

YUNE HELENA BORGES BENVENGO

**ENVOLVIMENTO DOS GENES *rdxA* e *frxA* DE
Helicobacter pylori NA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS
METRONIDAZOL E FURAZOLIDONA**

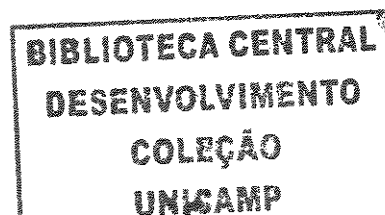
*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mes.
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas,
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia,
Bióloga – Yune Helena Borges Benvenuto.*

Campinas, 30 de agosto de 2005.

*Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno
- Orientador -*

CAMPINAS

2005



YUNE HELENA BORGES BENVENGO

**ENVOLVIMENTO DOS GENES *rdxA* e *frxA* DE
Helicobacter pylori NA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS
METRONIDAZOL E FURAZOLIDONA**

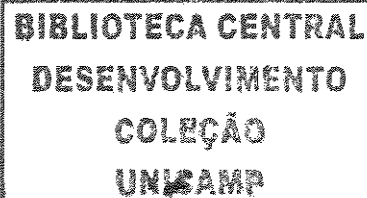
*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

CAMPINAS

2005

ii



UNIDADE 80
Nº CHAMADA
T/UNICAMP
B447e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 68740
PROC. 16.123-06
C ☐ D ☒
PREÇO 1,00
DATA 02/06/06

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Bib. id. 382942

B447e

Benvengo, Yune Helena Borges

Envolvimento dos genes *rdxA* e *frxA* de *Helicobacter pylori* na resistência aos antibióticos metronidazol e furazolidona. / Yune Helena Borges Benvengo. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Ronilson Agnaldo Moreno

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Resistência a drogas. 3. Metronidazol.
4. Furazolidona. I. Moreno, Ronilson Agnaldo. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III Título.

(Slp/fcm)



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Membros:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Prof. Dra. Sonia Aparecida Gurgueira

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

Data:

30/08/2005

Para Maria Helena

Leonardo e Milena

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno e aos Profs. Dr. Sérgio de Mendonça e Marcelo Lima Ribeiro, pela grande contribuição na elaboração deste trabalho.

Aos Drs. Profs. Stephen Hyslop, Sônia Aparecida Gurgueira, Maria Silvia V. Gatti, e Alessandra Gambero pela atenção e disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

Aos Drs. Profs. Domingos da Silva Leite e Natalia Miayasaka pela participação no meu processo de qualificação.

À Anita pela amizade e por todas as orientações sobre *Helicobacter pylori*.

À minha irmã Milena pela sua amizade e solicitude

Meu reconhecimento ao Wanderlei (Dep. Farmacologia) pelo profissionalismo e objetividade.

Aos meus queridos amigos do laboratório pelas conversas divertidas e agradáveis.

Ao meu amigo Rafael que me lembrou a importância da sinceridade.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.

O que for o teu desejo, assim será a sua vontade.

O que for a tua vontade, assim serão teus atos.

O que forem teus atos, assim será teu destino.

Brihadaranyaka Upanishad

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO	17
1- HISTÓRICO	18
2-CLASSIFICAÇÃO DA <i>H. pylori</i>	19
3- DIVERSIDADE	20
4- PROVÁVEIS RESERVATÓRIOS DA <i>H. pylori</i>	22
5- ROTAS DE TRANSMISSÃO	22
5.1- Transmissão gastro-oral.....	22
5.2- Transmissão oral-oral.....	23
5.3- Transmissão fecal-oral.....	24
6- DIAGNÓSTICO	24
6.1- Identificação histológica.....	24
6.2- Cultura.....	25
6.3-Sorologia.....	25
6.4- Teste respiratório da uréia.....	25
6.5- Teste rápido da uréase.....	25
6.6- Reação em cadeia da polimerase.....	26
7-TRATAMENTO	26

8- EPIDEMIOLOGIA.....	27
8.1- Incidência da infecção.....	27
8.2- Incidência da resistência.....	27
9- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E METABOLISMO.....	29
10- MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA <i>H. pylori</i> AOS ANTIMICROBIANOS METRONIDAZOL E FURAZOLIDONA.....	32
10.1- Metronidazol.....	32
10.2- Furazolidona.....	36
2- OBJETIVOS.....	39
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	41
1- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	42
1.1- Cultivo em meio sólido.....	42
1.2- Identificação de linhagens de <i>H. pylori</i>	42
1.3- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	43
2- MÉTODOS GENÉTICOS.....	44
2.1-Obtenção de DNA.....	44
2.2- Amplificação por PCR.....	45
2.3-Transformação natural.....	46
4- RESULTADOS.....	49
1- MICROBIOLÓGICOS.....	50
2- TRANSFORMAÇÃO NATURAL.....	51
5- DISCUSSÃO.....	52
6- CONCLUSÃO.....	56

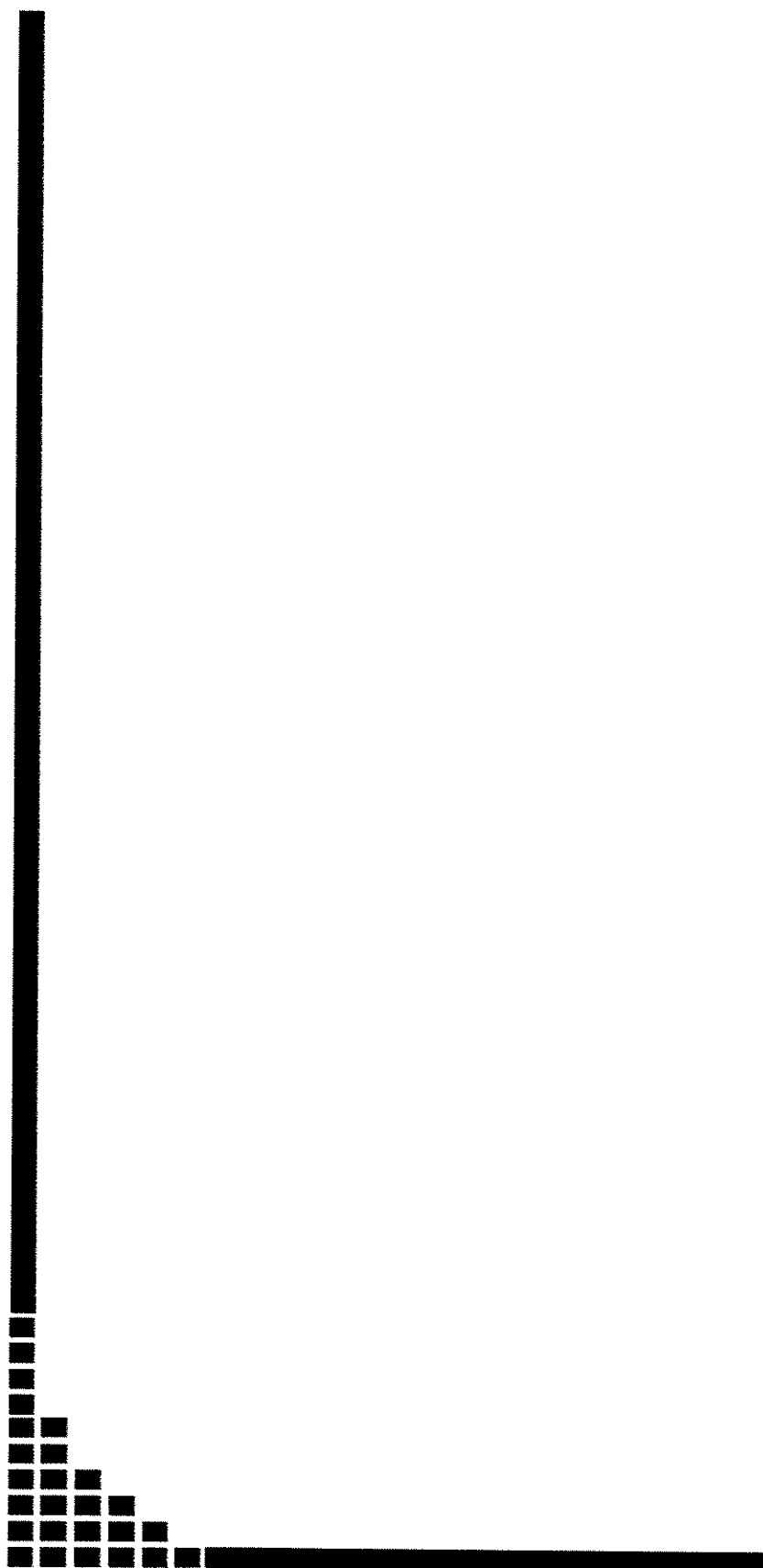
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8- ANEXO.....	69
1 - Artigo submetido: Annals of clinical microbiology and antimicrobials...	70

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM	Concentração inibitória mínima
PCR	Ração em cadeia da polimerase
Pb	Pares de bases

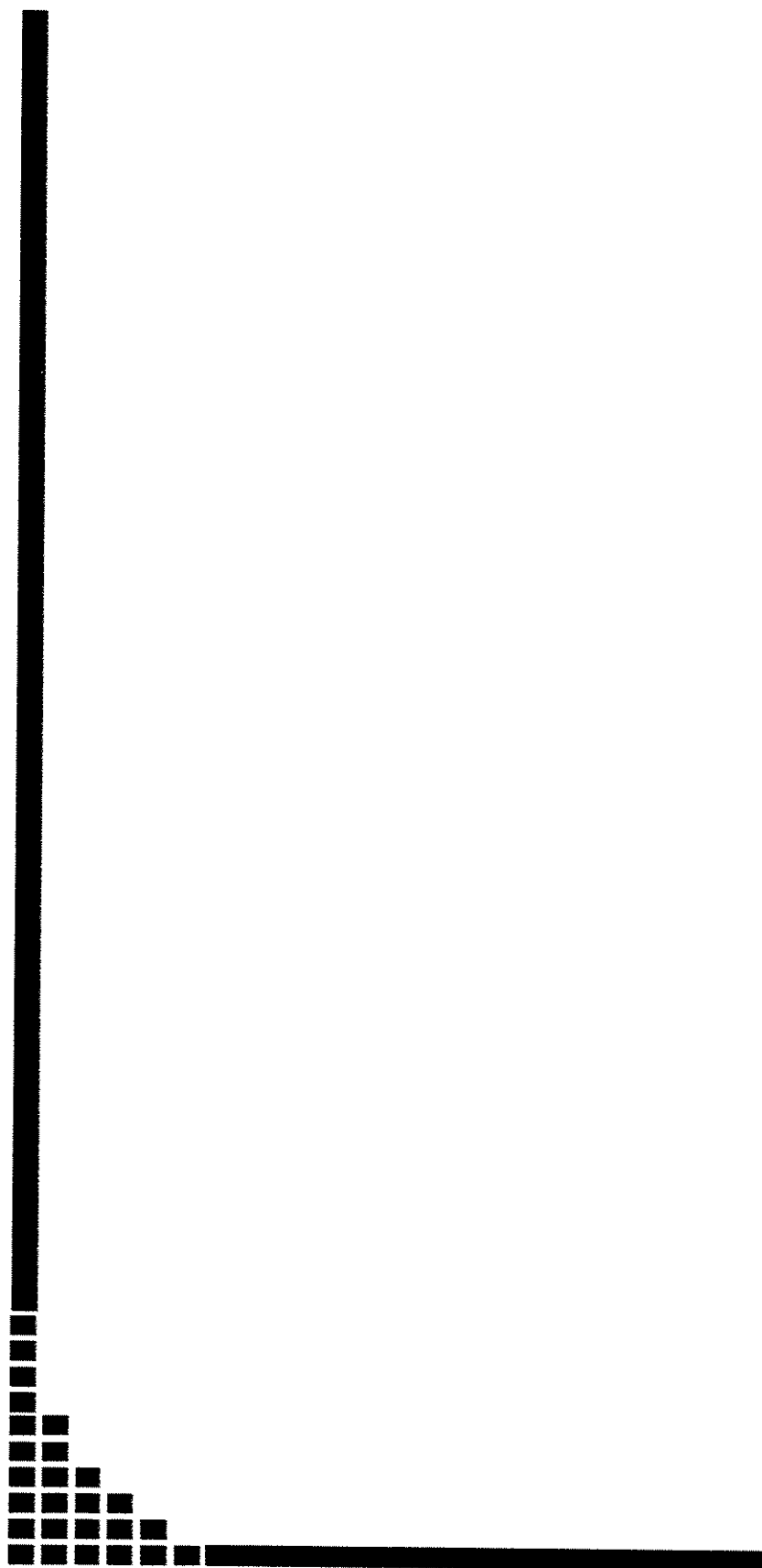
	PÁG.
Figura 1- Atividades de catabolismo e anabolismo detectados em linhagens de <i>H. pylori</i>	31
Figura 2- Estrutura do metronidazol.....	32
Figura 3- Transformação de DNA para testar o envolvimento da mutação no gene <i>rdxA</i> na resistência ao metronidazol.....	35
Figura 4- Estrutura da furazolidona.....	36
Figura 5- Desenho esquemático da transformação natural da linhagem 26695.....	48

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Sequências dos iniciadores utilizados.....	45
Quadro 2- Número de ciclos, tempos e temperaturas usados para cada iniciador nas reações de PCR.....	46
Quadro 3- Valores em µg/mL das concentrações inibitórias mínimas de metronidazol e furazolidona.....	50



RESUMO

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma das mais comuns em todo o mundo estando relacionada ao câncer gástrico, gastrite crônica, úlceras, adenocarcinomas e linfomas gástricos. O metronidazol foi muito usado como componente de terapias contra *H. pylori*. No entanto metronidazol é um composto mutagênico e a resistência a esse antimicrobiano é muito comum. Isso estimulou o interesse em antimicrobianos que tivessem resistência incomum para *H. pylori*. No Brasil, onde o índice de resistência para metronidazol foi determinado em 42%, a furazolidona passou a ser usada nas terapias de erradicação. A furazolidona e o metronidazol, são compostos classificados como nitro-heterocíclicos ou nitroaromáticos e possuem mecanismos de ação similares. O mecanismo de resistência da *H. pylori* ao metronidazol foi relacionado com alterações nos genes NAD(P)H nitroredutase oxigênio insensível (*rdxA*) e NAD(P)H flavina oxidorre- dutase (*frxA*) produtores de nitroredutases que reduzem o metronidazol gerando produtos intermediários os quais tem ação tóxica. Devido a algumas linhagens apresentarem resistência simultânea para metronidazol e furazolidona foi sugerido que os mecanismos de resistência para essas drogas poderiam ser os mesmos. Entretanto linhagens construídas em laboratório com os genes *rdxA* e *frxA* inativados não apresentaram resistência a furazolidona. Nesse estudo foi utilizado o método de transformação natural, feitos com os produtos de PCR dos genes *rdxA* e *frxA* de oito amostras brasileiras resistentes simultaneamente aos dois antimicrobianos para verificar o envolvimento dos genes *rdxA* e *frxA* com a resistência ao metronidazol e a furazolidona. Das oito amostras utilizadas foram obtidos seis transformantes de diferentes produtos de PCR do gene *rdxA*, resistentes ao metronidazol. Não foram obtidos transformantes com o gene *frxA* resistentes ao metronidazol, nem transformantes resistentes a furazolidona com nenhum dos dois genes. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a resistência ao metronidazol esta relacionada ao gene *rdxA*, mas não ao *frxA*, e sugere que o gene *rdxA* influencia a concentração inibitória mínima de furazolidona, mas não confere resistência.



ABSTRACT

Helicobacter Pylori infection is one of the most common infections worldwide and recognized as the major cause of peptic ulcer disease, risk factor for gastric adenocarcinoma and primary gastric lymphoma. Metronidazole has often used in combination therapies against *H. pylori*. However, metronidazole is highly mutagenic and resistance to this drug is very common. These stimulated the use the alternatives drugs that resistance was uncommon in *H. pylori*. In Brazil, where the level of resistance for metronidazole was detected in 42%, the nitrofurantoin furazolidone passed to be one of the components therapies. Metronidazole and furazolidone are classified as nitroheterocyclic and nitroaromatic compounds, hence the modes of drug action are similar and nitroreduction is required for activation these. The mechanism of metronidazole resistance among *H. pylori* strains has been related to alterations in gene products having metronidazole nitroreductase activity, like the oxygen insensitive NAD(P)H nitroreductase (RdxA), and NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA). Due some strains present simultaneous resistance for furazolidone and metronidazole suggests that the resistance mechanism for these drugs may be the same. However, *frxA* and *rdxA* knockout mutations constructed in laboratory reference strains are not resistant to furazolidone, which indicates that mutations in others genes were also need for resistance. We used natural transformation with PCR products of eighth brazilian clinical isolates, simultaneous resistant to this these two drugs, for verify the involvement of the genes *rdxA* and *frxA* with resistance to metronidazole and furazolidone drugs. Our results showed that metronidazole resistance are associated with *rdxA* gene, but not *frxA*, and suggest the involvement of *rdxA* gene in increased level of furazolidone minimum inhibitory concentration, but not confer resistance.



