

ANITA PAULA ORTIZ DE GODOY

**Estudo da Associação entre a Resistência Primária
aos Antimicrobianos Amoxicilina, Claritromicina,
Furazolidona, Metronidazol e Tetraciclina com os
Fatores de Virulência *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE* do
*Helicobacter pylori***

ORIENTADOR:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Campinas

2002

ANITA PAULA ORTIZ DE GODOY

**Estudo da Associação entre a Resistência Primária
aos Antimicrobianos Amoxicilina, Claritromicina,
Furazolidona, Metronidazol e Tetraciclina com os
Fatores de Virulência *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE* do
*Helicobacter pylori***

ORIENTADOR:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

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

Campinas

2002

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

G548e Godoy, Anita Paula Ortiz de
 Estudo da possível relação dentre a resistência primária aos
 antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina
 e furazolidona com os fatores de virulência vacA, iceA cagA e cagE do
 Helicobacter Pylori / Anita Paula Ortiz de Godoy. Campinas, SP :
 [s.n.], 2002.

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

1. Úlceras. 2. Dispepsia. 3. Microbiologia. 4. Genética. 5.
Tratamento. 6. Patologia. 7. Patogenicidade. I. José Pedrazzoli
Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Membros:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
--

Profa. Dra. Dulciene Maria Magalhães Queiroz

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

Data: 09/12/2002

***À minha mãe Cristina e
minha avó Ignez, que me
incentivaram e apoiaram em
todos os momentos de
minha vida***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior e aos Profs. Dr. Sérgio de Mendonça e 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 Yune, Lea e Mayra, que contribuíram de forma exemplar na execução deste trabalho, pelos momentos agradáveis compartilhados no laboratório, pela amizade.

À Maristela e Christina, pelos momentos de apoio e de alegria, pelos conselhos e incentivos, enfim pela amizade.

Meu reconhecimento aos profs. Luiz Alberto Beraldo de Moraes (Beto) e Paulo Sérgio de Carvalho, que contribuíram na elaboração dos gráficos e fórmulas.

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

Meu reconhecimento aos profs. Dr Domingos da Silva Leite, Dra Dulciene M. M. Queiroz, Luciana Campos Paulino, Laura M. M. Ottoboni, Frederico Magalhães e Edson Antunes, pela atenção e disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho, sempre com valiosas sugestões.

À grande amiga Monica presente nos principais momentos de minha vida destes últimos anos, pela compreensão, lealdade e momentos agradáveis de convivência, pelas intermináveis e divertidas conversas. Ao seu filho João Pedro, que com seu nascimento, me mostrou um lado muito mais bonito da vida.

Aos meus irmãos Luis e Mariana, pela paciência, compreensão e momentos de apoio.

Às amigas Jerusa e Carla pelo companheirismo e momentos de alegria proporcionados por uma convivência hilária

Sou imensamente grata a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Clara de Assis (FUNCLAR) pelo apoio financeiro.

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	xv
LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS	viiix
RESUMO	xix
I – INTRODUÇÃO	21
1- DESCOBRIMENTO	22
2- MICROBIOLOGIA	23
2.1- Morfologia	23
2.2- Fatores de colonização	24
3-EPIDEMIOLOGIA	25
3.1- Prevalência	25
3.2- Transmissão	27
3.2.1- Transmissão fecal-oral	27
3.2.2- Transmissão oral-oral	28
4- IDENTIFICAÇÃO	29
4.1 – Sorologia	30
4.2- Teste respiratório da uréia (UBT)	30
4.3- Teste rápido da urease – TRU	31
4.4- Histologia	32
4.5- Cultura bacteriana	32
4.6- PCR	33
5- Diversidade genética	34
5.3- Heterogeneidade e diversidade	34
5.4 -Patogenicidade e virulência	35
5.4.1- <i>vacA</i>	36
5.4.2- <i>cagA</i> e <i>cagE</i>	39
5.4.3- <i>iceA</i>	40
6– TRATAMENTO	42
6.1- Esquemas terapêuticos	42
6.2- Resistência a antimicrobianos	43
6.3- Resistência e patogenicidade	44
II – OBJETIVOS	46
III – MATERIAL E MÉTODOS	48
1- Casuística	49
2- Métodos	49
2.1- Cultivo em meio sólido	49
2.2- Identificação de linhagens de <i>H. pylori</i>	50
2.3- Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	50
2.4- Extração de DNA	51

2.5- PCR.....	52
SUMÁRIO	Anita Paula Ortiz de
Godoy	
2.6- Análise dos dados.....	53
IV – RESULTADOS.....	55
1- Fatores de virulência.....	56
1.1- Fatores de virulência relacionado com as doenças.....	56
2- Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	59
3- Associação entre doenças e a resistência.....	60
4- Relação entre genes de virulência e a resistência.....	61
V – DISCUSSÃO.....	65
1- Fatores de virulência relacionados com as doenças.....	66
2- Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	70
3- Associação das doenças e fatores de virulência com a resistência.....	72
VI – CONCLUSÃO.....	74
VII - SUMMARY	76
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
IX– ANEXOS.....	104
1- Parecer do comitê de ética.....	105
2- Artigo aceito na FEMS.....	107

Ac	Amoxicilina
CFU	Unidades Formadoras de Colônia
CIM ou MIC	Concentração Inibitória Mínima
Cl	Claritromicina
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
FDA	Food and Drug Administration
Fu	Furazolidona
G	Gastrite Enantematosa
GE	Gastrite Erosiva
GERD	Doença do Refluxo Gastroesofágico
IL-8	Interleucina 8
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
Mz	Metronidazol
PAI	Ilha de Patogenicidade
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Tc	Tetraciclina
TTC	Cloreto de Trifenil Tetrazolium
UD	Úlcera Duodenal
UG	Úlcera Gástrica
UNIFAG	Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia

Figura 1 – Teste rápido da urease – Página 31

Figura 2 – Análise histológica da biópsia gástrica – Página 32

Figura 3 – Cultura do *H. pylori* – Página 33

Figura 4 – Gene *vacA* e seu produto primário – Página 38

Figura 5 – Representação do gene *iceA* – Página 41

Tabela I – Número de pacientes relacionados às doenças – Página 49

Tabela II – Tempos, temperaturas e números de ciclos das reações de PCR para cada *primer* – Página 52

Tabela III – Oligonucleotídeos e tamanhos esperados para o produto de amplificação – Página 53

Tabela IV - Genotipagem do *vacA*, *iceA* , *cagA* and *cagE* obtida de 138 pacientes com diferentes patologias clínicas – Página 57

Tabela V : Relação entre as resistências aos antimicrobianos com as diferentes doenças causadas pelo *H. pylori* – Página 60

Tabela VI - Associação dos genótipos *vacA* m1/m2 e s1/s2 com a resistência a antimicrobianos – Página 62

Tabela VII - Associação dos genótipos *iceA* com a resistência aos antimicrobianos – Página 63

Tabela VII – Associação dos genótipos *cagA* e *cagE* com a resistência a antimicrobianos – Página 64

Gráfico I - Associação entre os subtipos *vacA* (m1s1, m2s1, m2s2) com as doenças – Página 58

Gráfico II - Associação entre os genótipos *iceA* (A1, A2, ausência) com as doenças – Página 58

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS
de Godoy

Anita Paula Ortiz

Gráfico III - Associação entre a presença dos genes *cagA* e *cagE* com as doenças – Página 58

Gráfico IV – Resistência (%) do *Helicobacter pylori* aos antimicrobianos Amoxicilina, Claritromicina, Furazolidona, Metronidazol e Tetraciclina – Página 59

Gráfico V: Resistência aos antimicrobianos, associado com as diferentes manifestações clínicas – Página 61

Gráfico VI - Associação dos genótipos *vacA* m1/m2 e s1/s2 com a resistência a antimicrobianos – Página 62

Gráfico VII - Associação entre os subtipos *iceA* (A1, A2 e ausência) com a resistência – Página 63

Gráfico VIII - Associação entre os genótipos *cagA* e *cagE* e a resistência – Página 64

A infecção causada pelo *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica é considerada uma das infecções crônicas bacterianas mais comuns em seres humanos, e está intimamente associada à úlcera péptica, adenocarcinoma e linfoma gástrico, além de ser, reconhecidamente, um agente carcinogênico tipo I. Em 1997, foi recomendado dois esquemas terapêuticos para a erradicação da bactéria: terapia tripla com omeprazol, claritromicina e amoxicilina ou subcitrato de bismuto, tetraciclina e furazolidona. As terapias não apresentaram a eficiência desejada. A principal razão deste fracasso das terapias para erradicação do *H. pylori* deve-se a resistência observada a alguns antimicrobianos. Algumas linhagens de *H. pylori* podem ser intrinsecamente mais propensas ao tratamento com antibióticos do que outras. Os objetivos deste estudo foram: determinar os genótipos de *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE* do *Helicobacter pylori* e estabelecer uma relação entre as diferentes manifestações clínicas; verificar a suscetibilidade do *Helicobacter pylori* frente aos antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e tetraciclina e avaliar a possível relação dos genes *cagA*, *cagE*, *vacA*, *iceA* do *Helicobacter pylori* com a suscetibilidade da bactéria à esses antimicrobianos. Foram cultivadas 155 linhagens de *H. pylori*, dentre elas 17 (11%) apresentaram genótipo múltiplo sendo assim, excluídas de nossa análise estatística. Foi observado uma relação entre o genótipo *vacA* s1m1 e úlceras duodenais. A presença da linhagem menos virulenta *vacA* s2m2 foi relacionada com o desenvolvimento de doença do refluxo gastroesofágico, suportando a hipótese de que linhagens mais virulentas podem conferir um tipo de proteção esofágica. A resistência ao metronidazol foi observada em 75 pacientes (55%), à amoxicilina, 54 (38%), à claritromicina, 23 (16%), à tetraciclina, 13 (9%) e à furazolidona, 19

(13%). Não houve associação entre as diferentes manifestações clínicas dos pacientes e a resistência da bactéria aos antimicrobianos. Nenhuma relação entre os fatores de patogenicidade e a resistência bacteriana aos medicamentos usados na terapia de erradicação, foi detectada.

I - INTRODUÇÃO



1- DESCOBRIMENTO

Em 1983, WARREN e MARSHALL descreveram a associação entre gastrite e a presença de uma bactéria espiralada no estômago de seres humanos, e propuseram que este microrganismo poderia ser fundamental no desenvolvimento de doenças gástricas (MARSHALL & WARREN, 1984; AXON & QUINNA, 1994). Entretanto, esta não foi a primeira vez que uma bactéria espiralada foi observada na mucosa gástrica. Em 1893, Bizzozero e colaboradores já haviam relatado a presença de organismos espiralados no estômago de cães. Três anos depois, Salomon também descreveu espiroquetas no estômago de cães e gatos. Posteriormente, estas observações foram confirmadas por outros autores, como Balfour, que em 1906 detectou microrganismos espiralados em úlceras gástricas e duodenais de cães e macacos. No mesmo ano, a presença de microrganismos no estômago e no vômito de pacientes com câncer gástrico foi detectado por Krienitz. Em 1924, Luck & Seth descreveram a atividade da enzima urease na cavidade gástrica ligada a presença do *H.pylori*. Alguns anos mais tarde (1954), postulou-se que a presença desta bactéria não passava de contaminação da mucosa, ocorrendo um certo descaso com as pesquisas e publicações nesta área. A redescoberta da bactéria foi tardia devido à dificuldade e lentidão no crescimento. (LEE, 1993; AXON & QUINNA, 1994; McNULTY, 1999).

A bactéria *H. pylori* foi primeiramente chamada de *Campylobacter like organism*, passando posteriormente a *Campylobacter pyloridis*. Mais tarde, por uma correção gramatical, foi chamada de *Campylobacter pylori*. Após vários estudos taxonômicos seu nome foi atualizado para *Helicobacter pylori* devido às suas caracterizações bioquímicas e genéticas que são diferentes de outras espécies do gênero *Campylobacter*. Neste novo gênero foram incluídos o

Helicobacter felis e o *Helicobacter mustelae*, encontrados em gatos e furões respectivamente (HEATHEY, 1995).

2- MICROBIOLOGIA

O *Helicobacter pylori* é um bacilo espiral Gram negativo, de crescimento lento, microaerófilico. Possui flagelos, o que lhe permite uma grande mobilidade. Sua principal característica bioquímica é a abundante produção da enzima urease. Esta, tem papel crucial na fase inicial de colonização do epitélio gastrointestinal, e por isso, tornou-se um importante marcador da presença do microrganismo (PETERSON & GRAHAM, 1998).

2.1- MORFOLOGIA

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa que pode ser encontrada sob dois tipos de morfologia diferentes, a forma de bacilo espiral e a cocóide. Em sua forma espiral, a bactéria possui 3-5µm de comprimento e aproximadamente 0,5µm de diâmetro. Esta morfologia é tida como a forma viável ou ativa do microrganismo. Existem controvérsias sobre sua viabilidade da forma cocoide (NILIUS *et al.*, 1993; MARAIS *et al.*, 1999; REN *et al.*, 1999).

A conversão e a reversão morfológica da forma espiral para cocóide da bactéria pode ser importante para a sua fisiopatologia e meios de transmissão, entretanto os estudos destes mecanismos ainda não forneceram dados conclusivos (NILIUS *et al.*, 1993; CELLINI *et al.*, 1994; SORBERG *et al.*, 1996; COLE *et al.*, 1997; WORKU *et al.*, 1999; TOMINAGA *et al.*, 2001). Durante a infecção, a maioria das bactérias presentes na mucosa gástrica permanecem

espiraladas, no entanto as formas cocóides também estão presentes no estômago humano, desse modo a relação entre morfologia e patogenicidade mantém-se

INTRODUÇÃO

Microbiologia

controvertida (MARSHALL & WARREN, 1984; MARSHALL, 1983; CHAN *et al.*, 1994).

2.2- FATORES DE COLONIZAÇÃO

A sobrevivência do *Helicobacter pylori* no ambiente gástrico pode ser atribuída ao desenvolvimento de características especializadas, sendo a mais importante delas a capacidade de colonizar a superfície do epitélio gástrico abaixo da camada do muco (McGOWAN *et al.*, 1996). Os mecanismos de colonização desta bactéria, em geral, favorecem os três passos primordiais: **penetração, ajuste ao meio e aderência** (BEACHEY, 1981).

Os fatores de penetração são aqueles que possibilitam a infecção da bactéria no organismo. Sua forma espiralada e a presença de cinco ou seis flagelos unipolares permitem que o *H. pylori* se movimente rapidamente da luz do estômago, onde o pH é muito baixo, através do lago mucoso, para uma área onde o pH esteja próximo do neutro, tornando as condições favoráveis para seu crescimento. Seus flagelos são compostos por subunidades de flagelina e cobertos por uma dupla camada de fosfolipídeos, que tem como finalidade protegê-los da acidez gástrica (EATON *et al.*, 1989; KOSTRZYNSKA *et al.*, 1991; LEYING *et al.*, 1992; SUERBAUM *et al.*, 1993; MARAIS *et al.*, 1999).

O *Helicobacter pylori* produz grande quantidade de urease, e esta é uma enzima essencial para a sua colonização, pois favorece o ajuste ao meio. O papel desta enzima é hidrolizar a uréia da mucosa gástrica, transformando-a em dióxido de carbono e amônia, a qual tampona a acidez gástrica e otimiza o pH ao redor da bactéria, permitindo o seu crescimento (McGOWAN *et al.*, 1994). A transformação

da uréia em amônia também funciona como fonte de nitrogênio para a síntese de proteínas, necessárias para a aderência bacteriana (EATON *et al.*, 1995).

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

Outra enzima que exerce papel importante na colonização é a catalase, que protege a bactéria contra os efeitos danosos dos metabólitos de peróxido de oxigênio produzidos pelos neutrófilos, permitindo assim a sobrevivência da bactéria na superfície da mucosa gástrica inflamada (PAJARES, 1995; McGOWAN *et al.*, 1996).

3- EPIDEMIOLOGIA

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

3.1- PREVALÊNCIA

A infecção por *H. pylori* ocorre mundialmente, havendo diferenças significantivas na prevalência da infecção quanto ao desenvolvimento regional. Em geral, o número de pessoas infectadas é superior em países em desenvolvimento, comparando-se com a prevalência nos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos e Austrália, por exemplo, a taxa de infecção oscila entre 19 e 57%, já em países

como China, Tailândia e Índia a prevalência pode chegar até 90% (HEATHEY, 1995; MITCHELL, 1999).

Estudos epidemiológicos mostram que a frequência da infecção pelo *H. pylori* parece ser maior quanto mais elevada for a faixa etária. Nos países desenvolvidos, a infecção é relativamente rara em crianças, e é adquirida em uma

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

taxa constante de, aproximadamente, 0,5-2,0% ao ano, alcançando a prevalência de 20-40% na população adulta. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, o *H. pylori* é adquirido rapidamente durante a primeira infância, como por exemplo na China, onde a taxa de infecção chega a 70% entre os adolescentes, e na Nigéria, onde a alta prevalência mostra dados de 58% de crianças soropositivas com um ano de idade chegando a 91% após dez anos (THOMAS & PRETOLANI, 1994). Adicionalmente, MITCHELL (1999) apresentou resultados de estudos epidemiológicos, mostrando que no mundo desenvolvido a taxa de infecção em crianças com idade inferior a 10 anos varia de 0 à 5% enquanto que em países em desenvolvimento essas taxas chegam a 60%.

Devido às dimensões continentais e às desigualdades sócio-econômicas existentes no Brasil, é fundamental que estudos epidemiológicos sejam realizados em diferentes regiões do país (OLIVEIRA *et al.*, 1994). Um trabalho realizado no estado do Mato Grosso mostrou uma alta taxa de infecção pelo *H. pylori* entre crianças e adolescentes (77,5%), atingindo 84,7% na população adulta (SOUTO *et al.*, 1998). Outro estudo realizado em Belo Horizonte apresentou taxa de prevalência para esta bactéria de 34,1% em crianças e 81,7% em adultos (OLIVEIRA *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.* 1999).

