, M.; SAKAGAMI, Y.; SUZUKI, A.; and MATSUHASHI, M. Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. **J. Bacteriol.** **170**(10):4619-24, 1988.

DORE, M.P.; GRAHAM, D.Y.; and SEPULVEDA, A.R. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. **Helicobacter** **4**:154–61, 1999.

DORE, M.P.; GRAHAM, D.Y.; SEPULVEDA, A.R.; REALDI, G.; and OSATO M.S. Sensitivity of amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* to other penicillins. **Antimicrob. Agents Chemother.** **43**(7):1803-4, 1999.

DORE, M.P.; PIANA, A.; CARTA, M.; ATZEI, A.; ARE, B.M.; MURA, I.; MASSARELLI, G.; MAIDA, A.; SEPULVEDA, A.R.; GRAHAM, D.Y.; and REALDI G. Amoxycillin resistance is one reason for failure of amoxycillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **12**:635-9, 1998.

DU PLESSIS, M.; BINGEN, E.; and KLUGMAN, K.P. Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. **Antimicrob. Agents Chemother.** **46**:2349-2357, 2002.

- DUNN, B.E.; COHEN, H.; and BLASER, M.J. *Helicobacter pylori*. **Clin. Microbial. Reviews** **10**:720-741, 1997.
- EBERHARDT, C.; KUERSCHNER, L.; and WEISS D.S. Probing the catalytic activity of a cell division-specific transpeptidase in vivo with beta-lactams. **J. Bacteriol.**, **185**:3726-34, 2003.
- ECCLISSATO, C.; MARCHIORETTO, M.A.; MENDONCA, S.; GODOY, A.P.; GUERSONI, R.A.; DEGUER, M.; PIOVESAN, H.; FERRAZ, J.G.; and PEDRAZZOLI J. Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. **Helicobacter**, **7**: 53-9, 2002.
- EIDT, S.; STOLTE, M.; and FISCHER, R. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. **J. Clin. Pathol.**, **47**:436–439, 1994.
- FALLONE C.A. Epidemiology of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Canada. **Can. J. Gastroenterol.**, **14**: 879-82, 2000.
- FORMAN, D; NEWELL, D.G; FULLERTON, F; YARNELL, J.W; STACEY, A.R; WALD, N.; and SITAS F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. **Br. Med. J.**, **302**: 1302-1305, 1991.
- FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; and LAMP, K.C. Metronidazole. A therapeutic review and update. **Drugs**, **54**: 679-708, 1997.
- FRENCK R.W.Jr.; and CLEMENS J. *Helicobacter* in the developing world. **Microbes Infect.**, **5**:705-13, 2003.

- FRIAS-LOPEZ, J.; BONHEYO, G.T.; and FOUKE, B.W. Identification of differential gene expression in bacteria associated with coral black band disease by using RNA-arbitrarily primed PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **70**:3687-94, 2004.
- FURRER, E.M.; RONCHETTI, M.F.; VERREY, F.; POS, K.M. Functional characterization of a NapA Na(+)/H(+) antiporter from *Thermus thermophilus*. **FEBS Lett. Feb 6**; **581**(3):572-8, 2007.
- GARCIA, P.; GONZALEZ, M.P.; GARCIA, E.; LOPEZ, R.; and GARCIA, J.L. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. **Mol Microbiol.**, **31**(4):1275-7, 1999.
- GERRITS, M.M.; SCHUIJFFEL, D.; van ZWET, A.A.; KUIPERS, E.J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; and KUSTERS, J.G. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46**:2229-2233. 2002.
- GHOSH, H. A.S.; KAR, A.K.; and KUNDU, M. Alterations in high molecular mass penicillin-binding protein 1 associated with beta-lactam resistance in *Shigella dysenteriae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**; **248**:669–72, 1998.
- GISBERT, J. P.; and PAJARES, J. M. *Helicobacter pylori* therapy: first-line options and rescue regimen. **Dig. Dis.** **19**: 134-143, 2001.
- GISBERT, J.P.; and PAJARES, J.M. Treatment of *Helicobacter pylori* eradication failures. **Curr. Treat. Options Gastroenterol.**, **6**:147-156, 2003.

GLUPCZYNSKI, Y.; MEGRAUD, F.; LOPEZ-BREA, M.; and ANDERSEN, L.P. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **20**:820-3, 2001.

GODOY, A.P.O.; RIBEIRO, M.L.; BENVENGO, Y.H.; VITIELLO, L.M.; MIRANDA, M.B.; MENDONCA, S.; and PEDRAZZOLI, J. Jr. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. **BMC Gastroenterol.** **3**:20, 2003.

GOFFIN, C.; and GHUYSEN, J.M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, **62**:1079-1093, 1998.

GOH, E.B.; YIM, G.; TSUI, W.; MCCLURE, J.; SURETTE, M.G.; and DAVIES, J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **99**:17025-30, 2002.

GOLDMAN, R.C.; ZAKULA, D.; FLAMM, R.; BEYER, J.; and CAPOBIANCO, J. Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **38**:1496-1500, 1994.

GOMEZ-LUS, R. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. **Int. Microbiol.** **1**:279-84, 1998.

GOMOLLON, F.; SICILIA, B.; DUCONS, J.A.; SIERRA, E.; REVILLO, M.J.; and FERRERO, M. Third line treatment for *Helicobacter pylori*: a prospective, culture-guided study in peptic ulcer patients. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **14**:1335-8, 2000.

- GOODWIN, A.; KERSULYTE, D.; SISSON, G.; VELDHUYZEN van ZATEM, S.J.; BERG, D.E.; and HOFFMAN, P.S. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. **Mol. Microbiol.** **28**:383-393, 1998.
- GORBACH, S.L. Bismuth therapy in gastrointestinal diseases. **Gastroenterology** **99**:863-75, 1990.
- GRAHAM, D.Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. **Gastroenterology**. **115**:1272-7, 1998.
- GRAHAM, D.Y.; BELSON, G.; ABUDAYYEH, S.; OSATO, M.S.; EL-ZIMAITY, H.M.T.; and DORE M.P. Twice a day (mid-day and evening), quadruple therapy for *H. pylori* in the United States. **Dig. Liver Dis.** **36**:377-9, 2004.
- GRAHAM, D.Y.; HAMMOUD, F.; EL-ZIMAITY, H.M.; KIM, J.G.; OSATO, M.S.; and EL-SERAG H.B. Meta-analysis: proton pump inhibitor or H₂-receptor antagonist for *Helicobacter pylori* eradication. **Aliment Pharmacol Ther.**, **17**:1229-36, 2003.
- GRAYSON, M.L.; ELIOPOULOS, G.M.; FERRARO, M.J.; and MOELLERING, R.C. Jr. Effect of varying pH on the susceptibility of *Campylobacter pylori* to antimicrobial agents. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, **8**:888-9, 1989.
- GUERRITS, M.M.; van der Wouden, E.J.; BAX, D.; de JONGE, A.; van VLIET, A.H.; THIJS, J.C.; KUSYERS, J.G.; van ZWET, A.A.; and KUIPERS, E.J. The role of the *rdxA* and *frxA* genes in oxygen-dependent metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.** **53**:1123-1128, 2004.

GUSLANDI, M. Review article: alternative antibacterial agents for *Helicobacter pylori* eradication. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **15**:1543-7, 2001.

HAMAN, K.E.; PAN, W.; SPRATT, B.G.; BALTHAZAR, J.T.; JUDD, R.C.; and SHAFER, W.M. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. **Microbiology** **141**:611-622, 1995.

HARRIS, A.G.; HAZELL, S.L.; and NETTING A.G. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. **J Antimicrob Chemother**, **45**:591–8, 2000.

HARTZEN, S.H.; ANDERSEN, L.P.; BREMMELGAARD, A.; COLDING, H.; ARPI, M.; KRISTIANSEN, J.; JUSTESEN, T.; ESPERSEN, F.; FRIMODT-MOLLER, N.; and BONNEVIE O. Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: importance of medium, inoculum, and incubation time. **Antimicrob Agents Chemother.**, **41**:2634-9, 1997.

HEDGE, P.J.; and SPRATT, B.G. Amino acid substitutions that reduce the affinity of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* for cephalexin. **Eur J Biochem.** **15**; **151**(1):111-21, 1985.

HELLMER, J.; PATZOLD, R.; ZEILINGER, C.; Identification of a pH regulated Na(+)/H(+) antiporter of *Methanococcus jannaschii*. **FEBS Lett. Sep 11**; **527**(1-3):245-9, 2002.

HENRIQUES, A.O.; GLASER, P.; PIGGOT, P.J.; and MORAN C.P. Jr. Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. **Mol Microbiol.** **28**(2): 1998:235-47.

HENTSCHEL, E.; BRANDSTATTER, G.; DRAGOISICS, B.; HIRSCHL, AM.; NEMEC, H.; SCHÜTZE, K; et al.,. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. **N Engl J Méd**, **328**:308-312, 1993.

HOCKER, M.; and HOHENBERGER P. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. **Lancet** **362**:1231-1233, 2003.

HUGHES, N.J.; CHALK, P.A.; CLAYTON, C.L.; and KELLY, D.J. Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate:flavodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.** **177**(14):3953-9, 1995.

HUGHES, N.J.; CLAYTON, C.L.; CHALK, P.A.; and KELLY, D.J. *Helicobacter pylori* por CDAB and oor DABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. **J. Bacteriol**,**180**:1119-28,1998

HULTEN, K.; GIBREEL, A.; SKOLD, O.; and ENGSTRAND, L. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **41**:2550-2553, 1997.

ISHINO, F.; MITSUI, K.; TAMAKI, S.; and MATSUHASHI, M. Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-

sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. **Biochem Biophys Res Commun**, **97**:287–93, 1980.

JENKS, P.J.; FERRERO, R.L.; and LABIGNE, A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob. Chemother.** **43**:753-758, 1999.

JEONG, J.Y.; MUKHOPADHYAY, A.K.; DAILIDIENE, D.; WANG, Y.; VELAPATINO, B.; GLMAN, R.H.; PARKINSON, A.J.; NAIR, G.B.; WONG, B.C.; LAM, S.K.; MISTRY, R.; SEGAL, I.; YUAN, Y.; GAO, H.; ALARCON, T.; BREA, M.L.; ITO, Y.; KERSULYTE, D.; LEE, H.K.; GONG, Y.; GOODEIN, A.; HOFFMAN, P.S.; and BERG, D.E. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.** **182**:5082-5090, 2000.

KAIHOVAARA, P.; HOOK-NIKANNE, J.; UUSI-OUKARI, M.; KOSUNEN, T.U.; and SALASPURO, M. Flavodoxin-dependent pyruvate oxidation, acetate production and metronidazole reduction by *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob Chemother.**, **41**:171-177, 1998

KANAMARU, K.; STEPHENSON, S.; PEREGO, M. Overexpression of the PepF oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol. Jan**; **184**(1): 43-50, 2002.

