

CAD. ACERVO: 63133
R. 13825827/04

EB 15,40

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

MÉTODO NÃO INVASIVO PARA DETECÇÃO DE *Helicobacter pylori*

Maria das Graças Sá Roriz Fonteles

TESE
612.313
F762m
2003

Fortaleza-Ceará
2003

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

MÉTODO NÃO INVASIVO PARA DETECÇÃO DE *Helicobacter pylori*

Maria das Graças Sá Roriz Fonteles

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob orientação do Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Farmacologia

Fortaleza-Ceará
2003

F762m Fonteles, Maria das Graças Sá Roriz
Método não invasivo para detecção de *Helicobacter pylori*
em uma comunidade da periferia de Fortaleza / Maria das
Graças Sá Roriz Fonteles. – Fortaleza, 2003.

120 f.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará .
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Saliva Humana – anticorpo. 2. *Helicobacter pylori* –
teste. I Título

CDD 612.313

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Defesa Formal aprovada em 08/08/2003,

Maria das Graças Sá Roriz Fonteles

Banca examinadora: 

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima,

Prof. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

Ao meu amado marido, Manassés Claudino Fonteles, pelo suporte
estimável e incondicional. Pelo exemplo de vida e pelas vitórias amealhadas
durante estes anos a dois.

Aos meus filhos Cristiane, Manassés Jr. e Daniel por serem a
expressão da dádiva do amor.

A minha mãe pelo exemplo de força em seus **noventa anos** de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Deus** Altíssimo provedor de todas as coisas cuja misericórdia nos sustém.

A minha mãe **Giselda Amaral de Sá Roriz** pelo amor e lições de vida.

Ao meu amado marido **Manassés Claudino Fonteles** pelo suporte incondicional.

Aos meus filhos **Cristiane, Manassés Jr. e Daniel** que me ensinaram a razão do doar-se.

Ao prof. Dr. **Aldo Ângelo Moreira Lima** pela orientação.

Aos amigos-irmãos **Nilberto e Marta** pela prestimosa ajuda.

A Profa. Dra. **Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga** por tornar factível a realização dos testes respiratórios.

A Dra. **Dulciene Queiroz** e ao seu grupo de Pesquisa Bacteriológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte por terem realizado os testes respiratórios.

Ao Dr. **Richard Guerrant** pelo pioneirismo nos estudos de *Helicobacter pylori* e pelo suporte logístico.

A diretora assistente do centro de doenças associadas ao *Helicobacter pylori* **Leah Barrett** por providenciar a execução dos testes PCR.

A **comunidade participante** do projeto sem a qual esse trabalho não teria sido realizado.

As auxiliares **Luzia, Fátima e Rosânia** pelo incansável trabalho de campo.

O bioquímico **Domingos Barreto de Oliveira** pela cooperação nas dosagens químicas.

Maria do Carmo, e aos funcionários **Kátia, Fabiana, Terezinha, José madeus, Sílvia Helena, Joantina**, pela cooperação sempre que solicitados.

FUNCAP pelo apoio financeiro.

**A glória de Deus é encobrir as coisas; mas a glória dos reis é
esquadrinhá-las (Pv. 25:2).**

SUMÁRIO

Oferecimento	v
Agradecimentos	vi
Lista de Abreviaturas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diagnóstico	4
1.2. Epidemiologia	5
1.3 Tratamento	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Preparação de Reagentes	16
3.2 Métodos	18
3.3 Procedimentos para a Leitura da ELISA	21
3.4 Preparação de antígeno de <i>Helicobacter pylori</i> para ELISA.	23
3.5 Dosagem de albumina na saliva	26
3.5.1 Características do Sistema	27
3.5.2 Metodologia	28
3.5.3 Amostra	29
3.5.4 Procedimento Operacional	29
3.5.5 Controle Interno da Qualidade	31
3.6 Dosagem de Proteínas Totais na Saliva	32
3.6.1 Princípio	32
3.6.2 Metodologia	33

3.6.3 Minimização da Ação de Interferentes	34
3.6.4 Preparo do Reagente Biureto e Seu Uso.	34
3.6.5 Sensibilidade Metodológica	37
3.7 Teste Respiratório	37
3.8 Determinação de DNA de <i>Helicobacter pylori</i> nas Fezes	38
3.9 Análise Estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Estudos Preliminares	41
4.2 Análise Comparativa dos Diversos Métodos Diagnósticos	51
4.3 Análise da População Infantil	55
4.4 Análise das Mães	79
5.DISSCUSSÃO	119
6.CONCLUSÃO	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
8. Anexos	145

LISTA DE ABREVIATURAS

HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano classe II
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
PBS	solução salina tamponada
BSA	albumina sérica bovina
IgG	imunoglobulina G
IgA	imunoglobulina A
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
HABA	ácido 4'-hidroxiazobenzeno-2-carboxílico
VBC	verde de bromo cresol
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
PCR	reação em cadeia da polimerase
HBAP	human B-cell receptor associated protein
TR	teste respiratório
O .D	densidade óptica
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos E.U.A

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1..** Gráficos representativos de experimentos controle, nos quais foram testados a melhor diluição da saliva para detecção do antígeno (determinante antigênico do *H. pylori*) (**a**) ou anticorpo IgA contra o antígeno a partir de amostras de pacientes que foram previamente diagnosticados através do teste respiratório e biópsia seguida de teste de urease e cultura como positivos (barras com margens vermelhas) ou negativos (barras com margens azuis). O.D= optical density 43
- Figura 2.** Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgA para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de crianças da comunidade Parque Universitário 44
- Figura 3.** Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgG para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de crianças da comunidade Parque Universitário 45
- Figura 4.** Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgA para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de adultos da comunidade Parque Universitário 46
- Figura 5.** Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgG para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de adultos da comunidade Parque Universitário 48
- Figura 6.** Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgA para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 46

- Figura 7.** Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgG para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 50
- Figura 8.** Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário Positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori*. 52
- Figura 9.** Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori* em relação ao universo de pacientes positivos no teste de PCR. 53
- Figura 10.** Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori* em relação ao universo de pacientes positivos no teste de TR. 54
- Figura 11.** Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori* em relação ao universo de pacientes positivos no teste sorológico. 55
- Figura 12.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 56
- Figura 13.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 58
- Figura 14.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 60
- Figura 15.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 62

- Figura 16.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 64
- Figura 17.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 66
- Figura 18.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 18
- Figura 19.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário. 70
- Figura 20.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade das crianças da comunidade Parque Universitário. 72
- Figura 21.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade das crianças da comunidade Parque Universitário. 74
- Figura 22.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade das crianças da comunidade Parque Universitário. 76
- Figura 23.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade das crianças da comunidade Parque Universitário. 78

- Figura 24.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário. 80
- Figura 25.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário. 82
- Figura 26.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário. 84
- Figura 27.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário. 86
- Figura 28.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 88
- Figura 29.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 90
- Figura 30.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 92
- Figura 31.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 94
- Figura 32.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 96

- Figura 33.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 98
- Figura 34.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 100
- Figura 35.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário. 102
- Figura 36.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 104
- Figura 37.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 106
- Figura 38.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 108
- Figura 39.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 110

- Figura 40.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 111
- Figura 41.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 113
- Figura 42.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 115
- Figura 43.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 116
- Figura 44.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 118

- Figura 40.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 111
- Figura 41.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 113
- Figura 42.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 115
- Figura 43.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 116
- Figura 44.** Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. 118

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Resultado de Testes diagnósticos para detecção de *H. Pylori* a partir de amostras de saliva das mães das crianças, que participaram do teste, da comunidade Parque Universitário, Fortaleza, Ceará no ano de 2000 144
- Tabela 2** Resultado de Testes diagnósticos para detecção de *H. Pylori* a partir de amostras de saliva de crianças do sexo feminino da comunidade Parque Universitário, Fortaleza, Ceará no ano de 2000 145
- Tabela 3** Resultado de Testes diagnósticos para detecção de *H. Pylori* a partir de amostras de saliva de crianças do sexo masculino da comunidade Parque Universitário, Fortaleza, Ceará no ano de 2000 147
- Tabela 4** Resultado de Testes diagnósticos para *H. Pylori* de pacientes do Hospital Geral de Fortaleza 149

Resumo**Título:** Método não invasivo para detecção de *Helicobacter pylori***Autor:** Maria das Graças de Sá Roriz Fonteles

Universidade Federal do Ceará - Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Ano: 2003**Orientador:** Aldo Ângelo Moreira Lima

A descoberta da bactéria *Helicobacter pylori* por Barry J. Marshall e J.B. Warren no início dos anos oitenta, sua associação com gastrite, úlcera péptica e sua associação posterior ao cancer gástrico, trouxe um crescente interesse em novos métodos de diagnóstico especialmente os não invasivos, que pudessem elucidar essa infecção através da epidemiologia molecular em populações de risco. Foram coletadas salivas na Comunidade Parque Universitário num estudo piloto observando-se desde a idade de 2 anos até a adolescência (14anos). As salivas eram coletadas nos fins de semana quando as mães estavam em casa e nos prestavam as informações necessárias. As salivas colhidas eram assim resfriadas em depósito de isopor com gelo e levadas ao laboratório onde eram centrifugadas a 3000G por 15 min, e então preservadas a -20°C , antes de serem analisadas. Foram determinadas IgG, IgA, proteínas totais e albumina; através do método de ELISA determinou-se as imunoglobulinas, e o resto por métodos espectrométricos. Realizou-se ELISA por um método específico usando-se um kit de ELISA para determinações sorológicas e adaptado em nosso laboratório para análise de saliva. O kit comercial contém placas para microtitulação, anticorpo conjugado anti-IgG humano de caprino com fosfatase como marcador, solução tampão de BSA dissolvida em solução fisiológica salina, glicerol a 50%, solução tampão de dietanolamina e antígeno de *Helicobacter pylori* preparado de espécimes oriundas da comunidade. Foram considerados positivos os casos cuja densidade óptica eram iguais ou superior a 2. Esse index foi calculado da diferença entre positivos e negativos. Os resultados eram comparados com os resultados obtidos do teste respiratório e PCR fecal. Quando comparado com os positivos houve uma confirmação de 79% com o PCR, enquanto que com o teste respiratório a confirmação foi de 83%. As comparações desses resultados dos testes com a saliva demonstram que essa técnica é uma boa e fácil ferramenta para o uso em epidemiologia molecular. Experimentos preliminares foram realizados em adultos soropositivos a *H. pylori* em alguns controles negativos no tocante a IgA. Entre as 44 crianças estudadas 10 foram consideradas positivas e 34 negativas para IgA na diluição salivar de 1:200. Assim como para IgG, 19 crianças foram positivas nessa mesma diluição; esse mesmo estudo foi realizado nas mães, e 7 foram positivas para IgA enquanto 10 foram IgG positivas. Num estudo realizado com um grupo externo, dez pacientes escolhidos do setor de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza, observou-se 2 pacientes positivos para IgA e o máximo de 8 positivos para IgG. A comparação desses dados de saliva foi feitos com IgG sorológico, teste respiratório e PCR nas fezes. Todas as comparações atestaram a eficiência da combinação das imunoglobulinas salivares como um bom marcador para diagnóstico e tratamento das infecções por *Helicobacter pylori*. PCR nas fezes, teste respiratório, IgG

Abstract

Title: Non-invasive method for *Helicobacter pylori* detection

Author: Maria das Graças Sá Roriz Fonteles

Adviser: Aldo Ângelo Moreira Lima

Federal University of Ceará - Department of Physiology and Pharmacology-2003

The discovery of *Helicobacter pylori* by Barry J. Marshall and J. R. Warren in the eighties and the posterior association of this bacterial species with gastric, peptic ulcer and lately with gastric cancer, brought about a crescent interest in new methods, specially non-invasive ones that could be used by molecular epidemiology to elucidate the infection of *H. pylori* in population at risk. Salivas were collected in a shantytown (University Park) in a pilot study in a survey from early childhood (2 years) to adolescence (14 years). The salivas were collected in weekends when the mother could give all the necessary information and cooled in ice in a stirofoam box. At the laboratory they were centrifuged at 3000G for 15minutes and thereafter frozen at -20°C , prior to analysis. IgG, IgA, total protein and albumins were determined; immunoglobulins by specific ELISA and the rest by spectrophotometric methods. The ELISA was done by a specific kit used for sorologic determination and adapted in our laboratory for saliva analyses. The comercial kit contained microtritation plates, goat antibody human anti-IgG conjugated with fosfatase as a marker, BSA bloking solution dissolved in physiological saline, glycerol at 50 %, dietanolamine buffer and *H. pylori* antigen prepared from community strains. The cases were considered positives when optical densities between the ratios of positives and negatives were equal or superior to 2. This index was calculated as a result of the quotient between the averages of positives and negatives. These data were compared with the ones obtained by breath tests and fecal PCR. When compared with the positive ones there was a confirmation of 79% with breath tests and 83% of the serum positives. The comparisons of these data in saliva with the different methods demonstrate that this technique is a good and easy tool for the use in molecular epidemiology. Preliminary experiments were first done with adults known as soropositives to *H. pylori* and some negative controls, regarding IgA. Among 44 children studied at least 10 were considered positives and 34 negatives to IgA at the saliva dilution of 1:200. As for IgG, 19 children were positives at this same dilution; the same study was conducted in 14 mothers, and 7 were positive for IgA while 10 were IgG positives. An outside positive control group from 10 patients chosen from the gastroenterology clinic of a General Hospital in Fortaleza, showed 2 positives patients for IgA and a maximum of 8 positives for IgG. The comparison of these saliva data were done with serum IgG, breath test and fecal PCR. All the comparisons attest the efficiency of the contribution of these salivary immunoglobulins as good markers for the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infections. Fecal PCR, breath test, serum IgG and salivary IgG correlates well with the degree of positivity in these populations studies in different degrees, dependent on the method compared. Nevertheless, breath test

and IgG presented the same degree of efficiency while serum IgG and fecal PCR presented the same positivity degree. IgA was the least in terms of correlation with other methods.

1. INTRODUÇÃO

Estudos nos últimos anos do século XIX identificaram bactérias do tipo espiroqueta na mucosa gástrica de várias espécies animais que passaram despercebidos nas suas importâncias e correlações fisiopatológicas (Bizzozero, 1893 e Salomon, 1896).

Em 1906, Krienitz identificou microorganismos similares na mucosa gástrica de humanos; isso foi confirmado por outros pesquisadores (Doengs, 1939), e também ficou sem nenhuma explicação fisiopatológica.

Em 1975, Steer e Colin-Jones demonstraram uma associação entre esses organismos e doença gastroduodenal. Apesar de observações histológicas terem sido realizadas só foi possível se realizar cultura dessa espécie em 1984, quando Marshall e Warren foram capazes de isolar organismo similar ao *Campilobacter* de espécimes biopsadas da parte antral de estômagos de humanos adultos, após uma prolongada incubação de 5 a 10 dias a 37⁰C, em um ambiente úmido microaerofílico (5-15% de O₂ com CO₂ adicional).