1- INTRODUÇÃO

1- HISTÓRICO

O conhecimento atual em relação a doenças gástricas em humanos decorre da pesquisa feita por Marshall e Warren em 1982 na qual esses dois pesquisadores australianos relataram a primeira cultura de *Helicobacter pylori*. Porém, os primeiros relatos relacionados ao gênero *Helicobacter* retrocedem em um século. Em 1893, Bizzozero observou, na mucosa gástrica de cachorros, espiroquetas gram negativas com aproximadamente 10 micrometros. Atualmente esses microorganismos são identificados como: *H. canis*, *H. felis* e/ ou *H. helmannii*. O trabalho de Bizzozero foi estendido por Salomon que foi hábil em propagar estes organismos espirais em estomago de ratos depois de alimenta- los com pedaços de estômagos infectados de gatos e cachorros. O trabalho de Salomon foi um importante precursor dos estudos do *H. pylori* , pois o rato passou a ser um dos principais modelos para vacinas e terapias de erradicação APUD, (ANDERSEN et al., 1988).

Os organismos foram notados na mucosa gástrica de macacos por Doengues nos EUA e na mesma espécie por Freedberg e Baron que acharam espiroquetas em 40% das amostras analisadas APUD, (ARCHER et al., 1988).

Nos anos DE 1940 Palmer não evidenciou espiroquetas em mais de 1.000 biópsias gástricas e publicou uma conclusão incorreta numa época em que mais de 50% da população americana era positiva para *H. pylori*. Nas décadas de 50 e 60, Susumu Ito, fez as primeiras descrições detalhadas da mucosa gástrica feitas por microscopia eletrônica onde fotografou a estrutura das células parietais e glândulas secretoras de ácido. Ele também observou espirilos em alguns de seus materiais APUD, (BORHAM- MANESH et al; 1993).

Em meados dos anos 70, uma bactéria espiral foi tema de um artigo cujos autores eram Steer e Colin Jones que estudaram a presença da bactéria em úlceras gástricas. Eles notaram que numerosas bactérias espirais estavam presentes em 80% dos espécimes gástricos , Infelizmente eles não foram capazes de propagar essa bactéria em cultura (BORHAM- MANESH et al; 1993).

Finalmente nos anos 80 Warren e Marshall conseguiram isolar em meio de cultura a bactéria que então foi chamada de *Campylobacter pyloridis*, que posteriormente passou a ser chamada de *Helicobacter pylori* após análises bioquímicas e genéticas demonstrarem que esse organismo não pertence ao gênero *Campylobacter* (BORHAM-MANESH et al; 1993).

A hipótese de que a *H. pylori* poderia ser a causadora de úlceras pépticas foi vagarosamente sendo aceita e hoje a infecção por *H. pylori* é tida como uma das mais comuns em humanos, estando relacionada à gastrites e adenocarcinomas.

2- CLASSIFICAÇÃO DO *H. pylori*

H. pylori é um organismo gram negativo que vive sob condições micro- aerofílicas (~ 80% N₂, 10% CO₂, 5% H₂ e 5% O₂), em um micro ambiente excluído do ácido gástrico, aderido às células epiteliais da mucosa gástrica principalmente no antro gástrico. Possui aproximadamente 3 – 5 µm de comprimento e 0,5 de diâmetro. Duas formas foram descritas para esse microorganismo, helicoidal e cocoide, sendo a forma helicoidal tida como mais virulenta. A habilidade da *H. pylori* em convergir para a forma cocoide sugere diferentes hipóteses sobre o significado desse evento (MCGOWAN et al., 1996). Durante a infecção, a bactéria apresenta-se principalmente com a forma espiral, mas a forma cocoide também foi vista na mucosa do hospedeiro. Entretanto, a função dessa forma em relação à patogenicidade e viabilidade ainda é controversa, sendo que alguns autores consideram a forma cocoide não viável para cultura, porém infecciosa, enquanto que alguns trabalhos sugerem que esta forma seria uma manifestação morfológica da morte da bactéria (CHAN et al., 1994). A *H. pylori* possui uma alta motilidade, tendo 5 ou 6 flagelos unipolares, que são essenciais na colonização da mucosa gástrica, sendo assim um dos fatores determinantes da virulência (GOLD, 1999).

As primeiras classificações taxonômicas do *H. pylori* foram embasadas em um método que agrupava os organismos em relação às semelhanças fenotípicas. Porém esse método apresentava alguns limites, o modo de análise de determinada característica poderia

levar a diferentes classificações, além do fato das características fenotípicas dependerem também do meio ambiente. O gênero *Helicobacter* foi proposto em 1989, baseado na comparação dos níveis de similaridade existentes entre as seqüências de nucleotídeos de diferentes linhagens. Os organismos são considerados sendo de uma mesma espécie quando o nível de hibridização DNA/DNA entre as linhagens for menor que 70% (WAYNE et al., 1987). A seqüência do seu gene 16S foi comparada à seqüência do gênero *Campylobacter*. Hoje mais de dez espécies estão atribuídas ao gênero *Helicobacter* (GOLD et al., 1989).

3- DIVERSIDADE

H. pylori é comumente citada como uma espécie com grande diversidade (LIN et al., 2001), este organismo habita o estomago de humanos durante muitas gerações de bactérias e se desenvolve separadamente em cada hospedeiro, sendo que não existem duas linhagens idênticas em hospedeiros diferentes, exceto em familiares ou instituições onde uma linhagem específica pode recentemente ter sido transmitida de um indivíduo para o outro (AXON, 1999).

Análises das seqüências genômicas de duas linhagens de *H. pylori* (J99 e 26695) revelaram que existe variação intraespécies, sendo que 6% a 7% são de genes específicos para cada linhagem (LIN et al., 2001). Aproximadamente metade desses genes específicos está localizada em uma única região hiper ativa chamada zona plástica, tendo a funcionalidade de codificar enzimas de restrição e modificação de DNA (ALM e TRUST, 1999). As linhagens 26695 e J99 possuem um genoma relativamente pequeno, com cerca de 1,67 e 1,64 milhões de nucleotídeos (LIN et al., 2001).

A geração de diversidade envolve tipicamente mutações endógenas e recombinação de DNA, e o *H. pylori* é extremamente hábil nesses mecanismos. A maioria das linhagens possui um fenótipo hiper mutante, devido à emergência que a pressão seletiva do meio impõe. Um ótimo exemplo da eficiência de adaptação através de mutações de ponto em *H. pylori*, é o rápido desenvolvimento de resistência a antibióticos comumente usados, como o macrolídeo claritromicina (BLASER e ATHERTON, 2004) e a nitroimidazoles, como o metronidazol, que tem seu índice de resistência dobrado a cada ano (GÖTTKE et al., 2000).

Em decorrência desta variação genética algumas linhagens causam repostas inflamatórias mais severas no hospedeiro que outras. Essas linhagens estão associadas também com uma maior probabilidade de causar úlcera, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico. Essas evidências sugerem que organismos mais virulentos podem também proteger os hospedeiros do desenvolvimento de efluxo esofágico e, possivelmente, câncer na região de função gastro-esofageal. A maior diferença entre *H. pylori* virulentos e avirulentos depende sobretudo da presença da ilha *cag* de patogenicidade associada à excreção de uma toxina vacuolizante que danifica células em culturas e “in vivo” (AXON, 1999).

O gene *cagA* (*citotoxin associated gene A*) que produz a citotoxina associada ao gene *A* é considerado um marcador de presença da ilha de patogenicidade e esta relacionado a níveis mais elevados de respostas inflamatórias. Outro fator de virulência é a citotoxina vacuolizante *VacA* codificada pelo gene *vacA*, secretada pelas linhagens de *H. pylori* que contêm a ilha de patogenicidade, causa vacuolização das células “in vitro” e “in vivo” danifica o epitélio gástrico. Os alelos *vacA* possuem de um a dois tipos de regiões sinais, *s1* ou *s2*, e dois tipos de regiões medianas: *m1* e *m2*. Não existem homólogos conhecidos para os genes *cagA* e *vacA* em outras espécies de *Helicobacter* ou em outras bactérias, sugerindo que esses genes são específicos para a colonização de humanos (BLASER e ATHERTON, 2004; AXON, 1999).

Alguns estudos sugerem que a heterogeneidade genética destes genes esteja relacionada com a diversidade geográfica das espécies de *H. pylori* na população e reflita o comportamento social humano e o padrão das migrações (COVACCI *et al.*, 1999).

O fato do *H. pylori* colonizar apenas humanos levou à especulação que sua colonização pode ter sido benéfica em um estágio pré-evolutivo do hospedeiro, sendo a atrofia do estômago, a gastrite antral e a hiperclorohidria condições predominantes em crianças que foram, provavelmente, as maiores beneficiadas com a colonização pelo aumento da barreira ácida protegendo-as de patógenos causadores de diarreia. Isto pode ter sido também uma forte seleção para manter a colonização por *H. pylori* em populações com pobre saneamento (BLASER e ATHERTON, 2004).

4- PROVÁVEIS RESERVATÓRIOS DO *H. pylori*

DORE et al. (1999), relacionaram a prevalência da *H. pylori* em pastores de ovelha da Sardenha (Espanha) que tinham contato com ovelhas e cachorros. Nesse estudo, 98% dos pastores estavam infectados por *H. pylori*, uma taxa maior que outros membros das famílias que não tinham contato com as ovelhas (78%). Os autores concluíram que a transmissão da *H. pylori* pode, em certas circunstâncias, incluir fases em ambientes animais ou humanos.

Entretanto, a maioria das pesquisas que tentaram relacionar a infecção por *H. pylori* com o contato com animais, apresentaram conclusões negativas (ANSORG et al., 1995; BODE et al., 1998).

A presença de DNA específico de *H. pylori* em reservatórios de água foi demonstrada em vários estudos (HULTEN et al., 1996, 1998; SASAKI et al., 1999). Porém, pela detecção de DNA não é possível indicar a viabilidade das células e outras espécies de *Helicobacter* ainda desconhecidas podem estar presentes nesse reservatório (MITCHELL, 2001).

Contudo a cultura de *H. pylori* a partir de amostras de água ainda não foi bem sucedida, o que sugere que quando a bactéria é exposta a condições ambientais adversas assume a forma cócoides, inviável para cultura (BODE et al., 1998). O fato do *H. pylori* não ter sido isolada a partir de um possível reservatório sugere que sua principal rota de transmissão seria o contato direto com pessoas infectadas (MITCHELL, 2001).

5- PROVÁVEIS ROTAS DE TRANSMISSÃO

5.1- Transmissão gastro-oral

A presença de *H. pylori* no suco gástrico de mais de 58% dos pacientes infectados sugere a possibilidade do refluxo do suco gástrico ser um veículo para a transmissão desse organismo (VAROLI et al., 1991).

O contato direto com secreções gástricas tem sido implicada na alta prevalência da infecção entre gastroenterologistas e a inadequada desinfecção de endoscópios pode possibilitar a transmissão de paciente para paciente (LIN et al., 1994).

Outra possibilidade, é a transmissão de criança para criança, ou criança para parente no cotidiano pelo contato com o vômito de uma criança contaminada como demonstrou Leung et al. (1999), que isolou *H. pylori* de uma criança e detectou DNA dessa bactéria por PCR em outras duas crianças.

5.2- Transmissão oral- oral

O *H. pylori* foi identificado em placas dentárias de pacientes positivos para a bactéria, através de isolamento em cultura e análise de PCR (reação em cadeia da polimerase) em vários trabalhos. Porém, devido ao fato dentistas e instrumentos dentários, não terem aumentado a prevalência da infecção por *H. pylori*, tem sido usado como argumento contra essa via de transmissão (MITCHELL, 2001)

O importante papel das mães na transmissão dentro das famílias foi confirmado por MALATY et al. (2000), que demonstram o risco relativo de crianças com mães positivas para *H. pylori* adquirirem a infecção é cinco vezes maior que as crianças de mães negativas para *H. pylori*. A transmissão entre cônjuges foi proposta pelo fato dos casais possuírem as mesmas linhagens de *H. pylori*. Neste trabalho também foi evidenciado a predisposição genética dos indivíduos para a infecção por *H. pylori* comparando 100 pares monozigóticos e 169 dizigóticos analisados juntos e separados. Eles concluíram que os efeitos genéticos influenciam na aquisição da *H. pylori* e que as pessoas que possuíam pares monozigóticos tinham mais predisposição a infecção do que as pessoas com pares dizigóticos.

5.3- Transmissão fecal- oral

THOMAS et al. (1992), relataram o primeiro isolamento de *H. pylori* em fezes humanos. Contudo outros grupos, não conseguiram os mesmos resultados. Com isso, foi proposto que este grupo só conseguiu isolar a bactéria porque as crianças do Gâmbia eram subnutridas e tinham diarreia (MEGRAUD, 1995). Essa suposição foi confirmada por PARSONNET et al. (1999), que mostram que a *H. pylori* não pode ser isolada de fezes de adultos, porém quando os pacientes foram induzidos à diarreia, a bactéria pode ser isolada de fezes de sete dos 14 indivíduos.

6- DIAGNÓSTICO

O principal método para o diagnóstico da infecção por *H. pylori* consiste em uma endoscopia digestiva alta com a retirada de biópsias gástricas, a partir das quais a bactéria poderá ser identificada por meio de análise histopatológica do tecido, cultura bacteriana, teste rápido da urease e PCR. Entretanto, existem técnicas confiáveis de detecção baseadas em uma característica da *H. pylori*, como a capacidade de hidrolisar uréia, ou na resposta do sistema imunológico à colonização do epitélio gástrico (GOLD, 1999).

6.1- Identificação histológica

Na caracterização histológica o *H. pylori* aparece como um bacilo espiral medindo 3.0 x 0.5 mm, localizado adjacente ao epitélio gástrico. As colorações de Silver, Giensa, hematoxilina e eosina são usadas na identificação. Falsos negativos ocorrem em apenas 5% dos casos devido à distribuição irregular da bactéria na mucosa gástrica. A vantagem desse método é a possibilidade de avaliar o tipo e a intensidade da inflamação (GOLD, 1999).

6.2- Cultura

O *H. pylori* é uma bactéria obrigatoriamente microaerofílica, de crescimento lento e sua distribuição pelo tecido gástrico é desigual o que pode contribuir para resultados falsos negativos. Outros fatores que podem dificultar o crescimento da bactéria são: o uso recente de antibióticos, a ingestão de um anestésico tópico durante a endoscopia e a contaminação da pinça de coleta de biópsia com outros microorganismos ou por glutaraldeído. Outra aplicação importante da cultura é a determinação da susceptibilidade ou resistência a antibióticos (MCNULTY et al., 1988).

6.3- Sorologia

Várias técnicas soro-diagnósticas têm sido usadas para determinar anticorpos específicos ao *H. pylori* (imunoglobulina G). Geralmente o teste é realizado por ELISA (*Enzyme- Linked Immunosorbent Assay*) ou látex aglutinação. Falsos negativos podem ocorrer em indivíduos que, por alguma razão não desenvolveram resposta imunológica a infecção (CUTLER et al., 1995).

6.4- Teste respiratório da uréia

Nesse teste a uréia isotopicamente marcada com C13 ou C14 é ingerida pelo paciente. Se este apresentar urease em seu estômago decorrente da infecção por *H. pylori*, expelirá em sua respiração a molécula de carbono isotopicamente marcada. Podem ocorrer falsos negativos caso o paciente tenha ingerido bismuto, antibiótico ou após cirurgia gástrica (GRAHAM et al., 1991).

6.5- Teste rápido da urease

A capacidade que a *H.pylori* tem de produzir urease é a base para vários testes de diagnóstico. A urease catalisa a degradação da uréia para amônia e bicarbonato, o que causa um aumento de pH e muda a coloração do meio que contém um indicador. Falsos

positivos podem decorrer pela presença de outras bactérias produtoras de urease e também da ingestão de inibidores de bombas de prótons (GLUPCZYNSKI e HIRSVHL, 1994).

6.6- Reação em Cadeia da Polimerase

A partir da técnica de PCR é possível detectar *H. pylori* em biópsias, suco gástrico, saliva, placa dental e fezes. Esta técnica é extremamente sensível, mas pode gerar resultados falsos positivos decorrentes da contaminação da pinça coletora de biópsia. Outra limitação da técnica é a falta de informação sobre a viabilidade da bactéria (WESTBLOM et al., 1992).

7- TRATAMENTO

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

No Brasil, o Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter pylori*, baseado em estudos preliminares que não recomendavam a utilização de metronidazol devido ao alto índice de linhagens resistentes na população brasileira, recomendou à classe médica do Brasil em 1997, dois esquemas terapêuticos iniciais para a erradicação da bactéria: a terapia tripla com omeprazol, claritromicina e amoxicilina e uma opção mais econômica com subcitato de bismuto, tetraciclina e furazolidona (CARVALHAES et al., 1997).

8- EPIDEMIOLOGIA

8.1- Incidência da infecção

Em geral a incidência da infecção por *H. pylori* é menor em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento. A taxa de incidência da infecção em crianças com 10 anos que moram em países em desenvolvimento de 13% a 60%, enquanto que em crianças de países desenvolvidos a taxa varia de 0% a 5%(DUNN et al., 1997). Esta situação é atribuída ao saneamento básico precário dos países em desenvolvimento, que resulta em uma freqüente exposição ao patógeno. Países, que tiveram um aumento na qualidade de vida, a freqüência da infecção se correlaciona com estado sócio- econômico, grupo étnico e idade, sendo metade dos idosos positivos à sorologia ao *H. pylori*, enquanto que apenas um décimo das crianças são infectadas nessas sociedades industrializadas (TAYLOR e PARSONNET, 1995; DUNN et al., 1997).