KAWAKAMI, E.; OGATA, S.K.; PORTORREAL, A.C.; MAGNI, A.M.; PARDO, M.L.; and PATRÍCIO F.R. Triple therapy with clarithromycin, amoxicillin and omeprazole for

Helicobacter pylori eradication in children and adolescents. **Arq Gastroenterol**, **38**:203-6, 2001.

KELLY, J.A.; DIDEBERG, O.; CHARLIER, P.; WERY, J.P.; LIBERT, M.; MOEWS, P.C.; KNOX, J.R.; DUEZ, C.; FRAIPONT, C.; and JORIS, B. On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. **Science**.**1**;231(4744) 1429-31, 1986.

KOHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPOUR, M.; HENZE, U.; GOTOH, N.; CURTY, L.K.; and PECHERE, J.C., Characterization of McxE-McxF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** **23**:345-354, 1997.

KOMATSUZAWA, H.; SUGAI, M.; OHTA, K.; FUJIWARA, T.; NAKASHIMA, S.; SUZUKI, J.; LEE, C.Y.; and SUGINAKA H. Cloning and characterization of the *fmt* gene which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of triton X-100 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** **41**(11):2355-61, 1997.

KRAUSS J.; and HAKENBECK R. A mutation in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* contributes to cefotaxime resistance of the laboratory mutant C604. **Antimicrob Agents Chemother.** **41**(5): 936-42, 1997.

KRISHNAMURTHY, P.; PARLOW, M.H.; SCHNEIDER, J.; BURROUGHS, S.; WICKLAND, C.; VAKIL, N.B.; DUNN, B.E.; and PHADNIS S.H. Identification of a novel penicillin-binding protein from *Helicobacter pylori*. **J Bacteriol.** **181**(16):5107-10, 1999.

-
- KWON, D.H.; DORE, M.P.; KIM, J.J.; *et al.*,. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob Agents Chemother**, **47**:2169–78, 2003.
- KWON, D.H.; KIM, J.J.; LEE, M.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; *et al.* Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **44**: 3203-3205, 2000.
- KWON, D.H.; LEE, M.; KIM, J.J.; KIM, J.G.; EL-ZAATARI, F.A.; OSATO, M.S.; and GRAHAM, D.Y. Furazolidone- and nitrofurantoin-resistant *Helicobacter pylori*: prevalence and role of genes involved in metronidazole resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**:306-8,2001.
- LAMBERT, J.R.; and MIDOLO, P. The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **11 Suppl 1**:27-33, 1997.
- LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin. Infect. Dis.**, **34**:482-492, 2002.
- LEE J.C.; CHA J.H.; ZERBV D.B.; and STEWART G.C. Heterospecific expression of the *Bacillus subtilis* cell shape determination genes mreBCD in *Escherichia coli*. **Curr Microbiol.** **47**(2):146-52, 2003.
- LI, S.; XIAO, X.; LI, J.; LUO, J.; and WANG, F. Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *hewanella* sp. WP3 using RNA arbitrarily primed PCR. **Extremophiles.** **10**:97-104, 2006.

-
- LI, X.Z.; NIKAIDO, H.; and POOLE, K. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **39**:1948-1953, 1995.
- LI, X.Z.; ZHANG, L.; SRIKUMAR, R.; and POOLE, K. β -Lactamase inhibitors are substrates of the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **42**:399-403, 1998.
- LIAO X.; and HANCOCK R.E. Susceptibility to beta-lactam antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing penicillin-binding protein 3. **Antimicrob Agents Chemother.** **41**(5):1158-61, 1997.
- LIVERMORE D.M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol** **8**(4):557-84, 1995.
- LLEO M.M.; CANEPARI P.; and SATTA G. Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci. **J Bacteriol.** **172**(7):3758-71, 1990.
- LUTHY, L.; GRUTTER, M.G.; and MITTL, P.R. The crystal structure of *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein B reveals a novel fold for a penicillin-binding protein. **J Biol Chem.** **22**;277(12):10187-93, 2002.
- MA, D.; COOK, D.N.; ALBERTI, M.; PON, N.G.; NIKAIDO, H.; and HEARST, J.E. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** **16**:45-55, 1995.

MAGALHAES, A.F.; MACEDO, C.; HAUCK, J.R.; CARVALHAES, A.; DE NUCCI, G.; MAGNA, L.A.; and PEDRAZZOLI J. Jr. Acid suppression with ranitidine plus oral triple therapy improves ulcer healing but not *Helicobacter pylori* eradication.

Hepatogastroenterology 45(24):2161-4, 1998.

MAKI H.; and MURAKAMI K. Formation of potent hybrid promoters of the mutant *Ilm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** 179(22):1997 :6944-8.

MAKI, H.; YAMAGUCHI, T.; and MURAKAMI, K. Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** 176(16): 4993-5000, 1994.

MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; O'MORAIN, C.; HUNGIN, A.P.; JONES, R.; AXON, A.; GRAHAM, D.Y.; and TYTGAT, G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht 2-2000 Consensus Report. **Aliment Pharmacol Ther**, 16:167-80, 2002.

MALOUIN, F.; BRYAN L.E. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 30(1):1-5, 1986.

McGEE, D.J.; MOBLEY, H.L. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. **Curr Top Microbiol Immunol.** 241:155-80, 1999.

McNULTY, C.A.; DENT, J.C.; FORD, G.A.; and WILKINSON S.P. Inhibitory antimicrobial concentrations against *Campylobacter pylori* in gastric mucosa. **J Antimicrob Chemother.** 22:729-38, 1988.

- MÉGRAUD, F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **11**:43-53, 1997.
- MEGRAUD, F.; and LAMOULIATTE, H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.** **17**:1333-43, 2003.
- MEGRAUD, F.; LEHN, N.; LIND, T.; BAYERDORFFER, E.; O'MORAIN, C.; SPILLER R.; UNGE, P.; van ZANTEN, S.V.; WRANGSTADH, M.; and BURMAN C.F. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. **Antimicrob Agents Chemother.**, **43**:2747-52, 1999.
- MENDONCA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M.S.; GODOY, A.P.; GUERZONI, R.A.; DEGGER, M.; and PEDRAZZOLI J. Jr. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, **5**:79-83, 2000.
- MENDZ, G.L.; and MEGRAUD, F. Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? **Trends Microbiol.** **10**:370-375, 2002.
- MEYER, J.M.; SILLIMAN, N.P.; WANG, W.; SIEPMAN, N.Y.; SUGG, J.E.; MORRIS, D.; ZHANG, J.; BHATTACHARYYA, H.; KING, E.C.; and HOPKINS, R.J. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. **Ann Intern Med.**, **136**: 13-24, 2002.
- MILLAR, M.R.; and PIKE, J. Bactericidal activity of antimicrobial agents against slowly growing *Helicobacter pylori*. **Antimicrob Agents Chemother.** **36**(1): 185-187, 1992.

- MITTL, P.R.; LUTHY, L.; HUNZIKER, P.; GRUTTER, M.G. The cysteine-rich protein A from *Helicobacter pylori* is a beta-lactamase. **J Biol Chem.** **9**;275(23):17693-9, 2000.
- MOORE, R.A.; BECKTHOLD, B.; WONG, S.; KUREISHI, A.; and BRYAN, L.E. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **39**:107-11, 1995.
- MURAKAMI, K.; and YOSHIDA T. Penetration of cephalosporins and corresponding 1-oxacephalosporins through the outer layer of Gram-negative bacteria and its contribution to antibacterial activity. **Antimicrob Agents Chemother.** **21**(2):254-8, 1982.
- NAKAGAWA, J.; TAMAKI, S.; TOMIOKA, S.; and MATSUHASHI M. Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. **J Biol Chem**, **259**:13937–46, 1984.
- NARDI, M.; RENAULT, P.; AND MONNET, V. Duplication of the *pepF* gene and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis*. **J Bacteriol.** **Jul; 179**(13): 4164-71, 1997.
- NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, 272: 65-9, 1994.
- NIKAIDO, H.; and NAKAE T. The outer membrane of Gram-negative bacteria. **Adv Microb Physiol.** **20**: 163-250, 1979.

- NIKAIDO, H.; ROSENBERG, E.Y.; and FOULDS, J. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. **J Bacteriol.** **153**(1): 232-40, 1983.
- NISTA, E.C.; CANDELLI, M.; CREMONINI, F.; CAZZATO, I.A.; DI CARO, S.; GABRIELLI, M.; SANTARELLI, L.; ZOCCO, M.A.; OJETTI, V.; CARLONI, E.; CAMMAROTA, G.; GASBARRINI, G.; and GASBARRINI A. Levofloxacin-based triple therapy vs. quadruple therapy in second-line *Helicobacter pylori* treatment: a randomized trial. **Aliment Pharmacol Ther**, **18**:627-33, 2003.
- NOMURA, A.C.; ATEMERMANN, G.N.; CHYOU, P.H.; KATO, I.; PEREZ-PEREZ G.I.; and BLASER M.J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N. Engl. J. Med.** **325**:1132-1136, 1991.
- OCCHIALINI, A.; URDACI, M.; DOUCET-POPULAIRE, F.; BEBEAR, C.M.; LAMOULIATTE, H.; and MEGRAUD, F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **41**:2724-2728, 1997.
- OKAMOTO, T.; YOSHIYAMA, H.; NAKAZAWA, T.; PARK, I.D.; CHANG, M.W.; YANAI, H.; OKITA, K.; and SHIRAI, M. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob. Chemother.**, **50**:849-856, 2002.
- ORSI P.; PINAZZI O.; ARAGONA G.; DI MARIO, F. Rabeprazol/levofloxacin based triple therapy as a salvatage treatment after failure of *H. pylori* eradication with standard regimens. **Helicobacter**, **8**:463-4, 2003.

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G.D.; VANDERSTEEN, D.P.; CHANG, Y.; VOGELMAN, J.H.; ORENTREICH, N.; and SIBLEY R.K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N. Engl. J. Med.** **325**:1127-1131, 1991.

PARSONNET, J.; HANSEN, S.; RODRIGUEZ, L.; GELB, A.B.; WARNKE, R.A.; JELLUM, E.; ORENTREICH, N.; VOGELMAN, J.H.; AND FRIEDMAN, G.D. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **N. Engl. J. Med.** **330**:1267– 1271, 1994.

PAUL , R.; POSTIUS, S.; MELCHERS, K.; and SCHAFER, K.P. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes rdxA and pbp1 cause resistance against metronidazole and amoxicillin. **Antimicrob. Agents Chemother**, **45**:962-965, 2001.

PAULINO, L.C.; DE MELLO, M.P.; OTTOBONI, L.M.M. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Electrophoresis** **23**:520-7, 2002.

PAUSEN, I.T.; BROWN, M.H.; and SKURRAY, R.A. Prton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiol. Rev.** **60**: 575-608, 1996.

PICHOFF, S.; LUTKENHAUS, J. Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. **Mol Microbiol. May**; **64**(4):1129-38, 2007.