A bactéria espiralada foi inicialmente chamada de *Campylobacter pyloridis* (Marshall e Warren, 1984) logo depois *Campylobacter pylori* (Marshall e Warren, 1987) e por fim *Helicobacter pylori* (Goodwin et al., 1989). O microorganismo foi subseqüentemente isolado de adultos e crianças portadores de doença gastroduodenal. Morfologicamente, esses microorganismos lembram outras espécies de *Campylobacter* e aparecem sob microscopia ótica como um Gram-negativo com formato de um bastão em S, de comprimento entre dois e 5 micra. Embora sejam classificados como uma espécie de *Campylobacter*,

diferenças morfológicas e bioquímicas foram detectadas entre *Campylobacter pylori* e outras espécies de *Campylobacter* (Czinn, 1989). Assim sendo, já há algum tempo atrás muitos pesquisadores acreditavam que esses microorganismos fossem parte de um novo gênero (Megraud et al. 1985), daí a mudança para *Helicobacter pylori*.

Estudos posteriores sugeriram que a história natural da gastrite superficial progrida após décadas a gastrite atrófica (Siurala et al. 1966; Siurala et al. 1968; Kekki et al. 1977).

Experiências *in vitro* demonstram que o *H. pylori* ativa neutrófilos e monócitos/macrófagos induzindo um quadro inflamatório (Mai, 1991).

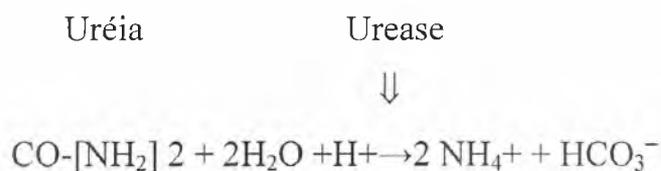
Também *in vitro* se demonstrou que o *H. pylori* estimula a expressão de HLA-DR sobre células gástricas (Engstrand, 1989).

Análises bioquímicas revelaram alta concentração de urease na bactéria, e essa enzima tem sido implicada na patogênese da doença gastroduodenal. A urease é um fator pró-inflamatório, que está presente na superfície do *Helicobacter pylori* e pode ser secretada (Blaser, 1992). Cepas diferentes variam quanto à produção de urease (Dunn e col. 1990). Urease pode ser encontrada em macrófagos da lâmina própria de pessoas infectadas através de coloração de imunoperóxido (Mai, 1992).

O *Helicobacter pylori* apresenta diferentes cepas cujos lipopolissacáridos são estruturalmente heterogêneos e podem ter graus de endotoxicidade variável (Perez-Perez, 1987). A enzima urease, quebrando a uréia no suco gástrico, gera bastante bicarbonato e íon amônio em volta

da bactéria permitindo sua passagem segura através da barreira ácida gástrica e sua chegada à mucosa protetora (Marshall et al. 1990 e Murakami et al., 1990). A amônia por sua vez é tóxica para as células eucarióticas (Hessey, 1990). A indução da produção de urease em resposta à falta de nitrogênio, provoca um mecanismo através do qual o *H. pylori*, embora exportando urease, provoca inflamação já referida resultando em liberação de nitrogênio. Esse mecanismo de feedback negativo é uma maneira pela qual o *H. pylori* poderia modular a inflamação a uma baixa extensão compatível com sua sobrevivência em meio hostil (Blaser, 1992). Seu flagelo permite seu deslocamento no suco gástrico e na mucosa gástrica (Hazell et al., 1986). O *Helicobacter pylori* também apresenta uma importante proteína de 54 KDa, a qual é antigênica para humanos (Dunn, 1990 e Perez-Perez, 1987).

Foi postulado que a produção de grandes quantidades de bicarbonato após hidrólise de uréia sobre a superfície da mucosa gástrica aumenta o pH da superfície dessa mucosa, assim interferindo com a bomba de sódio-potássio adenosina trifosfatase ($3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ -ATPase) e permitindo a difusão contrária de íons de hidrogênio (Hazell e Lee, 1986).



1.1. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de infecção por *Helicobacter pylori* pode ser estabelecido por exame histológico, avaliação microbiológica, e técnicas serológicas, ou uma combinação disso. Demonstrações histológicas inicialmente eram dependentes de técnicas de coloração pela prata Warthin-Starry (Marshall e Warren 1984). Hoje se usa Giemsa e coloração de hematoxilina-eosina mais satisfatoriamente e consumindo menos tempo.

Nos espécimes biopsados, após incubação adequada, os organismos aparecem em cultura em placas de Agar sangue como pequenas colônias translúcidas não hemolíticas. A identificação é confirmada sob microscopia ótica pelas características morfológicas, e bioquimicamente pela identificação da ação da oxidase, urease, e catalase. A alta quantidade de urease proporciona uma identificação mais rápida. A coloração instantânea do material biopsado dentro de caldo contendo uréia ocasiona uma mudança imediata da cor do amarelo ao vermelho, em aproximadamente 2h. Esses testes (ambos, de caldo de Stuart, uréia Agar de Christensen, ou o comercialmente encontrado CLO test, Delta West, Western Austrália), são sensíveis e específicos para a presença de *Helicobacter pylori* em tecido gástrico (Czinn,1989).

Outras técnicas de diagnóstico foram desenvolvidas com o objetivo de minimizarem a necessidade de endoscopia e biopsia. O teste respiratório da uréia marcada com carbono radioativo (C^{14}), foi desenvolvido, onde o CO_2 exalado contendo carbono marcado (C^{13} ou C^{14}) indica infecção por *H. pylori*. Técnicas serológicas de enzima imunoensaio foram reportadas por outros laboratórios para confirmar a presença de *H. pylori*. A grande limitação que se apresenta nos estudos epidemiológicos é

a incapacidade de se diferenciar entre infecção recente e remota. Essas técnicas estabelecem uma associação entre *H. pylori* e doença gastroduodenal (Czinn, 1989).

Numerosos estudos estabelecem uma correlação entre a recuperação de adultos e crianças com *H. pylori* histologicamente comprovados e gastrite antral. O estômago humano tem estruturas rudimentares imunológicas para lutar contra bactérias colonizadoras. Entre outras barreiras o estômago usa a acidez e peristaltismo para prevenir invasores que descendo da orofaringe possam colonizar, entretanto o *H. pylori* é capaz de resistir à essa defesa. É possível que o fato de sobrevivência de um grande número de microorganismos Gram negativos em uma mucosa relativamente indefesa seja suficiente para iniciar um processo patológico (Blaser, 1992).

A técnica serológica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foi sugerida por muitos laboratórios, para confirmar a presença de infecção por *H. pylori*. Em princípio ELISA é baseada em observações feitas no início da década de setenta, quando um antígeno ou anticorpo é quimicamente ligado (covalentemente) a uma enzima, o resultado conjugado, retém uma grande porção de sua ação imunológica e enzimática, como descrito adiante.

1.2. Epidemiologia

A infecção por *Helicobacter pylori* é extremamente comum no mundo, entretanto a grande maioria das pessoas não apresenta úlcera e se mantêm assintomática (Blaser 1992). Muitos aspectos epidemiológicos

dessa infecção são desconhecidos, a maneira de transmissão permanece obscura (Nguyen et al., 1993).

Humanos e primatas parecem ser os primeiros hospedeiros para *H. pylori* (Graham et al, 1991). O *Helicobacter* foi também identificado em outras espécies animais, como os *ferrets*. Nessa espécie se denomina *Helicobacter mustelae*. Nesses animais a bactéria também coloniza o duodeno proximal e o antrum em maior quantidade que o corpo. Esses animais contaminados apresentam gastrite. Eles são carnívoros monogástricos domésticos cujos estômagos apresentam semelhança com o estômago humano. As lesões observadas nesses animais são semelhantes às observadas em um subgrupo de adultos e crianças infectadas com *Helicobacter pylori* (Fox et al., 1990). Os roedores e coelhos não são colonizados por essa bactéria, não apresentando, portanto gastrite desse tipo de infecção (Krakowa et al., 1984, Fox e Lee, 1989).

De acordo com Mitchell et al. (1988) e Graham et al. (1991), estudos cruzados mostram um aumento na prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* com aumento da idade nas populações ocidentais. A presença de *Helicobacter pylori* na placa dentária parece ser um fenômeno raro; essa associação do *H. pylori* com placa dentária sugere que esse ambiente pode ser um dos muitos meios potenciais de transmissão (Krajden et al., 1989; Majmudar et al., 1990; Shames et al., 1989). Estudos realizados em 40 voluntários na Índia confirmaram a presença de *H. pylori* na placa dentária em 100% dos pacientes como também a presença de gastrite em todos eles (Majmudar et al., 1990), entretanto, Krajden et al. (1989) examinando 29 pacientes com gastrite no Canadá, em somente um paciente foi confirmada a presença do *H. pylori* na placa dentária. Não há diferença na placa dentária sub-gengival para a supragengival. Uma

amostra de um indivíduo sugere que a distribuição do *H. pylori* na placa dentária não é uniforme (Nguyen et al, 1993). O mecanismo pelo qual o *H. pylori* alcança a cavidade oral é desconhecido, é possível que refluxo ocasional gástrico permita a colonização da cavidade oral como também é possível que o contrário ocorra. A presença de *H. pylori* na placa dentária pode ser uma causa de recorrência da infecção. Confirmando isso que a rota oral é o meio principal de transmissão do *H. pylori* (Nguyen et al., 1993).

Shames et al. em 1989 publicaram que *H. pylori* foi encontrado na placa dentária e na biópsia de estômago de um paciente. Os exames realizados constavam de análise de restrição de endonuclease com Hind III, Hae III e Bg III extraídas das oito colônias. O resultado mostrou três cepas presentes na placa dentária, mas só uma no material biopsado. Uma das cepas da placa dentária teve padrão indistinguível das outras isoladas da biópsia, evidenciando que ambos estavam infectados com a mesma cepa.

Uma prévia associação entre trabalhadores de abatedouros e de escritórios sugeriu que *Helicobacter pylori* pode ser uma zoonose sem apresentar diferenças entre fatores sócioeconômicos (Vira et al., 1988).

A infecção por *Helicobacter pylori* tem predileção pela superfície das células da mucosa gástrica (Warren, 1983).

Imediatamente após infecção por *H. pylori*, há hipersecreção ácida, pepsina e muco (Graham et al., 1988); mas hipocloridria e diminuição de pepsina e muco ocorrem nos próximos meses (Graham et al., e Morris et al., 1989). Segundo Morris, a restauração da secreção ocorre em 1 ano. Subseqüentemente e cronicamente, a infecção por *H. pylori* induz

uma gastrinemia, mas a secreção ácida ocorre em níveis normais (Lewis et al., 1989, e Smith et al., 1989, Karnes et al., 1991, Graham et al., 1990).

A colonização do estômago humano por essa bactéria ocorre em longo prazo, isto é, décadas, e é considerada uma infecção de ação lenta (Blaser, 1992).

Graham et al. (1991) observando um grupo de 485 pessoas saudáveis entre 15 e 80 anos da área metropolitana de Houston detectaram através dos exames de ELISA e teste respiratório que a infecção por *H. pylori* se encontrava presente em 52% dessas pessoas. A prevalência aumentou rapidamente com a idade a 1% /ano sobre toda a população. Essa infecção apresentou-se maior na população negra com 70% e em brancos com 34% ($p < 0.001$); essa diferença foi efetuada após ajustes realizados para a idade, gênero, nível educacional, renda, uso de tabaco ou álcool. Observaram ainda ser essa infecção independente do gênero, mas proximamente relacionada com a condição sócio-econômica. Houve, contudo correlação inversa significativa entre infecção por *H. pylori* ajuste de idade, renda e nível social. Entretanto, nenhuma relação apresentou-se entre consumo de álcool, tabaco ou uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais.

A convivência de animais domésticos apresentou uma associação de baixa frequência de infecção por *H. pylori*, entretanto essa infecção foi altamente associada com o nível sócio-econômico, chegando a determinar a idade da aquisição da mesma. A transmissão do *H. pylori* continua sendo uma incógnita, mas os padrões sociais são consistentes com a sua transmissão oro-fecal. A epidemiologia dessa infecção assemelha-se à

epidemiologia da hepatite A ou da poliomielite, onde as condições de infecção se relacionam com padrões e práticas de higiene e as condições sócio-econômicas. A alta prevalência de infecção por *H. pylori* entre endoscopistas, particularmente entre os que não usam luvas, sugere que esse microorganismo pode ser transmitido a partir de instrumentos contaminados com secreção gástrica (Shahamat, 1989 e Mitchell et al., 1989). Shahamat e col. demonstraram que a forma móvel do *H. pylori* pode sobreviver pelo menos por uma semana em águas de rio. Klein (1989) demonstrou uma associação direta entre prevalência da infecção por *H. pylori* e a fonte da água de beber através de estudo realizado em uma comunidade em Lima no Peru.

O *Helicobacter pylori* vive na camada mucosa que atapeta o epitélio (Hazell, 1986), e uma fração desses microorganismos adere ao epitélio (Hessey, 1990). Essa infecção tem como característica a desorganização da estrutura tissular e da função das glândulas produtoras de muco levando a um aumento das células inflamatórias, apesar do aumento na produção de células epiteliais (Gilman, 1986). Uma fração de pacientes infectada com *H. pylori* apresenta atrofia glandular (Faisal, 1990).

O *Helicobacter pylori* secreta uma citotoxina que produz vacuolização de uma ampla variedade de linhagens de células e também pode provocar uma resposta inflamatória (Leunk, 1988; Cover, 1990). Essa ação citotóxica associada a amônia, ambas têm ação deletéria sobre as células (Cover, 1991). A amônia eleva o pH gástrico da camada mucosa de 6 a 7 (Kelly, 1993). Em ratos se sabe que a amônia na água de beber afina a mucosa gástrica (Kawano et al., 1991). A amônia depleta células aeróbias de alfacetoglutamato, um substrato essencial para o ciclo de Krebs (TCA-

Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos). Dial et al., 1994 reportaram aumento de RNAm de gastrina na mucosa de ratos expostos a amônia e agentes que induzem inflamação, sugerindo assim que a hipergastrinemia apresentada em pacientes com *H. pylori* deve ser secundária a presença de amônia. Seguindo a mesma linha Kulusi et al., 1994, reportaram que pacientes com úlcera duodenal apresentam aumento da urease, porque *H. pylori* é de alta densidade nesse grupo estudado. Vários pesquisadores documentaram que amônia em alta concentração induz a formação de vacúolos exatamente como os observados quando as células são expostas a toxina vacA do *H. pylori* (Xu et al., 1990). Ricci et al., 1994, sugerem que um papel da vacA parece ser a potenciação desse efeito da amônia. A citotoxina vacuolizadora do *H. pylori* é um aspecto interessante da patogenicidade desse microorganismo. Essa citotoxina de 87 KDa é expressa em 65% das cepas, e cria vacúolos nas células epiteliais.

Quase todos os pacientes com *H. pylori* associado à úlcera duodenal, apresentam essa toxina. O gene responsável por essa proteína citotóxica é o vacA e foi clonado por Cover et al (Tumuru et al., 1993). O gene vacA encontra-se presente em todos os germens *H. pylori*.

Marshall (1985) e Morris (1987) satisfizeram o postulado de Koch quando induziram gastrite, confirmada histologicamente, após ingestão de uma suspensão de microorganismos viáveis e subseqüentemente recuperando a bactéria ingerida. Após o estabelecimento da relação entre *H. pylori* e doenças da mucosa gástrica e duodenal, em um número limitado de pacientes adultos, verificou-se que a eliminação desses microorganismos resulta em eliminação de anormalidades histológicas e resoluções de sinais e sintomas.