Em países desenvolvidos o aumento da relação prevalência da infecção com a idade está relacionada ao efeito *cohort*, pois a maioria das pessoas foram infectadas na infância quando as condições sócio-econômicas e de saneamento

básico eram piores. As gerações mais jovens foram infectadas menos freqüentemente, devido à melhoria do saneamento básico (VAN der ENDE *et al.*, 1997). A incidência da infecção por *H. pylori* nos países desenvolvidos é menor comparando-se a dos países em desenvolvimento, o que confirma que a situação sócio-econômica é um fator determinante e importante, sugerindo a necessidade de realização de mais estudos epidemiológicos (HEATHEY, 1995).

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

3.2- TRANSMISSÃO

Várias pesquisas sobre o modo de transmissão do *H. pylori* estão sendo desenvolvidas, e pode-se dizer que esta é uma das áreas mais estudada, discutida e controvertida desse, recém descoberto, microrganismo.

As vias de infecção do *Helicobacter pylori* aceitas atualmente incluem a fecal-oral e a oral-oral. Não há possibilidade de transmissão através do ato sexual comum, e a infecção por insetos vetores é praticamente nula (DELTENRE & KOSTER, 2000). ESLICK (2002), descreveu a possibilidade de o *H. pylori* ser transmitido através das fezes durante a prática sexual oral-anal, entretanto, outros autores em um estudo anterior não chegaram à mesma conclusão (WEBB *et al.*, 1996).

3.2.1- TRANSMISSÃO FECAL-ORAL

Em 1992, foi publicado o primeiro trabalho sobre o isolamento de *H. pylori* em fezes humanas. Nesse estudo, THOMAS *et al.* (1992) descreveram o isolamento de *H. pylori* em fezes de crianças e adultos infectados na Gâmbia. Alguns anos mais tarde, KELLY *et al.* (1994) também isolaram esta bactéria em fezes de indivíduos dispépticos (*H. pylori* – positivos). Entretanto, outros estudos evidenciaram que o *H. pylori* não é bem adaptado à passagem do estômago para o duodeno, indicando que a bile possui um efeito letal para a bactéria, e por isso

a sobrevivência do *H. pylori* após esta transição parece ser incomum (RAEDSCH, 1989; DYE, 1990; MITCHELL *et al.*, 1992a).

MAPSTONE *et al.* (1993a) e NOTARNICOLA *et al.* (1996) descreveram altas taxas de DNA do *H. pylori* em amostras de fezes de seres humanos infectados (89,6% e 95,6%, respectivamente). Por outro lado, NAMAVAR *et al.* (1995), observaram DNA bacteriano em apenas 7% das fezes analisadas. Embora a detecção do material genético do *H. pylori* nas fezes sugira a possibilidade de

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

uma transmissão fecal-oral, a presença de DNA da bactéria nas fezes não significa, necessariamente, que o *H. pylori* esteja viável (MITCHELL 1999; DELTENRE & KOSTER, 2000).

Caso o *H. pylori* seja transmitido via fecal-oral, a água seria um provável meio de propagação da bactéria. Em um estudo epidemiológico sobre o modo de transmissão do *H. pylori* em crianças peruanas, KLEIN *et al.* (1991) propuseram uma associação entre a prevalência do microrganismo e a água potável. Adicionalmente, HOPKINS *et al.* (1993) sugeriram que a contaminação na agricultura, pela utilização de água contaminada na irrigação das lavouras, através do consumo de frutas e vegetais não cozidos pudesse ser um possível modo de transmissão do *Helicobacter pylori* (MITCHELL, 1999; DELTENRE & KOSTER, 2000).

3.2.2- TRANSMISSÃO ORAL-ORAL

Existem indícios de que o *Helicobacter pylori* possa permanecer ou transitar pela área bucal, na placa dentária ou saliva. Além disso, sua presença no suco gástrico faz com que a possibilidade de transmissão oral-oral deste microrganismo seja estudado (MITCHELL, 1999; DELTENRE & KOSTER, 2000).

Há evidências de que o vômito e o refluxo esofágico possam ser considerados como um meio de propagação do microrganismo, já que VAROLI *et al.* (1991), mostraram um número superior à 58% de *H. pylori* presente no suco gástrico de pacientes infectados (VAROLI *et al.*, 1991; MITCHELL, 1999). Desse modo, propõe-se uma maior atenção à possível transmissão gastro-oral, que ocorreria quando um indivíduo entrasse em contato com o vômito contaminado (MITCHELL *et al.*, 1992b; AXON, 1995).

INTRODUÇÃO

Isolamento

Em estudos de investigação da transmissão do *H. pylori*, KRAJDEN *et al.* (1989) e CELLINI *et al.* (1995) isolaram algumas bactérias de placa dentária de pacientes positivos ao microrganismo. Adicionalmente, DESAI *et al.* (1991) em um estudo com pacientes dispépticos da Índia, obtiveram uma taxa de 98% de presença de *H. pylori* na placa dentária. Entretanto, a identificação da bactéria foi feita através do teste da urease, que é inespecífico, aumentando a possibilidade de falsos positivos por outras bactérias produtoras da enzima urease (MITCHELL, 1999).

Estes dados indicam que a transmissão oral-oral, ou ainda a gastro-oral possam ser um dos principais meios de propagação da bactéria.

4- ISOLAMENTO

Existem várias técnicas utilizadas para identificar o *Helicobacter pylori*, estas podem ser divididas em **não invasivas** ou **não endoscópicas**, que são mais convenientes para o paciente e incluem a sorologia e o teste respiratório da uréia ou do ^{13}C ou ^{14}C e **invasivas** ou **endoscópicas**, feitas por meio de uma endoscopia digestiva alta (EDA), que freqüentemente envolve a retirada de

fragmentos de biópsias gástricas para o isolamento do *H. pylori* e o diagnóstico das doenças do tubo digestivo alto. Esta técnica é ideal para diagnóstico e planejamento do tratamento em pacientes com suspeita de infecção por esta bactéria. Após a endoscopia, a identificação da bactéria é feita por meio de cultura bacteriana, análise histopatológica do tecido e o teste rápido da urease, podendo ser utilizados também testes moleculares como o PCR (do inglês: **POLYMERASE CHAIN REACTION**) (COHEN, 1997; MAGALHÃES, 2000; OHANA, 2000).

INTRODUÇÃO

Isolamento

4.1 – SOROLOGIA

O teste de sorologia identifica os anticorpos específicos [imunoglobulina G (IgG)] originados como resposta imunológica à infecção pelo *H. pylori*. Os anticorpos são encontradas em amostra de soro das pessoas infectadas. Geralmente este teste é realizado através da técnica de ELISA (**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**) ou látex-aglutinação. Resultados falso-negativos podem ocorrer em crianças, idosos e em indivíduos imunodeprimidos, que não desenvolvem reação imunológica contra a infecção (ALEMOHAMMAD *et al.*, 1993; LUZZA *et al.*, 1995; WESTON *et al.*, 1995; ATHERTON *et al.*, 1997). A sorologia tem um papel limitado na confirmação da erradicação do *H. pylori*, pois na maioria dos pacientes são necessários de 6 a 12 meses para que o título de IgG reduza a 50% ou valores inferiores aos observados antes do tratamento (PRASAD, 1995).

4.2- TESTE RESPIRATÓRIO DA URÉIA

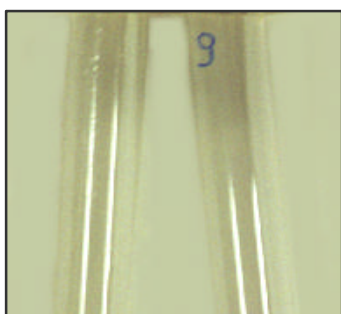
O princípio do teste é simples e consiste na administração, pelo paciente, de uma solução de uréia isotopicamente marcada com ^{13}C ou ^{14}C . O ar expirado pelo paciente é coletado para posterior análise. Caso o *H. pylori* esteja presente, a enzima urease catalisará a hidrólise da uréia, sendo o dióxido de carbono absorvido pela corrente sangüínea. A molécula com isótopo marcado será detectada no ar expirado. No entanto, podem ocorrer falso-positivos devido à hidrólise da uréia por bactérias da cavidade oral, ou falso-negativos caso o exame seja feito uma semana após o uso de bismuto, antimicrobianos ou após cirurgia gástrica (BELL *et al.*, 1987; GRAHAM *et al.*, 1987; RAJU *et al.*, 1994; HEATLEY, 1995; ATHERTON *et al.*, 1997).

INTRODUÇÃO

Isolamento

4.3- TESTE RÁPIDO DA UREASE

Este teste é baseado na principal característica bioquímica da bactéria, a produção da enzima urease que hidroliza a uréia em gás carbônico e amônia, alterando o pH do meio (Figura 1). Esta reação será observada através de um indicador de pH, que indicará a presença da bactéria. Para o diagnóstico do *H. pylori* na prática clínica, o teste da urease é barato, rápido e fácil de se realizar, entretanto não fornece informações sobre a intensidade da inflamação (MÉGRAUD, 1997). Falso-positivos podem ocorrer devido à presença de outros organismos produtores de urease, do mesmo modo falso-negativos podem ocorrer quando o paciente está sendo tratado com inibidores de bomba de prótons como omeprazol, lansoprazol ou pantoprazol (GLUPCZYNSKI & HIRSCHL, 1994).



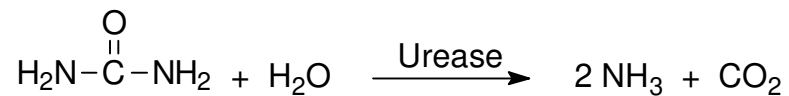


FIGURA 1 : Teste rápido da urease: amarelo – urease negativo; rosa – urease positivo. Reação de quebra da uréia.

INTRODUÇÃO

Isolamento

4.4- HISTOLOGIA

Embora a técnica histológica não esteja livre de falhas, a especificidade e a sensibilidade desta são altas, em torno de 95%. Além da detecção da bactéria, a análise histopatológica permite avaliar o tipo e a intensidade da inflamação da mucosa gástrica. As colorações mais utilizadas são a hematoxilina-eosina e a Giemsa (HEATHEY, 1995; LAINE *et al.*, 1997) (Figura 2). Há uma limitação na utilização desta técnica na prática clínica, devido ao alto custo, à demora e à necessidade de um histologista experiente (MEGRAUD, 1997).

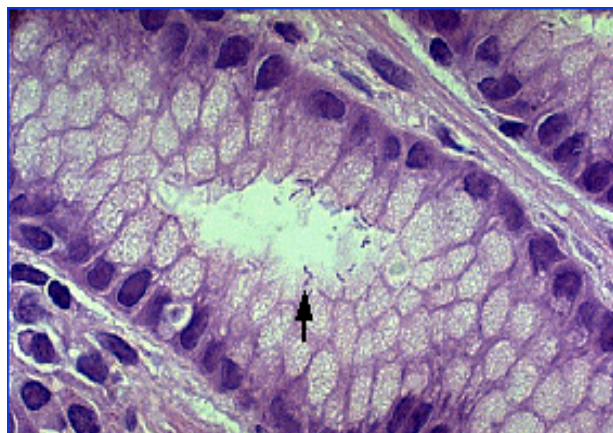


FIGURA 2: Análise histológica da biópsia gástrica: a seta indica a presença do *H. pylori*.

FONTE: LEE & MEGRAUD, 1996.

4.5- CULTURA BACTERIANA

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria muito adaptada ao seu habitat e de crescimento lento, sendo assim, é muito difícil cultivá-la *in vitro*. O crescimento pode ser afetado por vários fatores como o número de biópsias, o meio de cultura, a duração e a temperatura do transporte e o próprio método de cultivo. Sua detecção pode ser influenciada também pelo uso prévio de alguns medicamentos, usados por pacientes em tratamentos de dispepsia, como o omeprazol, alguns

INTRODUÇÃO

Isolamento

antimicrobianos, bismuto ou benzocaínas. Além disso, é possível que resíduos de glutaraldeído, presentes na pinça de coleta de biópsia, afete a viabilidade do *H. pylori*.

Para o desenvolvimento da cultura bacteriana (Figura 3), alguns cuidados devem ser tomados quanto ao ambiente de crescimento do *H. pylori*, que deve ser obrigatoriamente microaerofílico (5-6 % de O₂, 8-10% de CO₂, 80-85% de N₂). Este método permite o isolamento e a análise da susceptibilidade do *H. pylori* a antimicrobianos (McNULTY *et al.*, 1988; ELIZALDE *et al.*, 1998; GOLD *et al.*, 1999).

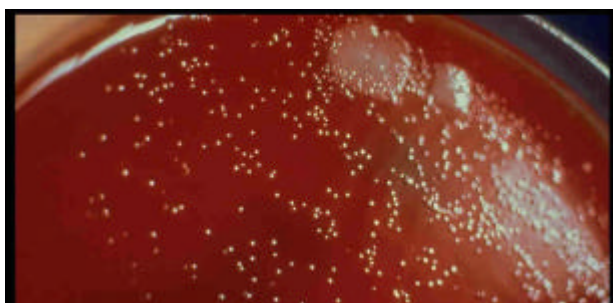


FIGURA 3: Cultura do *H. pylori*.

4.6 PCR

A reação de PCR (***P*olymerase *C*hain *R*eaction**) é outro método usado para a detecção do *H. pylori*. Este método apresenta altíssima sensibilidade e especificidade, podendo ser feito diretamente das biópsias gástrica ou duodenal, do suco gástrico, da placa dentária, da saliva, da cultura e até mesmo das fezes (WESTBLOM *et al.*, 1993; CHONG *et al.*, 1996; WESTBLOM, 1997; LU *et al.*, 1999). Os genes *rRNA 16S*, *ureA* e o *ureC* têm sido utilizados na identificação da bactéria. Além disso, por sua alta sensibilidade, a PCR é muito utilizado em estudos epidemiológicos ligados à identificação de reservatórios ambientais, e em

INTRODUÇÃO

Diversidade genética

trabalhos de determinação do modo de transmissão desta bactéria (WESTBLOM, 1997). As desvantagens deste método são o alto custo da técnica e a falta de informação sobre a viabilidade da bactéria estudada.

5- DIVERSIDADE GENÉTICA

A presença do *Helicobacter pylori* está associado com diversas doenças com diferentes graus de severidade, tais como gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma MALT (***M*ucosa *A*ssociated *L*ymphoid *T*issue**) e o carcinoma gástrico distal. A diversidade sintomática pode estar ligada à idade e a fatores genéticos do hospedeiro, juntamente com fatores ambientais, tais como a dieta inadequada e a

administração contínua de alguns medicamentos como os anti-inflamatórios não esteroidais. Esta variação sintomática pode também estar ligada às propriedades específicas da bactéria, pois numerosos estudos têm mostrado que o grau de diversidade entre as cepas de *Helicobacter pylori* parece ser superior ao registrado em outras espécies bacterianas (AXON, 1990; GO *et al.*, 1996; MOBLEY, 1997; VAN DOORN *et al.*, 1997; MARAIS *et al.*, 1999).

Muitos mecanismos diferentes podem contribuir para esta diversidade genômica. A obtenção de fragmento de DNA exógeno faz com que aumente a diversidade entre linhagens. Isso ocorreu com a ilha de patogenicidade *cag* (*cag* PAI), presente em muitas cepas de *H. pylori* (ATHERTON *et al.*, 1995; MARSHALL *et al.*, 1998; VAN DOORN *et al.*, 2000). Dentre outros mecanismos que contribuem para a diversidade genética, destacam-se as mutações pontuais que estão associadas com a diversidade de alguns genes (*ureC* e *iceA*, por exemplo), e com a aquisição de resistência a alguns antimicrobianos (COURCOUX *et al.*, 1990; KANSAU *et al.*, 1996; PEEK *et al.*, 1996; VAN DOORN *et al.*, 2000).

INTRODUÇÃO

Diversidade genética

O primeiro genoma completo da bactéria foi publicada em 1997 por TOMB *et al.*, que com sua equipe sequenciaram o cromossomo da cepa 26695, que foi isolada de um paciente com gastrite em 1987 no Reino Unido. No ano seguinte, HANCOCK *et al.* (1998) finalizaram o sequenciamento do genoma da linhagem J99, isolada nos Estados Unidos de um paciente com úlcera duodenal. O cromossomo circular da J99 tem 1.643.831 pb, sendo 24.036 pb menor que o da 26695 (TOMB *et al.*, 1997, HANCOCK *et al.*, 1998, ALM *et al.*, 1999; ALM & TRUST, 1999).

VAN der ENDE *et al.* (1996) sugeriram que o *Helicobacter pylori* está em evolução contínua, resultando assim em linhagens altamente diversificadas. Porém, BLASER & BERG (2001) afirmaram que o *H. pylori* é uma bactéria muito

heterogênea, entretanto muito dessa diversidade não afeta o seu desenvolvimento.

Alguns estudos que comparam as seqüências gênicas do *H. pylori* concluíram que a organização do genoma, a ordem dos genes e o proteoma das duas cepas sequenciadas são muito similares. Esta alta estimativa de variabilidade genética tem ocorrido provavelmente devido ao uso de técnicas de baixa resolução como *pulsed field gel electrophoresis* e RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**enght **P**olymorphism). Esses estudos comparativos mostram também que 20% dos genes são específicos do *Helicobacter pylori*, sendo que cerca de 7% são exclusivos de cada linhagem, com quase metade desses genes compactados em uma única e variável região (ALM *et al.*, 1999; ALM & TRUST, 1999; DOIG *et al.*, 1999; SALAMA *et al.*, 2000).

5.1 - PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

Além dos fatores de colonização, o *Helicobacter pylori*, tal como outras bactérias patogênicas, causa danos aos tecidos através da liberação de toxinas. Na década passada, foram identificados alguns genes do *H. pylori* relacionados

INTRODUÇÃO

Diversidade genética

ao desenvolvimento de doenças gástricas (BLASER *et al.*, 1995; XIANG, 1995; BLASER & CRABTREE, 1996).

Foi descrita uma citotoxina com capacidade de produzir vacúolos (VacA). Esta proteína é codificada pelo gene *vacA*, que é encontrado em todas as linhagens de *H. pylori*. Aproximadamente 50% destas cepas produzem a citotoxina ativa, que é capaz de induzir a vacuolização em células eucariontes (COVER & BLASER, 1992; COVER *et al.*, 1994; ATHERTON *et al.*, 1995).