PINHEIRO, J.O.P.; BOTH, C.T.; DIETRICH, S.; ZAMIN, J.I.; RAYMONDI, R.P.; MURETTI I.; and MATTOS, A.A. Tratamento do *Helicobacter pylori*: comparação de dois esquemas terapêuticos. **GED Gastroenterol Endosc Dig**, **18**:97-101, 1999.

- PLESSIS, M.; BINGEN, E.; and KEITH, P. K. Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. **Antimicrob. Agents Chemother.** **46**:2349-2357, 2002.
- POTTER, S.; YANG, X.; BOULANGER, M.J.; and ISHIGURO, E.E. Occurrence of homologs of the *Escherichia coli* *lytB* gene in gram-negative bacterial species. **J Bacteriol.** **180**(7):1959-61, 1998.
- PRAMANIK, A.; and BRAUN, V. Albomycin uptake via a ferric hydroxamate transport system of *Streptococcus pneumoniae* R6. **J Bacteriol.** **188**:3878-86, 2006.
- RAYNOR, R.H.; SCOTT, D.F.; and BEST G.K. Oxacillin-induced lysis of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** **16**(2):134-40, 1979.
- RIBEIRO, M.L.; GERRITS, M.M.; BENVENGO, Y.H.B.; *et al.*,. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. **FEMS Immunol Med Microbiol** , **40**:57–61, 2004.
- RIBEIRO, M.L.; VITIELLO, L.; MIRANDA, M.C.; BENVENGO, Y.H.; GODOY, A.P.; MENDONCA, S.; and PEDRAZZOLI, J. Jr. Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** **21**:2:11, 2003.
- RIVAS, B. D. L.; GARCÍA, J. L.; LÓPEZ, R.; and GARCÍA, P. Purification and polar localization of pneumococcal *LytB*, a putative endo- α -*N*-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. **J. Bacteriol.** **184**: 4988-5000, 2002.

ROPP, P.A.; HU, M.; OLESKY, M.; and NICHOLAS, R.A. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*.

Antimicrob Agents Chemother, **46**:769–77, 2002.

SAIER, M.H.M.; TAM, R.; REIZER, A.; and REIZER, J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. **Mol. Microbiol.** **11**:841-847, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; and MANIATIS, T. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Col Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, New York, 1989.

SANCHES, L.; PAN, W.; VINAS, M.; and NIKAIDO, H., The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. **J. Bacteriol.** **179**: 6855-6857, 1997.

SANCHEZ-PUELLES, J.M.; RONDA, C.; GARCIA, J.L.; GARCIA, P.; LOPEZ, R.; and GARCIA, E. Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. **Eur J Biochem.** **15**;158(2): 289-93, 1986.

SCHIRM, M.; SOO, E.C.; AUBRY, A.J.; AUSTIN, J.; THIBAUT, P.; LOGAN, S.M. Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol. Jun**; **48**(6):1579-92, 2003.

SHERWOOD, L.G. Bismuth therapy in gastrointestinal disease. **Gastroenterology**, **99**:863-75, 1990.

SILVA, F.M.; EISIG, J.N.; CHEHTER, E.Z.; SILVA, J.J.; and LAUDANNA, A.A. Omeprazole, furazolidone, and tetracycline: an eradication treatment for resistant *H. pylori* in Brazilian patients with peptic ulcer disease. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo**, 57:205-8, 2002.

SIROY, A.; MOLLE, V.; LEMAITRE-GUILLIER, C.; VALLENET, D.; PESTEL-CARON, M.; COZZONE, A.J.; JOUENNE, T.; and DE, E. Channel formation by *CarO*, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** 49:4876-83, 2005.

SISSON, G.; GOODWIN, A.; RAUDONIKIENE, A.; HUGHES, N.J.; MUKHOPADHYAY, A. K.; BERG, D.E.; and HOFFMAN, P.S. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46:2116-23, 2002.

SISSON, G.; JEONG, J.Y.; GOODWIN, A.; BRYDEN, L.; ROSSLER, N.; LIM-MORRISON, S.; RAUDONIKIENE, A.; BERG, D.E.; and HOFFMAN, P.S. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. Pylori* RdxA(+) (Nitroreductase) gene. **J. Bacteriol.** 182:5091-5096, 2000.

SU, Z.; XU, H.; ZHANG, C.; SHIHE SHAO; LIANGJU, L.I.; HUA WANG; HUIFANG WANG; and GUFENG QIU. Mutations in *Helicobacter pylori* *porD* and *oorD* Genes May Contribute to Furazolidone Resistance. **Croat Med J.** 47:410-15, 2006.

SUGIYAMA, T.; SAKAKI, N.; KOZAWA, H.; SATO, R.; FUJIOKA, T.; SATOH, K.; SUGANO, K.; SEKINE, H.; TAKAGI, A.; AJIOKA, Y.; and TAKIZAWA, T. Sensitivity of biopsy site in evaluating regression of gastric atrophy after *Helicobacter pylori* eradication treatment. **Aliment Pharmacol Ther.** 16 Suppl 2:187-90, 2002.

SWEETMAN, S. Martindale: The Complete drug reference. London: **Pharmaceutical press.** 33:149-150, 2002.

TALLEY, N.J.; ZINSMEISTER, A.R.; WEAVER, A.; DiMAGNO, E.P.; CARPENTER, H.A.; PEREZ-PEREZ, GI, and BLASER, MJ. Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. **J. Natl. Cancer Inst.** , 83: 1734-1739, 1991.

TAVARES, W. Manual de antibioticos e quimioterapicos antiinfeciosos. 2. ed. **São Paulo: Atheneu, 792 p**, 1996.

TAYLOR, D.E.; GE, Z.; PURYCH, D.; LO, T.; and HIRATSUKA, K. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. **Antimicrob. Agents Chemother**, 41:2621-2628, 1997.

THIBESSARD, A.; FERNANDEZ, A.; GINTZ, B.; LEBLOND-BOURGET, N.; and DECARIS, B. Effects of rodA and pbp2b disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. **J Bacteriol.** 184(10):2821-6, 2002.

TOMB, J.F.; WHITE, O.; and KERLAVAGE, A. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, 388: 539-547, 1997.

TORRES, J.; CAMORLINGA-PONCE, M.; PEREZ-PEREZ, G.; MADRAZO-DE LA GARZA, A.; DEHESA, M.; GONZALEZ-VALENCIA, G.; and MUNOZ, O. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. **J Clin Microbiol.**, **39**: 2677-80, 2001.

TREIBER, G.; AMMON, S.; MALFERTHEINER, P.; and KLOTZ, U. Impact of furazolidone-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* after previous treatment failures. **Helicobacter** **7**: 225-31, 2002.

TRIEBER, C.A.; and TAYLOR, D.E. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. **Journal of Bacteriology**, **184**:2131-2140, 2002.

UBUKATA, K.; SHIBASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; CHIBA, N.; HASEGAWA, K.; TAKEUCHI, Y.; SUNAKAWA, K.; INOUE, M.; and KONNO, M. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. **Antimicrob Agents Chemother.** **45**(6):1693-9, 2001.

van der HULST, R.W.; KELLER, J.J.; RAUWS, E.A.; and TYTGAT, G.N. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: a review of the world literature. **Helicobacter**, **1**:6-19, 1996.

van der Wouden, E.J.; DE JONG, A.; THIJS, J.C.; KLEIBEUKER, J.H.; and van ZWET, A.A. Subpopulations of *Helicobacter pylori* are responsible for discrepancies in

the outcome of nitroimidazole susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother.**, 43:1484-6, 1999.

van DOORN, L.J.; GLUPCZYNSKI, Y.; KUSTERS, J.G.; MEGRAUD, F.; MIDOLO, P.; MAGGI-SOLCA, N.; QUEIROZ, D.M.; NOUHAN, N.; STET, E.; and QUINT, W.G. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. **Antimicrob. Agents Chemother**, 45:1500-1504, 2001.

van ZANTEN, S.J.; GOLDIE, J.; HOLLINGSWORTH, J.; SILLETTI, C.; RICHARDSON, H.; and HUNT, R.H. Secretion of intravenously administered antibiotics in gastric juice: implications for management of *Helicobacter pylori*. **J Clin Pathol**, 45:225-7, 1992.

van ZWET, A.A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; THIJS, J.C.; *et al.*. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. **Lancet**, 352:1595, 1998.

VASQUEZ, A.; VALDEZ, Y.; GILMAN, R.H.; McDONALD, J.J.; WESTBLOM, T.U.; BERG, D.; MAYTA, H.; and GUTIERREZ, V. Metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* determined by measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. The Gastrointestinal Physiology Working Group of Universidad Peruana Cayetano Heredia and the Johns Hopkins University. **J Clin Microbiol.**, 34: 1232-4, 1996.

VERSALOVIC, J. ; SHORTRIDGE, D. ; KIBLER, K. ; *et al.*. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob Agents Chemother**, 40:477–80, 1996.

VIEIRA, W.L.S. Retrato da infecção pelo *Helicobacter pylori* em pacientes portadores de úlcera duodenal e seguimento a longo prazo. Ensaio clínico, aberto, prospectivo e randomizado com dosagens séricas e urinárias de antimicrobianos [tese]. Belo Horizonte: **Universidade Federal de Minas Gerais**; 2002.

VIEIRA, W.L.S.; COELHO, L.G.V.; CASTRO, F.J.; PASSOS, M.C.F.; FRANCO, J.M.M.; MORETZSOHN, L.D.; TRINDADE, O.R.; CARVALHO, S.C.; CASTRO, L.P. Terapia tripla com lansoprazol, claritromicina e amoxicilina, por dez dias, na erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com ulcera duodenal. **GED Gastroenterol. Endoscopia Digestiva**, **20**:201-207, 2001.

WACHI, M.; DOI, M.; TAMAKI, S.; PARK, W.; NAKAJIMA-IIJIMA, S.; and MATSUHASHI, M. Mutant isolation and molecular cloning of mre genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** **169**(11): 4935-40, 1987.

WAIDNER, B.; MELCHERS, K.; IVANOV, I.; LOFERER, H.; BENSCH, K.W.; KIST, M.; BERESWILL, S. Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants CrdA (HP1326), CrdB (HP1327), and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. **J Bacteriol. Dec**; **184**(23):6700-8, 2002.

WALT, R.P. Regression of MALT lymphoma and treatment for *Helicobacter pylori*. **Lancet** 348:1041–1042, 1996.