Pacientes com gastrite crônica ou recorrente, dor abdominal, vômitos, ou hematemese, necessitam de endoscopia da parte superior do trato gastrointestinal para confirmar a infecção já era recomendado por Czinn, em 1988. *H. pylori* agora é aceito como causador da gastrite tipo B. Estudos preliminares reportam que a prevalência do *H. pylori* aumenta com a idade, no entanto informações detalhadas a respeito da prevalência da bactéria em qualquer população definida assim como fatores que influenciem o padrão de distribuição permanecem insuficientemente explicados.

Uma segunda proteína de 127 kDa é chamada citotoxina associada ao gene A, ou cag A. O cag A é uma marca para o efeito da toxina vacuolizadora, o gene vacA só está presente quando o efeito para vacA está também presente. Na mucosa gástrica, o *H. pylori* é capaz de atacar os fosfolipídios, como fosfatidiletanolamina (Gold et al., 1993) glicoproteína sializada, como um gangliosídeo GM3 (Slomiany et al., 1989), e antígenos B de Lewis presentes em pessoas do grupo sanguíneo O (Dickey et al., 1993 e Boren et al., 1993). Uma vez na barreira da mucosa gástrica e no muco, o *H. pylori* libera proteases e fosfolipases, que podem causar dano à integridade da barreira mucosa e células subjacentes. Um exemplo disso é quando há aumento do muco (Goggin et al., 1991) isso pode ser causado pela lise parcial de componentes fosfolipídios.

Na maioria dos países subdesenvolvidos, a pandemia por *H. pylori* continua sem ser avaliada; a grande parte dos adultos é infectada. A aquisição ocorre por ano em 10% das crianças entre 2 e 8 anos; assim sendo a maioria se encontra infectada na adolescência (Graham, 1991 e Megraud, 1989).

1.3 TRATAMENTO

Estudos laboratoriais confirmam que *H. pylori* é susceptível a numerosos antimicrobianos, incluindo bismuto coloidal, combinado com amoxicilina, conforme proposto inicialmente pelo grupo de Marshall (Marshall, 1993). O acompanhamento dessas pessoas à longo prazo mostra entretanto recidiva muito alta, sugerindo que essa combinação suprime mas não elimina o patógeno responsável. Este fenômeno está provavelmente relacionado a dificuldade de penetração dos agentes devido ao germem localizar-se abaixo do muco; entretanto, metronidazol associado a claritromicina e mesmo ampicilina em combinação tríplice, podem erradicar a bactéria em até 80% dos casos (Harris, 1998), naturalmente associando-se sempre omeprazol ou ranitidina.

2. OBJETIVOS

Como apresentado no início desta dissertação, pretende-se utilizar :

- a) Determinação de IgA e IgG na saliva de crianças e adultos na Comunidade Parque Universitário e compará-la com os dados imunológicos obtidos em serologia e pelos resultados dos testes respiratórios da Uréia C¹³ bem como PCR das fezes (determinação da polimerase em cadeia de reação); parte dessa população vem sendo seguida pela Unidade de Pesquisas Clínicas, desde o nascimento;
- b) Será também objetivo do presente trabalho, a análise salivar para essas imunoglobulinas nas mães das referidas crianças, bem como de um grupo de pacientes adultos externos, pertencentes ao Hospital Geral de Fortaleza;
- c) Procurar-se-á também avaliar o conteúdo de proteínas totais e albumina salivares, correlacionando-os com os níveis de imunoglobulinas supramencionados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A população escolhida para o estudo foi definida previamente e constou de 44 crianças da faixa etária entre 2 e 14 anos, pertencentes a comunidade Parque Universitário, comunidade essa onde se realiza um projeto piloto em associação com a Universidade da Virgínia. Uma amostra de adultos também foi incluída, no caso cerca de 14 mães, onde se procurou averiguar o relacionamento da presença de infecção por *Helicobacter pylori* na mãe e na criança.

Utilizou-se também uma população de 10 pacientes externos pertencentes ao ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

) Protocolo para coleta de saliva

A saliva foi coletada em frascos de 10 mL, na quantidade aproximadamente de 4ml, sendo armazenada provisoriamente em isopor com gelo durante todo o período da coleta e trazida para o laboratório da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, onde passou pelo processo de centrifugação durante o período de 15 minutos a 3000 G. Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer à -20°C .

A coleta sempre foi realizada nos fins de semana, quando as crianças se encontravam em casa com suas mães; dessa forma as informações necessárias para o preenchimento dos formulários foram obtidas. Os formulários constavam de perguntas sobre a situação de saúde da criança

em questão. As diluições das amostras usadas foram de 1:100 e 1:200 respectivamente, após um ensaio piloto com diluições maiores.

- b) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ou Enzima-Imuno-Ensaio.
Objetivo: Usou-se nos ensaios o método ELISA para determinar a titulação para anticorpos IgG no soro de pacientes portadores de *Helicobacter pylori*. O mesmo ensaio foi utilizado para saliva e constitui uma adaptação metodológica que se desenvolveu no curso deste trabalho.

Materiais:

1. Placas de microtitulação (“flat bottom wells”)

Cat.#76-381-04. Flow Laboratories, Inc., (800) 368-3569

2. IgG de caprinos anti-humana marcada com fosfatase (H+L), 0,5mg (Cat.#15-10-06). Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (KPL); (800) 638-3167

3. Microwell ELISAmate Kit para Fosfatase Conjugada (KPL); (Cat#55-80-00)

O kit inclui: Diluente para Albumina Sérica Bovina / solução concentrada Bloqueadora (10x), 100mL (Cat. #506101)

Solução concentrada para lavagem (20x), 200mL (Cat. #506301)

Solução de Glicerol à 50% , 5mL (Cat.#508300)

Tampão concentrado de Dietanolamina (5x), 25mL (Cat. # 508000)

4. Comprimidos do substrato da fosfatase (5mg) (Cat. # 104-105).

Sigma (800) 325-3010

5. Antígeno para *H. pylori* = preparado pelo Laboratório da Universidade da Virgínia pela Sra. Leah Barret, a partir de amostras de *H. pylori* da população do Parque Universitário.

3.1 Preparação de reagentes:

A. Tampão de revestimento (Tampão Carbonato-Bicarbonato) pH 9.6 preparado com a seguinte composição:

Na ₂ CO ₃	1.59g	(0.398g)
NaHCO ₃	2.93g	(0.733g)
NaN ₃	0.2g	(0.05g)

Colocou-se água destilada para completar 1 litro e armazenou-se em frascos de 250 mL a 4^o C por uma semana.

B. Solução salina de lavagem (PBS-Tween):

A concentração da solução de lavagem era de 20 vezes (sol. estoque) e para uso a mesma era diluída em água destilada. Normalmente para preparo de 1 L usava-se 50 mL da solução estoque em 950 mL de água destilada.

C. PBS-BSA: (solução salina contendo albumina bovina)

1 placa

Diluyente BSA/solução bloqueadora (10x)	12 mL
Água destilada	108 mL

D. Conjugação do segundo anticorpo (IgG antihumana de caprino):

O anticorpo foi reconstituído a partir do material do frasco liofilizado adicionando-se 1 mL de 50% de glicerol e agitando-se para dissolver; a seguir adicionava-se 4 mL PBS/BSA.

A seguir o material era armazenado e congelado em alíquotas de 400 μ L / frasco à -20°C (solução estoque 100 μ g/mL)

Trabalhando anticorpo conjugado = diluiu-se 1:50 com PBS/BSA

Para 1 placa = 400 μ L de solução estoque + 20 mL PBS/BSA

E. Solução do substrato do Fosfato: Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso (5-10 min.)

Para 1 placa de 96 poços:

Tampão concentrado de Dietanolamina (5x) 5 mL

Água destilada 20 mL

Adicionou-se 5 comprimidos de p-NPP na solução acima, misturando-se com um bastão para dissolver.

3.2 Métodos:

I-Sequência do ensaio:

Primeiro Dia:

1. Diluiu-se o antígeno de *H. pylori* no tampão de revestimento para atingir uma concentração de $0.625\mu\text{g/mL}$ de proteína

Por exemplo: concentração de proteína = $820\mu\text{g/mL}$; para fazer uma placa de $200\mu\text{L/well} \approx 21\text{mL}$ contendo 96 poços.

$$V \times C = V' \times C'$$

$$V \times 820\mu\text{g/mL} = 21\text{mL} \times 0.625\mu\text{g/mL} \quad V = 0.016\text{mL}$$

Portanto adicionou-se $16\mu\text{l}$ de antígeno a 21ml de solução de revestimento (para 1 placa), e $80\mu\text{l}$ de antígeno para 105mL de solução de revestimento (para cada conjunto de 5 placas).

2. Adicionou-se a seguir $200\mu\text{L}$ ($0.125\mu\text{g/poço}$ de proteína) desta solução para cada poço, cobrindo-se a placa com parafilme e tampa.
3. Incubou-se por 1h à temperatura ambiente.
4. Para usar no dia seguinte: incubou-se a placa à 4°C durante a noite, então continuando-se com o segundo Dia.

Para armazenagem prolongadas as placas eram mantidas à -20°C por até 3 meses.

Segundo Dia:

1. Retirava-se a placa do refrigerador e colocava-se à temperatura ambiente.
2. A saliva foi diluída 1:100 e 1:200 em PBS/BSA (10 μ L de saliva total + 2mL PBS/BSA), agitando-se sempre com o cuidado de usar-se luvas.
3. Derramou-se o conteúdo de antígeno revestido das placas.

Os poços foram então lavados com solução de PBS-Tween, invertendo-se rapidamente a placa, derramando seu conteúdo, e firmemente batendo-se a placa invertida contra toalhas de papel absorvente, repetindo-se duas vezes essa manobra.

4. A seguir adicionou-se 250-300 μ L de PBS/BSA a todos os poços da placa recobrimo-se de antígeno. Depois as placas foram cobertas com parafilme e uma tampa. Praticou-se a incubação à temperatura ambiente por 10min.
5. O conteúdo sobrenadante foi derramado como já descrito anteriormente, evitando-se nova lavagem.
6. Adicionou-se 150 μ L de PBS/BSA à todos os poços da placa recoberta com antígeno.

7. Pipetou-se 100 μ L de saliva diluída para cada um dos dois poços da placa recoberta com antígeno e misturou-se pipetando para cima e para baixo, cada saliva sendo colocada em duplicata, realizando-se sempre diluições de 1:100 e 1:200 respectivamente, sempre usando luvas em toda a sequência.
8. Cobriu-se a seguir a placa com parafilme e uma tampa.
9. Seguiu-se incubação da placa à temperatura ambiente por 3 horas.
10. Lavou-se a placa como no item # 3.
11. Adicionou-se 200 μ L do Segundo Anticorpo Conjugado em cada poço. Cobriu-se a placa como antes.
A placa foi Incubada na temperatura ambiente por 2 horas.
12. Lavou-se como no item # 3.
13. Adicionou-se 200 μ L de Solução Substrato em cada poço da placa.
14. Incubou-se a placa recoberta por aproximadamente 5 ± 20 minutos; fez-se a leitura da placa com 15min, 18min, 20min e 25min até o maior controle atingir 1000-1300 O.D.
15. Leu-se a absorvância à 405nm.

3.3 Procedimentos para a Leitura da ELISA

1. Liga-se o aparelho (Titertek reader), deixando-se aquecer por 15 min.
2. Coloca-se o filtro de 405nm.
3. Coloca-se a placa com o branco usando-se uma placa somente com substrato.
4. Aperta-se o botão do Blank.
5. Coloca-se a placa com a amostra e aperta-se a tecla “start”(iniciar).
6. Observam-se os resultados a partir do positivo para o negativo dos pocos para controle.
7. Lê-se a placa toda quando o controle positivo estiver entre 1000-1300 e o controle negativo em 0.3.
8. Se os controles estiverem muito baixos, espera-se 2 min., e repete-se o item #5.

I-CÁLCULOS:

1. Toma-se a média OD dos dois pocos
Subtrai-se da média OD do branco PBS de cada média de amostra.

2. Os resultados são expressos de acordo com a fórmula:

$$\text{Razão Positivo / Negativo} = \frac{\text{média OD da amostra positiva}}{\text{média OD do controle negativo}}$$

II-INTERPRETAÇÃO:

Positivo = $P / N \geq 2.0$

Borderline = $P / N 1.5-2.0$

Negativo = $P / N \leq 1.4$

III-Determinação de IgA

De modo geral esta imunoglobulina foi também determinada da mesma maneira já descrita para IgG, nas amostras salivares.

O método descrito atende na sua sequência praticamente a todas as etapas apresentadas nesta seção. Toda a parte do ensaio relativa ao preparo do antígeno é em essência também o mesmo, e a maior distinção diz respeito ao anticorpo e sua especificidade para IgA. Assim após preparo dos poços na sequência mencionada para as duas diluições da saliva (1:100 e 1:200), previamente centrifugadas e congeladas, as amostras de salivas previamente diluídas foram pipetadas com micropipetas de 100 μL e deixadas durante 24 horas a 4^o C. A seguir, os poços foram esvaziados e lavados 3 vezes com PBS (10 mM de fosfato e 0.14 NaCl) contendo 0.05% de tween 20 e bloqueados por 1h a 37^o C com 1% de solução de albumina. Após lavagem eles foram incubados com anticorpos anti-IgA humana marcados com fosfatase alcalina. Na sequência os poços foram novamente incubados por 30 min a 37^o C com uma solução tampão recentemente preparada de paranitrofenilfosfato diluído em etanolamina a pH 9.8. A conversão do substrato foi avaliada pela medida

da densidade óptica no respectivo leitor de ELISA, conforme del Muro et al., em (1990) e adaptado à pesquisa de *H. pylori* em nossos laboratórios (Fortaleza e Charlottesville).

3.4 Preparação de antígeno de *Helicobacter pylori* para ELISA.

O antígeno pode ser preparado no laboratório ou comprado de fonte fornecedora. O antígeno usado na presente pesquisa, foi preparado a partir de cepas isoladas de pacientes da própria comunidade e descrito previamente. Apresenta-se sumariamente na sequência as etapas essenciais do processo extrativo.

a) Materiais:

1. Meios de cultura: HBAP + GCHI suplemento = REMEL, Cat. # 01-208
2. HBAP + suplemento de Skirrow = preparado no Laboratório de Medicina Geográfica (Universidade da Virgínia, USA)
Sangue de cavalo desfibrinado (7%) (Columbia Diag.)
Skirrow's (Oxid Cat. # CM331)
Placas de Petri, cotonetes estéreis, pipetas de 10mL, água destilada estéril, tubos para centrífuga.

Métodos:

1^o Passo: Subcultura de cepas de *H. pylori* para HBAP + meio de Skirrow para purificar e eliminar contaminação; incubar 2-3 dias à 37^oC 10% de CO₂;

2^o Passo: Inocula-se com as cepas de *H. pylori* nas placas de 10 HBAP + GCHI e incubam-se as placas por 4 dias à 37^o C em 10% de CO₂;

3^o Passo: Coloca-se a seguir 10 ml de água destilada estéril com cada cepa de *H. pylori*; Usa-se frasco individual de 10 mL para cada cepa. Centrifuga-se a 3000 rotações por minuto por 20 min. e pipeta-se o sobrenadante e adiciona-se 1 mL de água destilada estéril, agitando, congelando à - 20^o C, podendo ser transportado a distância desde que mantido congelado; isso permitiu o transporte para o laboratório no Ceará.