A infecção por *H. pylori* ocorre principalmente na infância e, uma vez estabelecida na mucosa gástrica, caso não seja tratada, persiste por toda a vida. Rotas de infecção superiores que a média em alguns grupos ocupacionais, sugerem que a infecção pode ocorrer também na idade adulta. Em alguns estudos, gastroenterologistas se mostraram mais susceptíveis a possibilidade de transmissão devido ao contato com o paciente durante a endoscopia. Porém, em geral, adultos de países desenvolvidos apresentam risco de soro conversão de apenas 0,5% e 0,3% por pessoa por ano (MALATY et al. 2000).

8.2. Incidência da resistência

A resistência do *H. pylori* aos antimicrobianos é de particular importância, por ser este fato o maior determinante de falhas no tratamento (GLUPCZYNSKI, 1998). Vários artigos sugerem que o aumento da resistência nos últimos anos pode ser decorrente de tratamentos prévios de outras infecções ou da própria infecção por *H. pylori* (GLUPCZYNSKI, 1998; GOODWIN et al., 1998; JEONG et al., 2001; KAIHOVARA et al., 1998).

A resistência bacteriana em relação a uma droga específica é definida de acordo com a concentração da droga ativa e seu efeito no local onde o organismo está presente, relacionado à concentração mínima que é necessária para inibir o crescimento do microorganismo (CIM). A linhagem é classificada como resistente quando é capaz de suportar altas concentrações da droga, comparada a concentração inibitória mínima de outras linhagens da mesma espécie (resistência bacteriológica), ou quando pode tolerar altas concentrações da droga, quando são atacadas *in vivo* no local da infecção (resistência farmacológica) (GLUPCZYNSKI, 1998).

A prevalência da resistência à claritromicina (CIM > 2 µg/ml), varia de país para país, ocorrendo um paralelo entre a resistência e o uso dessa classe de antibiótico no tratamento de outras infecções, principalmente as do trato respiratório. Em países industrializados aproximadamente 10% das linhagens de *H. pylori* são resistentes à claritromicina, enquanto que em países em desenvolvimento essa taxa varia de 25 a 50% (GLUPCZYNSKI et al, 2001).

A incidência da resistência ao metronidazol (CIM > 8 µg/ml) também varia geograficamente: aparece em 50% ou mais das linhagens de países em desenvolvimento e em cerca de 35% das linhagens dos EUA e da Europa. Essa resistência ao metronidazol nas linhagens isoladas coincide com o índice de metronidazol usado em uma sociedade em particular, o que leva a crer que muitas das linhagens de *H. pylori* resistentes ao metronidazol é decorrente da frequência do uso de metronidazol e nitroimidazoles relativos usados no tratamento de anaeróbios e protozoários. Porém essa dosagem não elimina todas as linhagens susceptíveis ao metronidazol de uma pessoa infectada. Qualquer inibição do crescimento da *Helicobacter pylori* durante esse período de tratamento com o metronidazol pode enriquecer ou selecionar linhagens resistentes à essa droga. (GLUPCZYNSKI, 1998, 2001).

A marcante diferença vista entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento em relação à resistência ao metronidazol, é devida esse antibiótico ser comumente usado no tratamento de infecções por parasitas e infecções genitais, principalmente trichomoniasis (GLUPCZYNSKI, 1998).

As resistências à tetraciclina e a amoxicilina foram consideradas raras ou inexistentes até o final do século passado. Porém a incidência dessas resistências vem aumentando, especialmente em países como Brasil, El Salvador, Índia e Lituânia onde esses antibióticos podem ser obtidos sem prescrição médica (DORE et al, 1999; ECCLISSATO et al, 2002). Taxas de resistência 72% para amoxicilina e 59% para tetraciclina, foram recentemente relatados em Xangai, China (WU et al, 2000). Nas linhagens brasileiras de *H. pylori* analisadas quanto à resistência primária, as taxas foram de 42% para metronidazol, 29% para amoxicilina, 7% para claritromicina e tetraciclina e 4% para furazolidona (MENDONÇA et al., 2000).

9- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E METABOLISMO

As atividades enzimáticas identificadas em *H. pylori* incluem, catalase, citocromo oxidase, superóxido dismutase, fosfolipase e urease (HUGHES et al., 1995).

Como a bactéria requer altas taxas de CO₂ para seu crescimento, a simples produção de urease como neutralizadora do ácido não é suficiente. Esta enzima também providencia o surgimento de nitrogênio para síntese protéica. A amônia derivada da uréia pode ser adicionada ao glutamato, podendo assim ser incorporada na proteína ou convertida em outros aminoácidos (GOLD, 1999).

Foi sugerido que a *H. pylori* possui um ciclo para uréia completo tendo assim um grande controle sobre o nitrogênio, sendo assim, a função chave da urease pode ser nutricional, quando na ausência de alguma atividade enzimática, o nitrogênio for insuficiente (GOLD, 1999).

Este organismo utiliza glicose como fonte de carbono e energia de maneira limitada, mas possui as vias pentose fosfato e Entner- Doudoroff (HUGHES et al., 1995).

Alguns estudos concluíram que glicose e piruvato são oxidados por ácidos orgânicos sugerindo que o ciclo do ácido cítrico pode ser ausente ou incompleto na bactéria. Entretanto HOFFMAN et al. (1996), (Figura.1) demonstraram atividade de citrato

sintase em *H. pylori*, sugerindo que a acetil CoA gerada pela oxidação do piruvato pode ser rapidamente catabolizado via ciclo do ácido cítrico, mas não no sentido tradicional como em *E. coli*. Em *H. pylori* as reações incluem α cetoglutarato, succinil coenzima A, acetato coenzima A tranferase e malato quinona oxidorredutase, permitindo uma completa conectividade entre os metabólitos do ciclo do ácido cítrico. Contudo essas reações não são tipicamente consideradas como parte do ciclo (SCHILLING et al., 2002).

Vários aminoácidos podem entrar nas vias metabólicas, como o ciclo do ácido cítrico e serem diretamente convertidos a piruvato, que é requerido para síntese de alanina, leucina e valina (TOMB et al.,1997). A descarboxilação do piruvato no *H. pylori* é catalisada pelo complexo enzimático piruvato: flavodoxina oxidorredutase (POR), (HUGHES et al.,1995), ao invés do complexo enzimático aeróbico piruvato desidrogenase (AceCF) ou da anaeróbica piruvato liase (Pff) (TOMB et al.,1997). *In vivo* o receptor de elétrons para essa enzima é provavelmente uma flavina endógena (HUGHES et al.,1995).

A enzima 2 oxoglutarato: oxidorredutase (OOR) aparece como catalisadora de uma das reações do ciclo do ácido cítrico, esta enzima descarboxila 2 oxoglutarato para formar succinil coenzima A, que é principal intermediário do ciclo do ácido cítrico. Nessa reação o fumarato pode agir como um receptor de elétrons na respiração anaeróbica (MENDZ et al., 1994).

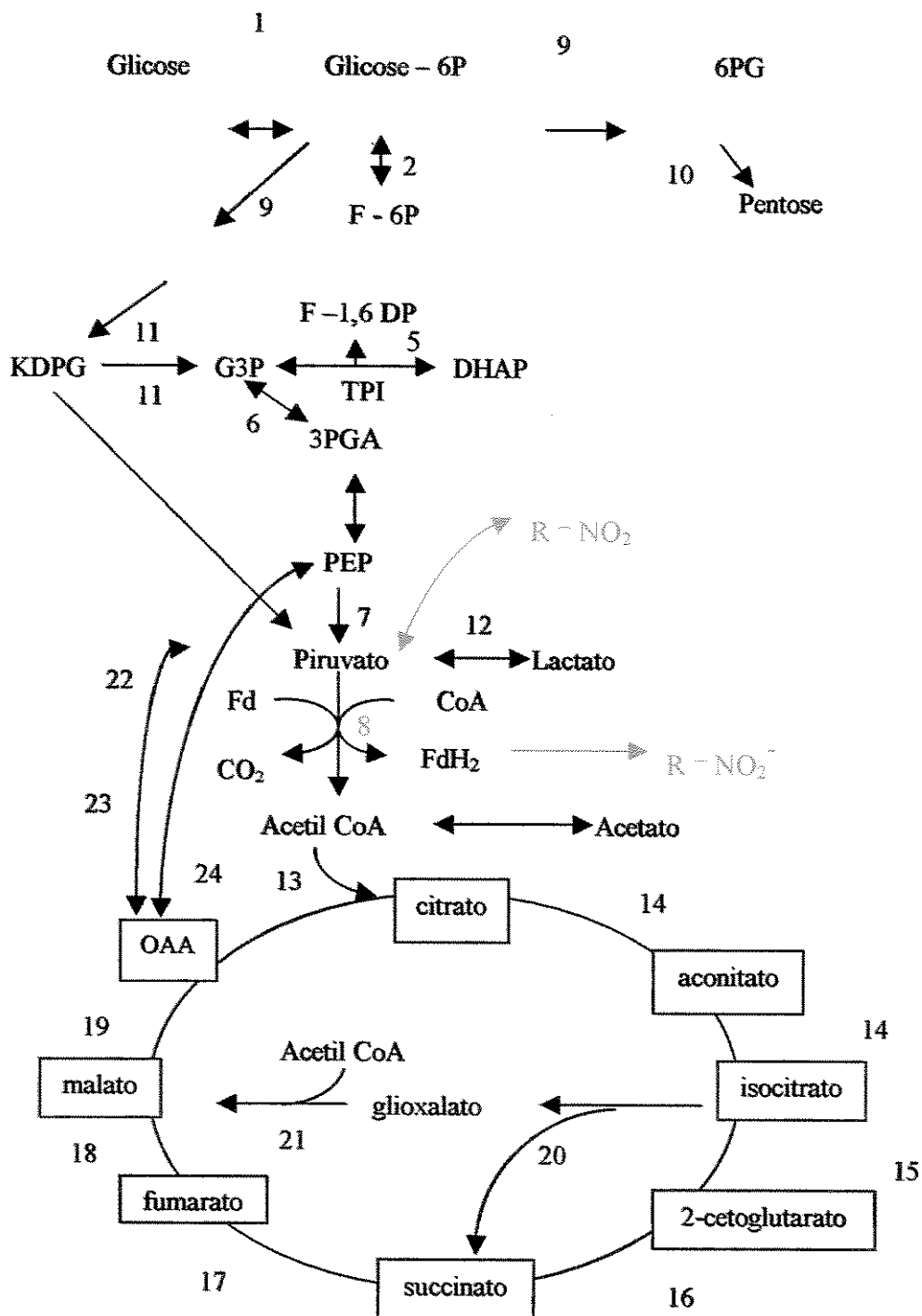


Figura 1- Atividades de catabolismo e anabolismo detectados em linhagens de *H. pylori*, enzimas associadas com o metabolismo da glicose. Fd, flavoxina; TPI, triose fosfato isomerase; 6PG, 6-fosfocluconato; F-6P, frutose-6-fosfato; F-DP, frutose-difosfato; KDPG, 2-keto-3-deoksi-6-fosfogluconato; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; 3PGA, 3-fosfoglicerato; OAA, oxalacetato; ciclo do ácido cítrico completo detectado na bactéria; reação nº 8 o composto niro-heterocíclico (R - NO₂) é ativado e passa para ativada tóxica (R - NO₂) e impede a formação de acetil CoA interrompendo o ciclo do ácido cítrico.

A presença de piruvato: flavodoxina oxidorreductase e 2 oxoglutarato acceptor oxidorreductase são elementos que contribuem para o caráter microaerofílico e suporta o conceito de um sistema metabólico anaeróbico nessa bactéria, sendo o oxigênio requerido para o crescimento (KAIHOVARA et al., 1998).

10- MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA *H. pylori* AOS ANTIMICROBIANOS METRONIDAZOL E FURAZOLIDONA

10.1- Metronidazol

O metronidazol [1-(2-hidroxil)2 metil 5 nitroimidazole] é um dos componentes chave na terapia usada contra *Helicobacter pylori* (VIDAVIKOVIC et al., 2002). A atividade das drogas nitro-heterocíclicas depende da ativação do seu grupo nitro tanto para a classe dos nitroimidazoles como para a dos nitrofuranos. Os radicais gerados na ativação dessas drogas são similares para ambas as famílias de nitro-heterocíclicos, porém estas possuem diferentes potenciais eletrônicos e seu mecanismo de ação depende de diferentes vias metabólicas.

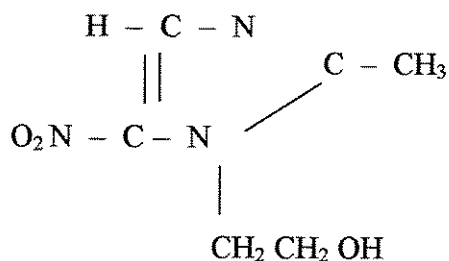


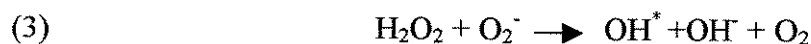
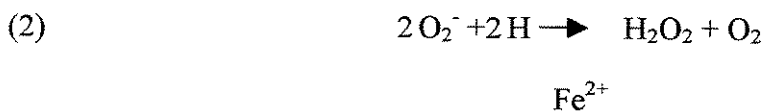
Figura 2- Estrutura do metronidazol

O mecanismo de ação do metronidazol resulta da ligação de produtos intermediários, originados de sua redução intracelular, com o DNA, formando complexos que inibem a replicação e inativam o DNA, impedindo desta forma as sínteses enzimáticas e causando a morte celular. Sua ação seletiva é devida à presença da atividade de um sistema de proteínas de baixo potencial de oxirredução, como a ferredoxina, que reduz o grupo nitro do metronidazol gerando produtos intermediários os quais têm ação tóxica e são responsáveis pela atividade antimicrobiana. Dessa forma o metronidazol atua como captante de elétrons depletando a célula sensível de equivalentes redutores necessários à sua plena atividade (LINDEMARK e MULLER, 1976).

Um dos produtos originados da redução do radical nitro do metronidazol é a hidroxila, um composto danoso a macromoléculas como o DNA e proteínas. A hidroxila é gerada através de um processo chamado de “ciclo fútil”, onde o oxigênio molecular pela captura de elétrons, regenera o metronidazol ativado à sua forma original não tóxica, resultando na formação de um de um superóxido



Em presença de um metal de transição como o ferro, ocorre a geração de peróxido de hidrogênio (2) e radicais hidroxila (3), causando dano ao DNA bacteriano e subsequentemente a morte da bactéria (SMITH e EDWARDS, 1995):



Em condições aeróbicas o oxigênio, melhor aceptor biológico de elétrons, com potencial redutor maior que o da droga, captura elétrons da reação que transforma flavoxina em acetil CoA, impedindo a ativação da droga (Reação nº 8, Figura 1) (MENDZ et al., 1994).

As nitroredutases são classificadas como oxigênio sensível ou insensível, baseado no fato de os substratos dependerem respectivamente, de uma ou duas transferências de elétrons. A redução de transferência de um elétron para o grupo nitro de um composto em particular produz o radical nitro que na presença do oxigênio, gera uniões de superóxidos e regenera o grupo 5-nitro. Isso sugere que aeróbios ou anaeróbios facultativos são resistentes ao metronidazol devido a condições aeróbicas de redução do ciclo que regenera o metronidazol (WHITHEWAY et al., 1998).

A maioria das nitrorredutases de organismos microaerofílicos são do tipo oxigênio insensível e reduzem apenas compostos nitroaromáticos a partir da sequencial redução de dois elétrons, resultando num intermediário nitroso e tendo a hidroxilamida como produto final (KAIHOVARA et al., 1998).

A formação de hiroxilamina, um composto extremamente carcinogênico pelo *H. pylori*, pode ter um potencial de distribuição mutagênica para a mucosa gástrica durante alguma terapia com metronidazol. Isso é de implicação para a saúde pública do achado que a infecção por *H. pylori* pode ser um fator de risco para o câncer gástrico e pode ser um acelerador do desenvolvimento de resistência para outros antibióticos importantes para o esquema terapêutico, como a claritromicina (KAIHOVAARA et al., 1998).

Durante os últimos anos vários genes codificadores de nitrorredutases, foram apresentados como candidatos a serem responsáveis pelo fenótipo resistente ao metronidazol, entre eles as proteínas POR, OOR e KOR, os genes *fdxA*, *fdxB*, *rdxA* e *rdxB* (KWON et al., 2000; JEOMG et al., 2001).

GOODWIN et al. (1998) realizaram um trabalho demonstrando que a atividade das redutases POR (piruvato: ferredoxin/flavina oxidoredução) e KOR (cetoglutarato oxido redutor) são reguladoras da ativação do metabolismo da bactéria, sendo que a deleção de

um destes diminui consideravelmente o crescimento bacteriano. Porém, a mutação dessas redutases não confere resistência ao metronidazol.

Nas linhagens de *H. pylori* resistentes ao metronidazol, POR e KOR foram reprimidos nas bactérias manipuladas em culturas contendo metronidazol, mas continuaram ativados nas culturas que não continham metronidazol (GOODWIN et al., 1998).

Em 1998, GOODWIN et al. comprovaram através de subclonagem de um cosmídeo e inserção deste em uma linhagem de *E. coli*, que a inativação mutacional de um gene da *H. pylori*, que codifica uma nitroredutase NAD(P)H oxigênio insensível, chamada *rdxA* (designado HP0954 dentro da sequência genômica) é causa natural da aquisição da resistência ao metronidazol. Sugeriram que o fenótipo sensível é devido à redução do metronidazol pelo *rdxA* gerando radicais de hidroxila, que é diretamente responsável pela morte das linhagens de *H. pylori* sensíveis.