- WANG, G.; and TAYLOR, D.E. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **42**:1952-1958, 1998.
- WANG, G.; RAHMAN, M.S.; HUMAYUN, M.Z.; and TAYLOR, D.E. Multiplex sequence analysis demonstrates the competitive growth advantage of the A-to-G mutants of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **43**:683-685, 1999.
- WARREN, J.R.; and MARSHALL, B.. Unified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**: 1273-1275, 1983.
- WHITEWAY, J.; KOZIARZ, P.; VEALL, J.; SANDHU, N.; KUMAR, P.; HOECHER, B.; and LAMBERT, I.B. Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, **180**:5529-5539, 1998.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; and TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** **18**:6531-5, 1990.
- WINDERICKX, J.; and CASTRO, J.M. Practical course in molecular biology of microorganisms. **Universidade Federal de Ouro Preto** - MG, January 23 - February 11, p. 59, 1994.
- WOTHERSPOON, A.C.; DOGLIONI, C.; DISS, T. C.; PAN, L.; MOSCHINI, A.; DE BONI, M.; and ISAACSON, P. G. Regression of primary low-grade B-cell gastric

lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. **Lancet** **342**:575–577, 1993.

WOTHERSPOON, A.C.; ORTIZ-HIDALGO, C.; FALZON, M. R.; AND ISAACSON, P. G. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. **Lancet** **338**:1175–1176, 1991.

WUTIPRADITKUL, N.; WADITEE, R.; INCHAROENSAKDI, A.; HIBINO, T.; TANAKA, Y.; NAKAMURA, T.; SHIKATA, M.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains NapA-type Na⁺/H⁺ antiporters with novel ion specificity that are involved in salt tolerance at alkaline pH. **Appl Environ Microbiol. Aug; 71**(8):4176-84, 2005.

XIA, H.X.; BUCKLEY, M.; KEANE, C.T.; and O'MORAIN, C.A. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: prevalence in untreated dyspeptic patients and stability in vitro. **J. Antimicrob. Chemother.**, **37**:473-481, 1996.

YAMAMOTO, K.; and UBUKATA, K. Beta-lactamase negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*(BLNAR) **Nippon Rinsho**. **59**(4): 688-93, 2001.

YILMAZ, O.; and DEMIRAY, E. Clinical role and importance of fluorescence in situ hybridization method in diagnosis of *H pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *H pylori* eradication therapy. **World J Gastroenterol**. **13**:671-5, 2007.

YOSHIMURA, F.; and NIKAIDO H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. **Antimicrob Agents Chemother**. **27**(1): 84-92, 1985.

ZETH, K.; DIEDERICHS, K.; WELTE, W.; and ENGELHARDT, H. Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. **Structure**. **8**:981-92, 2000.

ZULLO, A.; HASSAN, C.; DE FRANCESCO, V.; LORENZETTI, R.; MARIGNANI, M.; ANGELETTI, S.; IERARDI, E.; and MORINI, S. A third-line levofloxacin-based rescue therapy for *Helicobacter pylori* eradication. **Dig Liver Dis**, **35**:232-6, 2003.

VIII - ANEXOS



1 – **Artigo:** Multiple Mutations in or Adjacent to the Conserved Penicillin - Binding Protein Motifs of the Penicillin-Binding Protein 1A Confer Amoxicillin Resistance to *Helicobacter pylori*.

Monique M. Gerrits, **Anita P. O. Godoy**, Ernst J. Kuipers, Marcelo L. Ribeiro, Jeroen Stoof, Sergio Mendonça, Arnoud H. M. van Vliet, José Pedrazzoli Jr and Johannes G. Kusters.

Publicado na revista *Helicobacter* **11**: 181–187, 2006 (ISSN 1523-5378).

Multiple Mutations in or Adjacent to the Conserved Penicillin-Binding Protein Motifs of the Penicillin-Binding Protein 1A Confer Amoxicillin Resistance to *Helicobacter pylori*

Monique M. Gerrits,* Anita P. O. Godoy,[†] Ernst J. Kuipers,* Marcelo L. Ribeiro,[†] Jeroen Stoof,* Sergio Mendonça,[†] Arnoud H. M. van Vliet,* José Pedrazzoli Jr[†] and Johannes G. Kusters*

*Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC – University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands, [†]Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil

Keywords

Helicobacter pylori, amoxicillin, antibiotic resistance, *pbp1A* gene mutations, treatment outcome.

Reprint requests to: Dr J.G. Kusters, Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC – University Medical Center Rotterdam, Room L-459, Dr Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam, The Netherlands.
Tel.: +31-10-4632982; Fax: +31-10-4632793;
E-mail: j.g.kusters@erasmusmc.nl

Abstract

Background: Amoxicillin-based therapies are highly effective for the treatment of *Helicobacter pylori* infections, but the efficacy may decrease as the incidence of amoxicillin resistance is increasing. So far, the molecular mechanism underlying stable amoxicillin resistance has only been identified for a few naturally occurring amoxicillin-resistant (Amx^R) *H. pylori* isolates, and is mediated by mutations in penicillin-binding protein 1A (PBP1A). In this study the molecular mechanism underlying amoxicillin resistance of seven additional Amx^R *H. pylori* isolates has been established.

Methods: *H. pylori* strain 26695 (minimal inhibitory concentration (MIC) 0.125 mg/l) was naturally transformed with total DNA and *pbp1A* polymerase chain reaction (PCR) products from the seven Amx^R *H. pylori* isolates, and the MIC of amoxicillin and *pbp1A* gene sequence of the obtained Amx^R transformants were determined.

Results: Replacement of the wild-type *pbp1A* gene of *H. pylori* reference strain 26695 by the *pbp1A* gene of the Amx^R *H. pylori* isolates resulted in an increased MIC (0.5–1.0 mg/l). Sequence analysis of the smallest PBP1A fragments able to transfer the resistance indicated that several amino acid substitutions in or adjacent to the second (SKN_{402–404}) and third (KTG_{555–557}) conserved penicillin-binding protein motifs (PBP-motifs) mediate amoxicillin resistance in *H. pylori*. This was confirmed by site-directed mutagenesis using oligonucleotides that contained defined mutations in or adjacent to these PBP-motifs.

Conclusion: In naturally occurring Amx^R *H. pylori* isolates, amoxicillin resistance is mediated by various mutational changes located in or adjacent to the second and third PBP-motifs of the PBP1A. Although we cannot exclude the role of the other genes in amoxicillin resistance, it is likely that multiple mutational changes in the *PBP1A* gene are the predominant cause of amoxicillin resistance in *H. pylori*. The findings of this study currently preclude the rapid detection of amoxicillin resistance in *H. pylori* by molecular tests.

Helicobacter pylori is a common human pathogen that is strongly associated with the development of active gastritis, peptic ulcer diseases, and gastric cancer [1]. Successful treatment of *H. pylori* infection often leads to regression of the associated diseases [2,3]. Most anti-*H. pylori* therapies consist of two antibiotics in combination with a proton pump inhibitor and/or bismuth component [4]. The antibiotic amoxicillin is one of the key components of many *H. pylori* eradication therapies [5].

Until the end of the 20th century, amoxicillin resistance in *H. pylori* was very rare [6], but this is no longer the case. The first indications of an increased incidence of amoxicillin resistance in *H. pylori* came from amoxicillin-resistant (Amx^R) isolates obtained from dyspeptic patients in Italy and the USA [7]. Amoxicillin resistance of these isolates is not stable, as it is lost upon freezing at –80 °C. Thus, these isolates are referred to as amoxicillin tolerant rather than amoxicillin resistant [7]. Later, stable Amx^R *H. pylori*

Table 1 *Helicobacter pylori* isolates used in this study, their MICs of amoxicillin determined by agar dilution, and PBP1A sequence accession numbers

Isolates/reference strain	Origin/reference	Gastric disorders	MIC (mg/l) ^a	Accession number ^b
BH13	Brazil	Duodenal ulcer	4	AY743230
13	Brazil	Duodenal ulcer	2	AY743231
60	Brazil	Gastroesophageal reflux disease	4	AY743232
219	Brazil	Gastric ulcer	8	AY743233
SZ79	The Netherlands	Gastric cancer	4	AY743234
Hardenberg	[20]	Gastritis	8	AF479617
H-I ^c	The Netherlands	Gastritis	16	AY743235
H-II ^c	The Netherlands	Gastritis	16	AY743236
26695 (reference strain)	[37]	Gastritis	< 0.125	

^aMIC of amoxicillin shown are means of results from three independent experiments. The isolates were considered to be resistant when the MIC of amoxicillin was > 0.25 mg/l [12].

^bThe *pbp1A* gene sequences have been deposited into the GenBank database.

^cFollow-up isolate the Hardenberg strain [10], obtained from the same patient 9 months after the isolation of the Hardenberg strain.

isolates were obtained from dyspeptic patients living in different geographic regions [8–10]. Currently, amoxicillin resistance rates are reported to vary between 0.8 to 1.4% [11,12]. If amoxicillin resistance in *H. pylori* would further increase, this would pose the serious problem of reduced efficacy of amoxicillin-containing regimens [13].

In Gram-negative bacteria, resistance to β -lactam antibiotics like amoxicillin is often because of the enzymatic degradation of the antibiotic by β -lactamase [14]. Other mechanisms, such as structural alterations in penicillin-binding proteins (PBPs), decreased membrane permeability for antibiotics, and/or active efflux of the antimicrobial drug from the bacterial cell have also been reported [15–17]. Although the *H. pylori* genome contains β -lactamase-like genes [18], no significant β -lactamase activity has been detected, and thus amoxicillin resistance in *H. pylori* does not seem to rely on the acquisition or expression of a β -lactamase [10,19].

PBPs are enzymes that are involved in the synthesis and maintenance of the peptidoglycan layer of the bacterial cell wall. All conventional PBPs contain characteristic penicillin-binding protein motifs (PBP-motifs): SXXK, SXN, and KTG (X is a variable amino acid residue) [33]. In *H. pylori*, nine putative PBPs have been identified; three high-molecular-weight PBPs and six low-molecular-weight PBPs [33]. Two of these proteins have been associated with amoxicillin resistance in *H. pylori*. In the five amoxicillin-tolerant *H. pylori* isolates characterized thus far, amoxicillin resistance depends on a lack of the low-molecular-weight penicillin-binding protein PBP D (also called PBP4, HP0160) [19], whereas in three Amx^R *H. pylori* isolates and two in vitro-selected Amx^R mutants, the resistance is mediated by mutational changes in the gene encoding the penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*; HP0597) [20–24].

In this study, we have established the molecular mechanism of amoxicillin resistance in seven naturally occur-

ring Amx^R *H. pylori* isolates that were obtained between 1999 and 2003 from dyspeptic patients from Brazil and The Netherlands.

Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

H. pylori isolates used in this study are listed in Table 1. The *H. pylori* isolates were routinely cultured on Columbia agar plates (Becton, Dickinson and Company, Cockeysville, MD, USA) supplemented with 7% lysed horse blood (BioTrading, Mijdrecht, The Netherlands) and *H. pylori* Dent selective supplement (Oxoid, Basingstoke, UK). *H. pylori* was grown for 48–72 hours at 37 °C in an atmosphere of 5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂.