4^o Passo: Descongelar os tubos de antígenos organizando os frascos respectivos; Sonicar 6x15 segundos (30 segundos esfriando entre cada período de 15 seg. pela colocação do tubo em um descongelador). Centrifugar a 10.000 rpm à 4^o C por 40 min. e pipetar fora o sobrenadante e usar como antígeno. Determinar a concentração de proteína pelo método Lowry conforme descrito a seguir.

3.4.1. Ensaio pelo método de Lowry para Determinação de Proteínas Totais.

Trata-se de um método para dosagens de proteínas segundo a descrição de Cooper, 1977.

Materiais:

Albumina Bovina Sérica (1 mg / mL)= 1 mg BSA + 1 mL salina

2N NaOH = 8g NaOH + 100mL de água destilada- aqui albumina é usada como padrão e este ensaio não é específico para a proteína em si.

Trabalha-se com reagentes de cobre (solução estoque armazenada à 25^oC indefinidamente) e adicionando-se os seguintes compostos juntos:

50ml 2% NaCO₃ (estoque = 11.7g Na₂CO₃-H₂O ou 10g anidro em 500ml de água destilada)

500mL 1% CuSO₄ (estoque = 1.56g CuSO₄-H₂O em 100mL de água destilada)

500mL 2% tartarato NaK (estoque = 2.68g tartarato NaK - 4H₂O em 100mL dH₂O)

1N fenol reagente (estoque = 2N Folin & reagente fenólico de Ciocalteu; diluir 1:1 com de água destilada)

Métodos:

1. Liga-se o espectrofotômetro para aquecer
2. Faz-se padrões e amostras (em duplicata ou triplicata) de maneira que o volume final quando diluído com PBS seja 100uL

Curva Padrão:

Tubo #	μL BSA	μL PBS	= μg Proteína
1	0	100	0
2	2	98	2
3	5	95	5
4	7	83	7
5	10	90	10
6	15	85	15
7	20	80	20
etc.			

3. Adicionam-se $100\mu\text{L}$ 2N NaOH à cada amostra e incuba-se por 10 minutos.
4. Adiciona-se 2mL de Reagente de Cobre trabalhado em cada amostra e incubando-se por 10 minutos
5. Adicionam-se $200\mu\text{L}$ 1N reagente fenol e incubar por 30 minutos
6. Lê-se no espectrofotômetro a 650nm.

Este método foi usado apenas para as preparações antigênicas de *H. pylori* que exigem microdeterminação.

3.5 Dosagem de albumina na saliva

Este método consiste num sistema para a determinação da albumina em amostras de soro e foi aqui adaptado para medidas de albumina salivar.

O princípio da técnica baseia-se no fato de a albumina ter a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes.

O sistema de medição fundamenta-se no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo, no caso o verde de bromo cresol quando se liga à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre 600 e 640 nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra até a concentração máxima de 6,0 g/dL.

3.5.1 Características do Sistema

Os métodos mais comumente utilizados para a dosagem de albumina se baseiam na ligação com corantes. Esta ligação, que promove um desvio do pico de absorvidade do corante, permite que a cor resultante possa ser medida colorimetricamente na presença de excesso do corante. Em conjunto com a alta afinidade de ligação da albumina, consegue-se fazer com que as suas moléculas participem da reação. O sistema contém um detergente não iônico que reduz a absorbância do branco, previne o aparecimento de turvação e aumenta a linearidade.

Vários corantes como o laranja-metilado, HABA, verde de bromo cresol (VBC) e púrpura de bromocresol têm sido utilizados na dosagem da albumina sérica, mas o VBC é o reagente mais utilizado tendo inclusive sido recomendado pela AACC (Peters, 1982). Interferências de valores elevados dos triglicérides pode ser corrigida utilizando o branco da amostra.

O método tem excelente correlação com o fracionamento eletroforético em acetato de celulose e é facilmente aplicável na maioria dos analisadores semi-automáticos e automáticos capazes de medir uma reação de ponto final

em torno de 600, este também tem sido o método de escolha dos laboratórios, pois foi utilizado por 60% dos participantes do programa de proficiência do Colégio Americano de Patologistas no ano de 1998.

O verde do bromocresol possui especificidade para a albumina e não sofre interferência de valores elevados da bilirrubina e hemoglobina, permitindo também que as leituras possam ser feitas a 640nm, portanto, em espectrofotômetros extremamente simples e destituídos de sofisticação.

3.5.2 Metodologia

Reagentes:

- 1- Reagente de Cor: Conserva-se entre 2-8⁰C, o qual permanece estável até a data de expiração impressa no rótulo. Esse reagente contém tampão 60mmol/L, pH 3,8, verde bromocresol 300 μ mol/l, e Brij 35 \geq 6,0 mmol/L.
- 2- Padrão 3,8g/dL: Conserva-se entre 2-8⁰ C, permanecendo estável até a data de expiração impressa no rótulo. Armazena-se bem vedado para evitar evaporação. Esse padrão contém azida sódica 15,4mmol/L.

3.5.3 Amostra

Como as amostras utilizadas são potencialmente infectadas, sugere-se manuseá-las seguindo as normas estabelecidas para Biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, aplica-se a norma local de proteção ambiental.

Nos casos em que a amostra produz uma interferência colorimétrica procede-se da seguinte maneira, para minimização da ação de interferentes:

Branco da amostra : Mistura-se 1.0mL de NaCl 150mmol/L (0,85%) com 0,01ml da amostra. Mede-se a absorbância em 630nm, corrigindo o zero com água desionizada ou destilada. A leitura obtida da absorbância do teste permite calcular a concentração.

3.5.4 Procedimento Operacional

Tomamos 3 tubos de ensaio e procedemos como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Reagente de cor (n 1)	1,0mL	1,0mL	1,0mL
oro	—	0,01mL	—
Padrão(n2)	—	—	0,01mL

Mistura-se e após 2 minutos, no máximo 10 minutos, determina-se as absorbâncias do teste padrão em 630nm ou filtro vermelho (600-640), certando-se o zero com o branco. O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0mL. Deve-se fazer uma verificação da necessidade de ajuste

do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados, proporcionalmente, sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 10 microlitros são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição. Para o Cálculo da concentração de albumina em (g/dL) = Absorbância do teste x 3,8

Absorbância do padrão

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de calibração} = \frac{3,8}{\text{Absorbância do padrão}}$$

Linearidade

O resultado da medição é linear até 6,0g/dL. Para valores maiores, dilui-se a amostra com NaCl 150mmol/l (0,85%), realiza-se nova medição e multiplicando o resultado obtido pelo valor fator de diluição. Dilui-se a amostra de tal modo que o valor encontrado se situe entre 3,0 e 4,5 g/dL. Sugere-se a verificação da linearidade metodológica e fotométrica, no mínimo trimestralmente, utilizando amostras com valores até 6,0 g/dL.

3.5.5 Controle Interno da Qualidade

O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que define claramente os objetivos, procedimentos, normas, critérios para limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Ao mesmo tempo deve-se manter um sistema definido para monitorar a variabilidade analítica que ocorre em todo sistema de medida. Portanto, o uso de padrões controlados para avaliar a imprecisão e inexatidão das determinações deve ser prática rotineira do laboratório clínico.

Exatidão

Em duas amostras com concentrações de albumina iguais a 2,7 e 4,2 g/dL, foram adicionadas quantidades diferentes do material a analisar, obtendo-se recuperações entre 97 e 103%. O erro sistemático proporcional médio, obtido em um valor de 3,5g/dL, foi igual a 0,04g/dL ou 1,1%.

Repetitividade

	N	Média	DP	CV%
Amostra 1	20	3,5	0,03	0,9
Amostra 2	20	5,2	0,06	1,2

Reprodutibilidade

	N	Média	DP	CV%
Amostra 1	20	3,4	0,07	2,0
Amostra 2	20	5,1	0,06	1,2

3.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS NA SALIVA

Utilizou-se um sistema para a determinação das Proteínas Totais em amostras de sangue e líquidos pleural, sinovial e ascítico, com reação de ponto final. Adaptou-se portanto o método para determinação de proteínas totais às amostras salivares. Este método já foi descrito em secção anterior, com reagentes importados, na preparação do antígeno para *H. pylori*.

3.6.1 Princípio

Os íons cobre em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando uma cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

Utilizou-se aqui, o sistema de dosagens para Proteínas Totais – Labtest que é um método direto, rápido, com elevada sensibilidade e a grande especificidade da reação de biureto.

O reagente de biureto possui excelente estabilidade e resposta semelhante a todas as proteínas, o que não ocorre com outros reagentes, proporcionando excelente correlação com o método de Kjeldahl, padrão ouro desta análise.

O sistema podendo, é facilmente aplicável em analisadores semi-automáticos e automáticos podendo ser usados normalmente, capazes de medir com exatidão a absorvância entre 510 e 560 nm em qualquer espectrofotômetro.

3.6.2 Metodologia

Reagentes:

1. Biureto- Estoque: Conservado entre 15-25⁰C. Estável até a data de expiração impressa no rótulo. Contém hidróxido de sódio 1,86mol/L, tartarato de sódio e potássio 320mmol/L sulfato de cobre 120mmol/l e iodeto de potássio 300mmol/L. Por se tratar de reagente cáustico, usamos sempre pipeta automática.
2. Padrão 4,0 g/dL: Estável entre 15-25⁰ C. Armazena-se bem vedado para evitar evaporação.

Contém azida sódica 15,4mmol/L, como preservativo, que é tóxica e deve ser manuseada com cautela.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente. O reagente de Proteínas Totais contém hidróxido de sódio que é cáustico e pode produzir queimaduras. Grandes volumes de água são usados para descartar o reagente.

Amostra

As amostras foram colhidas e tratadas como já descritas anteriormente.

3.6.3 Minimização da Ação de Interferentes

Branco da amostra: Mistura-se 2,5mL de NaCl 150mmol/L (0,85%) com 0,05mL da amostra. Mede-se a seguir a absorvância em 545nm, acertando o zero com água destilada ou desionizada. Diminuir a absorvância assim obtida, da absorvância do teste e calcular a concentração. Este sistema de correção só pode ser aplicado nos casos em que a amostra produz uma interferência fotométrica.

3.6.4 Preparo do Reagente Biureto e Seu Uso.

Adicionar o conteúdo do frasco número 1 (50mL) a 450mL água destilada ou deionizada e misturar. Esse preparo se mantém estável por seis meses em recipiente de plástico, na temperatura entre 15-25C.

A água deve ter uma resistividade ≥ 1 megaohms ou uma condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $<0,1$ mg/L.

Procedimento

Toma-se 3 tubos de ensaio e procede-se como a seguir:

	Branco	teste	padrão
Amostra	-	0,05mL	-
Padrão (no. 2)	-	-	0,05mL
Água destilada ou deionizada	0,05mL	-	-
Biureto de Uso	2,5mL	2,5mL	2,5mL

Mistura-se e deixa-se em repouso em temperatura ambiente durante 15 minutos. Determina-se as absorvâncias do teste e padrão em 545nm ou filtro verde (510^a 560), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 3 horas, tempo em que devem ser realizadas as medidas.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,5mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 10microlitros são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

$$\text{Proteínas Totais (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 4$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, o método do fator pode ser empregado.

$$\text{Fator de calibração} = \frac{4}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{Proteínas Totais(g/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{Fator}$$

O resultado da medição é linear até 12g/dL.

Valores de Referência

Estes valores devem ser usados apenas como orientação. É recomendado que cada laboratório estabeleça, na população atendida, sua própria faixa de valores de referência.

Soro: 6,0 a 8,0g/dL.

Conversão: Unidades Convencionais (g/dL)x10 = Unidades SI(g/L).

O método proposto foi comparado com um método similar, utilizando 40 amostras com valores situados entre 3,2 e 12,8 g/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 1,012 x - 0,076$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,993. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (7,0g/dL), foi igual a 0,01g/dL ou 0,14%.

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e paciente hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

3.6.5 Sensibilidade Metodológica

Uma amostra não contendo proteínas foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio, tendo sido encontrado um valor igual a 0,042 g/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão como parâmetro, o limite de detecção fotométrica é 0,017g/dL, correspondendo a uma absorvância igual a 0,001.

Efeitos da Diluição da Matriz

Duas amostras com valores iguais a 7,1 e 9,3 g/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variam de 2 a 8, foram observados recuperações entre 102 e 105%.

3.7 TESTE RESPIRATÓRIO

Amostras do ar exalado foram coletadas das crianças entre 2 anos e 14 anos de idade. Para a coleta, foram usados balões de plástico apropriados. O ar exalado era coletado soprando-se naturalmente no pequeno canudo do balão. Crianças menores de três anos tiveram o ar exalado coletado usando uma máscara adaptada ao balão. Após jejum noturno, duas amostras do ar exalado foram coletadas em balões segundo um protocolo previamente validado em

crianças. Após coleta do ar exalado no primeiro balão (T0)- coleta basal-crianças até 20 kg ingeriram 100mL de suco de laranja, contendo 50mg de uréia marcada com ^{13}C , não radioativo. Por sua vez, em crianças acima de 20kg a diluição era feita em 200ml de suco para 75mL de uréia. Aguardava-se 30 minutos, após os quais uma segunda coleta do ar exalado era efetuada. (balão T30).

O material coletado por sua vez era remetido para o Laboratório de Pesquisa Bacteriológica do Hospital das Clínicas da Universidade de Minas Gerais – Belo Horizonte-Brasil. A concentração do ^{13}C colhido na exalação foi analisado por Espectrofotômetro de Massa Infravermelho não Dispersível (IRIS Analysator, Wagner Analysen Technik, Worpswede, Germany). O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Foram considerados positivos os resultados segundo o protocolo previamente validado para crianças. Acima da linha de base todo o valor excedente foi expresso em partes mil (delta ‰). Foi considerado positivo quando o valor acima da linha de base era maior que 5 ‰ (Hildebrando and Belinger, 1997).

3.8 Determinação de DNA de *Helicobacter pylori* nas fezes

Apresenta-se aqui sumariamente o desenvolvimento desta poderosa técnica conforme montada pela Sra. Leah Barret no laboratório da divisão de Medicina Geográfica do Departamento de Medicina Interna da Universidade da Virgínia. Vale ressaltar que ali esteve em duas oportunidades a autora deste trabalho, ocasião em que se familiarizou com a técnica e fez as experiências naquele centro de pesquisas. As fezes colhidas em Fortaleza foram enviadas para Virgínia em gelo seco a -40°C . Ali chegando as amostras foram guardadas a -70°C . Cerca de aproximadamente 1.5g foi pesado e

homogeneizado em tampão A Exact e novamente congelado a -70° C, naturalmente congeladas e enviadas para a companhia Applied Research Group, Exact Sciences Corp. para testes subseqüentes. Embora não se tenham detalhes devido a pendências de patente para o método, sabe-se através da literatura que na primeira fase processa-se a extração de DNA de *H. pylori* das fezes tomando o cuidado de antes inibir as ações dos inibidores de polimerase existentes que são principalmente constituídos por polissacarídeos complexos, conforme Watanabe et al., 1998. Através agora de amplificação por PCR das cadeias de DNA é possível com ajuda de padrões eletroforéticos compará-los com amostras do DNA do gérmen e com isso confirmar o diagnóstico.