JEONG et al. (2001) confirmaram através de uma transformação natural estratégica, com o gene *rdxA* inativo de uma *Helicobacter pylori* resistente, a importância deste gene em linhagens resistentes a metronidazol (Figura 2).

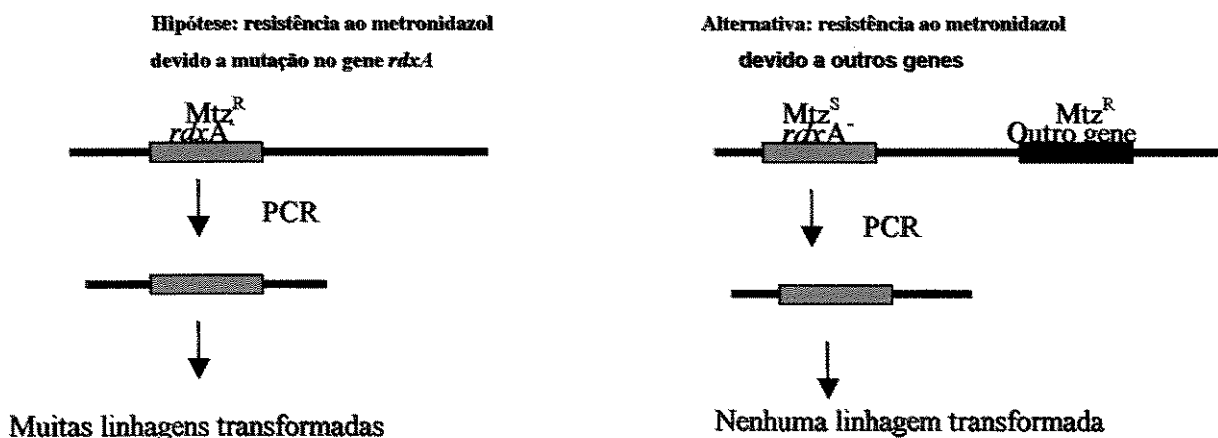


Figura 3- Transformação de DNA para testar o envolvimento da mutação no gene *rdxA* na resistência ao metronidazol.

O seqüenciamento de DNA demonstrou que mutações de ponto (missense e nonsense) são responsáveis pela inativação de *rdxA* nessas linhagens contendo o gene mutante (JEONG et al., 2001).

A introdução do *rdxA* de uma linhagem sensível por um vetor plasmidial transformou uma linhagem resistente em sensível, isso mostra como essa nitroredutase contribui para o fenótipo sensível em uma *Helicobacter pylori*. Foi observado também que a mutação isolada em *fdxA* (outra nitroredutase) não é capaz de conferir resistência mas que a dupla inativação em *rdxA* e *frxA* resulta em níveis mais altos de resistência (JEONG et al., 2001).

Microaerofílicos em geral são susceptíveis ao metronidazol e demonstram padrões de resistência similares aos verificados em *H. pylori*, sugerindo que homólogos de *rdxA* podem ser achados em outras espécies (HOFFMAN et al., 1996). Devido à atividade de *rdxA* foi sugerido que as mutações observadas em resistentes a metronidazol foram induzidas pela terapia com esse antibiótico e que essas mutações não teriam origem espontânea (GOODWIN et al., 1998).

10.2- Furazolidona

A furazolidona 3-(5 nitrofurfuridina amino) 2 oxo- oxazolidina tem atividade contra uma variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Foi o primeiro quimioterápico antibacteriano usado com sucesso no tratamento de geardíases nos anos de 1950. Na medicina veterinária a furazolidona é muito usada no tratamento ou prevenção de infecções nos brônquios (TOWSON et al., 1994).

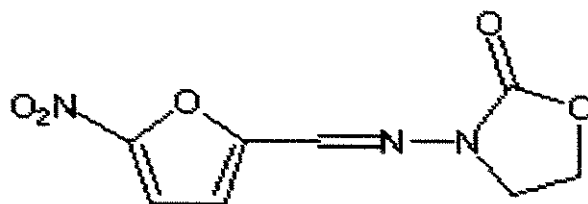


Figura 4- Estrutura da furazolidona

A furazolidona, assim como o metronidazol, é reduzido somente pelas vias anaeróbicas, no entanto por diferentes nitroreduases. Seus espectros de atividade e mecanismo de ação estão relacionados ao potencial redutor do seu grupo 5- nitro que está entre - 250 e 270 mV e pode ser reduzida por varias enzimas incluindo as nitrorreduases NAD(P)H das bactérias entéricas. Seu mecanismo de ação depende da geração de radicais tóxicos a partir da redução de seu grupo nitro, já que seus produtos finais são biologicamente inativos a hidroxila é provavelmente seu maior derivado intermediário, causando danos ao DNA bacteriano e conseqüentemente sua morte (SISSON et al., 2002).

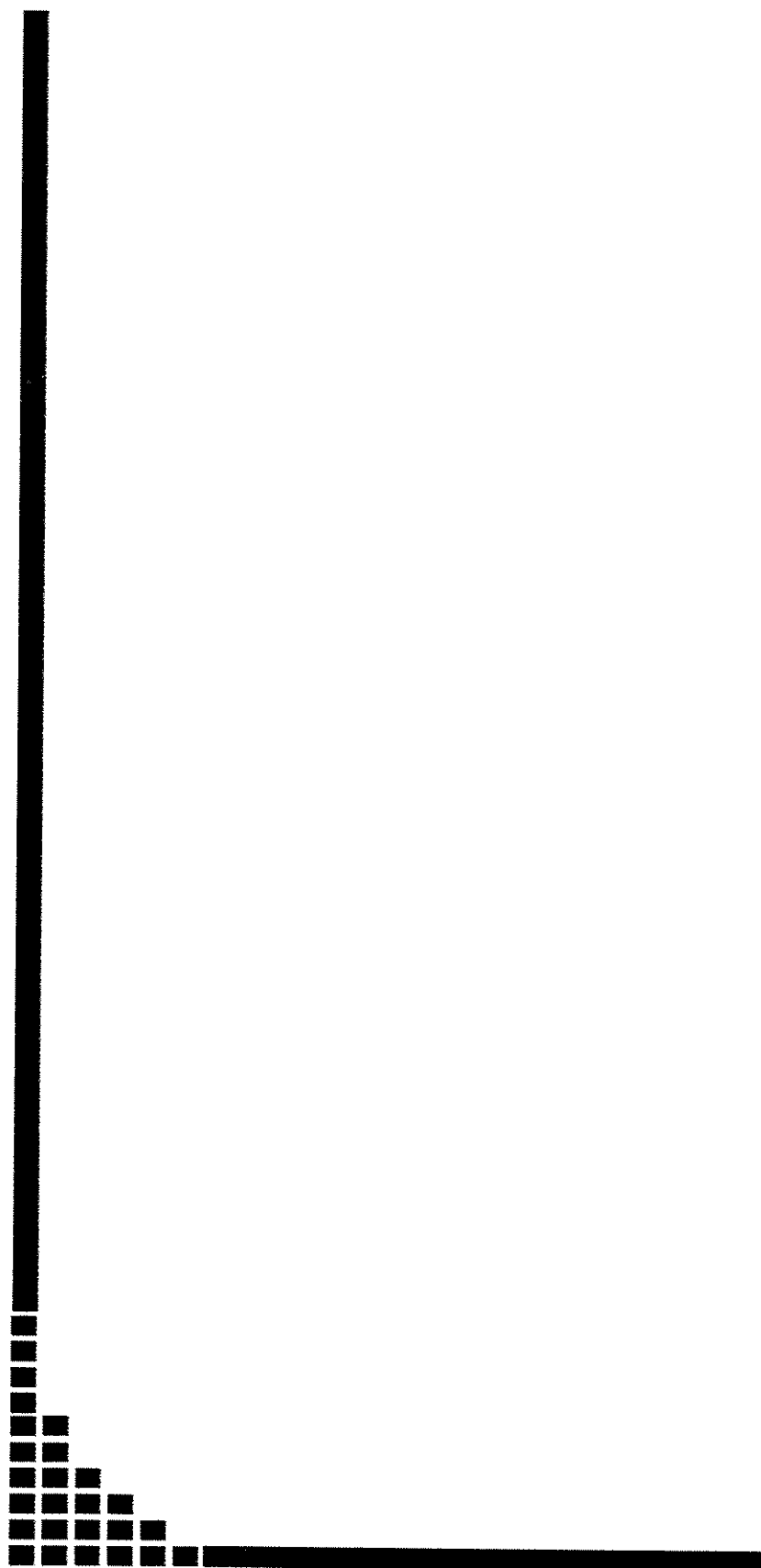
O mecanismo de resistência da *H. pylori* à furazolidona ainda não foi esclarecido. Atualmente os candidatos à resistência a furazolidona são as enzimas piruvato- flavodoxina oxidorreductase (PorCDAB) e 2-oxoglutarato oxidorreductase (OorDABC). Tanto a enzima POR quanto a OOR possuem quatro subunidades. Os genes *por* e *oor* foram clonados e seqüenciados, estão organizados respectivamente na ordem 5'-*porC-porD-porA-porB*-3' e 5'-*oorD-oorA-oorB-oorC*-3'. (HUGHES et al., 1998).

Em *Escherichia coli*, duas classes de nitrorreduases podem ser diferenciadas de acordo com a sensibilidade ao oxigênio: o tipo insensível ao oxigênio (tipo I) e o sensível ao oxigênio (tipo II). O gene *nfsA* foi clonado e codifica a proteína nitroreductase IA, uma flavina mononucleotídica (FMN) que utiliza o NADPH como doador de elétrons. O gene *nfsB* codifica também um composto protéico tipo flavoproteína que utiliza tanto NADH como NADPH como fonte redutora de equivalentes. Os genes que codificam as nitroreduases tipo II ainda não foram identificados (WHITEWAY et al., 1998).

Em condições aeróbicas a atividade das nitroreduases NfsA e NfsB são necessárias para a atividade biológica. Nesses casos, o estudo de mutantes resistentes a nitrofuranos mostrou que a resistência é conseqüência obrigatória de alterações em duas etapas: primeiramente uma alteração no gene *nfsA* seguido de uma inativação no gene *nfsB*. A seqüência da proteína *RdxA* de *Helicobacter pylori* possui alguns aminoácidos em alinhamento idêntico com a proteína NfsB, particularmente 14 resíduos próximos a extremidade aminoterminal, provavelmente relacionados ao sítio de ligação ao flavina mononucleotídica (WHITEWAY et al., 1998). Esta observação, associada ao fato das linhagens resistentes para a furazolidona serem resistentes simultaneamente para

metronidazol, levou a suposição de um mecanismo de ação e de resistência semelhante para ambos os compostos (KWON *et al.*, 2001). Entretanto, a análise de mutantes para os genes *rdxA*, *frxA* e *fdxB*, associados com a resistência da bactéria para o metronidazol, demonstrou que estes genes não estão diretamente envolvidos com a resistência a furazolidona para *H. pylori* (KWON *et al.*, 2001).

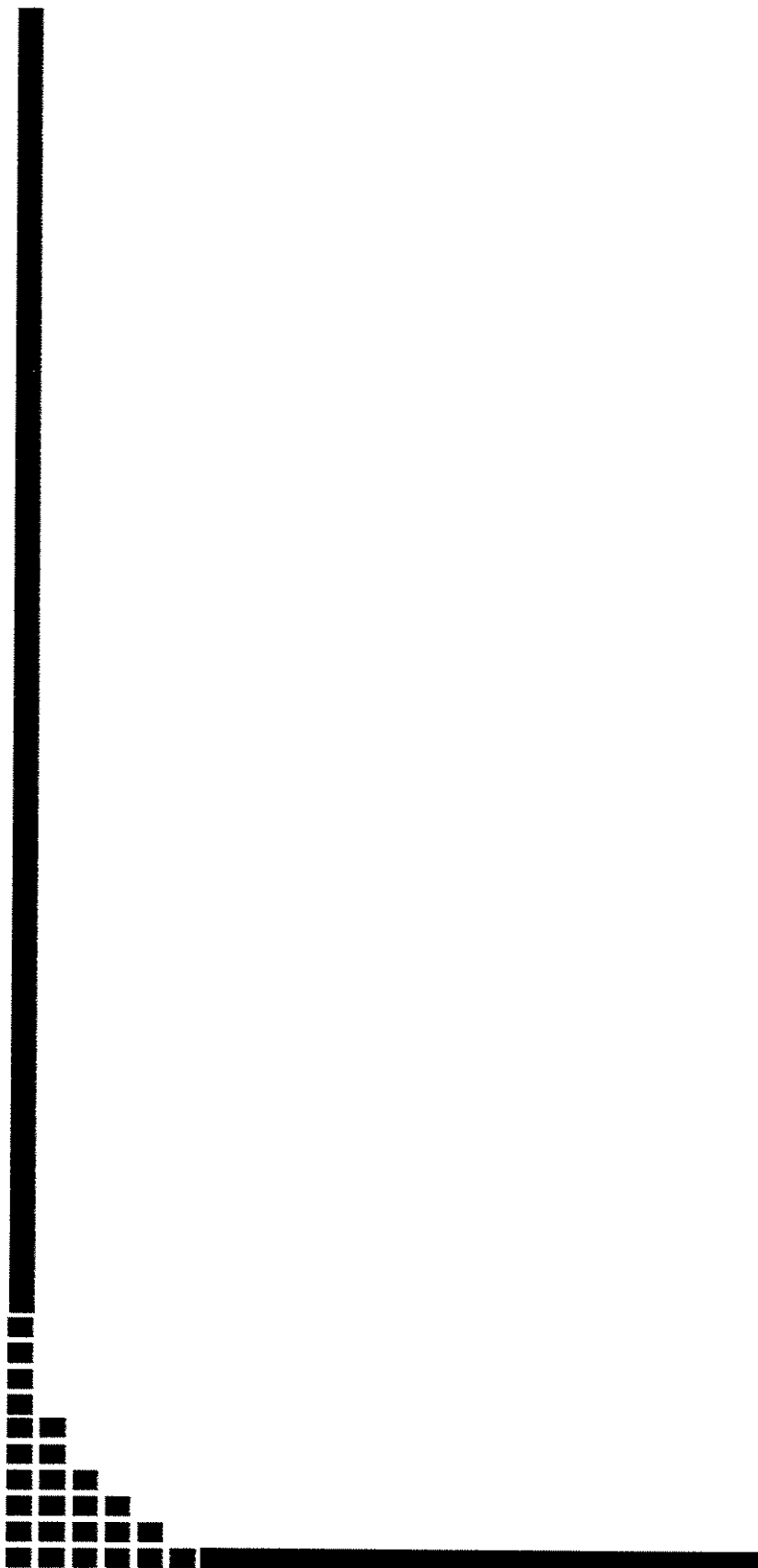
Linhagens construídas em laboratório, com os genes *rdxA* e *fdxA* inativados não apresentaram resistência a furazolidona, indicando assim que mutações em outros genes seriam necessárias (SISSON *et al.*, 2002).



2- OBJETIVOS

- Confirmar a relação entre os genes *rdxA* e *fdxA* de *H. pylori* com a resistência ao metronidazol em isolados clínicos brasileiros.

- Verificar a possível relação entre o gene *rdxA* e *frxA* de *H. pylori* a resistência a furazolidona em isolados clínicos brasileiros.



3- MATERIAL E MÉTODOS

1- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Linhagens bacterianas utilizadas

As amostras bacterianas utilizadas nesse trabalho foram obtidas apartir do banco de linhagens da Unidade integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco de Bragança Paulista. As oito amostras usadas, resistentes simultaneamente para metronidazol e furazolidona, foram selecionadas após os testes de susceptibilidade apartir de 13 isolados clínicos de pacientes que já tinham sido tratados com furazolidona, mas não erradicaram a bactéria.

1.1- Cultivo em meio sólido

As amostras mantidas à -70°C, foram reativadas através de inóculo em placas de Petri preparadas com meio Columbia ágar, suplementado com 10% sangue de carneiro desfibrinado, 6 µg/mL de vancomicina, 20 µg/mL de ácido nalidíxico, 10µg/mL de anfotericina B e 40 µg/mL de TTC. Os inóculos foram incubados a 37°C em condições microaerofílicas (12% CO₂) com 95% de umidade relativa por 3 dias.

1.2- Identificação de linhagens de *H. pylori*

A morfologia das bactérias obtidas em cultura foi observada ao microscópio óptico após coloração de Gram e as amostras que apresentaram morfologia característica para *H. pylori* foram confirmadas pela presença de atividade das enzimas urease e catalase.

Para o teste de urease, uma pequena quantidade do crescimento bacteriano obtido em placa, foi colocado em 3 mL de meio de uréia (uréia 2%, vermelho fenol 0,05%, azida sódica 0,002%; Probac, SP) e incubado a 37°C por 2 horas. Na presença da enzima urease, a uréia do meio é degradada formando amônia, que conseqüentemente, altera o pH do meio e a cor para rosa, devido ao indicador vermelho de fenol.

A atividade da enzima catalase foi analisada através da transferência de colônias bacterianas para um tubo transparente contendo aproximadamente 300µL de H₂O₂ 3% que quando degradado libera oxigênio observado pela presença de bolhas.

A amplificação por PCR do gene *glm*, específico da *H. pylori*, também foi utilizada na identificação da bactéria (ver adiante, Quadro I).