Outra proteína associada às manifestações clínicas é o antígeno de superfície codificado pelo gene *cagA*. Este gene não está presente em todas as

linhagens de *H. pylori*, e é considerado um marcador para presença da ilha de patogenicidade (*cagPAI*) (VAN DOORN *et al.*, 1998). As cepas de *H. pylori cagA* positivo (*cagA+*) parecem ser mais prevalentes em pacientes com úlceras pépticas, quando comparado a pacientes com gastrite. Recentemente, alguns genes também estão sendo relacionados à ulcerações, como é o caso do *cagE*, também presente na *cag PAI* e o *iceA* (ATHERTON *et al.*, 1995; LUPETTI *et al.*, 1996; VAN DOORN *et al.*, 1998; FALLONE *et al.*, 2000; VAN DOORN *et al.*, 2000).

5.1.1- *vacA*

A citotoxina vacuolizante (*VacA*), codificada pelo gene *vacA*, é um importante fator de virulência do *H. pylori* por induzir a vacuolização citoplasmática em células eucariontes (COVER & BLASER, 1992; COVER *et al.*, 1994; ATHERTON *et al.*, 1995; COVER, 1996, de BERNARD, 1997; MONTECUCCO *et al.*, 1999).

Todas as cepas desta bactéria contém seqüências que hibridam com sondas de *vacA*, e claramente todas estas bactérias secretam o produto *VacA*. No entanto, foi observada uma considerável variação interlinhagens na atividade

INTRODUÇÃO

Diversidade genética

vacuolizante da toxina (COVER *et al.*, 1994; ATHERTON *et al.*, 1995; FORSYTH *et al.*, 1998). A heterogeneidade dos alelos *vacA* pode ser um fator determinante nas variações das doenças entre os pacientes infectados por *H. pylori* (RUDI *et al.*, 1998; ATHERTON *et al.*, 1999; GERHARD *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 1999).

Existem duas regiões variáveis no gene *vacA*. Uma região de aproximadamente 50pb, denominada **s**, localizada na região 5' terminal, que codifica o peptídeo sinal (Figura 4). Nesta região podem ser identificados os

subtipos **s1** e **s2**. Além disso, o alelo s1 pode ser distinguido nos subtipos s1a, s1b, s1c (ATHERTON *et al.*, 1995; VAN DOORN *et al.*, 1998).

Outra região que apresenta uma grande heterogeneidade, chamada de **m**, com aproximadamente 700pb, está localizada na região mediana do gene, como mostra a Figura 4 (ATHERTON *et al.*, 1995). Esta apresenta os subtipos **m1** e **m2**, podendo este último ser identificado como m2a e m2b (ATHERTON *et al.*, 1995; VAN DOORN *et al.*, 1998).

A combinação em mosaico desses tipos alélicos distintos (s e m) determina a produção e a especificidade da atividade da citotoxina e está associada com a patogenicidade bacteriana (ATHERTON *et al.*, 1995; GUNN *et al.*, 1998; VAN DOORN *et al.*, 1998). Todas as linhagens possuem um dos tipos de seqüência sinal e um dos dois tipos da região mediana, assim sendo podemos ter s1m1, s1m2, s2m2 e o menos comum s2m1 (ATHERTON *et al.*, 1997; MORALES-ESPINOSA *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2001). Análises bioquímicas revelaram que todas variantes alélicas *vacA* produzem uma citotoxina vacuolizante. Esta proteína é autosecretada, similarmente ao sistema de secreção tipo V. Porém as proteínas *vacA* s2 não são eliminadas eficientemente, perdendo assim as propriedades tóxicas induzindo assim ao desenvolvimento de doenças gástricas leves como as gastrites (REAYRAT, *et al.*, 1999; GERHARD, *et al.*, 2002).

INTRODUÇÃO

Diversidade genética

Alguns estudos têm demonstrado a associação entre a infecção gástrica, por *H. pylori* contendo o alelo s1 e um maior risco de desenvolver doença ulcerosa péptica, do que os infectados com cepas s2 (RUDI *et al.*, 1998; ATHERTON *et al.*, 1999; GERHARD, 1999; VAN DOORN *et al.*, 1999). Esta associação parece ser menos aparente em muitos países asiáticos, quando comparado com os europeus e os americanos (ITO *et al.*, 1998; PAN *et al.*, 1998).

O gene *vacA* codifica a citotoxina vacuolizante com aproximadamente 140KDa de massa (Figura 4). O amino terminal na seqüência sinal e o fragmento carboxi-terminal são proteoliticamente retidos durante o processo de secreção do VacA, a toxina madura é exportada para o espaço extracelular possuindo aproximadamente 88 KDa, com aproximadamente 821 aminoácidos (COVER & BLASER, 1992; COVER *et al.*, 1994; PHADNIS *et al.*, 1994; SCHIMITT & HAAS, 1994; TELFORD *et al.*, 1994; COVER *et al.*, 1997; MOLINARI, 1998; YAHIRO *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2001).

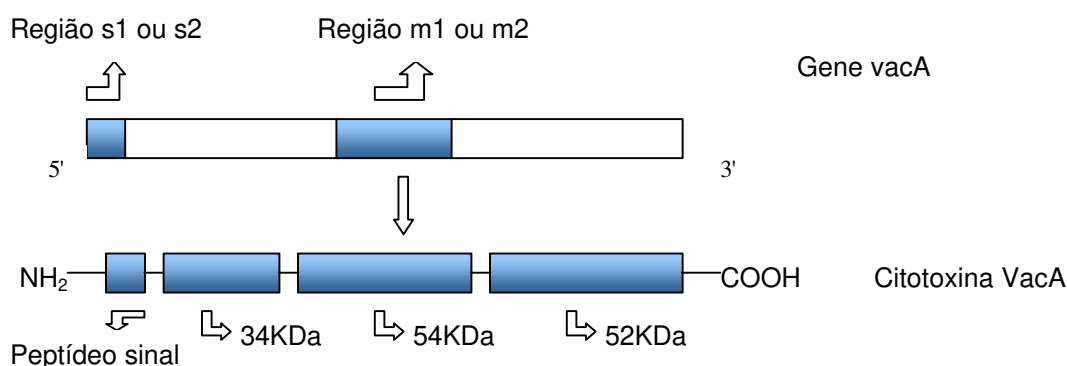


FIGURA 4 : Esquema do gene *vacA*, evidenciando as regiões que codificam o peptídeo sinal (s) e a mediana (m). Mostra também o produto primário traduzido do gene.

Desse modo, o VacA é secretado no espaço extracelular e também é retido parcialmente na superfície celular bacteriana. Em pH neutro, VacA agrupa-se em um grande complexo oligomérico, solúvel em água, composto predominantemente por 12 ou 14 monômeros idênticos (LUPETTI *et al.*, 1996; COVER *et al.*, 1997).

INTRODUÇÃO

Diversidade genética

Quando exposto a pH ácido ou alcalino, este complexo desassocia-se em monômeros e estes estão associados a um aumento da citotoxicidade do VacA (de BERNARD *et al.*, 1995; COVER *et al.*, 1997; MOLINARI *et al.*, 1998; YAHIRO *et al.*, 1999; Mc CLAIN *et al.*, 2000). Dentre os efeitos celulares induzidos pelo VacA incluem a vacuolização, alteração da função endolisossômica, formação de poros na membrana plasmática, apoptose e permeabilização da camada epitelial. VacA atinge alguns diferentes alvos celulares, incluindo as vesículas endocíticas, as

mitocôndrias, o citoesqueleto e as junções das células epiteliais (PAPINI *et al.*, 2001).

5.1.2 - *cagA* e *cagE*

O antígeno de superfície CagA é um possível fator de virulência do *H. pylori* e é codificado pelo gene *cagA*. A produção desta proteína está associada com avanços das doenças gastrointestinais (TUMURU *et al.*, 1993; COVER & BLASER, 1995). O gene *cagA* é convencionalmente usado como um marcador da ilha de patogenicidade *cag* PAI, contida nas linhagens mais virulentas. Alguns estudos sugerem que não se use apenas o gene *cagA* como marcador da presença da PAI, pois esta pode não estar íntegra. Linhagens obtidas de pacientes dispépticos podem possuir a maioria dos genes da PAI, incluindo a região promotora do gene *cagA*, mesmo que ele esteja ausente, sugerindo assim que outros genes, como o *cagE*, devam ser usados como marcador da presença da ilha de patogenicidade (MAEDA *et al.*, 1998; IKENOVE *et al.*, 2001; OWEN *et al.*, 2001).

Linhagens *cagA*⁺ são conhecidas por induzir a secreção de IL-8 (interleucina 8) pelas células epiteliais, um importante mediador da migração de neutrófilos durante o processo inflamatório (CRABTREE *et al.*, 1994; CRABTREE *et al.*, 1995). Entretanto, recentes estudos têm indicado que não apenas o *cagA*, como outros genes contidos na ilha, são responsáveis pela indução de IL-8. A

INTRODUÇÃO **genética**

Diversidade

inativação do *cagE* também pode causar uma redução na habilidade do *H. pylori* em induzir a produção IL-8 (SHARMA *et al.*, 1995; CENSINI *et al.*, 1996; AKOPYANTS *et al.*, 1998; MAEDA *et al.*, 1998; OGURA *et al.*, 1998)

5.1.3 – *iceA*

Recentemente, PEEK *et al.* (1998) descreveram um novo gene do *Helicobacter pylori*, denominado *iceA* (*Induced by **C**ontact with **E**pithelium*). Estudos iniciais mostraram que haviam duas variantes para este gene, os alelos *iceA1* e *iceA2* (Figura 5).

A expressão do *iceA1* é regulada através do contato da bactéria com células epiteliais (PEEK *et al.*, 1998; van DOORN *et al.*, 1998). O produto gênico de *iceA1* é uma provável endonuclease de restrição, que apresenta uma homologia de aproximadamente 60% com os nucleotídeos do gene *nlaIII* da *Neisseria lactamica*, codificador da endonuclease de restrição NlaIII que reconhece a sequência CATG (MORGAN *et al.*, 1996). O gene *hpyIM*, que sucede o *iceA*, codifica uma adenina metiltransferase que também reconhece a sequência CATG. Consequentemente, o arranjo gênico de *iceA-hpyIM* assemelha-se a um típico sistema modificado, codificante de endonuclease de restrição tipo II, encontrado em muitas outras espécies bacterianas (WILSON, 1991; XU *et al.*, 1997). A relação do produto gênico *iceA1* com a infecção humana ainda não está muito claro (VAN DOORN *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 2000). Foi sugerido que este alelo estaria associado a úlceras duodenais (PEEK *et al.*, 1998; van DOORN *et al.*, 1998). Esta informação mantém-se controversa, pois alguns estudos não confirmam a associação de *iceA1* com qualquer tipo de doença (KIDD *et al.*, 1999; YAMAOKA *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2000). A presença do alelo *iceA1* foi também relacionada a um aumento na indução de IL-8 e com a intensidade de infiltração neutrofílica (PEEK *et al.*, 1998; NISHIYA *et al.*, 2000).

INTRODUÇÃO

Diversidade genética

Em contraste com o *iceA1*, o tipo alélico *iceA2* não apresenta homologia com proteínas conhecidas, e sua estrutura revela padrões de repetições de cassetes. A sua forma mais comum codifica uma proteína de 59aa (aminoácidos), a qual possui dois domínios conservados nas extremidades (14aa e 10aa) e

outros três domínios internos com 13, 16 e 6aa. Análise das seqüências de várias linhagens de *H. pylori iceA2* mostram que este cassete interno, composto por 35aa, pode estar ausente ou se repetir em até três vezes, resultando assim em proteínas compostas por 24, 59, 94 ou 129aa como mostra a Figura 5 (FIGUEIREDO *et al.*, 2000). O gene *iceA2* apresenta aproximadamente 40% de homologia com os nucleotídeos do *iceA1*, mas sua estrutura gênica é totalmente diferente (PEEK *et al.*, 1998; VAN DOORN *et al.*, 1998).

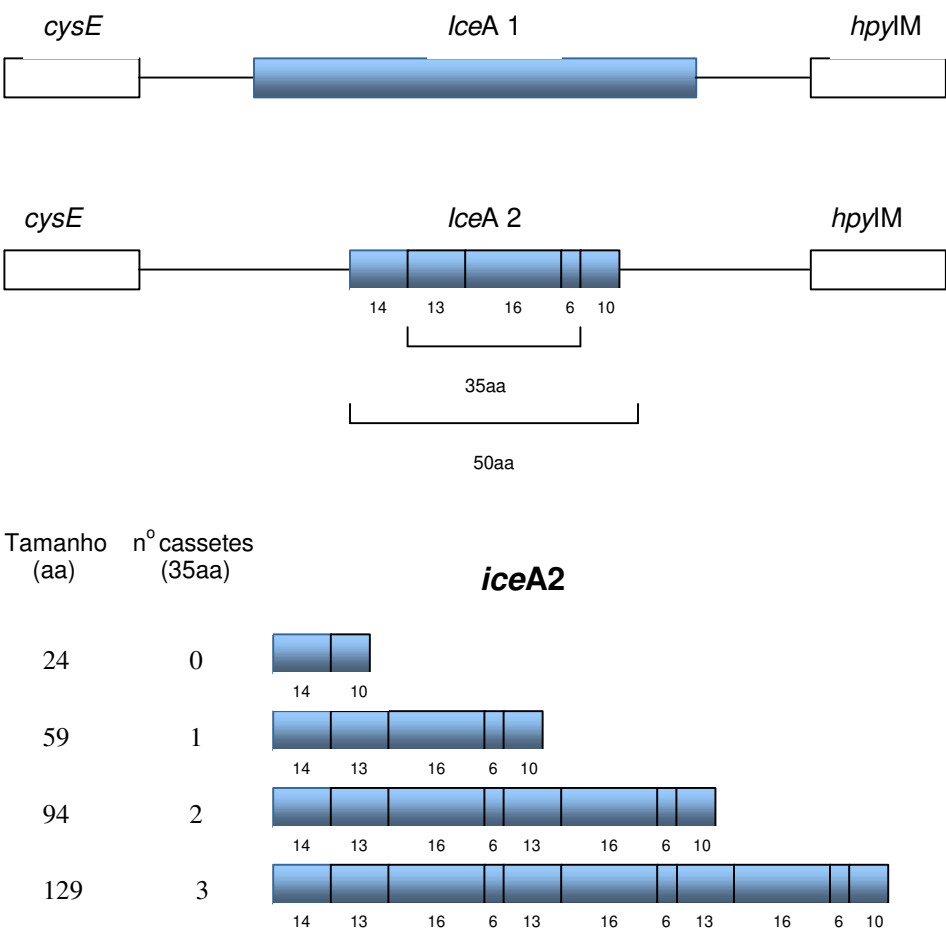


FIGURA 5: Representação esquemática do gene *iceA* que se encontra entre os genes *cysE* e *hpyIM*. Comparação entre os alelos *iceA1* e *iceA2*; e os subtipos de *iceA2*. Adaptado PEEK *et al.*, 2000.

INTRODUÇÃO
Tratamento

6 - TRATAMENTO

O tratamento da infecção do *H. pylori* tem sido objeto de um grande número de estudos. Os esquemas terapêuticos mais comumente empregados para a terapia de erradicação consistem na combinação de dois antimicrobianos (usualmente metronidazol, claritromicina, amoxicilina, tetraciclina ou furazolidona), juntamente com um inibidor de bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol ou pantoprazol), um antagonista de receptor de H₂ (ranitidina, cimetidina) ou componentes de bismuto (BUCKLEY *et al.*, 1996; GRAHAM *et al.*, 1996; The Irish Hp Study Group, 1996). Entretanto, a falência terapêutica aos regimes propostos ocorre em aproximadamente 10-20% dos pacientes (LAHEIJ *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2000). Dentre os fatores incluídos como causas da ineficiência terapêutica, o mais importante é a resistência das bactérias aos antimicrobianos. Além disso, destacam-se também a penetração não efetiva dos antibióticos através da mucosa gástrica e a inativação da droga no pH baixo do estômago (LABENZ *et al.*, 1994; VAN der HULST, 1996; ALARCON *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 2000).

6.1 – ESQUEMAS TERAPÊUTICOS

Em 1992 foi proposto pelo comitê organizador da Primeira Semana Européia de Gastroenterologia em Atenas, a utilização de três esquemas terapêuticos para a erradicação do *H. pylori*: terapia tripla com bismuto, metronidazol e tetraciclina; ou bismuto, metronidazol e amoxicilina e terapia dupla com omeprazol e amoxicilina (LEE, 1993).

Nos Estados Unidos, os esquemas aprovados pelo FDA (***Food and Drug Administration***) incluem também terapias triplas com subsalicilato de bismuto, metronidazol e tetraciclina; lansoprazol, amoxicilina e claritromicina e omeprazol,

INTRODUÇÃO

Tratamento

amoxicilina e claritromicina (*Evaluating clinical studies of antimicrobials in the Division of Anti-Infective Drug Products: Indication 25 Helicobacter pylori*).

Estes esquemas não se mostraram eficientes em várias regiões do mundo, assim como no nosso país, devido principalmente aos altos índices de resistência do *H. pylori* ao metronidazol. Durante o 1º Encontro do Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter pylori*, em 1997, foi recomendado à classe médica brasileira, dois esquemas terapêuticos iniciais para a erradicação da bactéria: terapia tripla com omeprazol, claritromicina e amoxicilina e uma opção mais econômica com subcitrato de bismuto, tetraciclina e furazolidona. Além disso, o Núcleo sugeriu 3 esquemas para retratamento, utilizando inibidor de bomba protônica, sal de bismuto e antibióticos com amoxicilina, claritromicina, azitromicina, tetraciclina e quimioterápicos como metronidazol, tinidazol em combinações variadas (CARVALHAES *et al.*, 1997).

6.2- RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A principal razão do fracasso de terapias utilizadas para erradicação do *H. pylori* deve-se à resistência a alguns antimicrobianos utilizados (MÉGRAUD, 1997). Pela heterogeneidade da bactéria, é recomendado analisar a diversidade genotípica e a resistência do *H. pylori* aos antimicrobianos propostos no esquema terapêutico. Sendo assim é de fundamental importância a análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC) das linhagens frente aos antimicrobianos usados no tratamento.

Quando linhagens brasileiras de *H. pylori* foram analisadas em relação à resistência primária a estes antimicrobianos, verificaram-se graus de resistência diferentes em comparação com dados obtidos em outras populações. A resistência ao metronidazol foi verificada em 42% das linhagens, para amoxicilina em 29%, para claritromicina e tetraciclina 7% e para furazolidona 4% (MENDONÇA *et al.*, 2000).