Correntemente o uso de “primers” específicos como os de ICD genes poderão apresentar um reforço na especificidade e sensibilidade para detecção de *H. pylori* em materiais altamente contaminados (Argyros et al., 2000). Acredita-se que esse seja um dos avanços desenvolvidos pela companhia que fez a corrente dosagem.

3.9 Análise Estatística

Todos os dados obtidos dos diversos experimentos foram calculados e expressos em médias \pm desvios padrões ou erros padrões das médias; a comparação entre as diversas populações foi feita pela análise de variância para medidas múltiplas acompanhadas da correção pelo teste Bonferroni. Regressões lineares foram realizadas em comparações múltiplas, sobretudo dos de IgA e IgG quando cotejados aos níveis de proteína total salivar, albumina e idade. Em outras situações utilizou-se o teste de Student pareado, quando dentro do mesmo grupo ou não pareado entre grupos distintos. Utilizou-se para isso o programa GraphPad Prism versão 3.00 para windows (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) compatível com PC Pentium.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDOS PRELIMINARES

Nestas experiências preliminares, testou-se uma série de diluições salivares para determinação de IgA num grupo de pacientes voluntários; cerca de seis, em vermelho, eram positivos (sorologicamente e/ou pelo teste respiratório e, nessas diluições que variam de 1:50, 1:100, 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400 e 1:12800; os controles negativos eram em número de quatro; optou-se por escolher duas diluições para todo o restante do estudo da pesquisa, isto é, 1:100 e 1:200, já que se queria detectar de maneira a mais homogênea possível; a diluição de 1:50 oferecia os mesmos resultados que 1:100 e 1:200 e já apresentava valores quase próximos da detecção máxima (figura 1b). Daí para a frente as diluições tendem a diminuir seu poder de discriminação desce sucessivamente a valores em torno de 50%, na diluição de 1:3200. Por outro lado, a concentração do antígeno considerada ótima para o ensaio foi observada na diluição 1:8, conforme o gráfico da figura 1a, depois desta diluição havia uma grande detecção e o mesmo se tornava quase indetectável já em diluições acima de 1:32; por isso utilizou-se sempre a prática de diluí-lo na proporção de 1:8 em todos os ensaios subsequentes.

Há cerca de 10 anos, quando se estudava títulos da lactoferrina em saliva de pacientes portadores de doença periodontal (Martins et al.1995), uma triagem foi feita com a finalidade de detectar-se a presença de anticorpos para *Helicobacter pylori*, utilizando-se para isso um kit de ELISA para IgA sorológico; durante cerca de 2 anos testou-se saliva de pacientes soro positivos para esta imunoglobulina, e verificou-se uma certa discriminação entre positivos e negativos, por este método, conforme sugerido em nossos estudos preliminares e confirmados subsequentemente.

A partir de 2000 nosso grupo resolveu sistematizar estes estudos, utilizando uma população definida, sobretudo de crianças, onde a análise bioquímica/imunológica da saliva se tornou um método não invasivo ideal para fins de diagnóstico, de uma população em que a frequência de infecção por *H. pylori* tem alta prevalência. Por isso resolveu-se convalidar os testes não só com as dosagens de IgA como também compará-las com IgG, seguindo uma tendência da literatura atual para determinações sorológicas de anticorpos para *H. pylori* (figuras 2 e 3).

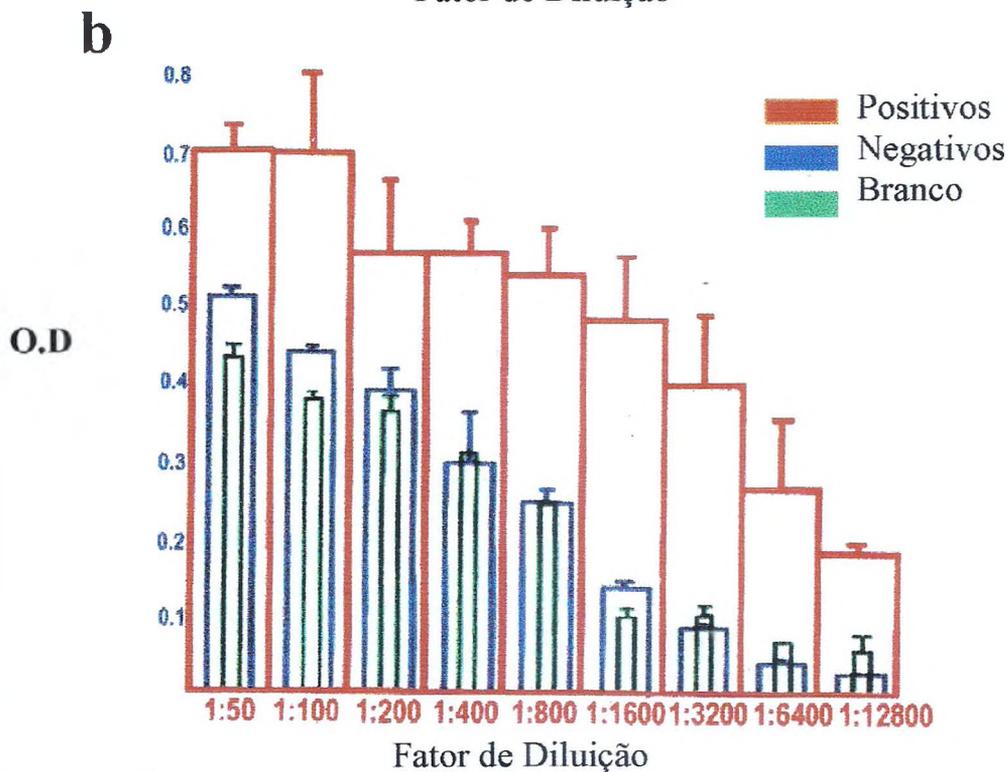
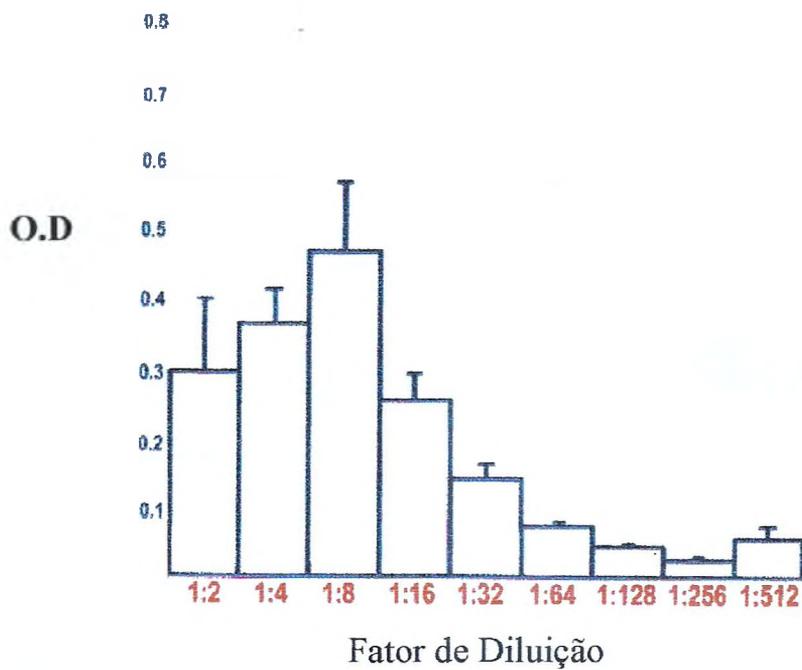


Figura 1. Gráficos representativos de experimentos controle, nos quais foram testados a melhor diluição da saliva para detecção do antígeno (determinante antigênico do *H. pylori*) (a) ou anticorpo IgA contra o antígeno a partir de amostras de pacientes que foram previamente diagnosticados através do teste respiratório e biópsia seguida de teste de urease e cultura como positivos (barras com margens vermelhas) ou negativos (barras com margens azuis). O.D= optical density.

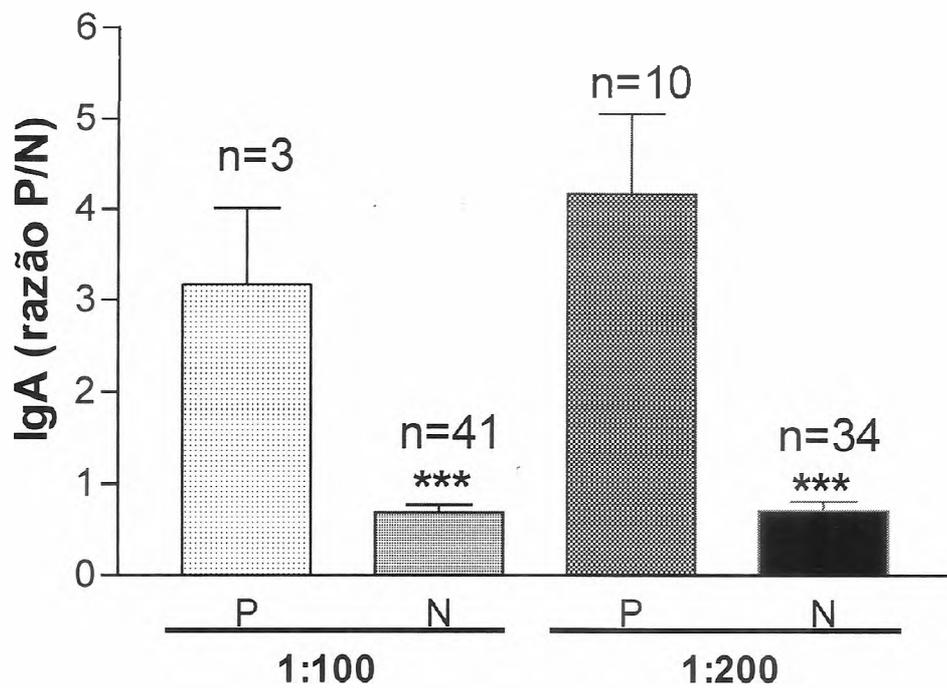


Figura 2. Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgA para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de crianças da comunidade Parque Universitário. *** $p < 0,001$.

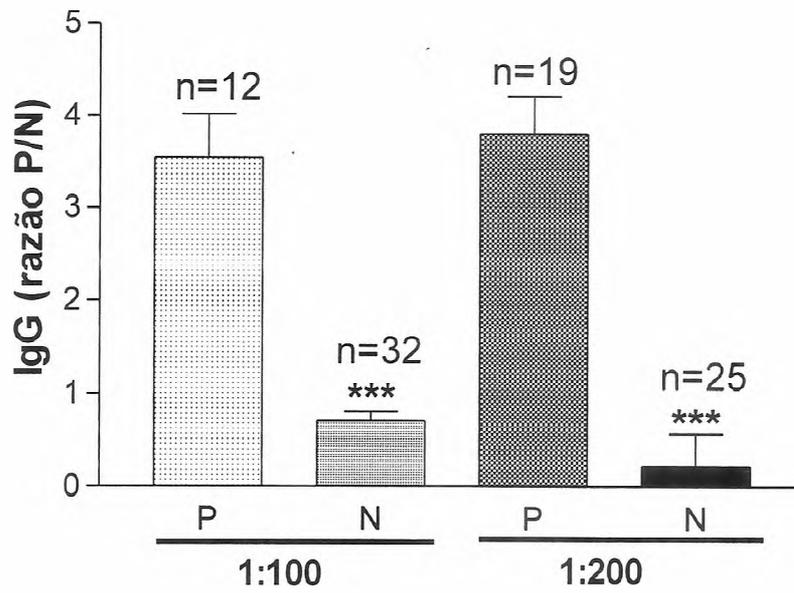


Figura 3. Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgG para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de crianças da comunidade Parque Universitário

Apresenta-se a seguir as primeiras determinações de IgA na saliva em adultos da comunidade Parque Universitário, (figura 4). Foram portanto utilizados as dosagens das salivas nas diluições de 1:100 e 1:200; verificou-se que nestas condições há diferenças no tocante a sensibilidade das diluições para IgA, uma vez que as médias nas duas diluições diferem muito, tanto nos grupos positivos quanto nos negativos, muitos dos quais se apresentaram com um número maior de positivos na diluição de 1:200; observou-se também que as médias dos valores positivos situam-se entre 2.8 e 3.5 dos quocientes obtidos. Esses dados estão apresentados na figura 4.

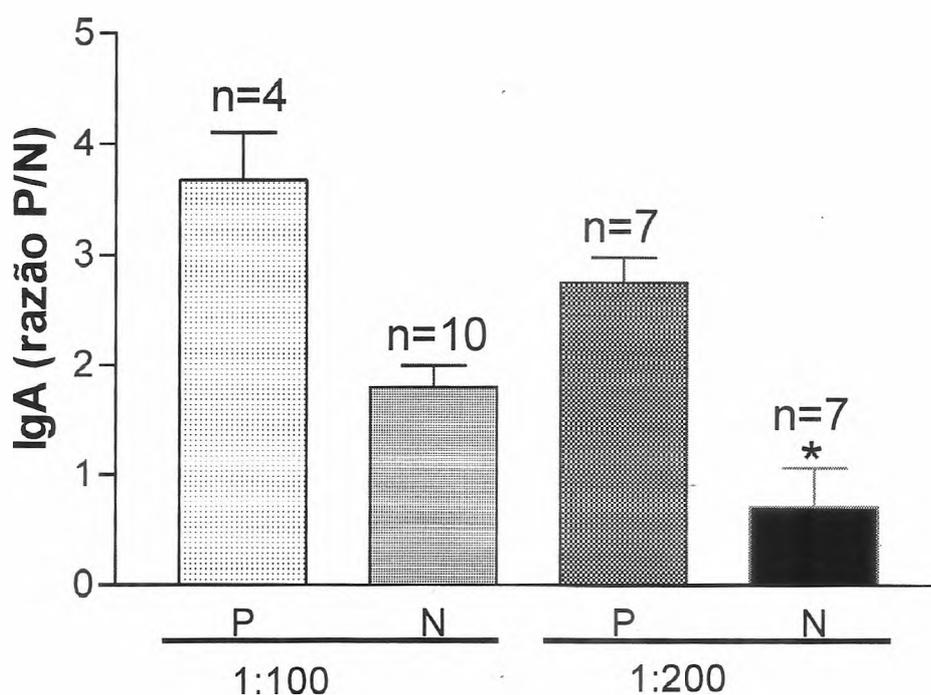


Figura 4. Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgA para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de adultos da comunidade Parque Universitário

Ainda no tocante as dosagens de IgA em salivas de crianças da comunidade (PU) os resultados expressos na figura 2, embora as diluições salivares de 1:100 sejam igualmente sensíveis, como já visto em pacientes adultos, os quocientes médios para a diluição de 1:200 apresentam médias bem maiores e acima de quatro; aqui as diferenças entre positivos e negativos são marcadamente significativas ($p < 0.001$) e por conseguinte, com um caráter discriminante claro entre positivos e negativos, em tudo muito semelhantes e com valores negativos para as duas diluições situadas nos mesmos níveis.