1.3- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de furazolidona e metronidazol

Para a determinação da concentração inibitória mínima foi utilizado o método gold standard de diluição em ágar (NCCLS, 1999). Para este método, placas de meio de cultura com ágar Mueller-Hinton (Merck) foram preparadas com a adição de diferentes concentrações dos antimicrobianos furazolidona e metronidazol de forma a construir uma escala logarítmica variando de 0,125 µg/mL até 256 µg/mL dos antimicrobianos, possuindo cada placa da seqüência o dobro da concentração da placa antecedente. Os isolados clínicos analisados foram reativados pelo cultivo em meio sólido (item 1.1) e os crescimentos obtidos em três dias foram transferidos para tubos tipo eppendorf com solução salina tamponada (PBS) para ajuste da densidade bacteriana pela comparação ao padrão visual 2 da escala de turbidez McFarland, aproximadamente 6×10^8 células por mL. Após este ajuste, 3µL de cada suspensão bacteriana, foram inoculados e incubados por três dias em condições pré- determinadas. A linhagem 26695 susceptível aos dois antibióticos com valores de CIM previamente determinados (0,5 µg/mL para metronidazol e 0,25 µg/mL para furazolidona), foi utilizada como controle. De acordo com a literatura, as linhagens que apresentaram CIM maiores que 2 µg/mL para furazolidona e >8µg/ml para metronidazol foram consideradas resistentes e selecionadas para avaliação do mecanismo molecular associado à resistência. O experimento foi feito por três vezes para confirmação dos resultados.

2- MÉTODOS GENÉTICOS

2.1- Obtenção de DNA

Após três dias de crescimento bacteriano, as colônias foram coletadas e ressuspensas em 1 mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ; EDTA 1 mM pH 8,0). Foram adicionados 30 µL de SDS a 10% e 0,01 g de proteinase K.

A suspensão foi incubada a 37°C durante 24 h, posteriormente foram acrescentados 400 µL de fenol clorofórmio isoamílico. A solução foi misturada por inversão e centrifugada 5 min a 13.000 rpm. O sobrenadante que se formou foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 400 µL de clorofórmio isoamílico, novamente a solução foi misturada por inversão e centrifugada. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a etapa foi repetida. Foram adicionados 600 µL de isopropanol e 100 µL de NaAc 3M e misturado cuidadosamente. O DNA foi coletado e lavado com 250 µL de etanol 70% gelado. O DNA foi passado para um novo tubo e foram adicionados 200 µL de TE 0,1%. As amostras foram incubadas a 37°C durante 15 min com a tampa aberta e 24 h com a tampa fechada.

O DNA extraído foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Aliquotas desse material foram misturadas a 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; Ácido bórico 89mM; EDTA 2mM pH 8,0) e submetida a uma voltagem de 100 V. Após 40 min o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5 µg/ml) por 20 min à temperatura ambiente e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta de onda curta. Para o registro definitivo dos resultados a imagem foi digitalizada por uma câmera Panasonic DNC- LC40.

2.2- Amplificação dos genes *glm*, *rdxA* e *frxA* por PCR

As PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo de 200 a 500 ng de DNA genômico, 25 pmol de cada iniciador (Quadro I), 200 µM de cada dNTP, 1,5% de MgCl₂, 2 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase (Gibco BRL) e tampão de reação para a enzima. Os genes *rdxA* e *frxA* amplificados, foram purificados com o Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, WI) seguindo as recomendações do fabricante.

O gene *glm* também foi amplificado com a finalidade de verificar se as linhagens utilizadas eram realmente de *H. pylori*. Os iniciadores utilizados aparecem descritos nos quadros 1 e 2.

Quadro 1- Sequências de nucleotídeos de *H. pylori* utilizados como iniciadores nas reações em cadeia da polimerase e tamanhos em pb do produtos da amplificação.

<i>Iniciadores</i>	5' → 3'	Produto (pb)	Referência
<i>glm</i> sense	AAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT	294	BICKLEY <i>et al.</i> , 1993
<i>glm</i> antisense	AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC		
<i>rdxA</i> sense	CGATCAGCCTGCCTTTAG	1150	JEONG <i>et al.</i> , 2000
<i>rdxA</i> antisense	AAGAGCGATTAAAACCATTC		
<i>frxA</i> sense	GCTTTACAGCACCAACGATTTG	614	JEONG <i>et al.</i> , 2000
<i>frxA</i> antisense	TAAATAACTTCTGTCTTCCAGCGG		

Quadro 2- Número de ciclos, tempos e temperaturas usados para cada iniciador nas reações de PCR.

<i>Iniciadores</i>	<i>Etapa Inicial</i>		<i>35 Ciclos</i>						<i>Etapa Final</i>	
	<i>Desnaturação</i>		<i>Desnaturação</i>		<i>Anelamento</i>		<i>Extensão</i>		<i>Extensão</i>	
	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)
<i>glm</i>	5	94	1	94	1	55	1	72	10	72
<i>fdxA</i>	5	94	1	95	1	48	1,5	72	7	72
<i>frxA</i>										

2.3- Transformação natural

A transformação natural é um processo no qual uma linhagem receptora de *Helicobacter pylori* incorpora o DNA ou um gene de uma bactéria doadora com determinada característica que se quer estudar pela simples adição do DNA ou gene em questão ao crescimento de uma linhagem padrão (26695).

A linhagem de *H. pylori* sensível 26695 (TOMB et al., 1997), foi inoculada em placas contendo Columbia ágar acrescidas com 10% de sangue de carneiro e incubadas durante dois dias em condições microaerofílicas. O crescimento foi repassado com Swab seco para novas placas em 11 spots, sendo oito usados para adição de 10µL de produto de PCR dos genes *rdxA* ou *frxA* das amostras doadoras resistentes à metronidazol e à furazolidona, um para o DNA genômico da linhagem sensível 26695 e 2 para adição de TE 1X. As placas foram incubadas durante 16h. Após esse período os spots foram transferidos para um tubo de 1,5ml contendo 1 ml de TE 1X [1 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA], estes então foram centrifugados por 2 min a 12000 rpm.

Descartou-se o sobrenadante, e adicionou-se 50 μ L de TE 1X nas bactérias precipitadas que então foram transferidas para placas com concentração 8 μ g/mL de metronidazol ou 2 μ g/mL de furazolidona, para a selecionar as bactéria que sofreram transformação. Como controles negativos foram usados: um spot com TE e um spot com DNA da linhagem 26695, repassados para placas com adição de antimicrobianos (8 μ g/mL de metronidazol ou 2 μ g/mL de furazolidona). Como controle positivo um spot com TE foi repassado para placa com Columbia ágar. As placas foram incubadas durante 10 dias sendo inspecionada a partir do 4º dia.

Os resultados só foram considerados quando os controles negativos, não apresentaram crescimento e o controle positivo apresentou um denso crescimento. Cada experimento foi transferido três vezes para confirmação dos resultados. As bactérias transformadas formaram colônias isoladas que foram cultivadas e estocadas a – 70 C. Após um período de congelamento essas linhagens resistentes foram reativadas para a comparação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos com a das linhagens originais.

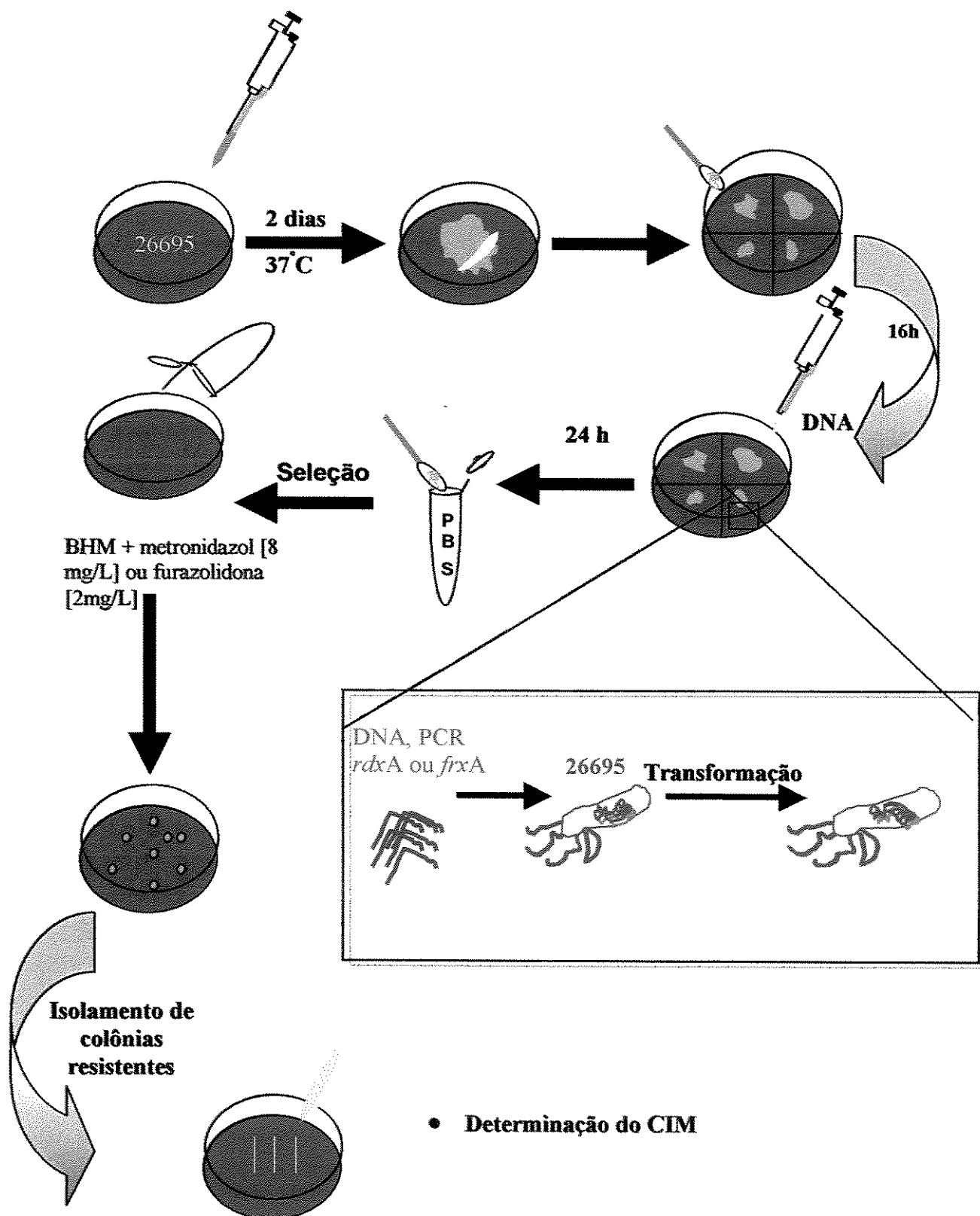
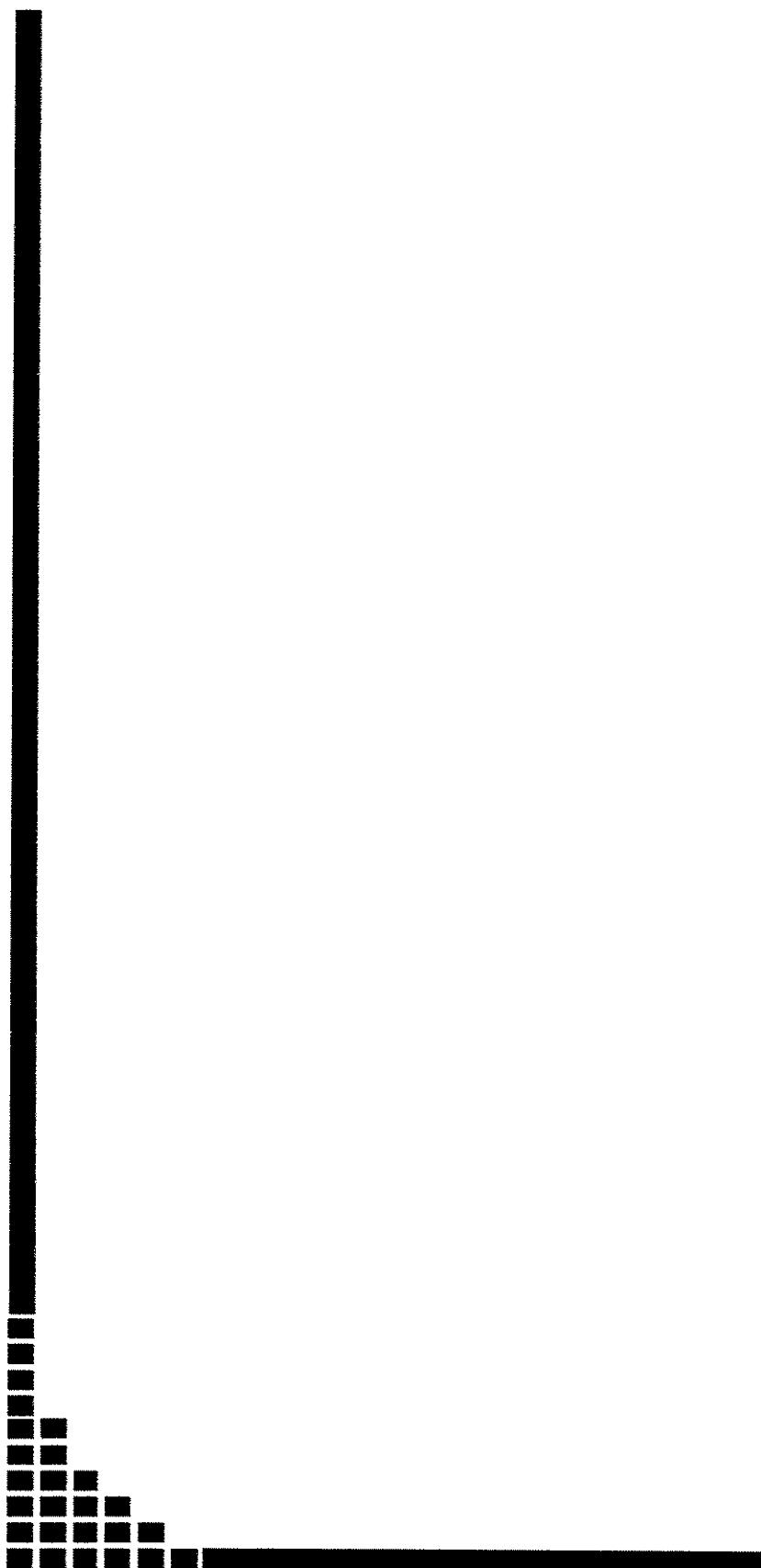


Figura 5- Desenho esquemático da transformação natural da linhagem 26695 de *H. pylori*.



4- RESULTADOS

1- MICROBIOLÓGICOS

As concentrações inibitórias mínimas de metronidazol e furazolidona para as amostras de *H. pylori* foram determinadas através do método de diluição em ágar (NCCLS, 1999). As linhagens selecionadas apresentaram padrões diferentes de resistência para cada antibiótico (Quadro III). Foram utilizados 13 isolados clínicos de pacientes que já tinham sido tratados com furazolidona, mas não erradicaram a bactéria, destes, foram selecionadas oito amostras, resistentes simultaneamente para metronidazol e furazolidona (Em azul no quadro 3).

Quadro 3- Valores em µg/mL das concentrações inibitórias mínimas de metronidazol e furazolidona

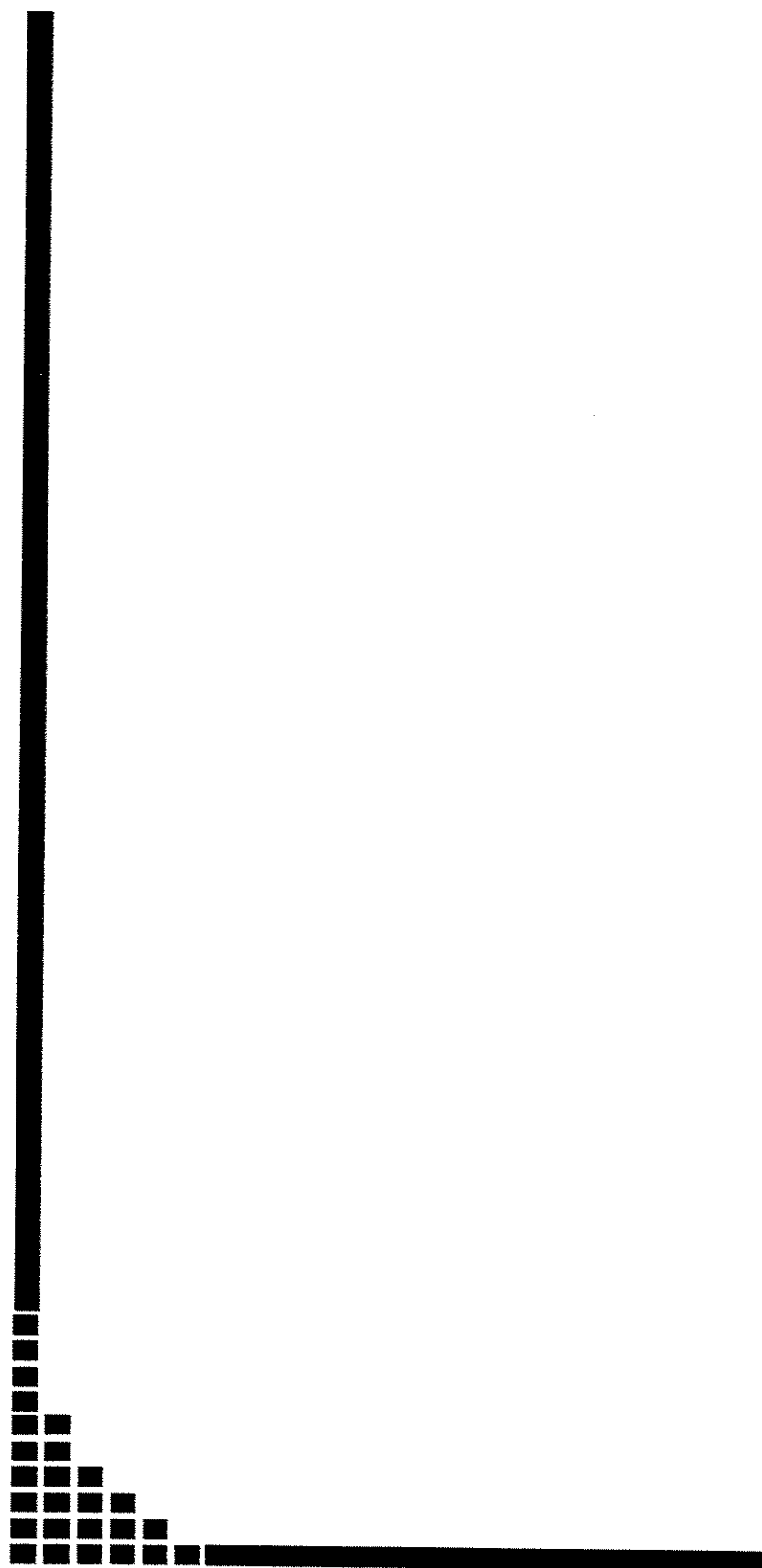
Amostras	metronidazol	furazolidona
BH13	>64	8
BH27	>64	32
551	16	1
552	32	>64
637	16	32
638	>64	8
640	8	1
642	32	0,5
644	16	16
646	8	0,5
664	32	64
702	16	0,5
707	8	16
linhagem 26695	0,5	0,25

2- TRANSFORMAÇÃO NATURAL

No experimento de transformação natural feito com a linhagem receptora 26695 mais o produto de PCR do gene *rdxA* e selecionado em placas com concentração 8 µg/mL de metronidazol, foram obtidos seis transformantes apartir dos genes das oito amostras doadoras resistentes utilizadas nesse trabalho (amostras 664 e 707 não transferiram resistência). No experimento, feito com a linhagem receptora 26695 mais o produto de PCR do gene *rdxA* e selecionado em placas com concentração 2 µg/mL de furazolidona, nenhuma colônia foi observada.