INTRODUÇÃO

Tratamento

Em outro estudo, foi observado que a resistência do *H. pylori* a estes antimicrobianos poderia reduzir a eficiência do tratamento para erradicação para 50% (ECCLISSATO *et al.*, 2002). As diferenças nas linhagens brasileiras em comparação com outros países, reforçam a importância dos estudos específicos de *H. pylori* provenientes dessa população.

A resistência a uma certa classe de antimicrobianos pode envolver diferentes mecanismos e pode ocorrer com todas as linhagens de uma determinada espécie bacteriana. Em 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).

6.3- RESISTÊNCIA E PATOGENICIDADE

O sucesso da erradicação do *Helicobacter pylori* não depende apenas da susceptibilidade da linhagem ao antimicrobiano utilizado na terapia, mas este é um dos principais fatores, tendo assim maiores taxas de cura em pacientes infectados com linhagens sensíveis ao antimicrobiano (LOPES-BREA *et al.*, 1999). Alguns estudos têm sugerido que a taxa de erradicação do *H. pylori* é menor em pacientes com gastrite, comparando-se a pacientes com úlcera péptica. Desse modo, os fatores de virulência poderiam influenciar na falência terapêutica (VAN der HULST, 1997; VAN DOORN *et al.*, 2000; BROUTET *et al.*, 2001; RUDI *et al.*, 2002).

Foi observado que pacientes infectados com bactérias cagA+ responderiam melhor ao tratamento para a erradicação. Isto pode ser atribuído ao fato de estas linhagens provocarem uma maior degradação de muco e da camada epitelial, permitindo assim, maior penetração dos antimicrobianos contidos na luz do

estômago. As cepas *cagA*⁺ induzem a secreção de IL-8, aumentando a resposta inflamatória local, alterando a vascularização, podendo favorecer uma melhor difusão das drogas utilizadas (SPILLER *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 2000; BROUTET *et al.*, 2001; SARUÇ *et al.*, 2001; RUDI *et al.*, 2002).

Outra possível explicação ao fato de as bactérias *cagA*⁺ apresentarem uma maior taxa de erradicação é que estas cepas podem colonizar com maior densidade, e possuem um crescimento mais rápido, comparando-se às linhagens *cagA*⁻, tornando-se mais susceptíveis aos antimicrobianos ativos durante a divisão celular, como a amoxicilina (VAN der HULST *et al.*, 1997; VAN DOORN *et al.*, 2000; BROUTET *et al.*, 2001; RUDI *et al.*, 2002). Algumas linhagens de *H. pylori* podem ser intrinsecamente mais propensas ao tratamento com esquemas terapêuticos do que outras. A ligação entre o genótipo *cagA* e a resistência aos antimicrobianos metronidazol e claritromicina foi observada em um estudo realizado com crianças espanholas (LOPEZ-BREA *et al.*, 1999). No entanto, a informação não foi confirmada em outros estudos realizados no Reino Unido e na Estônia (OWEN *et al.*, 1999; LOIVUKENE *et al.*, 2000; RUDI *et al.*, 2002).

II - OBJETIVOS



- ✓ Investigar a associação entre os diferentes genótipos de *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE* de amostras de *Helicobacter pylori* e doenças associadas à infecção;
- ✓ Verificar a suscetibilidade do *Helicobacter pylori* frente aos antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e tetraciclina, freqüentemente usados na terapia de erradicação da bactéria;
- ✓ Avaliar a possível associação entre os genes *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE* do *Helicobacter pylori* com a suscetibilidade da bactéria aos antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e tetraciclina;
- ✓ Determinar a possível associação entre as doenças associadas à infecção (gastrite enantematosa; gastrite erosiva; esofagite; úlcera gástrica; úlcera duodenal) em pacientes *Helicobacter pylori* positivos com a resistência aos antimicrobianos comumente usados na terapia de erradicação.

III - *MATERIAL E MÉTODOS*



1- CASUÍSTICA

As amostras de *Helicobacter pylori* foram obtidas do banco de linhagens da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco de Bragança Paulista-SP. Foram incluídos neste estudo amostras providas de pacientes com diferentes laudos endoscópicos: gastrite enantematosa (G), gastrite erosiva (GE), doença do refluxo gastricoesofágico (GERD), úlcera gástrica (UG) e úlcera duodenal (UD) como mostra a Tabela I. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética Médica (Anexo 1). Dentre as amostras, (n=155), 86 eram de pacientes do sexo masculino e 69 do feminino, com idades variando entre 20 e 87 anos ($X= 43.6$ e $dp= 14.9$).

TABELA I: Número de pacientes relacionado às doenças.

	G	GE	GERD	UG	UD	Total
nº pacientes	35	19	21	26	54	155

2- MÉTODOS

2.1- CULTIVO EM MEIO SÓLIDO

As linhagens estocadas foram reativadas por inóculo em placas de Petri com meio seletivo contendo BHI ágar, 10% de sangue de carneiro, 10mg/l

vancomicina, 20mg/l ácido nalidíxico, 10mg/l anfotericina B, 40mg/l TTC (**C**loreto de **T**rifenil **T**etrazolium) (QUEIROZ *et al.*, 1987; MENDONÇA *et al.*, 2000). As

MATERIAL E MÉTODOS

Metodos

placas foram incubadas a 37°C em condições de microaerofilia (5-6% O₂, 8-10% CO₂, 80-85% N₂), com 95% de umidade relativa.

2.2- IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE *H. PYLORI*

A morfologia das colônias, obtidas em cultura, foi observada ao microscópio óptico após coloração de Gram, e as amostras que apresentaram morfologia característica de *H. pylori* foram confirmadas pela produção de urease, catalase e oxidase.

Para o teste de urease, foi feito um inóculo em 3ml de meio de uréia (uréia 2%, vermelho fenol 0,05%, azida sódica 0,002%, Probac-SP), incubado-o à 37°C. Na presença de urease, com a degradação da uréia, o pH do meio é elevado e verificado através do indicador vermelho fenol.

A atividade da catalase foi analisada através da degradação de H₂O₂ 3%, em H₂O e O₂[↑], quando em contato com o *H. pylori*. Foi realizado também o teste de produção de oxidase usando dihidroclorito de etrametil-p-fenilediamina 1% (Difco) como substrato da enzima.

A identificação da bactéria também foi feita através da amplificação por PCR dos genes *r16s* e *ureC* utilizando-se *primers* específicos para cada um dos genes (TabelaIII).

2.3- TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade das amostras aos antimicrobianos foi avaliada pelo teste de diluição em ágar. O método consiste na preparação de placas com meio

adequado [Muller Hinton (Merk) e 10% de sangue de carneiro], acrescidas de agentes antimicrobianos [claritromicina, amoxicilina, furazolidona, metronidazol ou tetraciclina (Sigma)] em diluições sucessivas de 64µg/ml a 0,125µg/ml, possuindo

MATERIAL E MÉTODOS

Metodos

cada placa a metade da concentração da placa anterior. As amostras foram inoculadas com a densidade corrigida para aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (CFU) / ml através da comparação com padrão da escala de McFarland. Cerca de 1µl desta suspensão foi então inoculado nas placas através de um dispositivo replicador, e estas foram incubadas a 37°C em atmosfera de microaerofilia durante três dias. Foram consideradas resistentes as linhagens que apresentaram crescimento em placas com concentrações superiores ao *break point* descrito na literatura, sendo para claritromicina, furazolidona e tetraciclina, >2µg/ml e para amoxicilina e metronidazol, >8µg/ml (MENDONÇA *et al.*, 2000). Esta técnica permite analisar aproximadamente 40 linhagens simultaneamente.

As linhagens de *Helicobacter pylori* foram divididas de acordo com o resultado do teste de diluição em ágar em grupos resistentes à amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol ou tetraciclina ou susceptíveis para todos.

2.4- EXTRAÇÃO DE DNA

Após dois dias de crescimento bacteriano, as colônias foram coletadas e ressuspendidas em 500µl de TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,0 ; EDTA 1mM pH 8,0). A suspensão foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 2ml e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 1ml de *DNAzolTM Reagent* (Gibco) por 30-60 segundos. Posteriormente acrescentou-se 500µl de etanol absoluto e misturou-se gentilmente por inversão durante 1-3 minutos até a visualização do DNA. Caso

isso não tenha ocorrido, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 3 minutos a 4°C para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o

MATERIAL E MÉTODOS

Metodos

recipitado lavado com etanol 95%. O material genético foi dissolvido em 200µl de hidróxido de sódio 8mM.

O DNA extraído foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Alíquotas desse material foram misturadas à uma solução contendo azul de bromofenol 0,25%, glicerol 40% e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada com tampão TBE 1X (Tris 89mM; Ác bórico 89mM; EDTA 2mM pH 8,0) e submetida a uma diferença de potencial de 80 V a 100 V, de acordo com o tamanho do gel (5 V/cm). Após o tempo adequado, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5 µg/ml) por 20 min temperatura ambiente e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta de onda curta. Para o registro definitivo dos resultados a imagem foi digitalizada por uma camera Kodak DC40.

2.5- AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Os genes *r16s*, *ureC*, *vacA* (s1, s2 e m1, m2), *cagA*, *cagE* e *iceA* (A1e A2) do *Helicobacter pylori* foram amplificados por meio de reação de PCR (SAIKI *et al.*, 1989) com 50µl de volume final contendo 2,5µl de DNA genômico, 20pmol de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, 1,5% de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase e tampão de reação para a enzima. Os ciclos e *primers* específicos para cada um dos genes acham-se descritos na Tabela II e III.

TABELA II – Tempos, temperaturas e números de ciclos das reações de PCR para cada *primer*.

Primers	Etapa Inicial		35 Ciclos						Etapa Final	
	Desnaturação		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão	
	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)
<i>ureC</i> e <i>r16s</i>						55				
<i>vacA</i> m						52				

<i>vacA s</i>	5	94	1	94	1	50	1	72	10	72
<i>iceA 1 e 2</i>						47				
<i>cagA</i>						65				
<i>cagE</i>						50				

MATERIAL E MÉTODOS

Metodos

TABELA III: Oligonucleotídeos utilizados e tamanho esperado para o produto de PCR.

Genes e variantes	Primer	Seqüência (5'→3')	Prod. PCR (pb)	Referência
alélicas				
r16s	Hp1-F	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	110	HO et al., 1991
r16s	Hp2-R	ATTACTGACGCTGATTGTGC		
<i>ureC</i>	UC1-F	AAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT	294	BICKLEY <i>et al.</i> , 1993
<i>ureC</i>	UC2-R	AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC		
<i>cagA</i>	D008-F	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA	297	COVACCI <i>et al.</i> , 1993
<i>cagA</i>	R008-R	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		
<i>vacA</i> m1	VA3-F	GGTCAAAATGCGGTCATGG	290	
<i>vacA</i> m1	VA3-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC		
<i>vacA</i> m2	VA4-F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352	TUMMURU <i>et al.</i> , 1993
<i>vacA</i> m2	VA4-R	CATAACTAGCGCCTTGAC		
<i>vacA</i> s1/s2	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286	
<i>vacA</i> s1/s2	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>iceA1</i>	iceA1-F	GTGTTTTTAACCAAAGTATC	246	ATHERTON
<i>iceA1</i>	iceA1-R	CTATAGCCASTCTCTTTGCA		
<i>iceA2</i>	iceA2-F	GTTGGGTATATCACAAATTAT	124 ou 229 ou 334	<i>et al.</i> , 1995
<i>iceA2</i>	iceA2-R	TTGCCCTATTTTCTAGTAGGT		

2.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A possível associação entre os genes *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE* do *Helicobacter pylori* com as diferentes doenças associadas à infecção foi analisada por meio do teste Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates e Teste Exato de Fisher. Estes testes também foram usados para associar a resistência da bactéria aos antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e

MATERIAL E MÉTODOS

Metodos

tetraciclina com os fatores de virulência e com as doenças. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$. Em todos os casos foi usado o programa BIOESTAT (AYRES *et al.*, 1998).



1. FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de patogenicidade das linhagens de *H. pylori* isolados de pacientes da região de Bragança Paulista – SP foram determinados através da técnica de PCR. Os genes associados a virulência estudados foram *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE*.

Através dos resultados obtidos para os tipos alélicos dos genes *vacA* e *iceA* foi detectada a presença de 17 (11%) amostras contendo mais de um tipo alélico para estes genes, sendo assim consideradas como amostras de pacientes com infecções múltiplas. Estas amostras não foram utilizadas nas análises estatísticas do nosso trabalho, restando assim 138 cepas para o estudo.

Para o gene *vacA* obtivemos taxas de 62% e 38% para os subtipos s1 e s2, respectivamente. Cerca de 30% das linhagens foram identificadas como m1 e 70% m2. Para a associação em mosaico dos tipos s e m, obtivemos taxas de 30%, 32% e 38% para os genótipos s1m1, s1m2 e s2m2 respectivamente. Não foi detectada a presença de cepas com o genótipo s2m1.

Para o gene *iceA*, 17% das linhagens continham o subtipo A1 e 74% o subtipo A2, sendo que este gene não foi detectado em 11% das amostras.

Em relação à ilha de patogenicidade, em 65% (89) das linhagens foi detectada a presença do gene *cagA*, e em 84% (116) o *cagE*. Entretanto, apenas o gene *cagA* foi observado em 5% (7) das 138 cepas, já para o *cagE*, 24% (34) das

amostras apresentaram apenas este gene. Em apenas 15 cepas (11%), ambos os genes (*cagA* e *cagE*) estiveram ausentes.

1.1- ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES DE VIRULÊNCIA COM AS DOENÇAS

Comparando-se as diferentes doenças (gastrite enantematosa; gastrite erosiva; esofagite; úlcera gástrica; úlcera duodenal) com os genótipos de *vacA*

RESULTADOS

Fatores de virulência

através do teste Qui-quadrado (χ^2) observamos uma associação significativa entre úlcera duodenal (UD) com o mosaico s1m1 ($\chi^2 = 2,94$ $p=0,02$), devido um excesso do alelo s1 ($\chi^2 = 16,2$ $p=0,0001$) e de m1 ($\chi^2 = 5,35$ $p=0,02$). Por outro lado, devido a um excesso no alelo s2 ($\chi^2 = 14,02$ $p=0,0002$), uma associação entre a doença do refluxo gastroesofágico (GERD) com o genótipo s2m2 ($\chi^2 = 14,02$ $p=0,0002$) foi detectada. Entretanto quando as demais doenças foram estudadas não se detectou relação entre os genótipos de *vacA* (Gráfico I e Tabela IV).

Quando comparado os genótipos de *iceA* com as diferentes afecções estudadas, não foi observada associação significativa (Gráfico II e Tabela IV). Em relação à presença dos genes *cagA* e *cagE*, novamente não observamos associação desses genes com as doenças (Gráfico III e Tabela IV).

Tabela IV – Genotipagem do *vacA*, *iceA*, *cagA* and *cagE* de pacientes com diferentes doenças.

ENFERMIDADES						
Genótipo	G n (%)	Úlceras pépticas		GE n (%)	GERD n (%)	Total n (%)
		UG n (%)	UD n (%)			
<i>VacA</i>						
S1	13 (45)	15 (62,5)	42 (85)*	12 (70)	4 (21)	86 (62)
S2	16 (55)	9 (37,5)	7 (15)	5 (30)	15 (79)**	52 (38)
m1	6 (20)	6 (25)	21 (43)*	5 (30)	3 (16)	41 (30)
m2	23 (80)	18 (75)	28 (57)	12 (70)	16 (84)	97 (70)
S1m1	6 (20)	6 (25)	21 (43)*	5 (30)	3 (16)	41 (30)
S1m2	7 (25)	9 (37,5)	21 (43)	7 (40)	1 (4)	45 (32)
S2m2	16 (55)	9 (37,5)	7 (14)	5 (30)	15 (80)**	52 (38)
<i>IceA</i>						
<i>iceA</i> 1	5 (17)	3 (12)	9 (19)	1 (6)	3 (16)	21 (15)

<i>iceA2</i>	19 (66)	20 (83)	35 (71)	13 (76)	15 (80)	102 (74)
<i>iceA</i> -	5 (17)	1 (5)	5 (10)	3 (18)	1 (4)	15 (11)
CagA						
<i>CagA</i> +	15 (52)	18 (75)	37 (75)	10 (59)	9 (48)	89 (65)
<i>cagA</i> -	14 (48)	6 (25)	12 (25)	7 (41)	10 (52)	49 (45)
CagE						
<i>CagE</i> +	24 (83)	19 (79)	41 (83)	15 (88)	17 (90)	116 (84)
<i>cagE</i> -	5 (17)	5 (21)	8 (17)	2 (12)	2 (10)	22 (16)

* s1m1 x UD ($\chi^2=2,94$ $p=0,02$) devido a um excesso de s1 ($\chi^2=16,2$ $p=0,0001$) e de m1 ($\chi^2=5,35$ $p=0,02$).

** s2m2 x GERD ($\chi^2=14,02$ $p=0,0002$) devido ao excesso observado ao s2 dentro deste grupo ($\chi^2=14,02$ $p=0,0002$).