Determination of Minimal Inhibitory Concentration

The minimal inhibitory concentration (MIC) of amoxicillin was routinely determined by agar dilution using Mueller-Hinton (Difco, Sparks, MD, USA) plates supplemented with 5% sheep blood (BioTrading), according to the protocols of the National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) [25]. Two microliters of a 2.0 MacFarland bacterial suspension was inoculated on plates containing twofold serial dilutions of amoxicillin (Sigma Aldrich Chemie, Zwijndrecht, the Netherlands). As controls, the amoxicillin-susceptible (Amx^S) strain 26695 and Amx^R Hardenberg strain [10] were always included, and MIC determination was only accepted if the MIC of amoxicillin for these two strains were < 0.125 mg/l and > 4 mg/l, respectively. Isolates were considered to be resistant when the MIC of amoxicillin exceeded 0.25 mg/l [12]. All MICs of amoxicillin were determined in three independent experiments.

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'–3') ^a
Hp0597-F1	AGTTTGGGTAACACGGATA
Hp0597-F2	TTTGGGCATGGGTATTATGG
Hp0597-F3	CTAACGCGTCTAATGAAGAT
Hp0597-F4	TAATGGCTATTCCACGACTT
Hp0597-F5	AAACCCATGCTCATTGAAAG
Hp0597-F6	TAACCCCTTCAGYGCTGATG
Hp0597-R1	CTCGTGTGAGCACCATGTTT
Hp0597-R2	AATCTTACCGGTGCTCGTGT
Hp0597-R3	GTGGCTAGATTTAACGAATG
Hp0597-R4	CGCATGAAATACGAATAC

^aPrimers used for amplification of the *pbp1A* gene were based on the published genome sequence of *Helicobacter pylori* strain 26695 [37].

Detection of β -Lactamase Activity

Production of β -lactamase by *H. pylori* was tested using the Nitrocefin BBL™ DrySlide™ (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) according to the manufacturer's instructions.

General DNA Techniques

All DNA manipulation techniques were performed according to standard protocols [26]. Primers (Isogen, Maarsen, the Netherlands) used in this study are listed in Table 2. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in an automated thermal cycler (I-cycler; Bio-Rad Laboratories BV, Veenendaal, the Netherlands) using the PCR-core system I (Promega, Madison, WI, USA). Direct sequencing of the obtained PCR products was performed by BaseClear Inc. (Leiden, the Netherlands).

Natural Transformation of *H. pylori*

The Amx^S *H. pylori* reference strain 26695 was transformed with ~1 µg of genomic DNA from an Amx^R strain (Table 1), or 150–250 ng of *pbp1A* gene products amplified from genomic DNA dissolved in 10 µL TE (1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA). Amx^R transformants were selected on Columbia agar plates supplemented with 7% lysed horse blood and 0.25 mg/L amoxicillin. As controls, bacteria were transformed with either DNA from the Hardenberg strain (Amx^R), DNA from strain 26695 (Amx^S), or TE without DNA.

Site-Directed Mutagenesis

Three different pools oligonucleotide primers (Isogen) were designed based on the sequence of the *pbp1A* gene of

H. pylori strain 26695, except that they contained several mismatches resulting in several amino acid substitutions. The first pool (spanning nucleotides 953–1098, numbering according to the *pbp1A* gene of *H. pylori* strain 26695), consisted of a mixture of oligonucleotides containing the nucleotide changes A₁₀₀₉R (A/G), A₁₀₁₅R, G₁₀₁₉R, and/or T₁₀₂₀N (A/C/G/T) (numbering according to nucleotide sequence of the *pbp1A* gene of *H. pylori* strain 26695), was used to substituted amino acids in or adjacent to the first conserved PBP-motif, STGK_{338–341} (numbering according to amino acid sequence of PBP1A of *H. pylori* strain 26695), whereas the amino acids in or around to the second conserved PBP-motif, SKN_{402–404} were mutated by a second pool of oligonucleotides (spanning nucleotides 1140–1313) containing the nucleotide changes A₁₂₀₅R, T₁₂₀₇W (A/T), A₁₂₀₉M (A/C), T₁₂₁₆W, A₁₂₁₈M, C₁₂₄₃M, and/or T₁₂₅₀W. Amino acids in or adjacent to the third (KTG_{555–557}) PBP-motif were mutated by a mixture of oligonucleotides (spanning nucleotides 1575–1741) containing the substitutions C₁₆₂₂Y (C/T), A₁₆₂₇M, A₁₆₆₆N, A₁₆₇₂R, A₁₆₈₄W, and/or A₁₆₈₇R. The different pools of oligonucleotides were amplified separately using 5 pmol of one mixture of oligonucleotides as template, together with 25 pmol of two primers that start at the outside of the fragment. After amplification, the obtained fragments were purified and transformed to *H. pylori* strain 26695.

Nucleotide Sequence Accession Numbers

The *pbp1A* gene sequences of the seven Amx^R *H. pylori* isolates have been deposited into the GenBank database (Table 1).

Results

High-Level Amoxicillin Resistance is not Mediated by β -Lactamase Activity

The MICs of amoxicillin for four Brazilian and three Dutch Amx^R *H. pylori* isolates were determined by agar dilution and compared with previously described Amx^R *H. pylori* strain Hardenberg (MIC 8 mg/l) and the Amx^S *H. pylori* reference strain 26695 (MIC < 0.125 mg/l) (Table 1). The MICs of amoxicillin for the four Brazilian Amx^R *H. pylori* isolates ranged from 2 to 8 mg/l (susceptibility breakpoint > 0.25 mg/l), whereas the MICs of amoxicillin for the three Dutch Amx^R *H. pylori* isolates (SZ79 and the two follow-up isolates of the Harderberg strain, H-I and H-II) ranged from 4 to 16 mg/l. For all seven isolates, the MIC values were not affected by either storage at –80 °C or repetitive subculturing upon amoxicillin-free agar plates, indicating that amoxicillin resistance in these seven novel Amx^R *H. pylori* isolates is stable.

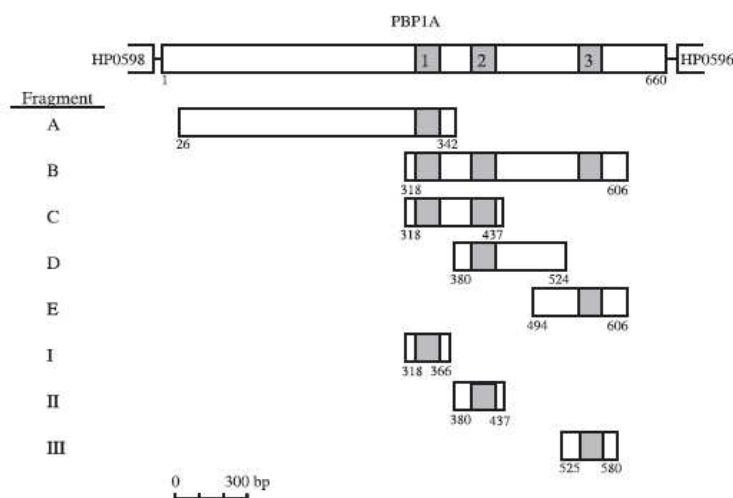


Figure 1 Identification of mutational changes in PBP1A required for amoxicillin resistance. Transformants were obtained by transformation of PCR fragments to the Amx^S *H. pylori* reference strain 26695. Fragments A–E have been used to identify the region required for amoxicillin resistance, while fragments I–III have been used for site-directed mutagenesis of the three conserved PBP-motifs, STGK_{338–441} (Box 1), SKN_{402–404} (Box 2), and KTG_{555–557} (Box 3), numbering according to amino acid sequence of PBP1A of *H. pylori* strain 26695, SwissProt database accession number O25319. Transcript orientation is from left to right.

There was no β -lactamase activity detectable in any of the Amx^R isolates when tested by using the chromogenic cephalosporin method, excluding a role for β -lactamase in amoxicillin resistance in these Amx^R isolates.

Amoxicillin Resistance is Transferable by Natural Transformation

To examine whether the resistance to amoxicillin of the seven Amx^R strains was transferable to Amx^S *H. pylori*, natural transformation was performed using genomic DNA isolated from the Amx^R strains with the Amx^S *H. pylori* reference strain 26695 as recipient. Amx^R colonies were consistently obtained after transformation with genomic DNA isolated from the seven Amx^R *H. pylori* isolates and the Amx^R Hardenberg strain, but not when DNA from the Amx^S 26695 strain or TE without DNA was used. The transformation frequency ($\sim 10^{-5}$ CFU/ μ g DNA) with DNA from the Amx^R isolates was similar to the efficiency obtained when using the Hardenberg positive control. MICs of amoxicillin for the Amx^R 26695 transformants (two transformants from two independent transformation experiments for each isolate tested) were determined by agar dilution and ranged from 0.5 to 1.0 mg/l.

The *pbp1A* Gene is Involved in Amoxicillin Resistance

Stable amoxicillin resistance in all Amx^R *H. pylori* isolates studied thus far is mediated by mutations in the *pbp1A* gene [20–22]. To investigate whether the *pbp1A* gene was also involved in amoxicillin resistance in the seven Amx^R

isolates used in this study, *H. pylori* reference strain 26695 (Amx^S) was transformed with *pbp1A* PCR fragments amplified from the genomic DNA of the seven Amx^R isolates. Amx^R colonies were obtained for all seven isolates with a transformation frequency of $\sim 10^{-6}$ CFU/ μ g DNA. The MICs of amoxicillin for the obtained transformants ranged between 0.5 and 1.0 mg/l. Consistent with previous observations [20,22,23], the MICs of amoxicillin for the Amx^R transformants were still five- to 10-fold lower than the MICs of the original strains. Retransformation of these transformants with total DNA of the Amx^R donor strain, the Hardenberg strain, or one of the other six Amx^R isolates did not result in an increase of the MIC of amoxicillin.

Identification of PBP1A Mutations Involved in Amoxicillin Resistance

To determine which of the amino acid substitutions of PBP1A mediates amoxicillin resistance in the seven Amx^R *H. pylori* isolates, two overlapping *pbp1A* fragments were amplified from genomic DNA of the seven Amx^R isolates and transformed to the Amx^S *H. pylori* reference strain 26695. The first PCR fragment, fragment A (Fig. 1), spans amino acid 26–342 (numbering according to amino acid sequence of PBP1A of *H. pylori* strain 26695, SwissProt database accession number O25319), whereas the second PCR fragment, fragment B (Fig. 1), spans amino acid 318–606. Amx^R colonies were only observed after transformation of fragment B (transformation frequency, $\sim 10^{-6}$ CFU/ μ g DNA). The MIC of amoxicillin for four randomly selected transformants (obtained from two independent transformation experiments) was 0.5–1.0 mg/l.