Os experimentos de transformação natural feitos com linhagem receptora 26695 mais o produto de PCR do gene *frxA*, não foram obtidos transformantes resistentes tanto para metronidazol como para furazolidona.

Cada experimento foi repetido por mais duas vezes e os mesmos resultados foram obtidos. Os valores de CIM dos transformantes selecionados foram idênticos aos observados nas linhagens originais para metronidazol e demonstrou um aumento de MIC para furazolidona (0,25 para 1 µg/ml).



5- DISCUSSÃO

Metronidazol foi largamente utilizado como componente crítico de regimes terapêuticos triplos para a infecção de *H. pylori*. Porém esses regimes se tornaram inviáveis devido às altas taxas de resistência a esse antibiótico em todo mundo. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, as taxas de resistência para metronidazol chegam a 42% (MENDONÇA *et al.*, 2000).

A resistência para metronidazol resulta da mutacional inativação do gene *rdxA*, que codifica uma nitroredutase NADPH e não da aquisição de genes externos de resistência, ao contrário do que ocorre em outras espécies nos mecanismos de resistência a outros antibióticos. O surgimento de linhagens resistentes a metronidazol a partir de linhagens sensíveis, geralmente ocorre devido a novas mutações ao invés da aquisição de alelos mutantes de outra linhagem já resistente (GOODWIN *et al.*, 1998).

Nitrorredutases de outros organismos são classificadas como sensível ou insensível ao oxigênio, baseado se os substratos são reduzidos a partir de uma ou duas transferências de elétrons respectivamente. Quando a redução do grupo nitro ocorre com a transferência de um elétron produz radicais ânions nitro que, em presença de oxigênio, geram ânions de superoxide e regeneram o grupo nitro. Isso sugere que aeróbios e anaeróbios facultativos são resistentes ao metronidazol devido às condições aeróbicas de redução que levam à regeneração do metronidazol a sua forma original que não é tóxica. O crescimento de linhagens *H. pylori* sensíveis não é afetado por diferentes condições de oxigênio, isto sugere que em bactérias microaerofílicas, uma transferência de elétrons provavelmente não envolve a redução do metronidazol. Esta interpretação é suportada pelo fato de uma nitroredutase insensível ao oxigênio ser responsável pelo fenótipo sensível da *H. pylori* (GOODWIN *et al.*, 1998).

Microaerofílicos em geral são susceptíveis ao metronidazol e dispõe de padrões de resistência similar ao da *H. pylori*, sugerindo que homólogos de *rdxA* podem ser achados em outras espécies.

Tipicamente as bactérias contêm diferentes nitroredutases incluindo redutases flavinas e ferredoxinas que podem exibir uma atividade nitroredutase. Um homólogo de *rdxA* que teve 25% de seu índice de proteínas identificado é o gene *frxA* que codifica uma

flavina redutase NAD(P)H. Observações anteriores sugeriram que *frxA* não contribui significativamente para o fenótipo resistente ou sensível ao metronidazol mas que talvez *FrxA* ou outras redutases flavinas ou ferredoxinas, contribuam para a ativação de metronidazol em condições anaeróbicas (GOODWIN et al., 1998).

O metronidazol foi largamente usado no tratamento de bactérias e protozoários e geralmente as dosagens utilizadas nos regimes que inibem o crescimento bacteriano selecionam mutantes resistentes mas não erradicam o organismo. Dado a formação de hidroxila, um potente mutagênico pela nitrorredutase *RdxA*, foi sugerido que muitas das mutações encontradas nas linhagens resistentes foram induzidas pela terapia com metronidazol e que elas não tiveram origem espontânea. Essa mutagenicidade do metronidazol pode também acelerar o desenvolvimento da resistência para outros antibióticos clinicamente importantes como a claritromicina (GOODWIN et al., 1998; Sisson et al., 2000). O acúmulo de hidroxila na mucosa gástrica quando o metronidazol é usado e reduzido pelas linhagens sensíveis é de grande importância já que a infecção por *H. pylori* é tida como fator de risco para o câncer gástrico (GOODWIN et al., 1998).

A alta taxa de resistência e a mutagenicidade estimularam o interesse em drogas alternativas, como nitrofuranos e nitrotiazoles que possuem resistência incomum em *H. pylori*. No Brasil, a furazolidona passou a ser recomendada agente alternativo na terapia de erradicação dessa bactéria (Sisson et al., 2000).

A furazolidona tem espectro de atividade e mecanismo de ação dependente do potencial de redução de seu grupo 5 - nitro que varia de - 250 a -270 mV e pode ser ativado por várias enzimas incluindo as nitrorredutases NAD(P)H de bactérias entéricas, enquanto que o metronidazol só é ativado por sistemas enzimáticos geradores de um potencial de redução muito baixo (- 480 mV) (Sisson et al., 2002).

A furazolidona e o metronidazol são classificados como compostos nitroeterocíclicos ou nitroaromáticos. Os modos de ação dessas drogas são similares requerendo uma nitrorredução para sua ativação, porém os mecanismos de resistência a essas drogas requerem mutações em diferentes nitrorredutases (JEONG et al., 2001).

Algumas linhagens estudadas para resistência a metronidazol apresentaram também resistência a furazolidona e nitrofuratoín, o que sugeriu que as nitrorredutases RdxA e FdxA poderiam contribuir na ativação dessas drogas. Entretanto, linhagens construídas em laboratório, com os genes *rdxA* e *fdxA* inativados não apresentaram resistência a furazolidona, indicado assim que a mutação outros genes seriam necessárias (SISSON et al., 2002).

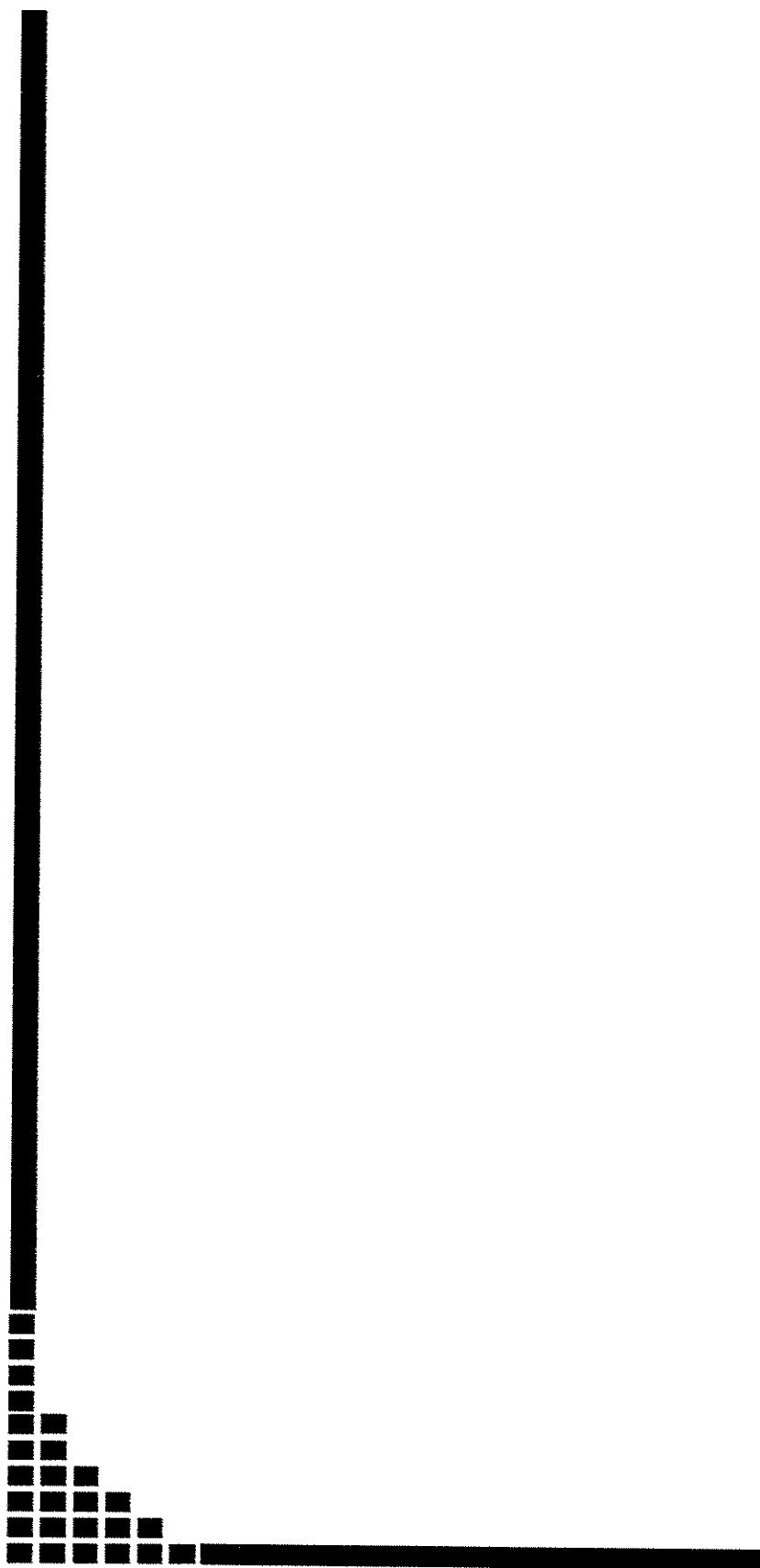
Nesse trabalho foi obtido sucesso de transformação natural em dois diferentes produtos de PCR do gene *rdxA* quando o metronidazol foi usado para selecionar colônias resistentes. Depois de três diferentes análises, duas amostras (664 e 707) não transferiram resistência. A concentração inibitória mínima de metronidazol para os transformantes foi igual à de suas amostras doadoras.

Uma análise de seqüenciamento dos produtos de PCR de transformante e sua amostra doadora original poderão demonstrar possíveis diferenças de padrões de mutação.

O gene *frxA* sozinho não foi capaz de transformar a linhagem sensível 26695, usada como linhagem receptora nesse trabalho, confirmando em amostras brasileiras que esse gene não é responsável pela resistência a metronidazol.

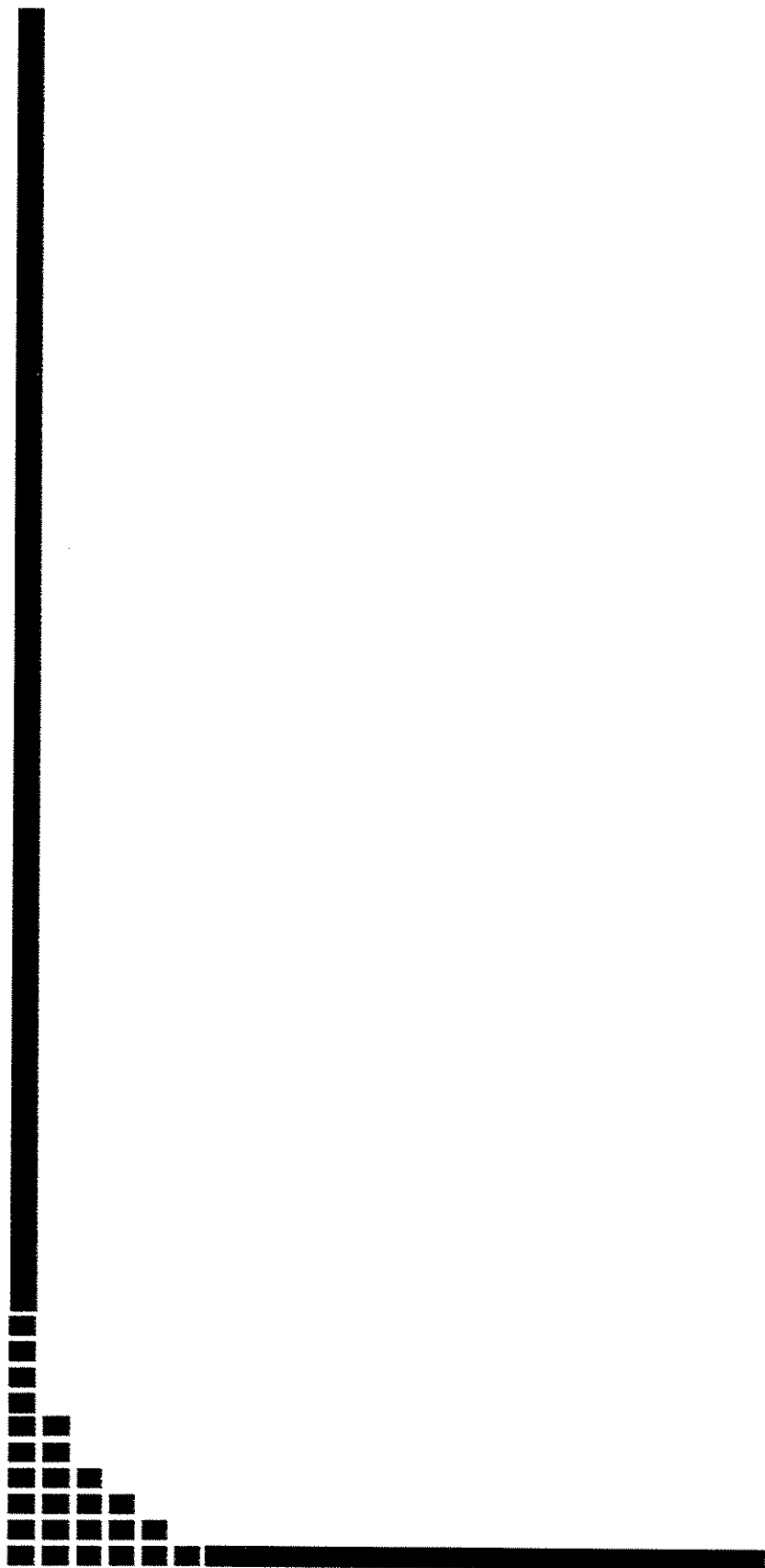
Não foi obtido nenhum transformante 26695 resistente a furazolidona usando o método de transformação natural. Esse resultado sugere que os genes *rdxA* e *frxA* não são responsáveis pela resistência à furazolidona em isolados clínicos brasileiros.

Os resultados desse trabalho, com a transformação natural de uma linhagem sensível, confirmam conclusões prévias de outros autores (GOODWIN et al., 1998; KWONG et al., 2001; KWONG et al., 2001; SISSON et al., 2002). A transformação natural demonstrou que o gene *rdxA* de linhagens resistentes é a principal causa da aquisição de resistência ao metronidazol, que o gene *frxA* por si só não é capaz de conferir resistência ao metronidazol e que esses genes apesar de influenciarem o CIM, não estão relacionados à resistência ao nitrofurano furazolidona.



6- CONCLUSÃO

- O gene *rdxA* de *H. pylori* é o principal responsável pela resistência da bactéria ao metronidazol.
- O gene *frxA* de *H. pylori* por si só não é capaz de conferir a resistência da bactéria ao metronidazol.
- Os genes *rdxA* e *frxA* não estão envolvidos na resistência da *H. pylori* à furazolidona.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, T.; DOMINGO, D.; PRIETO, N.; LOPEZ-BREA, M. Clarithromycin resistance stability in *Helicobacter pylori*: influence of the MIC and type of mutation in the 23S rRNA. **J. Antimicrob. Chemother.**, 46: 613-616, 2000.