RESULTADOS

Fatores de virulência

FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS COM AS DOENÇAS

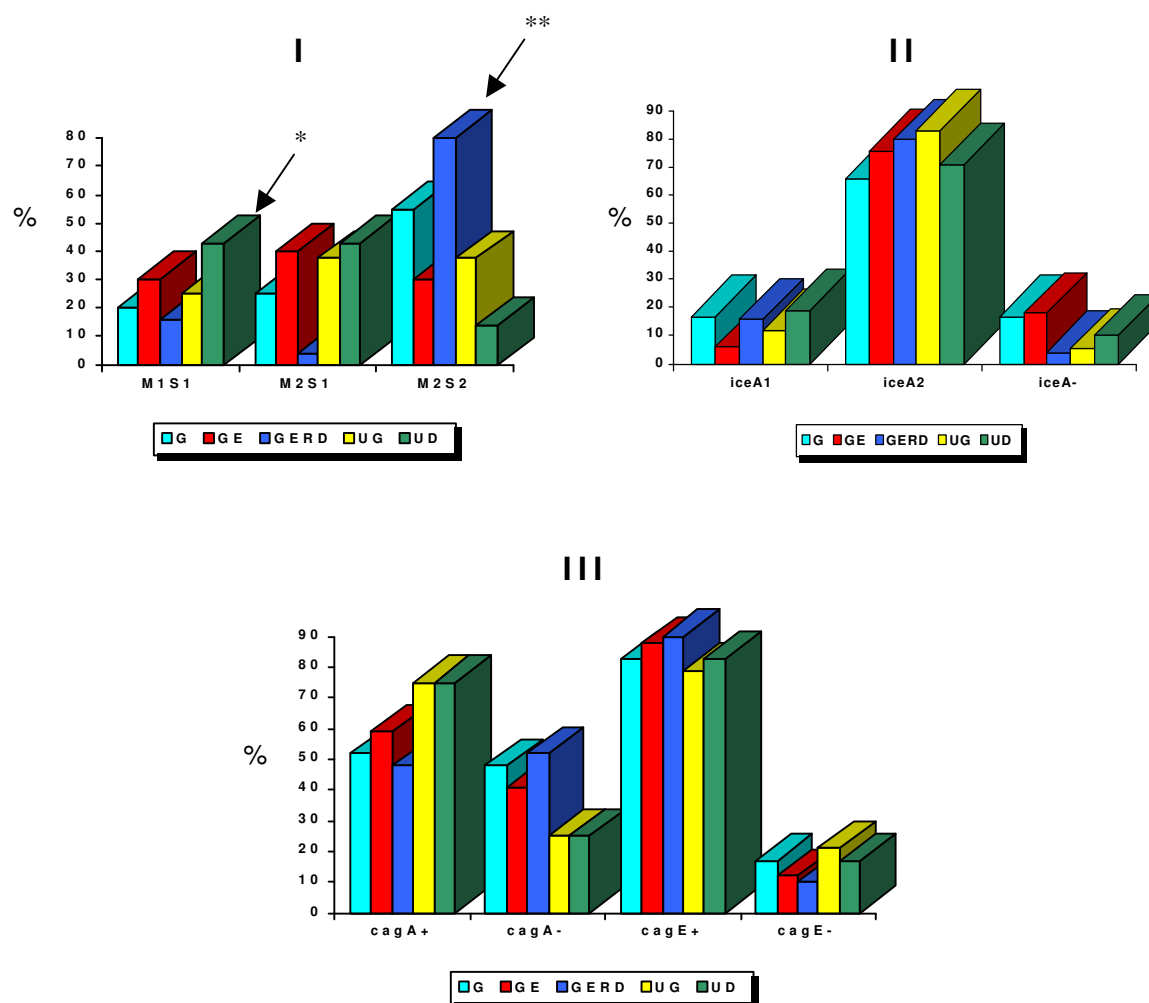


Gráfico I - Associação entre os subtipos *vacA* (m1s1, m2s1, m2s2) com as doenças

Gráfico II - Associação entre os genótipos *iceA* (A1, A2, ausência) com as doenças

Gráfico III - Associação entre a presença dos genes *cagA* e *cagE* com as doenças

* s1m1 x UD - $\chi^2 = 2,94$, $p = 0,02$

** M2S2 x GERD - $\chi^2 = 14,02$, $p = 0,0002$

RESULTADOS

antimicrobianos

Susceptibilidade aos

2. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Através do teste de diluição em ágar, foi avaliada a susceptibilidade de amostras do *H. pylori* frente aos antimicrobianos usados na terapia de erradicação. Das 138 linhagens estudadas, foi detectada resistência ao metronidazol em 75 amostras estudadas (55%), à amoxicilina em 54 (38%), à claritromicina em 23 (16%), à tetraciclina em 13 (9%), e à furazolidona em 19 (13%), como mostra o Gráfico IV.

ANTIBIOGRAMA

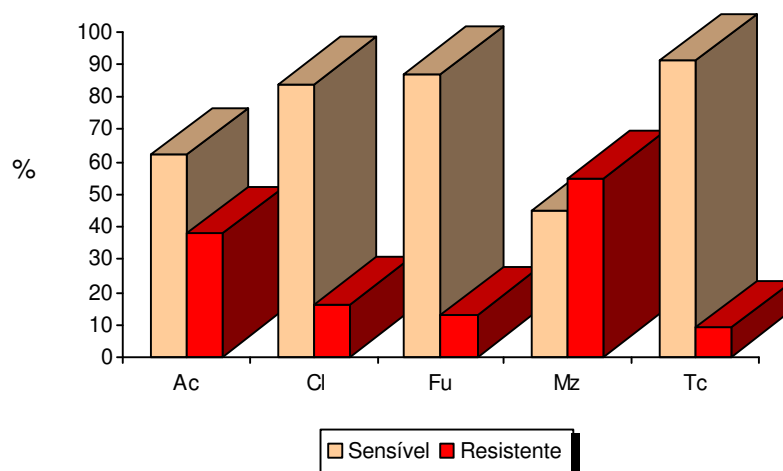


Gráfico IV – Resistência (%) do *Helicobacter pylori* aos antimicrobianos Amoxicilina (Ac), Claritromicina (Cl), Furazolidona (Fu), Metronidazol (Mz) e Tetraciclina (Tc).

RESULTADOS

resistência

Doenças X

3. ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS E A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Foi analisada a possível associação entre os diferentes doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*, com a resistência da bactéria frente aos antimicrobianos estudados. Não foi detectada associação significativa entre as afecções distintas e a resistência aos antimicrobianos usados nesta análise (Tabela V e Gráfico V).

TABELA V : Relação entre as resistências aos antimicrobianos e as diferentes doenças causadas pelo *H. pylori*.

Doença	Amoxicilina		Claritromicina		Furazolidona		Metronidazol		Tetraciclina	
	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S N° (%)	R N° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)
UG	11(46)	13(54)	5(21)	19(79)	2(8)	22(92)	17(71)	7(29)	0(0)	24(100)
UD	18(36)	31(64)	11(22)	38(73)	6(12)	43(88)	25(51)	24(49)	3(6)	46(94)
G	13(45)	16(55)	5(18)	24(82)	6(21)	23(79)	13(45)	16(55)	7(24)	22(76)
GE	8(47)	9(53)	2(11)	15(89)	3(17)	14(83)	8(47)	9(53)	1(6)	16(94)
GERD	4(21)	15(79)	0(0)	19(100)	2(10)	17(90)	12(63)	7(37)	2(10)	17(90)

R - resistente; S - sensível

RESULTADOS

resistência

Doenças X

RESISTÊNCIA ASSOCIADA A DOENÇA

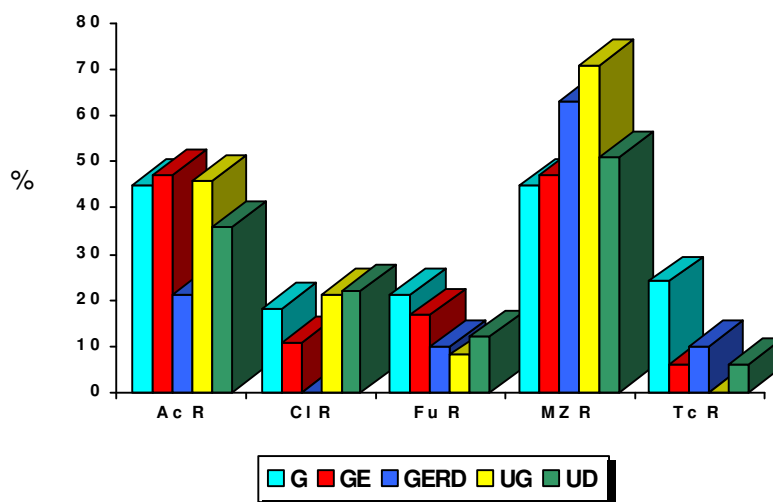


Gráfico V: Resistência aos antimicrobianos, associada com as diferentes manifestações clínicas.

4. ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES DE VIRULÊNCIA E A RESISTÊNCIA

Também foi analisada a relação entre os diferentes fatores de virulência do *H. pylori* com a resistência da bactéria frente aos antimicrobianos estudados. Não

foi observada associação significativa entre os genótipos de *vacA* (s1m1, s1m2, s2m2) com a resistência do *Helicobacter pylori* aos antimicrobianos amoxicilina (Ac), claritromicina (Cl), furazolidona (Fu), metronidazol (Mz) e tetraciclina (Tc) (Gráfico VI e Tabela VI).

RESULTADOS

resistência

Genes de virulência X

TABELA VI - Associação dos genótipos *vacA* m1/m2 e s1/s2 com a resistência a antimicrobianos.

	Amoxicilina		Claritromicina		Furazolidona		Metronidazol		Tetraciclina	
	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)
<i>vacA m1</i>	14(26)	27(32)	7(30)	34(30)	5(26)	36(30)	20(27)	21(34)	1(8)	40(32)
<i>vacA m2</i>	40(74)	57(68)	16(70)	81(70)	14(74)	83(70)	55(73)	42(66)	12(92)	85(68)
<i>vacA s1</i>	36(66)	50(60)	17(74)	69(60)	12(63)	74(62)	49(65)	37(59)	7(54)	79(63)
<i>vacA s2</i>	18(34)	34(40)	6(26)	46(40)	7(37)	45(38)	26(35)	26(41)	6(46)	46(37)
<i>vacA m1s1</i>	14(26)	27(32)	7(30)	34(30)	5(26)	36(30)	20(27)	21(33)	1(8)	40(32)
<i>vacA m2s1</i>	22(40)	23(27)	10(44)	35(30)	7(37)	38(32)	29(38)	16(25)	6(46)	39(31)
<i>vacA m2s2</i>	18(34)	34(41)	6(26)	46(40)	7(37)	45(38)	26(35)	26(42)	6(46)	46(37)

RESISTÊNCIA ASSOCIADA A FATORES DE VIRULÊNCIA

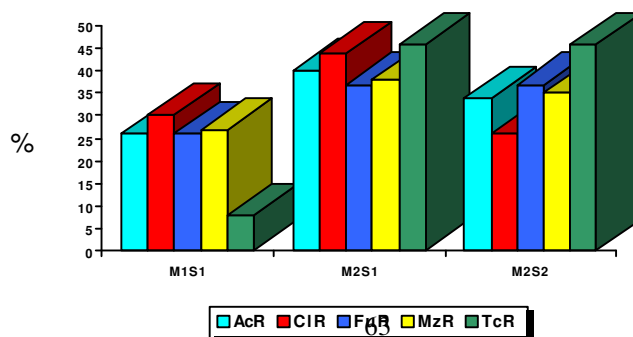


Gráfico VI - Associação dos genótipos *vacA* m1/m2 e s1/s2 com a resistência a antimicrobianos.

Não foi observada associação entre os genótipos *iceA* (A1, A2, ausência) com a resistência do *Helicobacter pylori* aos antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e tetraciclina (Gráfico VII e Tabela VII).

RESULTADOS

resistência

Genes de virulência X

TABELA VII - Associação dos genótipos *iceA* com a resistência aos antimicrobianos.

	Amoxicilina		Claritromicina		Furazolidona		Metronidazol		Tetraciclina	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)
<i>iceA1</i>	7(13)	14(17)	4(17)	17(15)	4(21)	17(14)	12(16)	9(14)	1(8)	20(16)
<i>iceA2</i>	42(78)	59(70)	18(78)	83(72)	12(63)	89(75)	57(76)	44(70)	8(61)	94(75)
<i>iceA -</i>	5(9)	11(13)	1(5)	15(13)	3(16)	13(11)	6(8)	10(16)	4(31)	11(9)

RESISTÊNCIA ASSOCIADA AOS FATORES DE VIRULÊNCIA

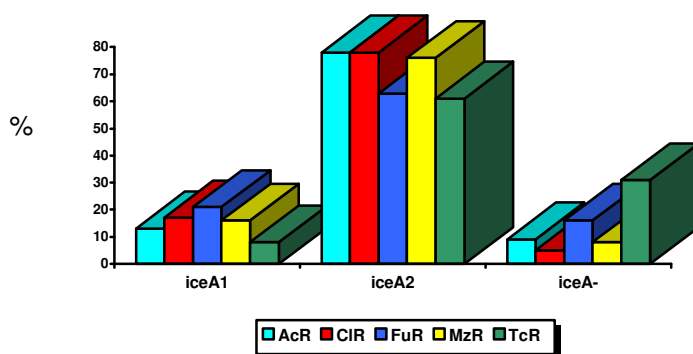


Gráfico VII - Associação entre os subtipos *iceA* (A1, A2 e ausência) com a resistência.

Analisando a associação entre os diferentes genótipos *cagA* e *cagE* com a resistência, foi observada uma associação significativa somente entre a ausência de *cagA* com a resistência do *Helicobacter pylori* à tetraciclina ($\chi^2 = 10,75$; $p = 0,0029$). Em relação aos outros antimicrobianos não foi detectado associação entre a presença ou ausência dos genes *cagA* e *cagE* com a resistência (Gráfico VIII e Tabela VIII).

RESULTADOS

resistência

Genes de virulência X

TABELA VIII – Associação dos genótipos *cagA* e *cagE* com a resistência aos antimicrobianos.

	Amoxicilina		Clarithromicina		Furazolidona		Metronidazol		Tetraciclina	
	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)	R N° (%)	S n° (%)	R n° (%)	S n° (%)
<i>cagA</i> +	35(64)	54(64)	14(60)	75(65)	11(58)	78(65)	48(64)	41(65)	3(23)***	86(69)
<i>cagA</i> -	19(35)	30(36)	9(40)	40(35)	8(42)	41(35)	27(36)	22(35)	10(77)	39(31)
<i>cagE</i> +	45(83)	71(84)	17(74)	99(86)	14(74)	102(86)	60(80)	56(89)	9(69)	107(86)
<i>cagE</i> -	9(17)	13(16)	6(26)	16(14)	5(26)	17(14)	15(20)	7(11)	4(31)	18(14)

*** *cagA* -x resistência a tetraciclina - $\chi^2 = 10,75$; $p = 0.0029$

RESISTÊNCIA ASSOCIADA AOS FATORES DE VIRULÊNCIA

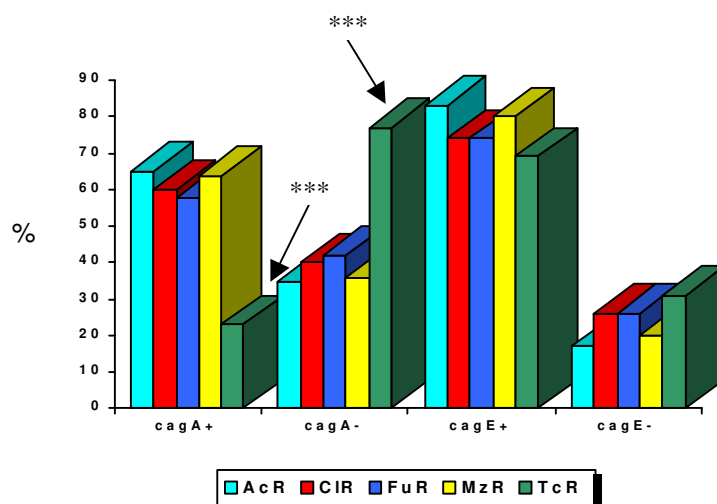


Gráfico VIII - Associação entre os genótipos *cagA* e *cagE* e a resistência.

*** *cagA* -X resistência a tetraciclina - $\chi^2 = 10,75$; $p = 0,0029$



1. FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS COM AS DOENÇAS

O *Helicobacter pylori* coloniza a mucosa gástrica humana, induzindo uma gastrite que pode evoluir para doenças graves como úlcera péptica gástrica e duodenal e linfoma MALT do estômago. Entretanto, nem todos os indivíduos infectados desenvolvem alguma doença. Alguns fatores de virulência têm sido associadas com diferentes doenças. No presente estudo, foi avaliado os genótipos do *H. pylori* isolados de pacientes da região de Bragança Paulista, SP (Brasil), para os possíveis genes de virulência *vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE*. Foi feita também, uma tentativa de associação entre as diferentes doenças e a presença destes genes.

Das 155 amostras estudadas, 17 (11%) apresentaram genótipos múltiplos, indicando a uma infecção múltiplas dos pacientes estando de acordo com índice descritos em outro trabalho realizado no Brasil (ASHOUR *et al.*, 2002). O que nos permitiu esta análise foi a presença de mais de uma variante alélica *vacA* e *iceA*. As infecções múltiplas foi descrita previamente, apresentando diferentes taxas em sua prevalência, sendo encontrada em proporções menores que 10% em locais como Hong Kong, Estônia, EUA, Itália e França, e variações de até 25% na Holanda, Coreia, Colômbia, Brasil e Japão, atingindo altas taxas em Portugal e

México (MORALES-ESPINOSA *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 1999; YAMAOKA *et al.*, 1999; GUSMÃO *et al.*, 2000; ARENTS *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; WONG *et al.*, 2001; ANDRESON *et al.*, 2002). Esta variação entre as taxas de infecções múltiplas pode ser explicada devido à grande diversidade da prevalência mundial da bactéria.

Os genótipos *vacA* têm sido considerados marcadores de patogenicidade do *Helicobacter pylori*, devido à produção de citotoxina vacuolizante, causando danos epiteliais *in vivo* e além disso associados à úlcera péptica (ATHERTON *et al.*, 1997; VAN DOORN *et al.*, 1998).

DISCUSSÃO **doença**

Fatores de virulência X

Nossos resultados mostraram uma prevalência alta do alelo s1 em pacientes com úlcera duodenal, estando de acordo com o descrito por outros autores (ATHERTON *et al.*, 1995; RUDI *et al.*, 1998; VAN DOORN *et al.*, 1998; YAMAOKA *et al.*, 1999; FALLONE *et al.*, 2000; ARENTS *et al.*, 2001; ASHOUR *et al.*, 2002). Alguns estudos propuseram que estas linhagens secretam uma maior quantidade de citotoxinas ativas, quando comparadas às cepas s2. Sendo assim, as linhagens *vacA* s1 são supostamente mais virulentas, podendo contribuir para o desenvolvimento de doença péptica ulcerosa (ATHERTON *et al.*, 1995; ATHERTON *et al.*, 1997).