A seguir passou-se a investigar a concentração de IgG em amostras da comunidade nas mesmas diluições observadas para IgA, ou sejam 1:100 e 1:200. Observou-se que as razões entre positivos e negativos apresentam-se bastante diferentes, para ambas as diluições, conforme demonstrado na figura 3. Há diferenças estatísticas significativas entre os valores positivos para as duas diluições, sendo a diluição de 1:200 mais sensível na detecção dos positivos com 19 versus 12 na diluição menor (1:100). Cerca de 44 crianças foram avaliadas nestas condições, sendo detectados anticorpos contra *Helicobacter pylori* em 19 crianças.

Os membros das casas que continham as crianças, no caso as mães, foram igualmente avaliados, e, mais uma vez as 14 mães em que foram medidos IgA e IgG salivares (figuras 4 e 5), as diferenças entre os positivos nas duas diluições foram apenas aparentes já que as leituras médias na maior parte apresentou-se com médias mais altas, mas que não chegou, a haver diferença estatística entre as duas diluições conforme a figura 5. Todavia as diferenças entre negativos e positivos estão bastante caracterizados com valores em torno de 1 para os negativos e acima de 3 para os positivos, chegando a um máximo de 4.0; paradoxalmente, na

diluição maior. Êsses últimos resultados estão claramente expressos na figura 5.

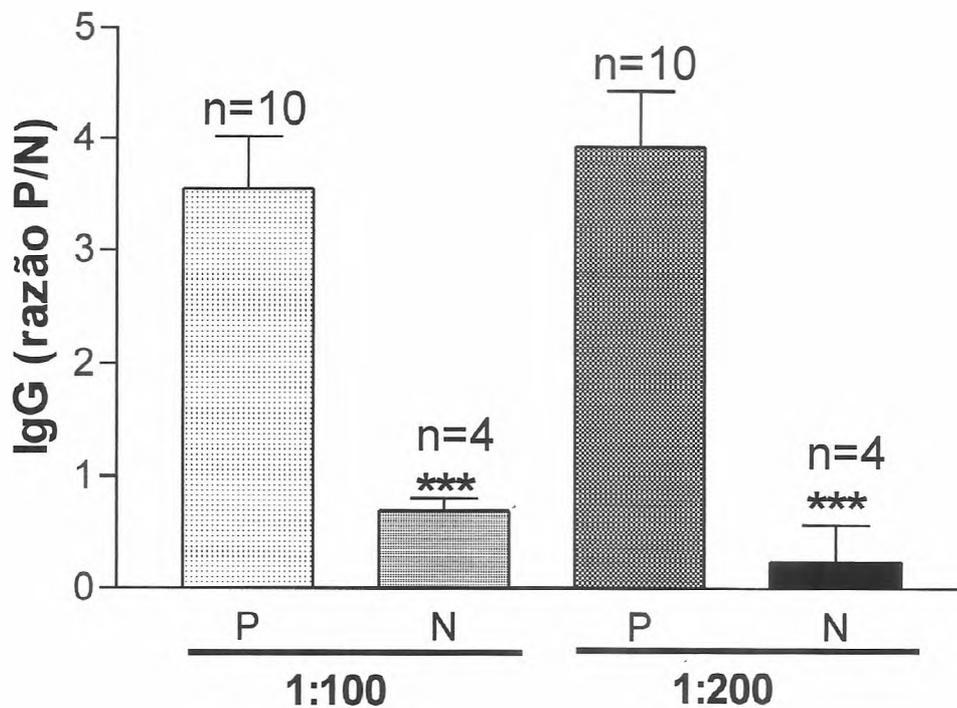


Figura 5. Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgG para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de adultos da comunidade Parque Universitário

Noutro grupo constituído por dez pacientes usados como controlos positivos externos, oriundos do serviço de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza (HGF), e urease positiva, em 7 pacientes apenas, determinadas em biópsias por via endoscópica (figura 6) e atestada pela determinação de urease.

Os resultados para IgA salivares desses pacientes do HGF, indicam pouca sensibilidade na detecção de positivos com apenas 2 casos definidos em ambas as diluições, conforme se demonstra na figura 6.

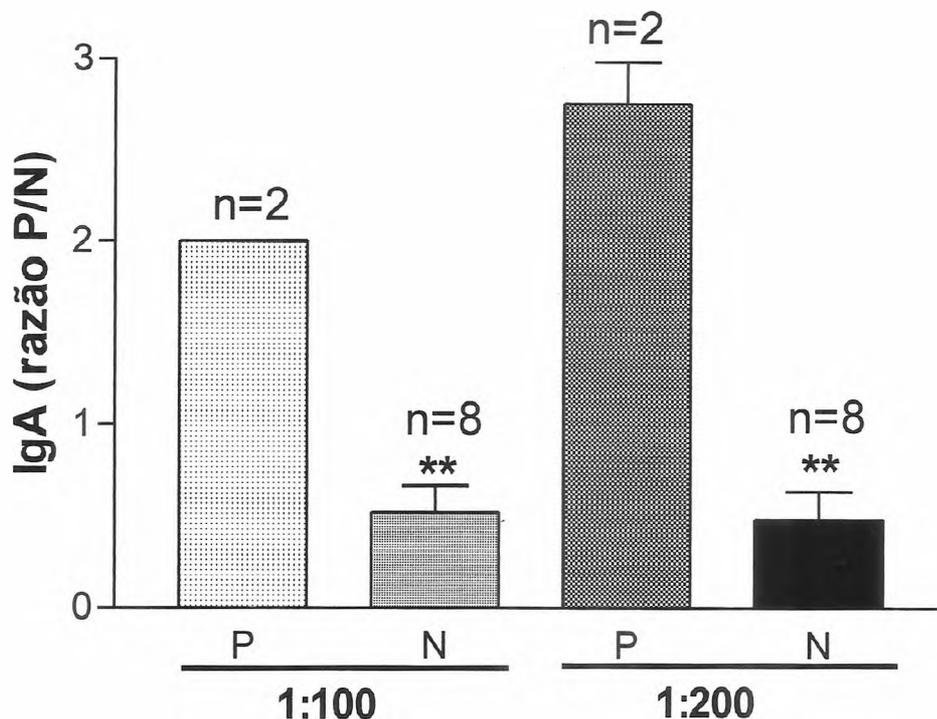


Figura 6. Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgA para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

Já os resultados da dosagem de IgG na saliva apresentaram um grupo negativo, com valores ligeiramente acima do limite de corte de 2 para positivos, para a diluição de 1:100. Na diluição de 1:200 os resultados positivos foram em número menor que nas diluições de 1:100. Os negativos se aproximaram de 1 enquanto os positivos apresentaram títulos em torno de 4, conforme a figura 7.

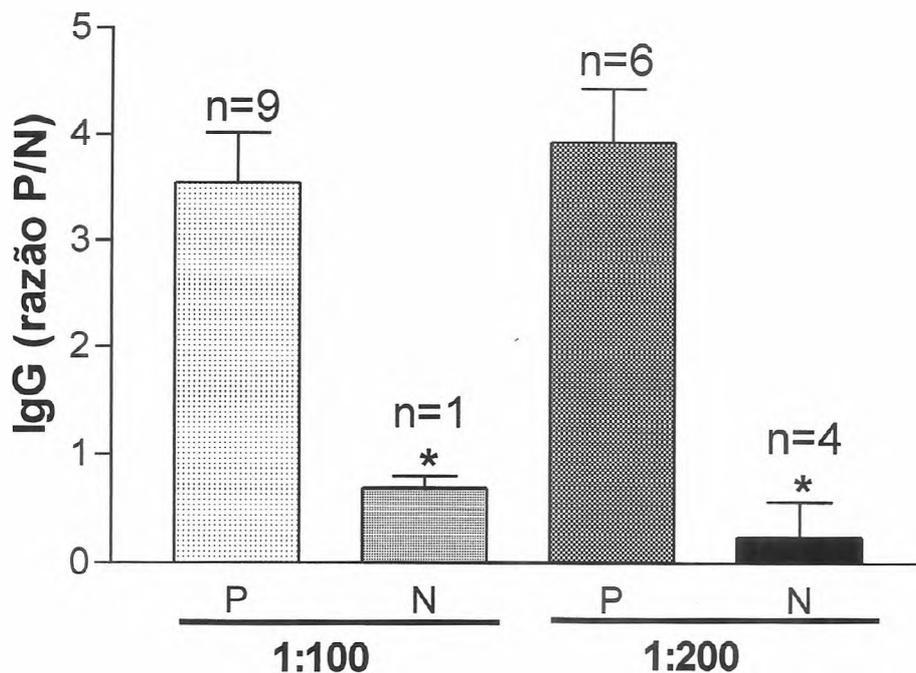


Figura 7. Histograma representativo do número de pacientes positivos (P) e negativos (N) em teste de detecção de IgG para *H. pylori* em saliva (diluições de 1:100 e 1:200) de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

Dos 10 pacientes adultos do HGF, todos tinham sintomas gástricos patentes ao exame clínico e, por isso, eles foram utilizados nestes ensaios e todos eles foram considerados IgG(+), exceto uma paciente que foi considerada ‘borderline’ com valor 1.8, isso na diluição de 1:100. Na diluição de 1:200 a positividade caiu para seis, sendo que um paciente apresentou valores médios de 1.91 e que por coincidência, tratava-se de um dos 3 urease negativos.

4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DOS DIVERSOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS:

A figura 8 faz uma comparação entre mães e filhos da comunidade Parque Universitário que foram avaliados “ positivos” pelo método de determinação de imunoglobulinas G e A salivares, e comparados por ELISA no soro, PCR nas fezes e Teste Respiratório. Percebemos deste gráfico que a dosagem de imunoglobulina G, na diluição de 1:200 aproxima-se muito do padrão de positividade sorológica e que o número de adultos infectados deve estar influenciando na taxa de contaminação das crianças. Os valores de PCR embora apresentem valores percentuais mais altos, mantêm essa mesma relação entre mães positivas e filhos positivos. Isso é também observado neste mesmo gráfico no tocante ao teste respiratório (TR). Um fato importante é que a relação de proporcionalidade “caindo em degraus” é melhor observado no soro, declinando de PCR a TR. Fica claro também que IgA apresenta sensibilidades diferentes entre crianças e adultos. Essa correlação de positividade pode ser melhor observada na mesma figura, quando avaliamos os resultados de positividade entre mães e filhos e os comparamos com os outros métodos de detecção. A relação mais sólida entre as mães compara-se melhor quando as dosagens do soro são cotejadas a IgG versus soro e neste caso IgA em adultos paralela aos dados de PCR, sendo que o teste respiratório apresenta-se ligeiramente menor que os dois outros de referência. Já para as crianças, nos demonstra o referido gráfico, que a detecção nesse grupo é menor pelo método de IgA na diluição de 1:100 e melhora na de 1:200.

Os testes sorológicos, juntamente com PCR e teste respiratório são indiferenciáveis do ponto de vista comparativo, e são provavelmente, semelhantes em sensibilidade. Quando mães e filhos positivos são

comparados percentualmente pelos diversos métodos, IgA é o único excluído, com baixa taxa de discriminação.

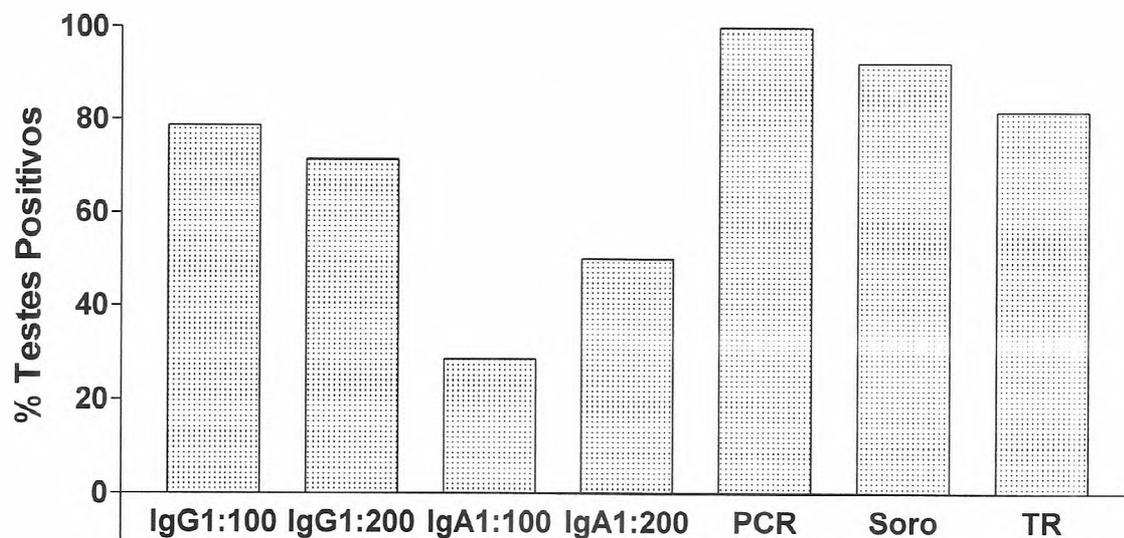


Figura 8. Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário Positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori*.

Na figura 9 é feita comparação com os valores de PCR, em termos percentuais em relação a imunoglobulinas na saliva e no soro. Percebe-se que IgG (1:100) na saliva, no soro padronizado e o teste respiratório têm valores semelhantes estatisticamente.

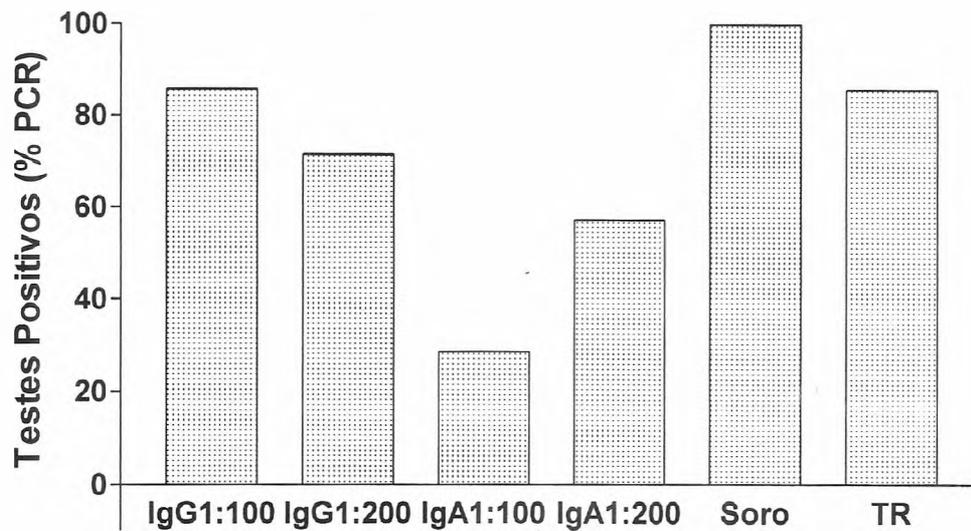


Figura 9. Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori* em relação ao universo de pacientes positivos no teste de PCR.

Na figura 10 são apresentados as comparações dos dados de IgG, IgA, PCR, e Sorológicos em relação aos pacientes positivos pelo teste respiratório. Quando se normaliza os valores de TR para 100% é que IgG apresenta maior índice de positividade que IgA e que êsses são semelhantes a PCR nas fezes.