ALM, R. A.; LING, L. S.; MOIR, D. T.; KING, B. L.; BROWN, E. D.; DOIG, P. C. et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, 397: 176-180, 1999.

ALM, R. A.; TRUST, T. J. Analysis of the diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. **J. Mol. Med**, 77 (12): 834-846, 1999.

ANDERSEN, L. P.; ELSBORG, L.; JUTESSEN, T. *Campylobacter pylori* in peptic ulcer disease II. Edoscope findings and cultivation *C. pylori*. **Scand. J. Gastroenterol.**, 23: 60-767, 1988.

ANSORG, R.; VONHEINEGG, E. H.; VONRECKLINGHAUSEN, G. Can owner's risk of acquiring a *Helicobacter pylori* infection. **Zentralbl. Bakteriol. Int. Med. Microbiol. Vir. Parastol. Infect. Dis.**, 283: 22-126, 1995.

ARCHER, J. R.; ROMERO, S.; RITCHIE, A. E.; HAMACHER, M. E.; STEINER, B. M.; BRYNER, J. H.; SCHELL, R. F. Characterization of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 101-105, 1988.

AXON, A. T. R. Are all *Helicobacters* equal? Mechanisms of gastroduodenal pathology and their clinical implications. **Gut**, 45(1): 11-14, 1999.

BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J. Clin. Invest.** 113(3): 321-333, 2004.

BODE, G.; ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H. e ADLER, G. Pets are not a risk for *Helicobacter pylori* infection in young children – results of a population based study in southern German. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 17: 909-912, 1998.

BORHAM- MANESH, F.; FARNUM, J. B. Study of *Helicobacter pylori* colonization of patches of heterotopic gastric mucosa (HGM) at the upper esophagus. **Dig. Dis. Sci.**, 38: 142-146, 1993.

CARVALHAES, A.; MAGALHÃES, A. F. N.; CORDEIRO, F. 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.

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

CHAN, W. Y.; HUI, P. K.; LEUNG, K. M.; CHOW, J.; KWOK, F.; NG, C. S. Cocoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 102: 503-507, 1994.

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

COVACCI, A.; TELFORD, J. L.; DEL GIUDICE, G.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**, 284:1328-1333, 1999.

COVER, T. L.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* : A bacterio of, peptic ulcer disease, and gastric cancer. **Am. Soc. Microbiol. News**, 61: 21- 26, 1995

COVER, T. L.; BLASER, M. J. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **J. Biol. Chem.**, 267(15): 10570-10575, 1992.

COVER, T. L.; DOOLEY, C. P.; 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.

CUTLER, A. F.; HAVSTAD, S.; MA, C. K.; BLASER, M. J.; PEREZ-PERES, G. I.; SHUBERT, T. T. Accuracy of invasive and non invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, 109:136-141, 1995.

DEBETS- OSSENKOPP, Y. J.; Pot, R. G.; VAN WESTERLOO, D. J.; GOODWIN, A.; VANDERBROUKE- GRAAULS, C. M.; BERG, D. E.; HOFFMAN, P. S. ; KUSTERS, J. G. Insertion of mini- IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase(*rdxA*) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 43: 2657- 2662, 1999.

DORE, M. P.; BILOTTA, M.; VAIRA, D.; MANCA, A.; MASSARELLI, G.; LEANDRO, G.; ATZEL, A.; PISANU, G.; GRAHAM D. Y.; REALDI, G. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. **Dig. Dis. Sci.**, 44:1161-1164, 1999 a.

DORE, M. P.; OSATO, M. S.; REALDI, I. M.; GRAHAM, D. Y.; SEPULVEDA, A. R. Amoxycillin tolerance in *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob. Chemother.** 43: 47-57, 1999 b.

DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clin Microbiol. Rev.**, 10: 720-741, 1997.

ECCLISSATO, C.; MARCHIORETTO M. A. ; MENDONÇA, S.; GODOY, A. P. GUERSONI, R. A. ; PIOVESAN, H.; FERRAZ, J. G.; PEDRAZZOLI, J. Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. **Helicobacter**, 7:53-59, 2002.

GERRITS, M. M.; ZOETE. M. R.; ARENTS, N. L.; KUIPERS, E.J.; KUSTERS, J. G. 16S rRNA mutation mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 46: 2996-3000, 2002.

GLUPCZYNSKI, Y. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: A global overview. **Acta Gastroenterol.**, Belg. 61: 357- 366, 1998.

GLUPCZYNSKI, Y.; MAGAUD, F.; LOPEZ- BREA, M.;ANDERSEN, L. P. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 20: 820-823, 2001.

GOLD, B. D. Gastroduodenal disease and helicobacter pylori: Pathophysiology, diagnosis and treatment. In: WESTBLOM, T. V.; CZINN, S.J. e MEGAUD, J. G. **Pediatric *Helicobacter pylori* infection: Clinical manifestations, diagnosis and therapy**. Alemanha: Springer,1999. p. 71-102.

GOODWIN, A.; HOFFMAN, S.; BERG, D. E. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA*(HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.**, 182:5082- 5090, 2000.

GOODWIN, A.; KERSULYTE, D.; SISSON, G.; VELDHUYEN VAN ZANTEN, S. J. O.; BERG, D. E.; HOFFMAN, P. S. Metronidazole resistance in *Helicobacter Pylori* is due to null mutations in gene (*rdxA*) that encodes an oxygen- insensitive NADPH nitroreductase. **Mol. Microbiol.**, 28:383-393, 1998.

GÖTTKE, M. U.; FALLONE, C. A.; BRKUN, A.N.; VOGT, K.; LOO, V.; TRAUTMANN, M. et al. Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: Influence of clinical background and geographic origin of isolates. **J. Infect. Diseases**, 181: 1674-1681, 2000.

GRAHAM, D. Y.; MALATY, H. M.; EVANS, D. G.; EVANS, J. J.; KLEIN, P.D.; ADAM, E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in a asymptomatic population in the U. S. Effect of age, race, and socioeconomic status. **Gastroenterology**, 100: 1495-1501, 1991.

HOFFMAN, P. S.; GOODWIN,A.; JOHNSON,J.; MAGEE,K.; VELDHUYZEN VAN ZANTEN, S. J. O. Metabolic activities of metronidazole sensitive and resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. **J. Bacteriol.**, 178:4822- 4829, 1996.

HUGHES, N. J.; CHALK, P. A.; CLAYTON C. L.; KELLY, D.J. Identification of carboxylation enzymes and characterization of of a novel four- subunit pyruvate: favodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori* . **J. Bacterol.**, 177: 3953-3959, 1995.

HUGHES, N. J.; CLAYTON, C. L.; CHALK, P. A.; Kelly, D.J. *Helicobacter pylori* porCADB and oorDABCgenes encode distinct pyruvate: flavodoxin and 2- oxoglutarate: acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. **J Bacteriol.**, 180:1119-1128, 1998.

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

HULTEN, K.; ENROTH, H.; NYSTROM, T.; ENGSTRAND, L. Prevalence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. **J. Appl. Microbiol.**, 85:282-286, 1998.

JEONG, J. Y.; MUKHOPADHYAY, A.K.; AKADA, J. K.; DAIDILIDIENE,D.; HOFFMAN, P. S.; BERG, D. E. Roles of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. **J. Bacteriol.**, 183: 5155- 5162, 2001.

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

KWON, D. H.; EL ZAATARI,A. F.; KATO, M.; OSATO, REDDY, R.; YAMAACA,Y.; GRAHAM, D. Y. Analysis of *rdxA* and envolviment additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*FrxA*) and ferodoxin like protein (*frxB*) in metronidazol resistance of *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial. Agents Chemother.**, 44:2133-2142, 2000.

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

- LEE, A. The evangelism of *Helicobacter pylori*: How to convince the non believers and curb the believers. **Zbl Bkt.**, 280: 7-10, 1993.
- LEUNG, W. K.; SIU, K. L.; KWOK, C. K. L.; CHAN, S. Y.; SUNG, R.; SUNG, J. J. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro oral transmiton. **Am. J. Gastroenterol.**, 94: 2881-2884, 1999.
- LEUNK, R. D.; JOHNSON, P. T.; DAVID, B. C. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.**, 26: 93-9, 1988.
- LIN, L. F.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J.; KONG, H. Comparative genomics of the restriction modification sytems in *Helicobacter pylori*. **PNAS**, 98(5): 2740-2745.
- LIN, S. K.; LAMBER, J.R.; SCHENBRI, M. A.; NICHOLSON, L.; KORMAN, M. G. *Helicobacter pylori* prevalece in endoscopy and medcal staff. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 9: 319-324, 1994.
- LINDEMARK, D. G.; MULLER, M. Antimicrobial action, mutagenicity and reducion of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicob. Agets Chemother.**, 10: 476-482, 1976.
- LIVERMORE, D. M. Beta lactamasesin laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbial. Rev.**, 8: 557-584, 1995.
- MALATY, H. M.; GRAHAM, D. Y.; WATTIGNEY, W. A.; SRINIVASAN, S. R.; OSATO, M.; BERENSON, G. S. Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: 12 year followup cohort study in a biracial community. **Clin. Infect. Dis.**, 28: 279-282, 1999.
- MALATY, H. M.; KUMAGAI, T.; TANAKA, E.; OTA, H.; KIYOSAWA, K.; GRAHAM, D. Y.; KATSUYAMA, T. Evidence from a nine year birth cohort study in Japan of transmission pathways of *Helicobacter pylori* . **J. Clin. Microbiol.**, 38: 1971-1973, 2000.
- MC CALLA, D. R.; REWVERS, A.; KAISER, C. and M. H. L. Green, Genetics of nitrofurazone resistance in *Eschirichia coli*. **J. Bacteriol.**, 133: 10- 16,1978.

MC CALLA, D. R.; REWVERS, A.; KAISER, C. Mode of action of nitrofurazone. **J. Bacteriol.**, 104: 1126- 1134, 1970.

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

MCNULTY, C. A.; DENT, J. C. Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pylori* to twenty one antimicrobial agents. **Eur J. Clin Micorbiol**, 7: 566-569, 1988.

MEGRAUD, F. Transmission of *Helicobacter pylori*- faecal- oral versus oral- oral route. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 9: 85-91, 1995.

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

MENDZ, G. L.; Hazell, S. L.; VAN GORKOM, L. Piruvate metabolism in *Helicobacter pylori*. **Archives of Microbiology**, 162: 187- 192, 1994.

MITCHELL, H. M. Epidemiology of infection. In: MOBLEY, H. L. T.; MENZ, G. L. e HAZELL, L. **Helicobacter pylori physiology and genetcs**. Washington. DC: ASM Press, 2001. p. 7-17.

MOBLEY, H. L. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. **Gastroenterology**, 113:S21-28, 1997.

NARAYANASAMI, R. P.; Horowitz, M.; Masters, B. S. S. Flavin- binding and protein structural integrity stidies on NADPH- cytochrome P450 redutaseare consistent with the presence of distinct dominains. **Arch. Biochem. Biophys.**, 316: 267- 274, 1995.

NCCLS: Methods for dilution. Antimicrobial Susceptibility Test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. 5a Ed. Wayne, Pennsilvania: NCCLS document M7-A5; 1999.

- NGUYEN, V. Q.; CAPRIOLI, R. M.; COVER, T. L. Carboxyl terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **Infect. Immun.**, 69: 543-546, 2001.
- NIVIERE, V.; Fieschi, F.; Decont, J. L.; M. Fontecave. Is the NAD(P)H: flavin oxoreductase from *Escherichia Coli* a member of the ferredoxin NADP reductase family? **J. Biol. Chem.**, 271:16656- 16661, 1996.
- OKAMOTO, T.; YOSHIYAMA, H.; NAKAZAWA, T.; PARK, I. D.; CHANG, W.; YANI, K.; SHIRAI, M. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 50: 849-856, 2002.
- PARSONNET, J.; SHMUEL, Y. H.; HAGGERTY, T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. **JAMA**, 282: 2240-2245, 1999.
- PAUL, R.; POTIUS, S.; MELCHERS, K.; SCHAFER, K. P. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes *rdxA* and *pbpI* cause resistance against metronidazole and amoxicillin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45:962-965, 2001.
- PETERS, D. H.; CLISSOLD, S. P. Claritromicin a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. **Drugs**, 44: 117-164, 1992.
- PHADNIS, S. H.; ILVER, D.; JANZON, L.; NORMARK, S.; WESTBLOM, T. U. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, 62:1557-1565, 1994.
- SASAKI, K.; TAJIRI, Y.; SATA, M.; FOJIL, Y.; MATSUBARA, F.; ZHAO, M. G.; SHIMIZU, S.; TOYONAGA, A.; TANIKAWA, K. *Helicobacter pylori* i the natural environment. **Scand. J. Infect. Dis.**, 31:275-280, 1999.
- SCHIMTT, W.; HAAS, R. Genetic analylis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: strutral similarities with the IgA protease tipe of exported protein. **Mol. Biol.**, 12(2): 307-319, 1994.

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

SISSON, G.; GOODWIN, A.; RAUDONIKIENE, A.; HUGHES, N. J.; MUKHOPADWAY, A. K.; BERG, D. E.; HOFFMAN, P. S. Enzymes associated with reductive actions and action of nitazoxanide, Nitrofurans, and Metronidazole in *Helicobacter Pylori* : Antimicrobial, Agents and Chemotherapy, Bethesda, v. 46, n. 7, p. 2116- 2123, 2002.

SMITH, M. A.; Edwards, D.I. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter Pylori* to nitroheterocyclic drugs. **J. Antimicrob. Chemother.**, 35: 751- 764, 1995.

TAYLOR, D. N.; e PARSONNET, J.; Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. In: BASER, M. J.; SMITH, P. F. RAVDIN, J.; GREENBERG, H.; e GUERRANT, R. L. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, 1995. p. 551-564.

THOMAS, J. E.; GIBSON, G. R.; DARBOE, M. K.; DALE, A.; WEVER, L. T. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **Lancet**. 340: 1194-1195, 1992.

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

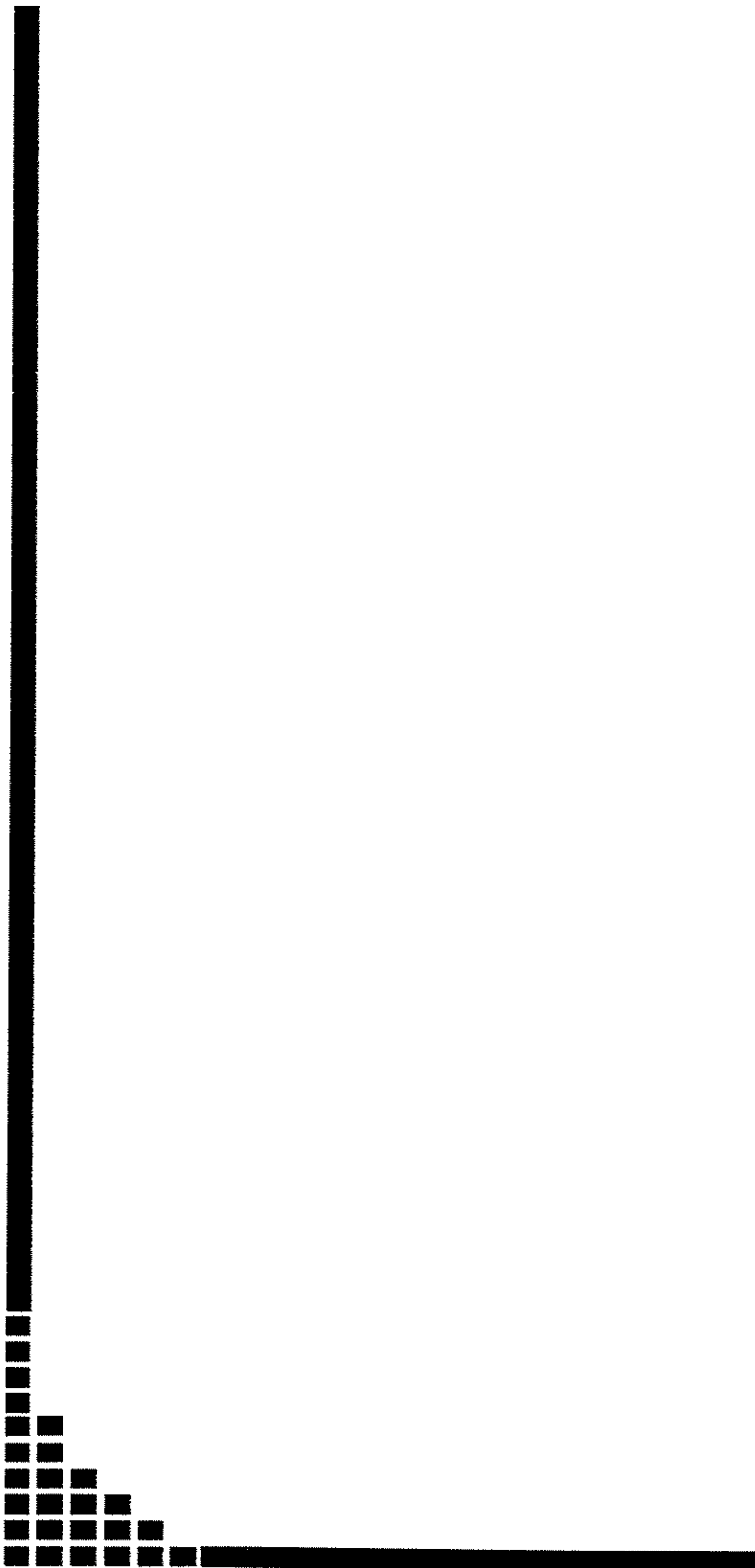
TOWNSON. S. M.; Boreham, P.F.L.; Upcroft, J. A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta tropica**, 56: 173- 194, 1994.