A sequência de nucleotídeos da região mediana do gene *vacA* costuma ser correlacionada com os níveis de citotoxina produzidos, assim o *vacA* m1 parece ser mais freqüente em pacientes com lesões do epitélio gástrico (ATHERTON *et al.*, 1997). Sabe-se que as proteínas codificadas por *vacA* m1 e *vacA* m2 podem reagir com diferentes receptores das células epiteliais gástricas humanas, resultando em uma resposta fisiológica particular (PAGLIACCIA *et al.*, 1998). Nossos dados sugerem que o genótipo m1 esteja associado ao desenvolvimento de úlceras duodenais, como já descrito anteriormente (ARENTS *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

A associação entre o genótipo *vacA* s1m1 e o desenvolvimento de úlcera péptica apresenta controvérsias na literatura (ATHERTON *et al.*, 1995; RUDI *et al.*, 1998; VAN DOORN *et al.*, 1998; YAMAOKA *et al.*, 1999; FALLONE *et al.*, 2000; RYAN *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2000; ARENTS *et al.*, 2001). Neste trabalho, pudemos detectar uma associação significativa entre os mosaicos *vacA* s1m1 e a presença de UD em concordância com outro trabalho realizado no Brasil e outros países (ATHERTON *et al.*, 1995; RUDI *et al.*, 1998; VAN DOORN *et al.*, 1998; YAMAOKA *et al.*, 1999; FALLONE *et al.*, 2000; ARENTS *et al.*, 2001; ASHOUR *et al.*, 2002). Estes dados são condizentes com alguns trabalhos realizados que propuseram que a citotoxina VacA s1m1 tem maior atividade vacuolizante *in vitro*,

DISCUSSÃO **doença**

Fatores de virulência X

causando assim maiores lesões no epitélio gástrico (COVER *et al.*, 1993; ATHERTON *et al.*, 1995).

O alelo *iceA*1 tem sido associado com úlcera péptica (PEEK *et al.*, 1998; VAN DOORN *et al.*, 1998), provavelmente devido a uma indução aumentada na resposta inflamatória da mucosa do hospedeiro (PEEK *et al.*, 2000). Por outro lado, vários estudos epidemiológicos falharam ao tentar associar esse alelo com úlcera péptica na Índia, Coreia, Colômbia, EUA, Japão, Singapura, África do Sul, Portugal e Brasil (YAMAOKA *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2000; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2000; KIDD *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2000; ASHOUR *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; KIDD *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001). No presente estudo também não foi possível associar os genótipos *iceA* como as doenças estudadas. Isto sugere que este gene não pode ser usado como um marcador para prever as doenças causadas em pacientes infectados pelo *H. pylori*. Além disso, diferentemente do que foi observado em estudos realizados na Holanda, Japão e Coreia (VAN DOORN *et al.*, 1998; YAMAOKA *et al.*, 1999; ASHOUR *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001), o alelo mais frequentemente visto em nossa população foi o *iceA*2.

Nossos resultados indicam que o gene *cagA* não deveria ser o único marcador utilizado para detectar a presença da *cag* PAI, pois em 25% dos casos os resultados obtidos por PCR indicaram que este gene estava ausente. No entanto, ao analisarmos a frequência do gene *cagE*, outro marcador para a ilha de patogenicidade, verificamos que em 5% das linhagens este não foi detectado. OWEN *et al.* (2001) sugeriram que quando esses dois marcadores estiverem ausentes, muito provavelmente a *cag* PAI também estaria. Neste trabalho, em 11% das linhagens a ilha de patogenicidade parece estar ausente.

A ligação entre os genes *cagA* e *cagE* com as doenças mostram diferenças entre as regiões geográficas (COVER *et al.*, 1990; TUMMURU *et al.*, 1993; PEEK

DISCUSSÃO **doença**

Fatores de virulência X

et al., 1995; PARSONNET *et al.*, 1997; VAN DOORN *et al.*, 1998; ARENTS *et al.*, 2001; MIEHLKE *et al.*, 2001). Não foi detectada relação significativa entre os genes *cagA* e *cagE* e os diferentes grupos clínicos. Isto sugere que este gene também não deve ser usado como marcador para predizer as doenças causadas nos pacientes pela infecção do *H. pylori*.

Postula-se que pacientes infectados por linhagens mais virulentas (*cagA*+, *vacAs1*) poderiam desenvolver uma "proteção" contra GERD (PEEK *et al.*, 1995; VICARI *et al.*, 1998; FALLONE *et al.*, 2000; LOFFELD *et al.*, 2000; ARENTS *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2002a). Hipóteses têm sido exploradas na tentativa de explicar este fenômeno. As lesões causadas no corpo gástrico resultam em uma diminuição de secreção ácida no estômago, podendo prevenir o desenvolvimento de GERD (VICARI *et al.*, 1998; SCHWIZER *et al.*, 2001). Linhagens *cagA*+ colonizam mais densamente a mucosa gástrica, assim a quantidade de amônia produzida é maior, comparando-se com pacientes infectados com cepas *cagA*-. Esta amônia servirá como um poderoso agente neutralizante, elevando assim o pH intragástrico, não permitindo o desenvolvimento de GERD (FELDMAN *et al.*, 1996; LABENZ & MALFERTHEINER, 1997; VICARI *et al.*, 1998; QUEIROZ *et*

al.,2002a). Em nosso trabalho, detectamos uma relação entre a presença de linhagens menos virulentas com esta doença ao compararmos o genótipo s2m2 do gene *vacA* da bactéria com o desenvolvimento de GERD, assim como observado por outros autores (FELDMAN *et al.*, 1996; LABENZ & MALFERTHEINER, 1997; VICARI *et al.*, 1998).

Nossos resultados reforçam a importância do gene *vacA* como um marcador de virulência do *H. pylori*. Por outro lado, os dados referentes aos genes *cagA*, *cagE* e *iceA* parecem não influenciar no desenvolvimento de doença gástrica.

DISCUSSÃO antimicrobianos

Susceptibilidade aos

2. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Foi analisada a resistência primária do *H. pylori* aos antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e tetraciclina, utilizados no tratamento da infecção. Esta análise é de grande importância devido aos altos índices de falência terapêutica obtidos nas diversas terapias utilizadas. A resistência tem variado em cada país e apresenta uma correlação com o contato prévio da população com o antimicrobiano utilizado para tratamento de outra infecção. A análise da resistência desta população deve facilitar a escolha da terapia mais adequada para a erradicação deste patógeno, sendo assim um estudo de fundamental importância na previsão do sucesso do tratamento terapêutico, através da análise do CIM.

Até recentemente, resistência à amoxicilina era considerada ausente ou muito rara (MÉGRAUD, 1998; VAN ZWET *et al.*, 1998). DORE e colaboradores (2000) descreveram uma taxa de resistência a amoxicilina de 31% em pacientes

H. pylori positivos no sul da Itália. No Brasil foram detectados índices de resistência equivalentes (29%) (MENDONÇA *et al.*, 2000), sendo que no presente estudo, foi observado uma taxa de 38% de resistência.

Em relação à claritromicina, foi detectado que 16% de nossas linhagens são resistentes a este antibiótico. Resultados similares foram obtidos em estudos anteriores realizados no Brasil assim como na Coreia, Bulgária e Nigéria (ANI *et al.*, 1999; BOYANOVA *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2002). Por outro lado, os resultados foram inferiores aos observados em pacientes peruanos (VASQUEZ *et al.*, 1996) e superiores aos observados em estudos realizados na Irlanda, Alemanha, Japão, Espanha, Portugal, Canada e Noruega (XIAI *et al.*, 1996; SIEHOFF *et al.*, 1997; GOTOH *et al.*, 1997; LOO *et al.*, 1997; BARTOLOMÉ *et al.*, 1998; ROSÁRIO *et al.*, 1998; DEBETS- OSSEMKOPP *et al.*,

DISCUSSÃO antimicrobianos

Susceptibilidade aos

1999). A resistência à claritromicina tem uma séria implicação clínica pois leva à perda completa de qualquer efeito anti- *H. pylori*, levando ao uso de outros esquemas terapêuticos (HUANG & HUNT , 1993; GRAHAM *et al.*, 1996; HOUBEN *et al.*, 1999; DORE *et al.*, 2000).

A furazolidona tem sido usada recentemente em substituição ao metronidazol devido à alta resistência ao mesmo (MAGALHÃES *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 1999). Em nosso estudo, observamos uma taxa de resistência a furazolidona de 13% . Um número superior ao detectado na Coreia, onde foram descritas 1,5% (10/652) de linhagens de *H. pylori* resistentes a este antimicrobiano (KIM *et al.*, 2001).

As taxas de resistência ao metronidazol variam de 10% a 80% nas diferentes regiões geográficas. No presente estudo encontramos uma taxa de resistência a este antimicrobiano de 55% estando de acordo com o encontrado em outro estudo realizado no Brasil (MAGALHÃES *et al.*, 2002). Este índice de

resistência pode ser explicado pelo seu uso no combate às infecções parasitárias e genitais, assim o aumento ou o abuso do consumo desta droga, barata, pode contribuir selecionar as linhagens do *Helicobacter pylori* resistentes ao metronidazol (KIM *et al.*, 2001).

A resistência primária à tetraciclina é considerada rara, chegando a 0% em vários trabalhos realizados em países desenvolvidos como Alemanha e Holanda (DEBETS-OSSENKOPP *et al.*, 1999; WOLLE *et al.*, 2002). Em outros estudos, a taxa de resistência não chega a 5%, como é o caso do Reino Unido, Bulgária, Líbano, Espanha, Arábia Saudita e países do leste Europeu (BOYANOVA *et al.*, 2002; CUCHI *et al.*, 2002; ELTAHAWY, 2002; PARSONS *et al.*, 2001; SHARARA *et al.*, 2002). Em nosso trabalho obtivemos uma taxa de 9% de resistência à tetraciclina, o que está de acordo com dados previamente obtidos em estudos realizados no Brasil e na Nigéria (ANI *et al.*, 1999; MENDONÇA *et al.*, 2000). A

DISCUSSÃO **resistência**

Doenças e genes de Virulência X

resistência primária a este antibiótico na Coreia e Japão apresentam taxas equivalentes às encontradas neste trabalho (KWON *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001).

Apesar de não haver informação sobre o uso de drogas antimicrobianas pela população brasileira, nossos resultados em relação à resistência do *H. pylori* a amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e tetraciclina podem ser parcialmente explicados pelo fato desses antimicrobianos serem largamente utilizados para infecções parasitárias do trato gastrointestinal em infecções do trato respiratório, levando então a um aumento na seleção das linhagens de *H. pylori* resistentes a estas drogas. Nossos resultados sustentam a necessidade da realização de culturas e de testes de suscetibilidade para definição de padrões de resistência do *H. pylori* antes do uso generalizado de antimicrobianos para o tratamento de erradicação.

3. ASSOCIAÇÃO DAS DOENÇAS E FATORES DE VIRULÊNCIA COM A RESISTÊNCIA

Alguns estudos têm sugerido que a taxa de erradicação do *H. pylori* é menor em pacientes com gastrite comparando-se a pacientes com úlcera péptica. Assim, tanto as manifestações clínicas quanto os fatores de virulência poderiam influenciar na falência terapêutica (VAN der HULST, 1997; VAN DOORN *et al.*, 2000; BROUTET *et al.*, 2001; RUDI *et al.*, 2002). Neste estudo foi comparada a resistência do *H. pylori* com os diferentes grupos de doenças, e também com os fatores de virulência pois, algumas linhagens dessa bactéria podem ser intrinsecamente mais propensas ao tratamento com antibióticos do que outras.

Ao verificar uma possível associação da resistência das linhagens com as doenças dos pacientes, não encontramos associação significativa. Assim, como descrito por QUEIROZ *et al.*, (2002b), BOYANOVA *et al.*, (2000) e LÕIVUKENE *et al.*, (2000), não detectamos diferenças na susceptibilidade aos antimicrobianos

DISCUSSÃO **resistência**

Doenças e genes de Virulência X

amoxicilina, claritromicina, furazolidona, metronidazol e tetraciclina nas linhagens de *H. pylori* isoladas de pacientes com úceras, esofagite ou apenas gastrite.

Em relação aos fatores de virulência (*vacA*, *iceA*, *cagA* e *cagE*) foi observada apenas uma associação entre o genótipo *cagA*- e a resistência da bactéria à tetraciclina. Este dado pode ter sido obtido devido ao fato de que o número de linhagens resistentes à tetraciclina foi muito baixo, assim as análises estatísticas podem ter sido prejudicadas ou enganosas em afirmar uma possível associação. A ligação entre o genótipo *cagA* e a resistência aos antimicrobianos metronidazol e claritromicina foi observada em apenas um estudo realizado com pacientes espanhóis (DAMASO *et al.*, 1999). Estes dados não foram observados em outros estudos realizados no Reino Unido, na Estônia e em nosso trabalho, ou seja, os diferentes marcadores de virulência como os subtipos *vacA* e *iceA* e a

presença dos genes *cagA* e *cagE* não foram correlacionados com a resistência das linhagens aos antimicrobianos (LOPEZ-BREA *et al.*, 1999; OWENR *et al.*, 1999; LOIVUKENE *et al.*, 2000; RUDI *et al.*, 2002).

Há indícios de que a taxa de erradicação do *H. pylori* possa ser influenciada por fatores de virulência, e ser menor em pacientes com gastrite comparando-se à pacientes com úlcera péptica (VAN der HULST, 1997; VAN DOORN, *et al.* 2000; BROUTET *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2002; RUDI *et al.*, 2002). Desse modo, a erradicação do *H. pylori* não dependeria apenas da susceptibilidade da bactéria aos antimicrobianos, mas também da penetração inefetiva dos antibióticos através da mucosa gástrica e inativação da droga pelo pH baixo do estômago (LABENZ, *et al.* 1994; VAN der HULST, 1996; ALARCON, *et al.* 1999; VAN DOORN, *et al.* 2000). Sendo assim, os fatores de virulência poderiam estar associados ao sucesso terapêutico, sem ter qualquer tipo de associação com a resistência aos antimicrobianos.

VI - CONCLUSÃO



CONCLUSÃO
de Godoy

Anita Paula Ortiz

- ✓ Alelos *vacA* s1m1 do *H. pylori* foram mais frequentemente observados em pacientes com úlceras duodenais o que parece conferir um risco aumentado para o desenvolvimento desta doença;
- ✓ Há uma maior tendência no desenvolvimento de refluxo gastroesofágico em pacientes infectados com *H. pylori vacA* s2m2, embasando a hipótese de que genótipos mais virulentos confeririam uma “proteção” no desenvolvimento dessa doença;
- ✓ Não se observou qualquer associação entre os genótipos *iceA*, *cagA* e *cagE* e o desenvolvimento de doenças;

- ✓ O número de pacientes colonizados por mais de uma cepa bacteriana encontrados em nossa população assemelha-se com várias regiões do mundo;
- ✓ Verificou-se um alto índice de resistência *in vitro* aos antibióticos metronidazol e amoxicilina, o que confirma a necessidade de se estudar a susceptibilidade *do H. pylori* aos antimicrobianos para se evitar um alto índice de falência terapêutica;
- ✓ Não houve associação entre as diferentes doenças dos pacientes e a resistência da bactéria aos antimicrobianos;
- ✓ Nenhuma relação entre os fatores de patogenicidade e a resistência bacteriana aos medicamentos usados na terapia de erradicação foi detectada.

VII - SUMMARY



SUMMARY
Godoy

Anita Paula Ortiz de

More than 50% of the world's population is supposedly infected by *Helicobacter pylori*, the most common chronic bacterial infection in humans. There is still no ideal therapy for curing *H. pylori* infection and, when treatment fails, the underlying reasons frequently remain unclear, although antibiotic resistance is generally considered to be the primary factor. In this study, we evaluated the prevalence of primary resistance of *H. pylori* isolates in Brazil to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone. Furthermore, this study aimed to determine *vacA*, *iceA*, *cagA* and *cagE* genotypes of strains isolated from Brazilian patients and to correlated then with clinical data; to evaluate the possible

association between these four virulence markers and antibiotic resistance. *H. pylori* was cultured in 155 *H. pylori*-positive patients. The MICs for metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone were determined by agar dilution method. Genomic DNA was extracted, and allelic variants of *vacA*, *iceA*, *cagA* and *cagE* were identified by the polymerase chain reaction. More than one *H. pylori* strain was detected in 17 (11%) patients, and these were excluded from subsequent statistical analysis. There was a strong association between the genotype *vacA* s1m1 and peptic ulcer disease. The presence of the less virulent strain *vacA* s2 was related to gastroesophageal reflux disease, supporting the hypothesis that virulent strains may protect against the development of gastroesophageal reflux disease. Resistance to metronidazole was detected in 75 patients (55%), to amoxicillin in 54 individuals (38%), to clarithromycin in 23 patients (16%), to tetracycline in 13 patients (9%), and to furazolidone in 19 individuals (13%). No significant correlation between pathogenicity and resistance or susceptibility was detected when the MIC values for metronidazole, amoxicillin, clarithromycin, tetracycline, and furazolidone were compared with different *vacA*, *iceA*, *cagA* and *cagE* genotypes. It seems that these different virulence markers and the resistance to these antibiotics are not interrelated.

VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

American Digestive Health Foundation. The report of the Digestive Health Initiative International Update Conference on *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol.**; 113:S4-S8, 1997

AKOPYANTS NS, CLIFTON SW, KERSULYTE D, CRABTREE JE, YOUREE BE, REECE CA, BUKANOV NO, DRAZEK ES, ROE BA, BERG DE. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol.**, 28(1):37-53,1998

ALARCON T, DOMINGO D, LOPEZ-BREA M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. **Int J Antimicrob Agents.**,12(1):19-26,1999

ALEMOHAMMAD MM, FOLEY TJ, COHEN H. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. **J Clin Microbiol.**, 31(8):2174-7,1993

ALM RA, TRUST TJ. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. **J Mol Med.**, 77(12):834-46, 1999

ALM RA, LING LS, MOIR DT, KING BL, BROWN ED, DOIG PC, SMITH DR, NOONAN B, GUILD BC, DEJONGE BL, CARMEL G, TUMMINO PJ, CARUSO A, URIA-NICKELSEN M, MILLS DM, IVES C, GIBSON R, MERBERG D, MILLS SD, JIANG Q, TAYLOR DE, VOVIS GF, TRUST TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, 14;397(6715):176-80, 1999.