Table 3 Overview on amino acid differences in PBP1A proteins from Amx^R *Helicobacter pylori* isolates and their Amx^R transformants compared to the Amx^S *H. pylori* strain 26695

Isolate	Amino acid position ^a											
	366	402	406	414	417	467	543	589	591	593	595	
26695	F	S	E	S	S	S	S	S	G	T	G	
BH13		G	A		T			G		P		
13		G	A		T							
60						T						
219							R	G	K	A	S	
SZ79	L			R								
H-I				R								
H-II				R								

^aPositions of amino acid differences are given to the relative start point of *pbp1A* gene of *H. pylori* strain 26695 [37].

Subsequently, three smaller overlapping fragments (Fig. 1) that spanned fragment B were amplified from the genomic DNA of the seven Amx^R isolates and transformed to strain 26695. For strain 13, SZ 79, H-I, and H-II, Amx^R colonies (transformation frequency, $\sim 10^{-6}$ CFU/ μ g DNA) were only observed using fragment C, while for strain 60 and 219, fragments D and E revealed Amx^R colonies (transformation frequency, $\sim 10^{-7}$ CFU/ μ g DNA), respectively (Fig. 1). For strain BH13, no Amx^R transformants were obtained using one of the smaller fragments. The MICs of amoxicillin for the obtained transformants were similar to the MIC values of the transformants obtained with fragment B.

Sequence analysis of the smallest *pbp1A* PCR fragments able to transfer amoxicillin resistance revealed multiple amino acid changes present in the Amx^R *H. pylori* isolates and their obtained Amx^R transformants, which did not occur in the Amx^S *H. pylori* reference strain (Table 3). All the changes were located in the C-terminal part (encoded by amino acids 320–660 [27], numbering according to amino acid sequence of PBP1A of *H. pylori* strain 26695) of the PBP1A protein, in or adjacent to the second (SKN_{402–404}) and third (KTG_{555–557}) conserved PBP-motifs (Table 3).

Mutational Changes in or Adjacent to the Conserved PBP-motifs of PBP1A Confer Amoxicillin Resistance

To confirm that only mutations in or adjacent to the second and third conserved PBP-motifs of PBP1A mediate amoxicillin resistance in *H. pylori*, strain 26695 was transformed with three different pools of PCR fragments, each containing several mismatches in or adjacent to one of the three conserved PBP-motifs. Amx^R colonies were

observed only after transformation with fragments II and III (transformation frequency, $\sim 10^{-6}$ CFU/ μ g DNA) that contained mutations in or adjacent to the second (SKN_{402–404}) or third (KTG_{555–557}) PBP-motif (Fig. 1). No Amx^R colonies were observed after transformation with the fragment I that contained mutations in or adjacent to the first PBP-motif (STGK_{338–441}). The MICs of amoxicillin for the obtained transformants were similar to the MIC values of the transformants obtained after transformation with fragment B.

Sequence analysis of area around the second and third PBP-motifs of 16 randomly selected Amx^R transformants, obtained from four independent transformation experiments using either fragment II or III, revealed several amino acid substitutions in or adjacent to one of the two PBP-motifs. Seven of the Amx^R transformants (obtained after transformation with fragment II) contained a S₄₀₂G, E₄₀₆A, and S₄₁₇T substitution, while one transformant only contained a S₄₁₄R substitution. For fragment III, all eight Amx^R transformants analyzed contained a T₅₅₅S and N₅₆₁Y substitution. Additionally, other amino acid differences were detected. Six Amx^R transformants contained a S₅₄₂R substitution, while three contained a T₅₄₀I substitution, and in one, an additional I₅₆₂V substitution was found. Apart for the mutations mentioned previously, no other sequence changes were detected in the C-terminal part of the PBP1A protein.

Discussion

Most *H. pylori* isolates are still susceptible to amoxicillin, an antibiotic commonly used in eradication therapy of *H. pylori*. Nevertheless, amoxicillin resistance is emerging in clinical isolates, especially in countries where this antibiotic can be obtained without prescription. Thus far, the molecular mechanism underlying amoxicillin resistance has only been identified for a few Amx^R and amoxicillin-tolerant *H. pylori* isolates [19–22,24]. In these Amx^R *H. pylori* isolates, resistance was mediated by mutations in the gene encoding the PBP1A [20–22], whereas in the two amoxicillin-tolerant *H. pylori* isolates, the resistance was mediated by a lack in PBP D [19]. In this study, the mechanism of amoxicillin resistance was established for seven additional naturally occurring Amx^R *H. pylori* isolates.

In Gram-negative bacteria, resistance to β -lactams is mostly due to the production of β -lactamase, either chromosomally encoded, or plasmid borne [28]. In contrast, alterations in PBPs have mainly been described in β -lactam-resistant Gram-positive bacteria, but they have also been reported in some Gram-negative bacterial species [29,30]. Consistent with earlier findings in *H. pylori* [10,19,21,22], amoxicillin resistance in all seven Amx^R *H. pylori* isolates did not rely on an increased β -lactamase activity. In this study, we have demonstrated that

amoxicillin resistance in all seven Amx^R *H. pylori* isolates is stable and mediated by various mutational changes in the gene encoding the PBP1A protein.

PBP1A has been characterized biochemically as a bifunctional glycosyl transferase–acyl transpeptidase [31,32]. The acyl transpeptidase domain, located in the C-terminal part of the PBP1A, contains three putative penicillin-binding motifs: STGK_{338–341}, SKN_{402–404}, and KTG_{402–404} [33]. It is thought that these PBP-motifs are involved in the formation and stabilization of the active cleft [33]. Motif 1, STGK_{338–341} (where S is the essential serine residue) occupies a central position in the catalytic center of the active cleft, whereas motif 2, SKN_{402–404} and motif 3, KTG_{402–404} are located on the outside [27]. In *H. pylori*, amoxicillin binds primary to the active cleft of PBP1A and interferes with bacterial growth [33,34]. Finding Amx^R-related mutations in or adjacent to the second and third PBP-motifs (Table 3) confirms the importance of this region for amoxicillin resistance in *H. pylori*. Site-directed mutagenesis using oligonucleotides that generate defined mutations in or adjacent to one of the three PBP-motifs proved that mutational changes in or around to the second and third PBP-motifs confer amoxicillin resistance. It seems that in *H. pylori* the S₄₀₂G (located in the second PBP-motif), E₄₀₆A, S₄₁₇T, S₄₁₄R, T₅₅₅S (located in the third PBP-motif), and N₅₆₁Y substitutions represent the major factors in the resistance. The MICs of amoxicillin for the obtained Amx^R transformants were 5- to 10-fold lower than the MICs for the seven naturally occurring Amx^R isolates. Repeated retransformation of the Amx^R transformants with either total DNA from the Hardenberg strain and/or total DNA from one of the seven Amx^R isolates did not result in an increase of the MIC of amoxicillin, and this suggests that either mutations in multiple loci or changes in efflux mechanisms and/or membrane permeability are required to confer high-level amoxicillin resistance to *H. pylori*.

In summary, in naturally occurring Amx^R *H. pylori* isolates, amoxicillin resistance is mediated by various mutational changes in or adjacent to the second and third PBP-motifs of the *pbp1A* gene. Although we cannot exclude the role of other genes in amoxicillin resistance, our results indicate that multiple mutational changes in the *pbp1A* gene are the major contributing factor to this resistance. In contrast to the situation with clarithromycin and tetracycline resistance [35,36], rapid detection of amoxicillin resistance in *H. pylori* by molecular tests is currently precluded by the large variety of PBP1A mutations associated with amoxicillin resistance.

We thank Dr A.A. van Zwet and Dr E.J. van der Wouden for providing the Dutch Amx^R *H. pylori* strains. This project was financially supported by the Foundation "De Drie Lichten" in the Netherlands and by the Fundação de amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (01/12369-1) in Brazil.

References

- 1 Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175–86.
- 2 Sugiyama T, Sakaki N, Kozawa H, et al. Sensitivity of biopsy site in evaluating regression of gastric atrophy after *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(Suppl. 2):187–90.
- 3 Graham DY, Agrawal NM, Campbell DR, et al. Ulcer prevention in long-term users of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: results of a double-blind, randomized, multicenter, active- and placebo-controlled study of misoprostol vs lansoprazole. *Arch Intern Med* 2002;162:169–75.
- 4 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:167–80.
- 5 Goodwin CS. Antimicrobial treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Infect Dis* 1997;25:1023–6.
- 6 Megraud F, Lehn N, Lind T, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2747–52.
- 7 Dore MP, Osato MS, Realdi G, Mura I, Graham DY, Sepulveda AR. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:47–54.
- 8 Wu H, Shi XD, Wang HT, Liu JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:121–3.
- 9 Mendonca S, Ecdissato C, Sartori MS, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter* 2000;5:79–83.
- 10 van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Thijs JC, et al. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998;352:1595.
- 11 Meyer JM, Silliman NP, Wang W, et al. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993–1999. *Ann Intern Med* 2002;136:13–24.
- 12 Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:820–3.
- 13 Dore MP, Sepulveda AR, Mura I, Realdi G, Osato MS, Graham DY. Explanation for variability of omeprazole amoxicillin therapy? Tolerance of *Helicobacter pylori* to amoxicillin. *Gastroenterology* 1997;112:A105.
- 14 Livemore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557–84.
- 15 Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781–91.
- 16 Mlynarczyk G, Mlynarczyk A, Jeljaszewicz J. Epidemiological aspects of antibiotic resistance in respiratory pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:497–502.
- 17 Frere JM, Joris B, Granier B, Matagne A, Jacob F, Bourguignon-Bellefroid C. Diversity of the mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Res Microbiol* 1991;142:705–10.
- 18 Mittl PR, Luthy L, Hunziker P, Grutter MG. The cysteine-rich protein A from *Helicobacter pylori* is a beta-lactamase. *J Biol Chem* 2000;275:17693–9.
- 19 Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1999;4:154–61.

- 20 Gerrits MM, Schuijffel D, van Zwet AA, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2229–33.
- 21 Kwon DH, Dore MP, Kim JJ, et al. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2169–78.
- 22 Okamoto T, Yoshiyama H, Nakazawa T, et al. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:849–56.
- 23 Paul R, Postius S, Melchers K, Schafer KP. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes *ndxA* and *pbp1* cause resistance against metronidazole and amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:962–5.
- 24 Co EMZ GM, Harrington JM, Lopez-Vidal Y, Schiller NL. Characterization of amoxicillin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. ASM A-089 2004.
- 25 NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M7-A5, informational supplement M100S10. NCCLS, Wayne, PA, USA 2002.
- 26 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 27 Goffin C, Ghuyssen JM. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1079–93.
- 28 Bush K. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001;32:1085–9.
- 29 Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA. Mutations in *penA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:769–77.
- 30 Ghosh AS, Kar AK, Kundu M. Alterations in high molecular mass penicillin-binding protein 1 associated with beta-lactam resistance in *Shigella dysenteriae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:669–72.
- 31 Ishino F, Mitsui K, Tamaki S, Matsuhashi M. Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;97:287–93.
- 32 Nakagawa J, Tamaki S, Tomioka S, Matsuhashi M. Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *J Biol Chem* 1984;259:13937–46.
- 33 Harris AG, Hazell SL, Netting AG. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:591–8.
- 34 DeLoney CR, Schiller NL. Competition of various beta-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2702–9.
- 35 Ribeiro ML, Gerrits MM, Benvenuto YHB, et al. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;40:57–61.
- 36 Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:477–80.
- 37 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539–47.