TU, Y.; McCalla, D. R. Effect of activated nitrofurans on DNA. **Biofys. Acta**, 402: 142-149, 1975.

VAROLI, O.; LANDINI, M. P.; LAPLCA, M.; TUCCI, A.; CORINALES, R.; PAPARO, G. F.; STANGHELLINI, V.; BABARA, L. Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. **Am. J. Gastroenterol.**, 86: 249, 1991.

WESTBLOM, T. U.; MADAN, E.; GUDIPATI, S.; MIDKIFF, B. R.; CZINN, S.J. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult and pediatric patients by using Pyloriset, a rapid latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 96-98, 1992.

WHITEWAY, J.;KOZIARZ, P.; Veall, J.;Sadhu, N.; Kumar, P.;Roecher , B.;Lambert, I. B. Oxygen insensitive nitroreductase: analysis of the roles of *nsfA* and *nsfB* in developed of resistance to 5- nitrofuram derivatives in *Eschirichia coli*. **J. Bacteriol.**, 180: 5529- 5539, 1998.



8- ANEXO

The *rdxA* gene is involved with the increase of MIC level for furazolidone in Brazilian *H. pylori* clinical isolates

1 - Artigo submetido: Annals of clinical microbiology and antimicrobials

Yune H. B. Benvengo¹, Lea Vitiello¹, Anita P. O. Godoy¹, Marcelo L. Ribeiro¹, Sergio Mendonça¹, Ronilson A. Moreno² and José Pedrazzoli Jr^{1}*

¹ Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil. ² Farmacology department, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Yune H. B. Benvengo – yune@helicobacter.com.br

Lea Vitiello – lea@helicobacter.com.br

Anita P. O. Godoy – anita@helicobacter.com.br

Marcelo L. Ribeiro – marceloribeiro@saofrancisco.edu.br

Sergio Mendonça - sergiomendonca@saofrancisco.edu.br

Ronilson A. Moreno – moreno@sincrofar.com.br

José Pedrazzoli Jr – dexter@mpc.com.br

* Correspondence: Dr. José Pedrazzoli Júnior

Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit

São Francisco University Medical School

Av. São Francisco de Assis, 218

12916-900, Bragança Paulista, SP, Brazil

E-mail: dexter@mpc.com.br

ABSTRACT

Most *Helicobacter Pylori* strains are susceptible to metronidazole, and this consideration stimulated interest in alternative drugs, especially those against which resistance may be uncommon in *H. pylori*, as the furazolidone.

The fact of these drugs showed similar mechanisms of action and of the resistant strains for furazolidone had been simultaneous resistant for metronidazole suggests that the resistance mechanism may be related. To verify the involvement of *rdxA* and *frxA* genes with resistance to metronidazole and furazolidone we used natural transformation with PCR products of eight Brazilian clinical isolates, simultaneous resistant to these two drugs. Our results showed that total metronidazole resistance are associated with *rdxA* gene, but not *frxA* alone, and suggest the involvement of *rdxA* gene in increased level of furazolidone minimum inhibitory concentration (MIC).

INTRODUCTION

Helicobacter pylori infection is one of the most common infections worldwide and recognized as the major cause of peptic ulcer disease, risk factor for gastric adenocarcinoma and primary gastric lymphoma (1, 2).

Metronidazole is a nitroimidazole prodrug that is often used in combination therapies against this microaerophilic bacterium (3,4). However, metronidazole is highly mutagenic (5, 6) and resistance to this drug is very common, with range from 10% in Japan to 90% in India, and up to 33% in Western Europe (7). These geographic differences probably reflect frequencies of MTZ use against other, mostly parasitic and anaerobic infections (8). These results stimulated the use of alternative drugs to eradicate *H. pylori*. In Brazil, where the level of resistance for metronidazole was detected in 42% of clinical isolates, the nitrofurantoin furazolidone passed to be one of the component therapies (level of 4% resistance) (9).

Metronidazole and furazolidone are classified as nitroheterocyclic and nitroaromatic compounds, hence the modes of drug action are similar and nitroreduction is required for these activation. However the mechanism of resistance to metronidazole and furazolidone seems to be different (10).

The mechanism of metronidazole resistance among *H. pylori* strains has been related to alterations in gene products having metronidazole nitroreductase activity, like the oxygen insensitive NAD(P)H nitroreductase (RdxA), and NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) (5, 11, 10). However, FrxA does not contribute significantly to metronidazole resistance, but collaborate with the activation of metronidazole under anaerobic conditions. In spite of some *H. pylori* strains showed simultaneous resistance to furazolidone and metronidazole, *frxA* and *rdxA* knockout mutations constructed in laboratory reference strains are not resistant to furazolidone, which indicates that mutations in others genes were also need for resistance (12). Due to *H. pylori* diversity, with different genotypes predominating around the world, and the few clinical isolates resistant to both antimicrobials, furazolidone and metronidazole, none of them from Brazil, we used natural transformation with PCR products of genes *rdxA* and *frxA* from eight Brazilian clinical isolates, simultaneous resistant to these drugs, to verify the possible involvement of this genes with metronidazole and furazolidone resistance.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *H. pylori* bacteria used in this study were eight metronidazole and furazolidone Brazilian clinical isolates, previous obtained from Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit of Sao Francisco University Medical School, Bragança Paulista, S.P; and one reference strain (26695), whose complete genome DNA sequences have been determined (13,14). *H. pylori* were routinely growth on Columbia Agar plates supplemented with 5% sheep blood (BBV, Campinas, Brazil), 6µg/ml vancomycin (Sigma Aldrich Chemie, St. Louis, MO, USA) 10µg/ml amphotericin B (Sigma Aldrich Chemie) 40µg/ml triphenyl tetrazolium chloride (Sigma Aldrich Chemie). Plates were incubated at 37° C in a microaerophilic atmosphere for 3 days.

Determination of MIC. The MICs for metronidazole and furazolidone were determined by agar dilution method in triplicate, using twofold increments (0,125 to 64µg/ml) in Mueller Hinton agar (Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% sheep blood, incubated at 37° C under microaerophilic conditions. The isolated were

considered resistant when the MIC was $> 8\mu\text{g/ml}$ to metronidazole and $> 2\mu\text{g/ml}$ to furazolidone.

PCR. Primers of *rdxA* 5'CGATCAGCCTGCCTTTAG3' and *frxA* 5'GCTTTACAGCACCAACGATTTG3' for amplification were based on the full genome of 26695 strain plus other entries in public database. PCR was performed in automated thermal cycler (Applied Biosystems) in a final volume of 50 μl out through 35 cycles, consisting a denaturation step of 94° C for 5 sec, a primer annealing step of 48° C for 1sec and extension step at 72 ° C for 7sec. An 1150 pb for *rdxA* and 614pb for *frxA* fragment was purified with Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, WI, USA).

Natural Transformation. *H. pylori* transformants were created by natural transformation of 26695 susceptible strain added by *rdxA* or *frxA* PCR products from 8 resistant strains. As control, bacteria were transformed with TE (10mM Tris- HCL [pH 8,0], 1mM EDTA) instead of 26695 total DNA. Transformants were selected on agar plates containing 8 $\mu\text{g/ml}$ of metronidazole or 2 $\mu\text{g/ml}$ of furazolidone. This assay were repeated as a triplicate.

RESULTS

MICs of metronidazole and furazolidone

Minimal inhibitory concentrations (MICs) of metronidazole and furazolidone were determined by agar dilution method (15) in 8 previously isolated *H. pylori* from patients that had already been treated with furazolidone, but without eradication. They showed different levels of resistance to each prodrug (Table 1). **26695 transformants.** We used natural transformation with PCR products of selected genes to verify transmission of drug resistance. This was based on findings that determinants of resistance can be transferred to susceptible strains by transformation (16). In this study we obtained 26695 MTZ^R transformants only to *rdxA* PCR product from 6 original isolates. The *rdxA* and *frxA* PCR products from all isolates were not able to transform 26695 to furazolidone resistance strain. The MIC of 26695 *rdxA*-MTZ^R transformants was tested to metronidazole and furazolidone. The MIC of transformants was exactly the same of original *rdxA* donor isolates for metronidazole, and surprisingly 1 $\mu\text{g/ml}$ for furazolidone.

DISCUSSION

The relative importance of the *frxA* and *rdxA* nitroreductase genes of *Helicobacter pylori* in metronidazole susceptibility had been controversial until the study of, that finally associated it with the inactivation of *rdxA* alone or both *rdxA* and *frxA*, depending on bacterial genotype, but rarely, if ever, inactivation of *rdxA* alone (8).

This study included only one South American clinical isolate from Peru, and did not represent the diversity of *H. pylori* possible influenced by large scale use of antibiotics by population. In our previous works (9) we found 8 clinical isolates from patients that do not eradicated bacteria with furazolidone-tetracycline based therapy. Interestingly, all of them were metronidazole resistant too, and we try to transfer PCR products of *rdxA* or *frxA* genes from resistant isolates to susceptible 26695, looking for furazolidone or metronidazole resistant colonies.

Our results showed successfully natural transformation only from 6 different *rdxA* PCR products, when metronidazole was used for resistant colonies selection. After 3 different assays, the remained two isolates (664 and 707) do not transfer resistance. The MIC level from these transformants was exactly the same obtained from original donors, but showed differences with each other. Future sequencing analysis of each PCR product looking for different mutation patterns possible will explain the differences.

The *frxA* PCR product alone was not able to transform 26695 susceptible in resistant metronidazole bacteria, confirming that in Brazilians isolates this gene is not responsible for metronidazole resistance, neither for resistant level.

We were not able to obtain 26695 transformants resistant for furazolidone by using this methodology, neither with *rdxA* or *frxA* PCR products. Our results suggest and agree that these genes are not responsible for furazolidone resistance in Brazilian isolates.

Interestingly, the *rdxA* transformants obtained to metronidazole showed different and higher furazolidone MIC levels (1 ug/ml) when compared with original 26695 strain (0,25 ug/ml).

Sisson showed that mutations in *frxA* and *rdxA* influence the relative MICs of nitrofurans, but these increases are not enough to confer clinically resistance (17). In the same study they was showed that the substrate preferences of RdxA and FrxA were dependent on the redox potential of the 5- nitro group of the prodrug, with RdxA reducing

metronidazole (low redox potential, - 485 mV) and FrxA reducing nitrofurans (higher redox potential, - 270 mV) (17, 18). No cross-resistance between nitrofurans and metronidazole was found, since laboratory induced mutations in *rdxA* and *frxA* not increase resistance to nitrofurans (12), despite of some strains resistant for metronidazole been simultaneous resistant for furazolidone, this susceptibility was attributed to retain pyruvate: flavodoxin oxidoreductase (POR) and 2- oxoglutarate oxidoreductase (OOR) activities and the one probable selective advantage during exposure to nitrofurans in vivo or that perhaps these strains have acquired additional mutations affecting drug transport or efflux (12,17).

In spite of this, our results suggest that the *rdxA* gene may be involved with the increase level of furazolidone resistance by a mechanism yet unknown.

List of abbreviation

RdxA – NAD(P)H nitroreductase; FrxA – NAD(P)H flavin oxidoreductase; PCR – Polymerase chain; MTZ^R – metronidazole resistant *H. pylori* strains; MIC – minimal inhibitory concentration; POR – pyruvate:flavodoxin oxidoreductase; OOR – 2-oxoglutarate oxidoreductase

Author's contribution

YHBB, MLR and APOG carried out the molecular genetic studies; YHBB, LV and SM participated in the antimicrobial susceptibility analysis; YHBB drafted the manuscript; MLR, SM, RAM and JPJ participated in the design of the study and coordination; All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (01/12369-1).

REFERENCES

1. Coudron, P. E.; Stratton, C. W. **In vitro evaluation of nitrofuratpin as an alternative agent for metronidazole in combination antimicrobial therapy against *Helicobacter pylori***. *J. Antimicrob. Chemother.*, **42**:657-660, 1998.
2. Parsonnet, J. ***Helicobacter pylori***. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, **12**:185-197, 1998.
3. Megraud, F. ***Helicobacter pylori* resistance to antibiotics**. p. 570-583. In R. H. Hunt and G. N. Tytgat (ed.). ***Helicobacter pylori* basis mechanisms to clinical cure**. *Kluwer Academic publishers*, Dordrecht, The Netherlands.
4. Smith, M. A.; Edwards, D. I. **Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter Pylori* to nitroheterocyclic drugs**. *J. Antimicrob. Chemother.*, **35**: 751- 764, 1995.
5. Goodwin, A.; Kersulyte, D.; Sisson, G.; Veldhuyen Van Zanten, S. J. O.; Berg, D. E.; Hoffman, P. S. **Metronidazole resistance in *Helicobacter Pylori* is due to null mutations in gene (*rdxA*) that encodes an oxygen- insensitive NADPH nitrorredutase**. *Mol. Microbiol.*, **28**:383-393, 1998.
6. Sisson, G.; Jeong, J. Y.; Goodwin, A.; Bryden, L.; Russler, N.; Lim- Morrison, S.; Raudonikiene, A.; Berg, D. E. Hoffman, P. S. **Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. pylori* *rdxA*⁺ (nitroreductase) gene**. *J. Bacteriol.*, **182**: 5091- 5096, 2000.
7. Glupczynski, Y.; Megraud, F.; Lopez- Brea, M.; Andersen, L. P. **European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori***. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 820-823, 2001.
8. Jeong, J. Y.; Mukhopadhyay, A. K.; Akada, J. K.; Daidiliene, D.; Hoffman, P. S.; Berg, D. E. **Roles of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole**. *J. Bacteriol.*, **183**: 5155 - 5162, 2001.
9. Mendonça, S.; Ecclissato, C.; Sartori, M. S.; Godoy, A. P. O.; Guerzoni R. A.; Degger, M.; Pedrazzoli, J. J. **Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil**. *Helicobacter*, **5**:79-83, 2000.

10. Kwon, D. H.; El Zaatari, A. F.; Kato, M.; Osato, Reddy, R.; Yamaaka, Y.; Graham, D. Y. **Analysis of *rdxA* and involvement additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*FrxA*) and ferodoxin like protein (*frxB*) in metronidazol resistance of *Helicobacter pylori*.** *Antimicrobial. Agents Chemother.*, **44**:2133-2142, 2000.
11. Goodwin, A.; Hoffman, S.; Berg, D. E. **Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA*(HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*.** *J. Bacteriol.*, **182**:5082- 5090, 2000.
12. Kwon, D. H.; Lee, M.; Kim, J. J.; Kim, J. G.; El- Zaatari, F. A.; Osato, M. S.; Graham, D.Y. **Furazolidone and nitrofurantoin resistant *Helicobacter pylori*: Prevalence and role genes involved in metronidazole resistance.** *Antimicrobial. Agents Chemother.*, **45**:306-308, 2001.
13. Alm, R. A.; Ling, L. S.; Moir, D. T.; King, B. L.; Brown, E. D.; Doig, P. C. et al. **Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** *Nature*, **397**:176-180, 1999.
14. Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. et al. **The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** *Nature*, **388**: 539-547, 1997.
15. NCCLS: **Methods for dilution. Antimicrobial Susceptibility Test for bacteria that grow aerobically.** Approved Standard. 5a Ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS document M7-A5; 1999.
16. Wang, Y.; Roos. K. P.; Taylor, D. E. **Transformation of *Helicobacter pylori* by chromosomal metronidazole resistance marker.** *J. Gen. Microbiol.* **139**:2485-2493, 1993.
17. Sisson, G.; Goodwin, A.; Raudonikiene, A.; Hughes, N. J.; Mukhopadway, A. K.; Berg. D. E.; Hoffman, P. S. **Enzymes associated with reductive actions and action of nitazoxanide, Nitrofurans, and Metronidazole in *Helicobacter Pylori*.** *Antimicrobial, Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. **46**, n. 7, p. 2116- 2123, 2002.
18. Debets- Ossenkopp, Y. J.; Pot, R. G.; Van Westerloo, D. J.; Goodwin, A.; Vanderbrouke- Graafls, C. M.; Berg, D. E.; Hoffman, P. S. ; Kusters, J. G. **Insertion of mini- IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase(*rdxA*) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637.** *Antmicrob. Agents Chemother.*, **43**: 2657- 2662,1999.

Table 1- MICs of metronidazole and furazolidone of original clinical isolates and 26695 transformants with *rdxA* or *frxA* PCR products.

Clinical Isolates	Metronidazole				Furazolidone			
	OriginalMIC (µg/ml)	Presence of transformants		26695 MTZ TransformantsMIC (µg/ml)	Original MIC (µg/ml)	Presence of transformants		26695 MTZ Transformants MIC (µg/ml)
		<i>rdxA</i>	<i>frxA</i>			<i>rdxA</i>	<i>frxA</i>	
BH13	>64	+	-	>64	8	-	-	1
BH27	>64	+	-	>64	32	-	-	1
552	32	+	-	32	64	-	-	1
637	16	+	-	16	32	-	-	1
638	>64	+	-	>64	8	-	-	1
644	16	+	-	16	16	-	-	1
664	32	-	-	-	16	-	-	-
707	8	-	-	-	16	-	-	-
26695	0,5	-	-	-	0,25	-	-	-