ANDRESON H, LOIVUKENE K, SILLAKIVI T, MAAROOS HI, USTAV M, PEETSALU A, MIKELSAAR M. Association of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. **J Clin Microbiol.**, 40(1):298-300, 2002.

Referências Bibliográficas ***Godoy***

Anita Paula Ortiz de

ANI AE, MALU AO, ONAH JA, QUEIROZ DM, KIRSCHNER G, ROCHA GA. Antimicrobial susceptibility test of *Helicobacter pylori* isolated from Jos, Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 93(6):659-61, 1999

ARENTS, N.L., VAN ZWET, A.A., THIJS, J.C., KOOISTRA-SMID, A.M., VAN SLOCHTEREN, K.R., DEGENER, J.E., KLEIBEUKER, J.H. AND VAN DOORN,

L.J. The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. **Am. J. Gastroenterol.**, 96: 2603-2608, 2001.

ASHOUR, A.A., COLLARES, G.B., MENDES, E.N., DE GUSMAO, V.R., QUEIROZ, D.M., MAGALHAES, P.P., DE CARVALHO, A.S., DE OLIVEIRA, C.A., NOGUEIRA, A.M., ROCHA, G.A. and ROCHA, A.M. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 1746-1750, 2001.

ASHOUR AA, MAGALHAES PP, MENDES EN, COLLARES GB, DE GUSMAO VR, QUEIROZ DM, NOGUEIRA AM, ROCHA GA, DE OLIVEIRA CA. Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, 33(3):173-8, 2002.

ATHERTON JC, CAO P, COVER TL, *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* : Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J. Biol. Chem.**, 270: 17771-7, 1995.

ATHERTON, J.C., PEEK, R.M., THAM, K.T., COVER, T.L. and BLASER, M.J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 112: 92-99, 1997.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

ATHERTON JC, SHARP PM, COVER TL, GONZALEZ-VALENCIA G, PEEK RM JR, THOMPSON SA, HAWKEY CJ, BLASER MJ. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. **Curr Microbiol.**, 39(4):211-8, 1999.

AYRES, M; AYRES, MJ; AYRES, DL; SANTOS, AS. **Bioestat:** Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá., 193p, 1998.

BEACHEY EH. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacterial to mucosal surface. **Infect. Dis.**,143: 325-45, 1981

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

BLASER MJ, BERG DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J Clin Invest.**,107(7):767-73, 2001

BOYANOVA L, SPASSOVA Z, KRASDEV Z, PETROV S, STANCHEVA I, DOCHEVA J, MITOV I, KOUMANOVA R. Characteristics and trends in macrolide resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated in Bulgaria over four years. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, 34(4):309-13, 1999

BROUTET N, MARAIS A, LAMOULIATTE H, DE MASCAREL A, SAMOYEAU R, SALAMON R, MEGRAUD F. *cagA* Status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. **J Clin Microbiol.**, 39(4):1319-22, 2001

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

BUCKLEY M, CULHANE A, DRUMM B, KEANE C, MORAN AP, O'CONNOR HJ, COLLINS J, KELLEHER D, MCAVINCHIEY D, SLOAN J, O'MORAIN C. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori*-related upper gastrointestinal diseases. Irish *Helicobacter Pylori* Study Group. : **Ir J Med Sci.**, 165 Suppl 5:1-11,1996

CARVALHAES A, MAGALHÃES AFN, CORDEIRO F *et al.* Terapêutica e epidemiologia da infecção por "*H. pylori*": recomendações do primeiro seminário promovido pelo "Núcleo Brasileiro para o Estudo do "*Helicobacter pylori*". **GED.**, 16: 99-100, 1997.

CARVALHO, A.S., QUEIROZ, D.M., MENDES, E.N., ROCHA, G.A. AND PENNA, F.J. Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of symptomatic children. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 24: 163-166, 1991.

CELLINI L, ALLOCATI N, ANGELUCCI D, IEZZI T, DI CAMPLI E, MARZIO L, DAINELLI B. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice. **Microbiol Immunol.**, 38(11):843-50, 1994.

CRABTREE JE, FARMERY SM, LINDLEY IJ, FIGURA N, PEICHL P, TOMPKINS DS. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. **J Clin Pathol.**, 47(10):945-50, 1994

CELLINI L, ALLOCATI N, PIATTELLI A, PETRELLI I, FANCI P, DAINELLI B. Microbiological evidence of *Helicobacter pylori* from dental plaque in dyspeptic patients. **New Microbiol.**, 18(2):187-92, 1995.

CENSINI, S., LANGE, C., XIANG, Z., CRABTREE, J.E., GHIARA, P., BORODOVSKY, M., RAPPUOLI, R. and COVACCI, A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 93: 14648-14653, 1996.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

CHAN WY, HUI PK, LEUNG KM, CHOW J, KWOK F, NG CS. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. **Am J Clin Pathol.**, 102(4):503-7, 1994.

CHONG SK, LOU Q, FITZGERALD JF, LEE CH. Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *Helicobacter pylori*. **J Clin Microbiol.**, 34(11):2728-30, 1996.

COHEN LF, SAYEEDUDDIN M, PHILLIPS C, SHAHAB I. A new staining method for identification of *Helicobacter pylori* and simultaneous visualization of gastric morphologic features. **Mod Pathol.**, 10(11):1160-3, 1997.

COLE SP, CIRILLO D, KAGNOFF MF, GUINEY DG, ECKMANN L. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. **Infect Immun.**, 65(2):843-6, 1997.

COVER, T.L., DOOLEY, C.P. AND BLASER, M.J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infect. Immun.**, 58: 603-610, 1990.

COVER TL, BLASER MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem.**, 25;267(15):10570-5, 1992.

COVER TL, CAO P, LIND CD, THAM KT, BLASER MJ. Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. **Infect Immun.**, 61(12):5008-12, 1993.

COVER TL, TUMMURU MK, CAO P, THOMPSON SA, BLASER MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. **J Biol Chem.**, 8;269(14):10566-73, 1994.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

COVER TL & BLASER MJ. *Helicobacter pylori* : A bacterial of gastrite, peptic ulcer disease, and gastric cancer. **Am. Soc. Microbiol. News.**, 61: 21-26, 1995.

TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol.**, 20(2): 241-6, 1996.

COVER TL, HANSON PI, HEUSER JE. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. **J Cell Biol.**, 25;138(4):759-69, 1997.

CRABTREE JE, COVACCI A, FARMERY SM, XIANG Z, TOMPKINS DS, PERRY S, LINDLEY IJ, RAPPUOLI R. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. **J Clin Pathol.**, 48(1):41-5, 1995.

DEBETS-OSSENKOPP YJ, HERSCHEID AJ, POT RG, KUIPERS EJ, KUSTERS JG, VANDENBROUCKE-GRAULS CM. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxycillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. **J Antimicrob Chemother.**, 43(4): 511-5, 1999.

DE BERNARD M, ARICO B, PAPINI E, RIZZUTO R, GRANDI G, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C. *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. **Mol Microbiol.**, 26(4): 665-74, 1997.

DELTENRE M, DE KOSTER E How come I've got it? (A review of *Helicobacter pylori* transmission). **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, 12(5): 479-82, 2000.

DESAI HG, GILL HH, SHANKARAN K, MEHTA PR, PRABHU SR. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? **Scand J Gastroenterol.**, 26(11): 1205-8, 1991.

DOIG P, DE JONGE BL, ALM RA, BROWN ED, URIA-NICKELSEN M, NOONAN B, MILLS SD, TUMMINO P, CARMEL G, GUILD BC, MOIR DT, VOVIS GF, TRUST TJ. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. **Microbiol Mol Biol Ver.**,63(3): 675-707, 1999.

DORE MP, PIANA A, CARTA M, ATZEI A, ARE BM, MURA I, MASSARELLI G, MAIDA A, SEPULVEDA AR, GRAHAM DY, REALDI G. Amoxycillin resistance is one reason for failure of amoxycillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther.**, 12(7): 635-9, 1998.

DORE MP, LEANDRO G, REALDI G, SEPULVEDA AR, GRAHAM DY. Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. **Dig Dis Sci.**, 45(1): 68-76, 2000.

EATON KA, MORGAN DR, KRAKOWA S. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. **Infec Immun.**,57: 1119-1125, 1989.

EATON KA, KRAKOWKA S. Avirulent urease-deficient *Helicobacter pylori* colonises gastric epithelial explants ex vivo. **Scand J Gastroenterol.**, 30: 434-437, 1995.

ECCLISSATO C, MARCHIORETTO MA, MENDONCA S, GODOY AP, GUERSONI RA, DEGUER M, PIOVESAN H, FERRAZ JG, PEDRAZZOLI J. Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. **Helicobacter.**, 7(1): 53-9, 2002.

ELIZALDE JI, GOMEZ J, GINES A, LLACH J, PIQUE JM, BORDAS JM, MARCO F, TERES J. Biopsy forceps disinfection technique does not influence *Helicobacter pylori* culture. **Am J Gastroenterol.**, 93(9): 1450-2, 1998.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

ELTAHAWY AT. Prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance to several antimicrobials in a Saudi Teaching Hospital. **Med Princ Pract.**, 11(2): 65-8 2002.

ESLICK GD. Sexual transmission of *Helicobacter pylori* via oral-anal intercourse. **Int J STD AIDS.**, 13(1): 7-11, 2002.

FALLONE CA, BARKUN, AN, GOTTKE MU, BEST LM *et al.*, Association of *Helicobacter pylori* genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal disease. **Am. J. Gastroenterol.**, 95: 659-669, 2000.

FELDMAN, M., CRYER, B., MCARTHUR, K.E., HUET, B.A. and LEE, E. Effects of aging and gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. **Gastroenterology**, 110: 1043-1052, 1996.

FIGUEIREDO C, QUINT WG, SANNA R, SABLON E, DONAHUE JP, XU Q, MILLER GG, PEEK RM JR, BLASER MJ, VAN DOORN LJ Genetic organization and heterogeneity of the *iceA* locus of *Helicobacter pylori*. **Gene**, 4; 246(1-2): 59-68, 2000.

FIGUEIREDO, C., VAN DOORN, L.J., NOGUEIRA, C., SOARES, J.M., PINHO, C., FIGUEIRA, P., QUINT, W.G. and CARNEIRO, F. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. **Scand. J. Gastroenterol.**, 36: 128-135, 2001.

FORSYTH MH, ATHERTON JC, BLASER MJ, COVER TL Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. **Infect Immun.**, 66(7): 3088-94, 1998.

GERHARD M, LEHN N, NEUMAYER N, BOREN T, RAD R, SCHEPP W, MIEHLKE S, CLASSEN M, PRINZ C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 26; 96(22): 12778-83, 1999.

GO MF, KAPUR V, GRAHAM DY, MUSSER JM. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. **J Bacteriol.**, 178(13): 3934-8, 1996.

GOTOH A, KAWAKAMI Y, AKAMATSU T, KATSUYAMA T. Interaction of drugs for eradication therapy against antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori*. **Microbiol Immunol.**, 41(11): 865-9, 1997.

GRAHAM DY, DE BOER WA, TYTGAT GN. Choosing the best anti-*Helicobacter pylori* therapy: effect of antimicrobial resistance. **Am J Gastroenterol.**, 91(6): 1072-6, 1996.

GRAHAM DY, GENTA R, EVANS DG, REDDY R, CLARRIDGE JE, OLSON CA, EDMONDS AL, SIEPMAN N. *Helicobacter pylori* does not migrate from the antrum to the corpus in response to omeprazole. **Am J Gastroenterol.**, 91(10): 2120-4, 1996.

GRAHAM DY. Therapy of *Helicobacter pylori*: current status and issues. **Gastroenterology**, 118: S2-S8, 2000.

GUNN MC, STEPHENS JC, STEWART JA, RATHBONE BJ, WEST KP. The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. **J Clin Pathol.**, 51(10): 761-4, 1998.

GUSMAO VR, NOGUEIRA MENDES E, DE MAGALHAES QUEIROZ DM, AGUIAR ROCHA G, CAMARGOS ROCHA AM, RAMADAN ASHOUR AA, TELES CARVALHO AS. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. **J Clin Microbiol.**, 38(8): 2853-7, 2000.

HANCOCK RE, ALM R, BINA J, TRUST T. *Helicobacter pylori*: a surprisingly conserved bacterium. **Nat Biotechnol.**, 16(3): 216-7, 1998.

HEATLEY, RV. **The *Helicobacter pylori* handbook**. 1. Ed. Osney Mead: Balckwell Science, 1995.

HOPKINS RJ, VIAL PA, FERRECCIO C, OVALLE J, PRADO P, SOTOMAYOR V, RUSSELL RG, WASSERMAN SS, MORRIS JG JR. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. **J Infect Dis.**, 168(1): 222-6, 1993.

HOUBEN MH, VAN DER BEEK D, HENSEN EF, CRAEN AJ, RAUWS EA, TYTGAT GN. A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy--the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. **Aliment Pharmacol Ther.**, 13(8): 1047-55, 1999.

International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Infection with *Helicobacter pylori*. In: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. LYON: IARC., 177-202, 1994.

ITO Y, AZUMA T, ITO S, SUTO H, MIYAJI H, YAMAZAKI Y, KOHLI Y, KURIYAMA M. Full-length sequence analysis of the *vacA* gene from cytotoxic and noncytotoxic *Helicobacter pylori*. **J Infect Dis.**, 178(5): 1391-8, 1998.

ITO, Y., AZUMA, T., ITO, S., SUTO, H., MIYAJI, H., YAMAZAKI, Y., KATO, T., KOHLI, Y., KEIDA, Y. AND KURIYAMA, M. Sequence analysis and clinical significance of the iceA gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 483-488, 2000.

KANSAU I, RAYMOND J, BINGEN E, COURCOUX P, KALACH N, BERGERET M, BRAIMI N, DUPONT C, LABIGNE A. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. **Res Microbiol.**, 147(8): 661-9, 1996.

KELLY SM, PITCHER MC, FARMERY SM, GIBSON GR. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterology**, 107(6): 1671-4, 1994.

KIDD, M., PEEK, R.M., LASTOVICA, A.J., ISRAEL, D.A., KUMMER, A.F. AND LOUW, J.A. Analysis of iceA genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. **Gut.**, 49: 629-635, 2000.

KIDD M, PEEK RM, LASTOVICA AJ, ISRAEL DA, KUMMER AF, LOUW JA. Analysis of iceA genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. **Gut.**, 49(5): 629-35, 2001

KIM, S.Y., WOO, C.W., LEE, Y.M., SON, B.R., KIM, J.W., CHAE, H.B., YOUN, S.J. AND PARK, S.M. Genotyping CagA, VacA subtype, IceA1, and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. **J. Korean Med. Sci.**, 16: 579-584, 2001.

KLEIN PD, GRAHAM DY, GAILLOUR A, OPEKUN AR, SMITH EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. **Lancet**, 22; 337(8756): 1503-6, 1991.

KOSTRZYNSKA M, BETTS JD, AUSTIN JW, TRUST TJ. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. **J Bacteriol.**, 173(3): 937-46, 1991.

LABENZ J, LEVERKUS F, BORSCH G. Omeprazole plus amoxicillin for cure of *Helicobacter pylori* infection. Factors influencing the treatment success. **Scand J Gastroenterol.**, 29(12): 1070-5, 1994.

LABENZ, J. AND MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* in gastro-oesophageal reflux disease: causal agent, independent or protective factor? **Gut.**, 41: 277-280, 1997.

LAHEIJ RJ, ROSSUM LG, JANSEN JB, STRAATMAN H, VERBEEK AL. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection--a meta-analysis. : **Aliment Pharmacol Ther.**, 13(7):857-64, 1999.

LAINE L, LEWIN DN, NARITOKU W, COHEN H. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Gastrointest Endosc.**, 45(6): 463-7, 1997.

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

LEYING H, SUERBAUM S, GEIS G, HAAS R. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. **Mol Microbiol.**, 6(19): 2863-74, 1992.

LIU WZ, XIAO SD, SHI Y, WU SM, ZHANG DZ, XU WW, TYTGAT GN. Furazolidone-containing short-term triple therapies are effective in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther.**, 13(3): 317-22, 1999.

LOFFELD, R.J., WERDMULLER, B.F., KUSTERS, J.G., PEREZ-PEREZ, G.I., BLASER, M.J. AND KUIPERS, E.J. Colonization with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains inversely associated with reflux esophagitis and Barrett's esophagus. **Digestion**, 62: 95-99, 2000.

LOIVUKENE K, KOLK H, MAAROOS HI, KASENOMM P, USTAV M, MIKELSAAR M. Metronidazole and clarithromycin susceptibility and the subtypes of *vacA* of *Helicobacter pylori* isolates in Estonia. **Scand J Infect Dis.**, 32(1): 59-62 2000.

LOO VG, FALLONE CA, DE SOUZA E, LAVALLEE J, BARKUN AN. In-vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to ampicillin, clarithromycin, metronidazole and omeprazole. **J Antimicrob Chemother.**, 40(6): 881-3, 1997.

LOPEZ-BREA M, MARTINEZ MJ, DOMINGO D, SANCHEZ I, ALARCON T. Metronidazole resistance and virulence factors in *Helicobacter pylori* as markers for treatment failure in a paediatric population. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, 24(2): 183-8, 1999.

LUPPETI P, HEUSER JE, MANETTI R, MASSARI P, LANZAVECCHIA S, BELLON PI, DALLAI R, RAPPUOLI R, TELDFORD J. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolizing cytotoxin. **J Cell Biol.**, 133: 801-807, 1996.

LUZZA F, MALETTA M, IMENEO M, MARCHEGGIANO A, IANNONI C, BIANCONE L, PALLONE F. Salivary-specific immunoglobulin G in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. **Am J Gastroenterol.**, 90(10): 1820-3, 1995.

MAEDA S, OGURA K, YOSHIDA H, KANAI F, IKENOUE T, KATO N, SHIRATORI Y, OMATA M. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. **Gut.**, 42(3): 338-43, 1998.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

MAGALHAES AF, MACEDO C, HAUCK JR, CARVALHAES A, DE NUCCI G, MAGNA LA, 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.

MAGALHAES P P, QUEIROZ DMM, BARBOSA DVC, ROCHA GA, MENDES EN, SANTOS A, CORREA PRV, ROCHA AMC, TEIXEIRA LM, OLIVEIRA CA. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, 46(6): 2021-3, 2002.