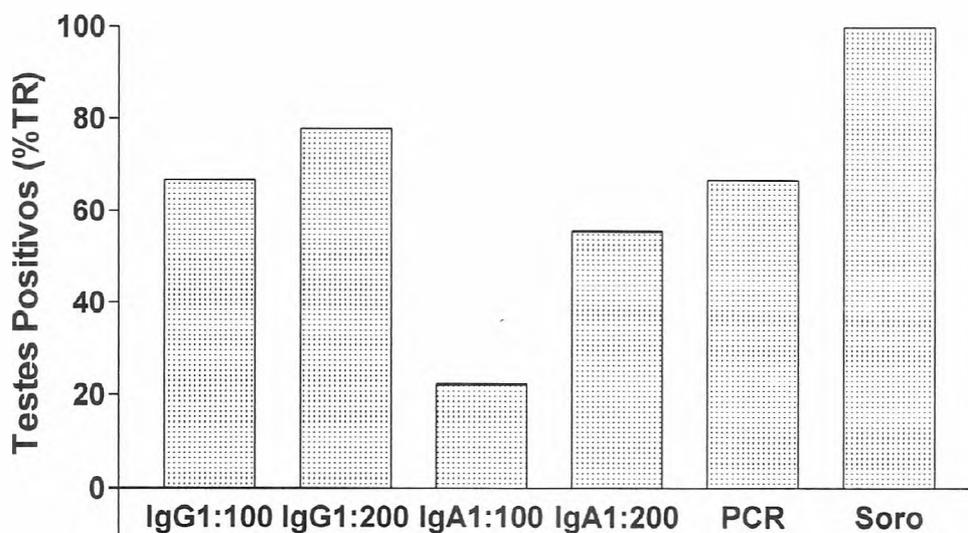


Figura 10. Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori* em relação ao universo de pacientes positivos no teste de TR.

Os títulos sorológicos de IgG são os mais próximos do padrão percentual de TR. Êsses resultados, como os da figura 11, correspondem a todos os casos positivos quando comparados respectivamente ou por TR (figura 10) ou por percentual sorológico (figura 11). Como não poderia deixar de ser, TR aqui é semelhante ao resultado sorológico e, mais uma vez IgG e PCR apresentam valores semelhantes, com IgA (1:100) sendo menos sensível, com melhora na diluição de 1:200.

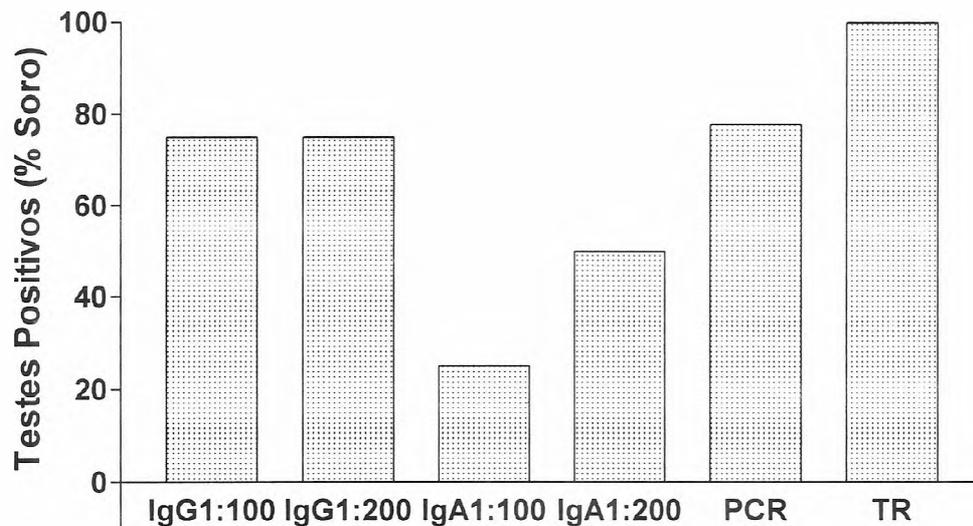


Figura 11. Percentual de pacientes da comunidade Parque Universitário positivos em diversos testes de detecção de *H. pylori* em relação ao universo de pacientes positivos no teste sorológico.

4.3 ANÁLISE DA POPULAÇÃO INFANTIL:

a) *IgA Salivar Negativo versus Proteínas Totais*

Realizou-se a seguir uma análise comparativa das dosagens de IgA por ELISA em salivas, com as dosagens de proteínas totais de crianças negativas. Observa-se como bem ilustra a figura 12a que há um “cluster” de distribuição dessas proteínas entre 20 e 80 mg, com redistribuição ao longo do eixo das abcissas (x) que chega a 360 mg /dl. Obviamente que não há uma correlação que identifique qualquer crescimento proporcional, como bem demonstram os valores negativos, já que eles se adensam em torno de valores muito semelhantes no que tange a relação positivos/negativos. Observações semelhantes podem ser detectadas da figura 12b, que corresponde a análise realizada para os casos em que IgA

apresenta-se na diluição de 1:200. Nas duas diluições percebe-se valores que se aproximam muito da média de positividade, isto é dois.

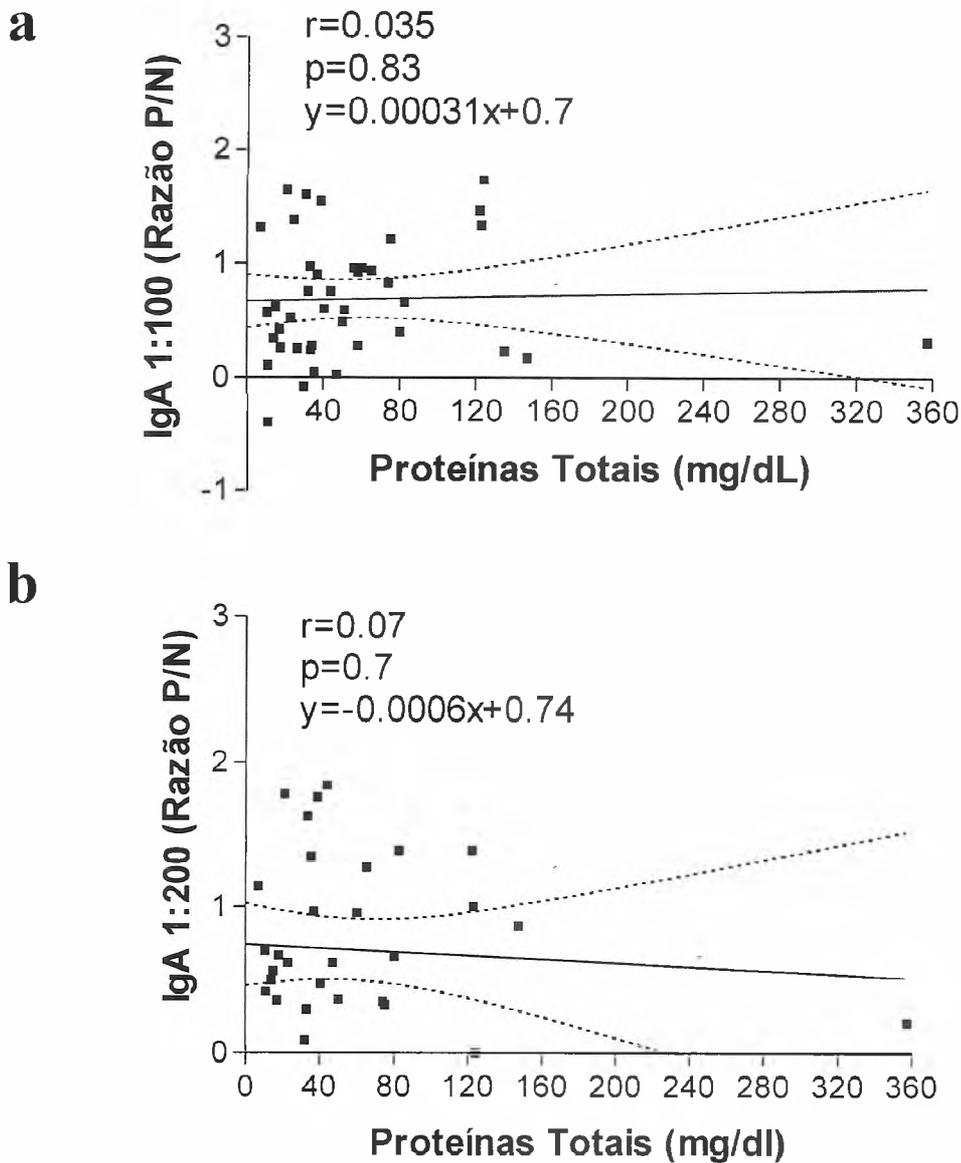


Figura 12. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

b) IgA Salivar Positivo versus Proteínas Totais

Na figura 13a demonstrou-se crianças com valores positivos correlacionando-os com as proteínas totais. Neste caso a dispersão dos valores foi muito grande e a correlação inexistente com distribuição de proteínas totais salivares variando de 20 a 230, apesar de na diluição 1:100, não ter sido observada correlação significativa entre os dois parâmetros. A reta entretanto, aproximou-se muito dos valores de significação ($p < 0.10$), não ocorrendo por se tratar de apenas 3 pontos.

A figura 13b avalia a correlação linear entre IgA, em dosagens salivares realizadas na diluição de 1:200, e as proteínas totais, conforme dosadas nos mesmos materiais das crianças consideradas positivas. Nesta diluição como pode ser observado, o número de casos positivos foi muito maior que na diluição anterior. A grande maioria dos casos positivos nesta diluição, cerca de 6 crianças, apresentou valores de proteínas totais entre 17.5 e 50.9mg/dL. Os restantes se distribuem entre 100 e 234mg/dL.

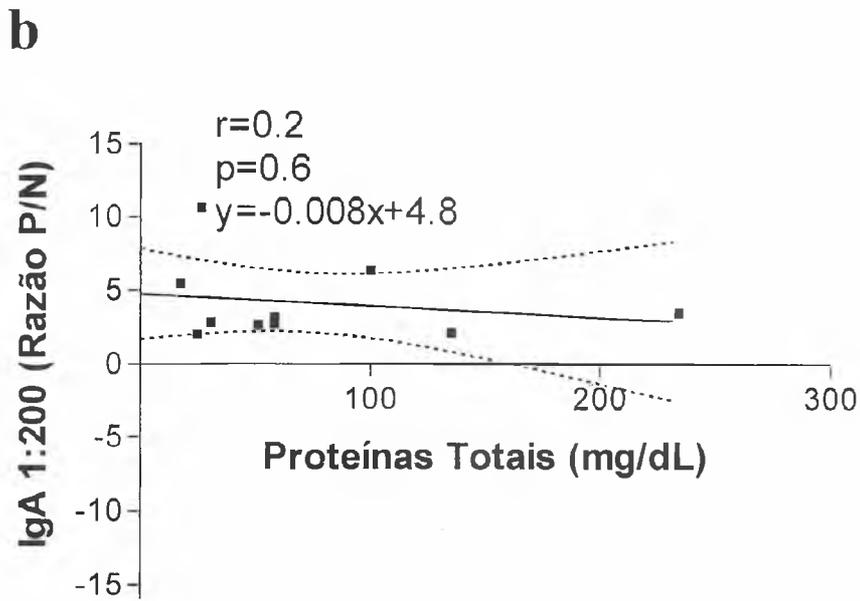
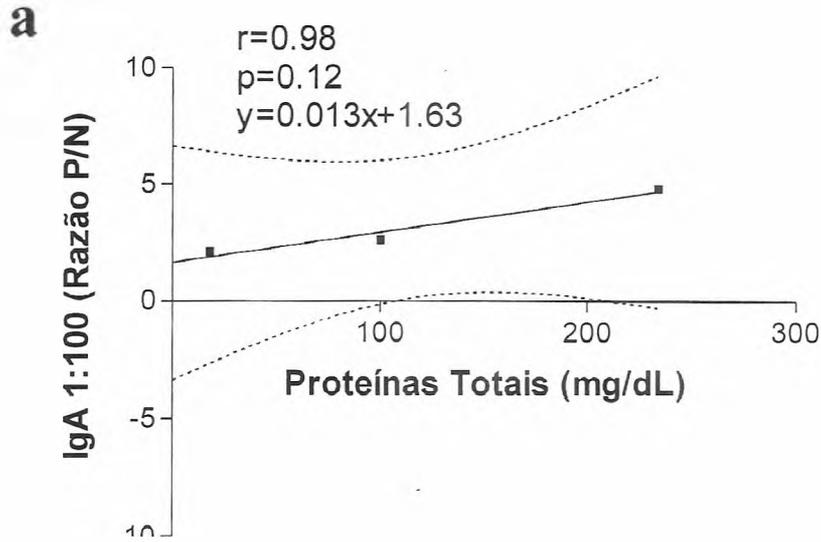


Figura 13. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

c) IgG Salivar Negativo versus Proteínas Totais

A figura 14a ofereceu um padrão típico percebendo-se a formação de um “cluster” muito denso entre 7 e 80 mg de proteínas salivares. A diluição de 1:100 para determinação de IgG, seguiu o mesmo padrão de falta de correlação entre os títulos negativos salivares e proteínas totais na saliva dessas crianças. Novamente se observa alguns títulos borderline cerca de três.

O estudo da regressão linear na população de crianças para IgG (1:200) em relação as proteínas totais, para os pacientes negativos se apresentou semelhantemente as análises anteriores com distribuição muito uniforme ao longo do eixo das abcissas variando entre 7 e 122.8 no tocante as proteínas totais, conforme apresentado na figura 14b, havendo alguns valores negativos e portanto discrepantes da média geral. Não há correlação significativa entre êsses dois parâmetros.