2 – **Artigo:** Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR

Anita P. O. Godoy, Fernanda C. Reis, Lúcio F. C. Ferraz, Monique M. Gerrits, Sergio Mendonça, Johannes G. Kusters, Laura M. M. Ottoboni, Marcelo L. Ribeiro, José Pedrazzoli Jr.

Enviado em 22 de Setembro de 2006, revisado em 27 de Novembro de 2006 e aceito em 27 de Novembro de 2006 pela revista FEMS Immunology Médical Microbiology (ISSN 0928-8244).

Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR

Anita P.O. Godoy¹, Fernanda C. Reis², Lúcio F.C. Ferraz², Monique M. Gerrits³, Sergio Mendonça¹, Johannes G. Kusters³, Laura M.M. Ottoboni², Marcelo L. Ribeiro¹ & José Pedrazzoli Jr¹

¹Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil; ²Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil; and ³Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Correspondence: Marcelo Lima Ribeiro, Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Av. São Francisco de Assis, 218, Jd. São José, Bragança Paulista, SP, Brazil. Tel.: +55 11 4034 8135; fax: +55 11 4034 1825; e-mail: marcelo.ribeiro@saofrancisco.edu.br

Received 22 September 2006; revised 27 November 2006; accepted 27 November 2006.
First published online 7 February 2007.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2006.00209.x

Editor: Alex van Belkum

Keywords

Helicobacter pylori; amoxicillin resistance; differentially expressed; RAP-PCR; real-time PCR.

Abstract

Because the molecular mechanism of amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* seems to be partially explained by several mutational changes in the *pbp1A* gene, the aim of the present study was to evaluate the gene expression pattern in response to amoxicillin in the Amx^R Hardenberg strain using RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR). In the experiments, c. 100 differentially expressed RAP-PCR products were identified using five arbitrary primers. The cDNAs that presented the highest levels of induction or repression were cloned and sequenced, and the sequences were compared with those present in databases using the BLAST search algorithm. The differential expression of the isolated cDNAs was confirmed by real-time PCR. The preliminary results showed that amoxicillin alters the expression of five cDNAs involved in biosynthesis, two involved with pathogenesis, four related to cell envelope formation, two involved in cellular processes, three related with transport and binding proteins, one involved with protein degradation, one involved with energy metabolism and seven hypothetical proteins. Further analysis of these cDNAs will allow a better comprehension of both the molecular mechanism(s) of amoxicillin resistance and the adaptative mechanism(s) used by *H. pylori* in the presence of this antibiotic.

Introduction

Helicobacter pylori is a spiral-shaped, Gram-negative bacterium that persistently colonizes the human stomach. It is the main causative agent of chronic superficial gastritis and peptic ulcer disease, and infection with *H. pylori* is strongly associated with the development of gastric cancer and gastric lymphomas (Dunn *et al.*, 1997).

Eradication is recommended for patients with symptomatic *H. pylori* infection and can be achieved by the combination of two antibiotics plus a proton pump inhibitor and/or bismuth component (Penston & McColl, 1997). Amoxicillin-based regimens are often used as the first line of treatment for *H. pylori*; however, the limited choice and extensive use of antibiotics, especially in countries where they can be obtained without prescription, has led to increased antibiotic resistance rates. The prevalence of antibiotic resistance of *H. pylori* shows regional variation per antibiotic, but for amoxicillin it varies between 1% and 29% (Mendonça *et al.*, 2000; Glupczynski *et al.*, 2001; Meyer

et al., 2002). As the prevalence of amoxicillin resistance in *H. pylori* still increases, serious problems can be expected in the near future, as it is the main cause of therapy failure (Glupczynski *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002).

In Gram-negative bacteria, resistance to β -lactam antibiotics such as amoxicillin is often the result of enzymatic degradation by β -lactamase. Although β -lactamase-like-genes are present in the *H. pylori* genome, no significant β -lactamase activity has been detected, indicating that amoxicillin resistance in *H. pylori* is not due to an acquisition or expression of β -lactamase (van Zwet *et al.*, 1998; Dore *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2003; Gerrits *et al.*, 2006).

Mechanisms that include a decrease in membrane permeability for antibiotics and/or active efflux of the antimicrobial drug from the bacterial cell have also been related with antibiotic resistance in other bacteria (Frere *et al.*, 1991; Chambers, 1997; Mlynarczyk *et al.*, 2001). Decreased membrane permeability has also been suggested for *H. pylori* (Kwon *et al.*, 2003), however, for *H. pylori* only structural alterations in penicillin binding proteins (PBPs) seem to be

responsible for amoxicillin resistance (Gerrits *et al.*, 2002; Gerrits *et al.*, 2006).

In *H. pylori*, nine putative PBPs have been identified; three high-molecular-weight PBPs and six low-molecular-weight PBPs. Two of these proteins have been associated with amoxicillin resistance in *H. pylori*. In the five amoxicillin-tolerant *H. pylori* isolates that have been characterized, amoxicillin resistance depends on a lack of the low-molecular-weight penicillin-binding protein PBP4 (also called PBP4). In contrast, in 11 AmxR *H. pylori* isolates and two *in vitro* selected AmxR mutants this resistance seems to be partially mediated by mutational changes in the gene encoding the PBP1A (Dore *et al.*, 1999; Gerrits *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2003; Gerrits *et al.*, 2006).

As the molecular mechanism of amoxicillin resistance is not fully explained by mutational changes in the *pbp1A* gene alone, the aim of the present study was to evaluate the usefulness of the RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) to identify differentially expressed genes in response to amoxicillin in the Amx^R Hardenberg strain.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Helicobacter pylori was routinely cultured on Columbia agar plates with 5% lysed horse blood, as previously described (Mendonça *et al.*, 2000). The bacteria were subcultured on brain heart infusion broth (BHI) with 7% calf serum, supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of amoxicillin, at 37 °C in an atmosphere of 5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂, on a shaker. As a control, the strain was grown in the absence of amoxicillin. The bacteria cells were harvested 24 h after incubation.

RNA isolation and RAP-PCR

Total RNA was isolated from *H. pylori* grown with or without amoxicillin according to Winderickx & Castro (1994). The RAP-PCR experiments were carried out in duplicate as described by Paulino *et al.* (2002). The arbitrary primers used in the experiments were: P1, P2 (Williams *et al.*, 1990), OPF19, OPL02 and, OPL16 (Operon Technologies). The first-strand cDNA was synthesized using ready-to-go real-time PCR (RT-PCR) beads (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions. For the second-strand synthesis, 4 µL of the first-strand reaction were mixed in a 20 µL reaction mixture containing 1 × PCR buffer, 1.25 mM, MgCl₂, 2 µM of the same arbitrary primer used in the first-strand synthesis, 2 µM of each deoxynucleoside triphosphate (Invitrogen), 1 µCi of [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences) and 1.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The amplifications were carried out in a Perkin

Elmer 2400 thermal cycler programmed to run 40 cycles at 94 °C (30 s), 40 °C (2 min) and 72 °C (30 s).

7 µL from each reaction were mixed with 5 µL of a solution containing 80% deionized formamide, 0.01% bromophenol blue and 0.01% xylene cyanol. The samples were incubated at 80 °C for 4 min and 10 µL were loaded on a 5% polyacrylamide gel containing 50% urea. After electrophoresis, the gels were transferred to 3 mM Whatman paper, and exposed to X-ray film (Kodak).

The differentially expressed RAP-PCR products were excised from the gel, and the DNA was eluted, amplified and cloned into the pGEM-T easy vector (Promega), according to the manufacturer's specifications. At least three clones from each RAP-PCR product were sequenced (ABI Prism 3700 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Hitachi). The sequences were compared with TIGR (<http://www.tigr.org>) and GenBank databases using the BLAST algorithm (BLASTN and BLASTX).

Confirmation of differential gene expression

The differential expression of the isolated cDNAs was confirmed by RT-PCR using different RNA preparations. Quantitative PCR was performed using an iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) and threshold cycle numbers were determined using REAL-TIME DETECTION System Software, version 3.0. Reactions were performed in triplicate, and threshold cycle numbers were averaged. The 50-µL reaction mixture was prepared as follows: 25 µL of Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen[™] Life Technologies, Alameda, CA), 10 µM of each gene specific primer (Table 1) and 10 µL of cDNA (100 ng). The reaction was cycled with preliminary UDG treatment for 2 min at 50 °C and a denaturation for 2 min at 95 °C, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and primer extension at 72 °C for 15 s. This was followed by melting point analysis of the double-stranded amplicons consisting of 40 cycles of 1 °C decrement (15 s each) beginning at 95 °C.

The selected genes were examined and normalized to a control gene (16S rRNA gene), and the relative expression was calculated according to the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where ΔC_T is the threshold cycle number for the experimental gene minus the threshold cycle number for the reference gene.

Table 1. Differentially expressed cDNAs, according to the primer used

Primers	Repressed	Induced	Total
OPL02	11	6	17
OPL16	16	9	25
P1	19	12	31
P2	14	8	22
OPF19	4	2	6
TOTAL	64	37	101

Results and discussion

Helicobacter pylori is usually sensitive to amoxicillin, but occasionally strains exhibiting an increased MIC are observed. The first stable Amx^R strain reported, the Hardenberg strain, was isolated from an 82-year-old Dutch dyspeptic patient (van Zwet *et al.*, 1998). For the Hardenberg strain, the MIC of amoxicillin was 8 mg L⁻¹ (break-point up to 0.25 mg L⁻¹); the MICs for the other β -lactam antibiotics also had higher breakpoints. With regard to the other antibiotics used in *H. pylori* eradication therapies, the Hardenberg strain was found to be sensitive to tetracycline, clarithromycin and metronidazole (Gerrits *et al.*, 2002).

Despite the resistance of *H. pylori* Hardenberg strain to amoxicillin, the genes induced and repressed by this antibiotic are still unknown. In the present study, five arbitrary primers were used to screen for differentially expressed genes in this *H. pylori* strain. For this, the fingerprint obtained from cells grown in the presence of amoxicillin was compared with the ones obtained from cells grown in the absence of the antibiotic (Fig. 1). The RAP-PCR technique, performed in duplicate, was very efficient for

characterizing gene expression in response to amoxicillin in *H. pylori*, with a large number of differentially expressed RAP-PCR products, *c.* 101, being identified in the fingerprints. These results are in agreement with the literature, as other authors have successfully used the RAP-PCR technique to identify differentially expressed genes in prokaryotes (Paulino *et al.*, 2002; Frias-Lopez *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006).