MAPSTONE NP, LYNCH DA, LEWIS FA, AXON AT, TOMPKINS DS, DIXON MF, QUIRKE P. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. **Lancet**, 13; 341(8842): 447, 1993.

MARAIS A, MONTEIRO L, MEGRAUD F. Microbiology of *Helicobacter pylori*. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 241: 103-22, 1999.

MARSHALL BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic GASTRITIS. **Lancet**, i:1273-5, 1983.

MARSHALL BJ. *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterol.**, 89: 116-128, 1994.

MARSHALL BJ, WARREN JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, i: 1311-4, 1984.

MARSHALL BJ, DUNDON WG, BEESLEY SM, SMYTH CJ. *Helicobacter pylori*: a conundrum of genetic diversity. **Microbiology**, 144: 2925-39, 1998.

MARTINEZ A, GONZALEZ C, KAWAGUCHI F, MONTOYA R, CORVALAN A, MADARIAGA J, ROA J, GARCIA A, SALGADO F, SOLAR H, PALMA M. *Helicobacter pylori*: cagA analysis and vacA genotyping in Chile. Detection of a s2/m1 strain. **Rev Med Chil.** 129(10): 1147-53, 2001.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

MCCLAIN MS, SCHRAW W, RICCI V, BOQUET P, COVER TL. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. **Mol Microbiol.**, 37(2): 433-42, 2000.

MCGOWAN CC, COVER TL, BLASER MJ. The proton pump inhibitor omeprazole inhibits acid survival of *Helicobacter pylori* by a urease-independent mechanism. **Gastroenterology**, 107(5): 1573-8, 1994.

MCGOWAN CC, COVER T, BLASER MJ. *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic implications. **Gastroenterology**, 110: 926-38, 1996.

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

MÉGRAUD F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 115(5): 1278-82, 1998.

MENDONÇA S, ECCLISSATO C, SARTORI MS, GODOY APO, GUERZONI RA, DEGGER M, PEDRAZZOLI JJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, 5: 79-83, 2000.

MIEHLKE, S., YU, J., SCHUPPLER, M., FRINGS, C., KIRSCH, C., NEGRASZUS, N., MORGNER, A., STOLTE, M., EHNINGER, G. AND BAYERDORFFER, E. *Helicobacter pylori* vacA, iceA, and cagA status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. **Am. J. Gastroenterol.**, 96: 1008-1013, 2001.

MITCHELL HM, LI YY, HU PJ, LIU Q, CHEN M, DU GG, WANG ZJ, LEE A, HAZELL SL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J Infect Dis.**, 166(1): 149-53, 1992 (a)

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

MITCHELL JD, MITCHELL HM, TOBIAS V. Acute *Helicobacter pylori* infection in an infant, associated with gastric ulceration and serological evidence of intra-familial transmission. **Am J Gastroenterol.**, 87(3): 382-6, 1992 (b)

MITCHELL HM. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 241:11-30, 1999.

MOBLEY HL. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. **Gastroenterology**, 113(6 Suppl): S21-8, 1997.

MOLINARI M, GALLI C, DE BERNARD M, NORAIS N, RUYSSCHAERT JM, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C. The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. **Biochem Biophys Res Commun.**, 20; 248(2): 334-40, 1998.

MONTECUCCO C, PAPINI E, DE BERNARD M, ZORATTI M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. **FEBS Lett.**, 4; 452(1-2): 16-21, 1999.

MORALES-ESPINOSA, R., CASTILLO-ROJAS, G., GONZALEZ-VALENCIA, G., PONCE DE LEON, S., CRAVIOTO, A., ATHERTON, J.C. AND LOPEZ-VIDAL, Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 3001-3004, 1999.

MUKHOPADHYAY, A.K., KERSULYTE, D., JEONG, J.Y., DATTA, S., ITO, Y., CHOWDHURY, A., CHOWDHURY, S., SANTRA, A., BHATTACHARYA, S.K.,

AZUMA, T., NAIR, G.B. AND BERG, D.E. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. **J. Bacteriol.**, 182: 3219-3227, 2000.

NAMAVAR F, ROOSENDAAL R, KUIPERS EJ, DE GROOT P, VAN DER BIJL MW, PENA AS, DE GRAAFF J. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 14(3): 234-7, 1995.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

NGUYEN VQ, CAPRIOLI RM, COVER TL. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **Infect Immun.**, 69(1): 543-6, 2001.

NILIUS M, STROHLE A, BODE G, MALFERTHEINER P. Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. **Zentralbl Bakteri.**, 280(1-2): 259-72, 1993.

NISHIYA D, SHIMOYAMA T, FUKUDA S, YOSHIMURA T, TANAKA M, MUNAKATA A. Evaluation of the clinical relevance of the iceA1 gene in patients with *Helicobacter pylori* infection in Japan. **Scand J Gastroenterol.**, 35(1): 36-9, 2000.

OGURA K, TAKAHASHI M, MAEDA S, IKENOUE T, KANAI F, YOSHIDA H, SHIRATORI Y, MORI K, MAFUNE KI, OMATA M. Interleukin-8 production in primary cultures of human gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori*. **Dig Dis Sci.**, 43(12): 2738-43, 1998.

OLIVEIRA AM, ROCHA GA, QUEIROZ DM, DE MOURA SB, RABELLO AL. Seroconversion for *Helicobacter pylori* in adults from Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 93(3):261-3, 1999.

OLIVEIRA AM, QUEIROZ DM, ROCHA GA, MENDES EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **Am J Gastroenterol.**, 89(12):2201-4, 1994.

PAGLIACCIA, C., DE BERNARD, M., LUPETTI, P., JI, X., BURRONI, D., COVER, T.L., PAPINI, E., RAPPUOLI, R., TELFORD, J.L. AND REYRAT, J.M. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 95: 10212-10217, 1998.

PAJARES JM. *H. pylori* infection: its role in chronic gastritis, carcinoma and peptic ulcer. **Hepato-Gastroenterology**, 42: 827-41, 1995.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

PAN ZJ, BERG DE, VAN DER HULST RW, SU WW, RAUDONIKIENE A, XIAO SD, DANKERT J, TYTGAT GN, VAN DER ENDE A. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct vacA alleles in *Helicobacter pylori* from China. **J Infect Dis.**, 178(1): 220-6, 1998.

PAPINI E, ZORATTI M, COVER TL. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. **Toxicon.**, 39(11): 1757-67, 2001.

PARSONS HK, CARTER MJ, SANDERS DS, WINSTANLEY T, LOBO AJ. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance in the United Kingdom: the effect of age, sex and socio-economic status. **Aliment Pharmacol Ther.**, 15(9): 1473-8, 2001.

PARSONNET, J., FRIEDMAN, G.D., ORENTREICH, N. AND VOGELMAN, H. Risk for gastric cancer in people with *cagA* positive or *cagA* negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut.**, 40: 297-301, 1997.

PEEK, R.M., MILLER, G.G., THAM, K.T., PEREZ-PEREZ, G.I., ZHAO, X., ATHERTON, J.C. AND BLASER, M.J. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. **Lab. Invest.**, 73: 760-770, 1995.

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

PEEK, R.M., VAN DOORN, L.J., DONAHUE, J.P., THAM, K.T., FIGUEIREDO, C., BLASER, M.J. AND MILLER, G.G. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression *in vivo* and relationship to gastric pathology. **Infect. Immun.** 68, 5488-5495, 2000.

Referências Bibliográficas

Anita Paula Ortiz de Godoy

PETERSON WL, GRAHAM DY. *Helicobacter pylori*. In: **Gastrointestinal and liver disease**, p. 604-619, 6th ed., 1998, WB Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA.

PHADNIS SH, ILVER D, JANZON L, NORMARK S, WESTBLOM TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. **Infect Immun.**, 62(5): 1557-65, 1994.

QUEIROZ DMM, MENDES EN, ROCHA GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.**, 25: 2378-9, 1987.

QUEIROZ DM, ROCHA GA, OLIVEIRA CA, ROCHA AM, SANTOS A, CABRAL MM, NOGUEIRA AM. Role of corpus gastritis and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* infection in reflux esophagitis. **J Clin Microbiol.**, 40(8): 2849-53, 2002 (a).

QUEIROZ DM, DANI R, SILVA LD, SANTOS A, MOREIRA LS, ROCHA GA, CORREA PR, REIS LF, NOGUEIRA AM, ALVARES CABRAL MM, ESTEVES AM, TANURE J. Factors associated with treatment failure of *Helicobacter pylori* infection in a developing country. **J Clin Gastroenterol.**, 35(4): 315-20, 2002 (b).

RAJU GS, SMITH MJ, MORTON D, BARDHAN KD. Mini-dose (1-microCi) ¹⁴C-urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterol** 89(7): 1027-31, 1994.

REN Z, PANG G, MUSICKA M, DUNKLEY M, BATEY R, BEAGLEY K, CLANCY R. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* can be viable. **Microbios.**, 97(388): 153-63, 1999.

ROSARIO M, CAETANO JM, PESSANHA MA, MAROTE G, DA SILVA JA, CAETANO JA. Profile of the resistance to macrolides and imidazoles of *Helicobacter pylori* in a sample of the Portuguese population. **Acta Med Port.**, 11(12):1069-72, 1998.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

RUDI, J., KOLB, C., MAIWALD, M., KUCK, D., SIEG, A., GALLE, P.R. AND STREMMEL, W. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 944-948, 1998.

RUDI J, REUTHER S, SIEG A, HOERNER M, STREMMEL W. Relevance of Underlying Disease and Bacterial *vacA* and *cagA* Status on the Efficacy of *Helicobacter pylori* Eradication. **Digestion.**, 65(1):11-5, 2002.

RYAN, K.A., MORAN, A.P., HYNES, S.O., SMITH, T., HYDE, D., O'MORAIN, C.A. AND MAHER, M. Genotyping of *cagA* and *vacA*, Lewis antigen status, and analysis of the poly-(C) tract in the alpha(1,3)-fucosyltransferase gene of Irish *Helicobacter pylori* isolates. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 28: 113-120, 2000.

SAIKI RK, WALSH PS, LEVENSON CH, ERLICH HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 86(16): 6230-4, 1989.

SALAMA N, GUILLEMIN K, MCDANIEL TK, SHERLOCK G, TOMPKINS L, FALKOW S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 19; 97(26): 14668-73, 2000.

SCHMITT W, HAAS R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. **Mol Microbiol.**, 12(2): 307-19, 1994.

SCHWIZER, W., THUMSHIRN, M., DENT, J., GULDENSCHUH, I., MENNE, D., CATHOMAS, G. AND FRIED, M. *Helicobacter pylori* and symptomatic relapse of gastro-oesophageal reflux disease: a randomised controlled trial. **Lancet.**, 357: 1738-1742, 2001.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

SHARARA AI, CHEDID M, ARAJ GF, BARADA KA, MOURAD FH. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxycillin and tetracycline in Lebanon. **Int J Antimicrob Agents.**, 19(2): 155-8, 2002.

SHARMA SA, TUMMURU MK, MILLER GG, BLASER MJ. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. **Infect Immun.**, 63(5): 1681-87, 1995.

SORBERG M, NILSSON M, HANBERGER H, NILSSON LE. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 15(3): 216-9, 1996.

SOUTO FJ, FONTES CJ, ROCHA GA, DE OLIVEIRA AM, MENDES EN, QUEIROZ DM. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, 93(2):171-4, 1998.

SPILLER RC. Is there any difference in *Helicobacter pylori* eradication rates in patients with active peptic ulcer, inactive peptic ulcer and functional dyspepsia? **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, 11 Suppl 2:S25-8; discussion S43-5, 1999.

SUERBAUM S, JOSENHANS C, LABIGNE A . Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. **J Bacteriol.**, 175(11): 3278-88, 1993.

TAYLOR DN, BLASER MJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol. Ver.**, 13: 42-59, 1991.

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

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

THOMAS JE, GIBSON GR, DARBOE MK, DALE A, WEAVER LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **Lancet**, 14; 340(8829): 1194-5, 1992.

THOMAS JE, PRETOLANI S. Epidemiology of infection in The year in *Helicobacter pylori* 1994. **The European Helicobacter pylori Study Group.**, 6-11, 1994.

TOMB JF, WHITE O, KERLAVAGE A, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, 388: 539-47, 1997.

TOMINAGA K, WATANABE T, FUJIWARA Y, HIGUCHI K, ARAKAWA T. Morphological investigation of *H. pylori* and its culture method. **Nippon Rinsho.**, 59(2): 296-300, 2001.

TUMMURU, M.K., COVER, T.L. AND BLASER, M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. **Infect. Immun.**, 61: 1799-1809, 1993.

VAN DER ENDE A, RAUWS EA, FELLER M, MULDER CJ, TYTGAT GN, DANKERT J. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. **Gastroenterology**, 111(3): 638-47, 1996.

VAN DER ENDE A, VAN DER HULST RWM, DANKERT J, TYTGAT GNJ. Reinfection versus recrudescence in *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther.**, 11 (suppl 1): 55-61, 1997.

VAN DER HULST RW, KELLER JJ, RAUWS EA, TYTGAT GN. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: a review of the world literature. **Helicobacter**, 1(1):6-19, 1996.

VAN DER HULST RW, VAN DER ENDE A, DEKKER FW, TEN KATE FJ, WEEL JF, KELLER JJ, KRUIZINGA SP, DANKERT J, TYTGAT GN. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastritis in relation to cagA: a prospective 1-year follow-up study. **Gastroenterology**, 113(1): 25-30, 1997.

Referências Bibliográficas

Anita Paula Ortiz de

Godoy

VAN DER HULST RW, VAN DER ENDE A, HOMAN A, ROORDA P, DANKERT J, TYTGAT GN. Influence of metronidazole resistance on efficacy of quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. **Gut.**, 42(2): 166-9, 1998.

VAN DOORN LJ, QUINT W, SCHNEEBERGER P, TYTGAT GM, DE BOER WA. The only good *Helicobacter pylori* is a dead *Helicobacter pylori*. **Lancet**, 5; 350(9070):71- 5, 1997.

VAN DOORN LJ, FIGUEIREDO C, SANNA R, PLAISIER A, SCHNEEBERGER PM, BOER W, QUINT W. Clinical Relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 115: 58-66, 1998.

VAN DOORN LJ, FIGUEIREDO C, SANNA R, BLASER MJ, QUINT WG Distinct variants of *Helicobacter pylori* cagA are associated with vacA subtypes. **J Clin Microbiol.**, 37(7): 2306-11, 1999.

VAN DOORN LJ, SCHNEEBERGER PM, NOUHAN N, PLAISIER A, QUINT W, BOER W. Importance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment. **GUT.**, 46: 321-326, 2000.

VAN ZWET AA, VANDENBROUCKE-GRAULS CM, THIJS JC, VAN DER WOUTEN EJ, GERRITS MM, KUSTERS JG, VANDENBROUKE-GRAULS CM. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. **Lancet**, 14; 352(9140): 1595, 1998.

VASQUEZ A, VALDEZ Y, GILMAN RH, MCDONALD JJ, WESTBLOM TU, BERG D, MAYTA H, 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(5): 1232-4, 1996.

Referências Bibliográficas

Anita Paula Ortiz de

Godoy

VICARI, J.J., PEEK, R.M., FALK, G.W., GOLDBLUM, J.R., EASLEY, K.A., SCHNELL, J., PEREZ-PEREZ, G.I., HALTER, S.A., RICE, T.W., BLASER, M.J. AND RICHTER, J.E. The seroprevalence of cagA-positive *Helicobacter pylori* strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**, 115, 50-57, 1998.

WEBB PM, KNIGHT T, NEWELL DG, ELDER JB, FORMAN D. *Helicobacter pylori* transmission: evidence from a comparison with hepatitis A virus. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, 8(5):439-41, 1996.

WESTBLOM TU. Molecular diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Immunol Invest.**, 26(1-2): 163-74, 1997.

WESTBLOM TU, PHADNIS S, YANG P, CZINN SJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of a polymerase chain reaction assay for gastric juice aspirates. **Clin Infect Dis.**, 16(3): 367-71, 1993.

WOLLE K, LEODOLTER A, MALFERTHEINER P, KONIG W. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. **J Med Microbiol.**, 51(8): 705-9, 2002.

WONG BC, YIN Y, BERG DE, XIA HH, ZHANG JZ, WANG WH, WONG WM, HUANG XR, TANG VS, LAM SK. Distribution of distinct *vacA*, *cagA* and *iceA* alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong. **Helicobacter**, 6(4): 317-24, 2001.

WORKU ML, SIDEBOTHAM RL, WALKER MM, KESHAVARZ T, KARIM QN. The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. **Microbiology**, 145:2803-11, 1999.

Referências Bibliográficas
Godoy

Anita Paula Ortiz de

XIANG Z, CENSINI S, BAYELI PF, TELFORD JL, FIGURA N, RAPPUOLI R, COVACCI A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. : **Infect Immun.**, 63(1): 94-8, 1995.

XIAO SD, LIU WZ, HU PJ, XIA DH, TYTGAT GN. High cure rate of *Helicobacter pylori* infection using tripotassium dicitrato bismuthate, furazolidone and

clarithromycin triple therapy for 1 week. **Aliment Pharmacol Ther.**, 13(3): 311-5, 1999.

XU Q, PEEK RM JR, MILLER GG, BLASER MJ. The *Helicobacter pylori* genome is modified at CATG by the product of hpyIM. **J Bacteriol.**, 179(21): 6807-15, 1997.

YAMAOKA, Y., KODAMA, T., GUTIERREZ, O., KIM, J.G., KASHIMA, K. and GRAHAM, D.Y. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 2274-2279, 1999.

YAHIRO K, NIIDOME T, KIMURA M, HATAKEYAMA T, AOYAGI H, KURAZONO H, IMAGAWA K, WADA A, MOSS J, HIRAYAMA T. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. **J Biol Chem.**, 17; 274(51): 36693-9, 1999.

ZHENG, P.Y., HUA, J., YEOH, K.G. and HO, B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. **Gut.**, 47: 18-22, 2000.

IX - ANEXOS



Anexo I
Godoy

Anita Paula Ortiz de

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Anexo II
Godoy

Anita Paula Ortiz de

**ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL
MICROBIOLOGY**