Goh *et al.* (2002) reported that low concentrations of erythromycin and rifampicin change the *Salmonella typhimurium* global transcription patterns. In our study, the isolation of 101 differentially expressed cDNAs, with five arbitrary primers, indicates that 1 mg L⁻¹ of amoxicillin alters transcription in the *H. pylori* Amx^R Hardenberg strain.

The primer that generated the largest number of differentially expressed cDNAs was P1 (Williams *et al.*, 1990). With this primer, a total of 19 up-regulated and 12 down-regulated cDNAs were recovered (Table 1). It is interesting to note that among the 101 RAP-PCR products identified, 64 were down-regulated and 37 were up-regulated by amoxicillin. Thus, although more data needs to be generated to support this hypothesis, we can infer that amoxicillin preferentially represses the gene transcription profile (*c.* 63% of the differentially expressed cDNAs) in the *H. pylori* Amx^R Hardenberg strain.

The differentially expressed RAP-PCR products were reamplified, cloned and sequenced. The differential expression of the RAP-PCR products was confirmed by RT-PCR using different total RNA preparations. To ensure reproducibility, the experiments were performed in triplicate. The preliminary results showed that amoxicillin alters the expression of five cDNAs involved in biosynthesis, two involved with pathogenesis, four related to cell envelope formation, two involved in cellular processes, three related with transport and binding proteins, one involved with protein degradation, one involved with energy metabolism and seven hypothetical proteins (Table 2). RT-PCR experiments using RNA from three independent bacterial cultures confirmed the transcriptome data.

It is well known that the virulence of pathogenic bacteria, such as *H. pylori*, is dependent on their adaptation and survival under the stressful conditions encountered in their hosts (McGee & Mobley, 1999). In this sense, the results presented here showed that the presence of amoxicillin increases the expression of genes related with the maintenance of metal homeostasis (HP0214, HP1326, HP1503 and HP1561 – Table 2). In *H. pylori*, the expression of genes that encodes for metal uptake and storage proteins has not been, until now, associated with antibiotic resistance. However, Pramanik & Braun (2006) showed that mutations in the ABC transporter operon inactivated the fur transport and are related with albomycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Although Amx^R affects growth rate, and the growth rate has an effect on cell-wall composition and,

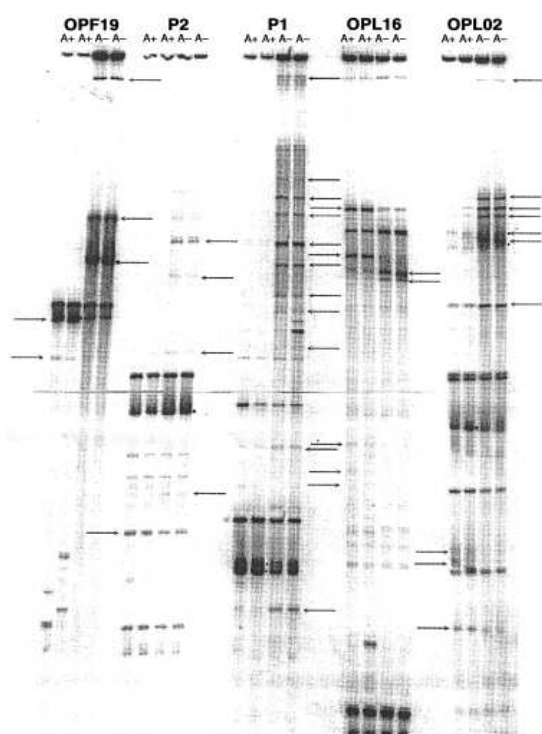


Fig. 1. RAP-PCR profiles of cDNA samples from the Hardenberg Amx^R *H. pylori* strain cultured (A+) in the presence of amoxicillin at 1 mg mL⁻¹ and (A-) in the absence of amoxicillin.

Table 2. BLAST homology search results of RAP-PCR products differentially expressed in response to amoxicillin

Similarity in <i>H. pylori</i> 26695 genome	Function class	Induced (+) or repressed (–) by amoxicillin 1 mg L ⁻¹
HP1218 – glycinamide ribonucleotide synthetase (purD)	Pyrimidine or purine ribonucleotide biosynthesis	+
HP1229 – aspartokinase (lysC)	Amino acid biosynthesis	+
HP1279 – anthranilate isomerase (trpC)	Amino acid biosynthesis	–
HP0695 – hydantoin utilization protein A (hyuA)	Amino acid biosynthesis	–
HP0397 – phosphoglycerate dehydrogenase (serA)	Amino acid biosynthesis	+
HP0527 – Cag pathogenicity island protein (cag7)	Cellular processes: pathogenesis	+
HP0544 – Cag pathogenicity island protein (cag23)	Cellular processes: pathogenesis	+
Flagellar basal-body rod protein (flgG)	Cellular processes: chemotaxis and motility	+
Paralysed flagella protein (pflA)	Cellular processes: chemotaxis and motility	+
HP1503 – cation-transporting ATPase, P-type (copA)	Transport and binding proteins: cations and iron carrying compounds	+
HP1561 – iron(III) ABC transporter (ceuE)	Transport and binding proteins: cations and iron carrying compounds	+
HP0214 – sodium-dependent transporter (huNaDC-1)	Transport and binding proteins: cations and iron carrying compounds	+
HP0597 – penicillin-binding protein 1A (PBP-1A)	Cell envelope: biosynthesis and degradation	–
HP1156 – outer membrane protein (omp25)	Cell envelope: other	+
HP1501 – outer membrane protein (omp32)	Cell envelope: other	–
HP0514 – 50S ribosomal protein L9 (rpl9)	Cell envelope: other	+
HP0590 – ferredoxin oxidoreductase β subunit	Energy metabolism	+
HP0109 – chaperone and heat shock protein 70 (dnaK)	Protein fate: protein folding and stabilization	+
HP0129 – hypothetical protein	DNA mismatch repair protein MutS	+
HP0453 – hypothetical protein	Pathogenicity island protein	–
HP1057 – hypothetical protein	Putative outer membrane protein	+
HP1326 – hypothetical protein	Cation efflux system (czcB-like)	+
HP1327 – hypothetical protein	Outer membrane efflux protein	+
HP1396 – hypothetical protein	3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase	+
HP1411 – hypothetical protein	Cation channel family protein	–
HP1586 – hypothetical protein	Unknown function	+
HP0517 – GTP-binding protein (era)	Unknown function	+

hence, the import/export/binding of metals, we suggest that the metal uptake genes, whose expressions are altered by amoxicillin, are possibly involved in the efflux of amoxicillin in the Hardenberg strain.

No β -lactamases were found among the differentially expressed products. However, the RAP-PCR results showed that two genes that encode outer membrane proteins, Omp25 (HP1156) and Omp32 (HP1501), had their expression altered by amoxicillin. In *Acinetobacter baumannii* and *Brucella* sp. it has been suggested that Omp25 is involved in the membrane permeability, acting as a porin (Boigegrain *et al.*, 2004; Siroy *et al.*, 2005). Thus, we may suggest that the up-regulation of Omp25 in the *H. pylori* Amx^R Hardenberg strain, in the presence of amoxicillin, might be related to increasing the drug efflux. Although Omp32 has been well characterized as an anion-selective porin (Zeth *et al.*, 2000; Contreras *et al.*, 2003), this gene was down-regulated by amoxicillin.

It is interesting to note that a cDNA encoding the PBP1A protein was identified in the RAP-PCR experiments. The

expression of this cDNA was down-regulated in the presence of 1 mg mL⁻¹ of amoxicillin.

Further analysis of the cDNAs differentially expressed in the presence of amoxicillin will allow a better comprehension of both (1) the molecular mechanism(s) of amoxicillin resistance and (2) the adaptive mechanism(s) used by *H. pylori* in the presence of this antibiotic.

References

- Boigegrain RA, Salhim I, Alvarez-Martinez MT, Machold J, Fedon Y, Arpagaus M, Weise C, Rittig M & Rouot B (2004) Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect Immun* 72: 5693–5703.
- Chambers HF (1997) Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10: 781–791.

- Contreras M, Thiberge JM, Mandrand-Berthelot MA & Labigne A (2003) Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **49**: 947–963.
- Dore MP, Graham DY & Sepulveda AR (1999) Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **4**: 154–161.
- Dunn BE, Cohen H & Blaser MJ (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* **10**: 720–741.
- Frere JM, Joris B, Granier B, Matagne A, Jacob F & Bourguignon-Bellefroid C (1991) Diversity of the mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Res Microbiol* **142**: 705–710.
- Frias-Lopez J, Bonheyo GT & Pouke BW (2004) Identification of differential gene expression in bacteria associated with coral black band disease by using RNA-arbitrarily primed PCR. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3687–3694.
- Gerrits MM, Schuijff D, van Zwet AA, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CM & Kusters JG (2002) Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2229–2233.
- Gerrits MM, Godoy AP, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stoof J, Mendonca S, van Vliet AH, Pedrazzoli J Jr & Kusters JG (2006) Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **11**: 181–187.
- Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M & Andersen LP (2001) European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**: 820–823.
- Goh EB, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG & Davies J (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 17025–17030.
- Kwon DH, Dore MP, Kim JJ, Kato M, Lee M, Wu JY *et al.* (2003) High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2169–2178.
- Li S, Xiao X, Li J, Luo J & Wang F (2006) Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *hewanella* sp. WP3 using RNA arbitrarily primed PCR. *Extremophiles* **10**: 97–104.
- McGee DJ & Mobley HL (1999) Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **241**: 155–180.
- Mendonca S, Ecclissato C, Sartori MS, Godoy AP, Guerzoni RA, Degger M & Pedrazzoli J Jr (2000) Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter* **5**: 79–83.
- Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Sugg JE, Morris D *et al.* (2002) Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993–1999. *Ann Int Med* **136**: 13–24.
- Mlynarczyk G, Mlynarczyk A & Jeljaszewicz J (2001) Epidemiological aspects of antibiotic resistance in respiratory pathogens. *Int J Antimicrob Agents* **18**: 497–502.
- Okamoto T, Yoshiyama H, Nakazawa T, Park ID, Chang MW, Yanai H *et al.* (2002) A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* **50**: 849–856.
- Paulino LC, de Mello MP & Ottoboni LMM (2002) Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis* **23**: 520–527.
- Penston JG & McColl KEL (1997) Eradication of *Helicobacter pylori*: an objective assessment of current therapies. *Br J Clin Pharmacol* **43**: 223–243.
- Pramanik A & Braun V (2006) Albomycin uptake via a ferric hydroxamate transport system of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* **188**: 3878–3886.
- Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T & De E (2005) Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4876–4883.
- van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Thijs JC, van der Wouden EJ, Gerrits MM, Kusters JG *et al.* (1998) Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* **352**: 1595.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531–6535.
- Winderickx J & Castro JM (1994). Practical course in molecular biology of microorganisms. Universidade Federal de Ouro Preto – MG, January 23 – February 11, p. 59.
- Zeth K, Diederichs K, Welte W & Engelhardt H (2000) Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure* **8**: 981–992.