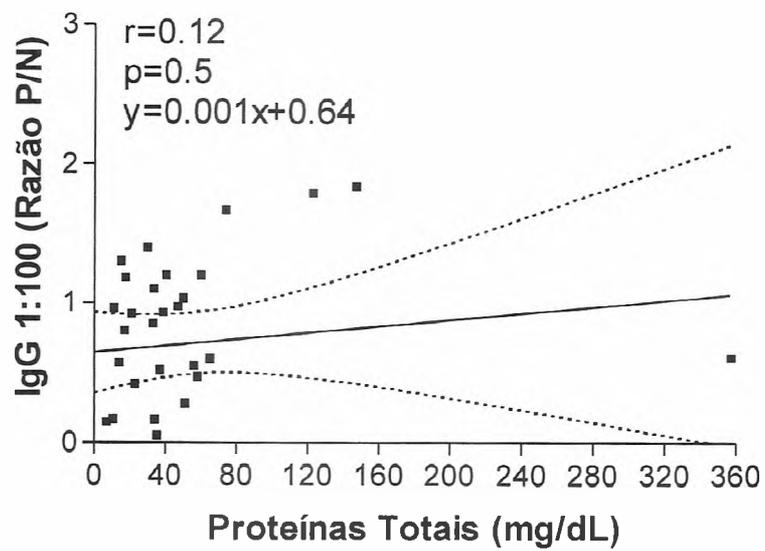
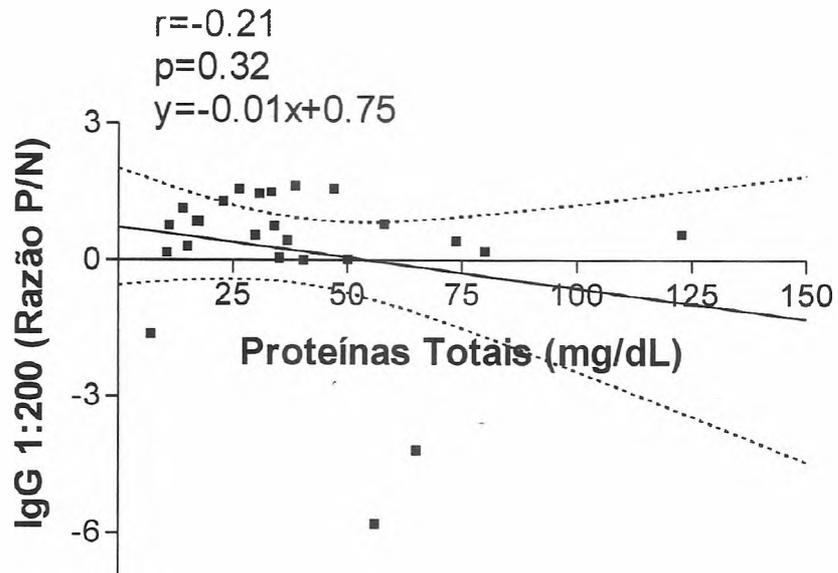
a**b**

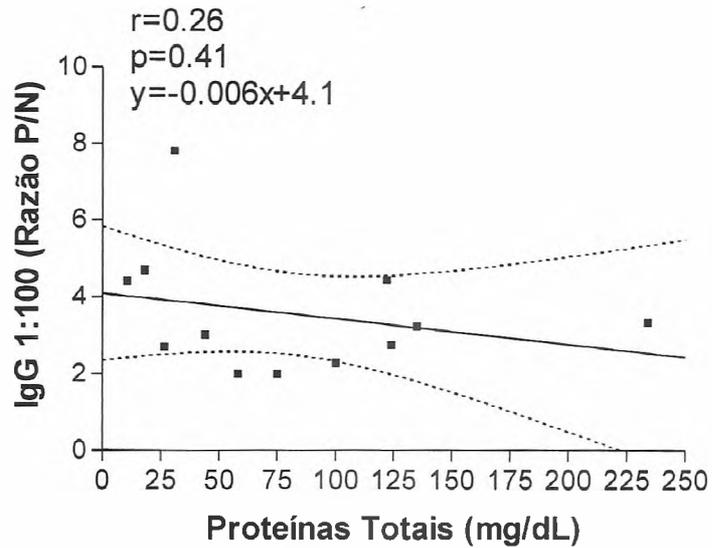
Figura 14. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

d) IgG Salivar Positivo versus Proteínas Totais

Como demonstrado na figura 15a, ao se correlacionar a diluição de 1:100, para determinação de IgG, nos casos de crianças positivas, também não se observou nenhuma correlação. Há neste gráfico ausência de densidade de proteínas em torno de uma média comum, como está bem caracterizado na distribuição de valores limites que vão de 10.6 a 234.

Na figura 15b são avaliadas as correlações entre títulos de IgG na diluição maior em salivas de crianças positivas e proteínas totais. O espectro gráfico é semelhante ao anterior como uma ligeira tendência a um adensamento maior entre 20 e 140mg/dL de proteínas totais, havendo valores mais espalhados até um máximo de 360. Não há nenhuma correlação estatística, mas o valor de $p=0.8$, está mais próximo dos 5% estabelecidos na pesquisa como limite de significância.

a



b

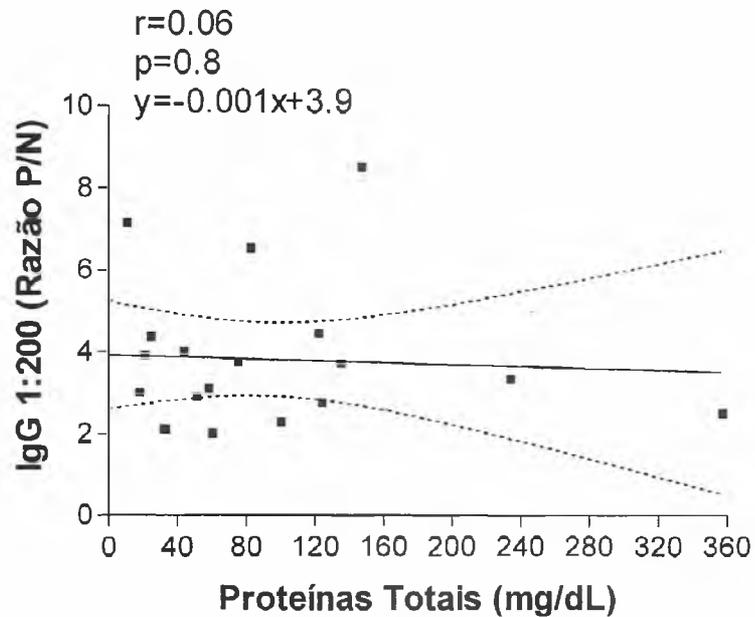


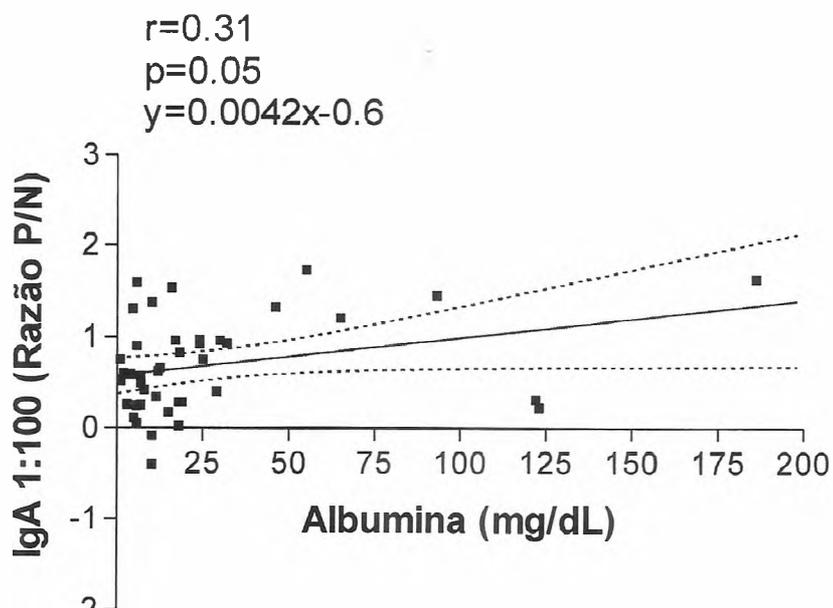
Figura 15. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

e) *IgA Salivar Negativo versus Albumina*

Outra avaliação interessante foi obtida pela determinação espectrofotométrica de albumina salivar. A correlação com IgA, de pacientes infantis mostrada na figura 16a demonstra valores de albumina salivar muito adensados entre 1 e 30mg/dL, com cerca de nove casos de concentrações mais altas, e, um deles revelando um extremo de concentração 10 vezes maior, com quase 186mg/dL. Há aqui uma reta que demonstra correlação significativa ($p < 0.05$) entre as concentrações de albumina salivar e as variações de IgA nas crianças negativas, na diluição de 1:100. Portanto a reta obtida está dentro dos limites de significância, que se deve a um certo adensamento dos valores desses pacientes negativos.

A figura 16b, em que o mesmo gráfico representativo, é expressa a diluição de 1:200, demonstra em essência as mesmas características, quando amostras de saliva de crianças negativas são comparadas com um suposto marcador biológico. Aqui não se observa linearidade.

a



b

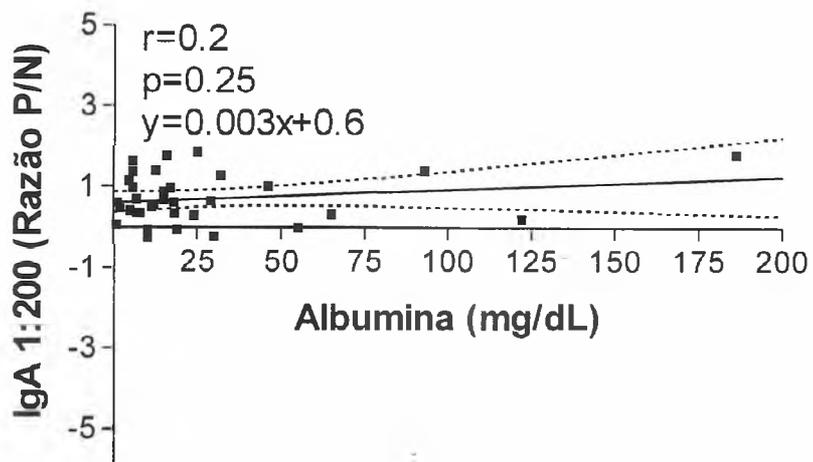


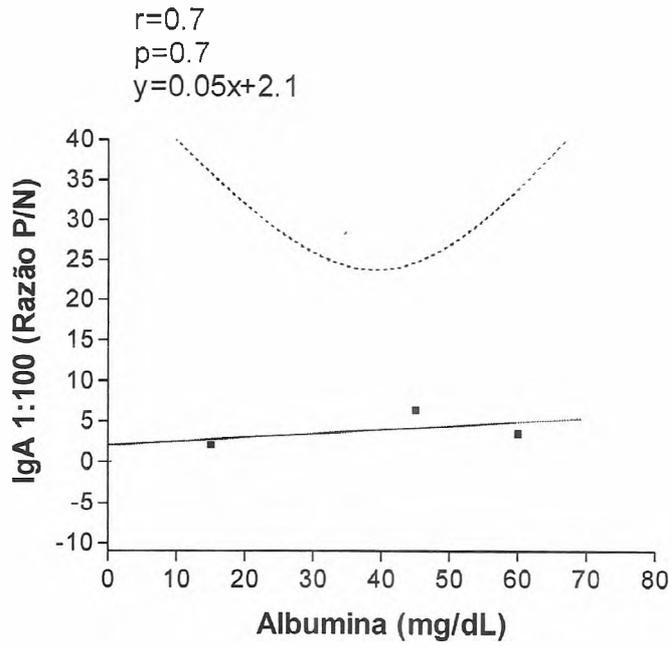
Figura 16. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

f) IgA Salivar Positivo versus Albumina

As crianças positivas, em número de 3, na diluição de 1:100 apresentadas na figura 17a, detectou-se a mesma ausência de correlação entre albumina e IgA salivares, e, como já comentado, nesta diluição apenas 3 crianças foram positivas e, dado pequeno número de casos não se observa significância estatística.

Na figura 17b compara-se as salivas positivas para IgA na diluição de 1:200 com albumina salivar. Mais uma vez, não há qualquer relação entre os níveis de albumina e as concentrações de IgA. No intervalo de 3 a 25mg/dL de albumina, observou-se a frequência de títulos de IgA, como também os maiores valores, isto é, sendo observado também o inverso, com completa ausência de correlação linear.

a



b

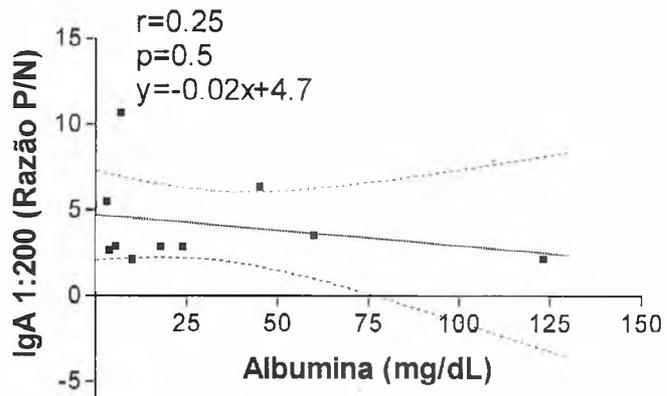
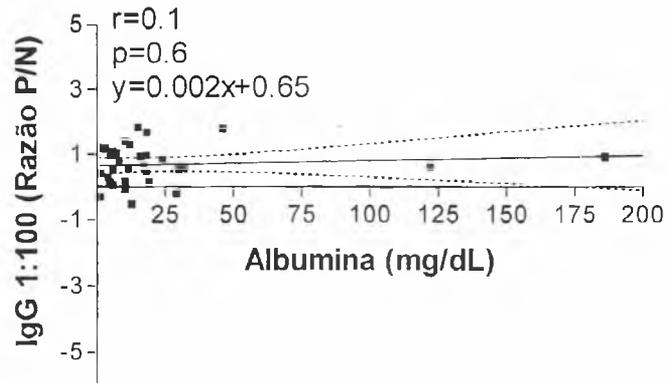


Figura 17. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

g) IgG Salivar Negativo versus Albumina

A seguir fez-se a correlação entre IgG salivar na diluição de 1:100 e as concentrações de albumina das salivas dessas mesmas crianças consideradas negativas e não se detectou qualquer significado estatístico da reta, a qual está expressa na figura 18a. O que se observou mais uma vez foi um adensamento entre 1-25mg/dL de albumina com alguns pontos espalhados ao longo de x. A figura 18b aponta para o mesmo cenário, só que na diluição de 1:200 os valores estão menos compactados; não há valores espalhados ao longo das abcissas, gerando-se uma reta de expressão estatisticamente significativa ($p=0.03$), inclinada e tendo para as abcissas.

a



b

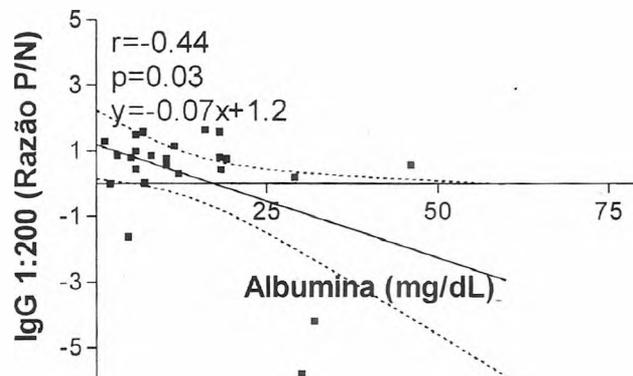


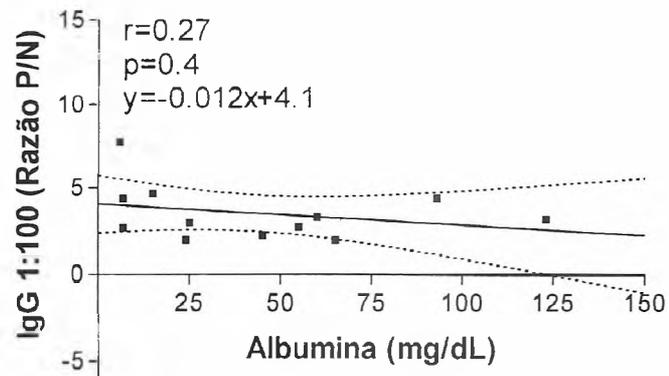
Figura 18. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

h) IgG Salivar Positivo versus Albumina

A figura 19 retrata a relação dos títulos salivares de crianças positivas para IgG nas duas diluições estudadas, em correlação com a albumina salivar. Enquanto que na diluição de 1:100 (figura 19a) percebe-se três grupos distintos de distribuição em torno de 5.7 e 25mg/dL; um segundo entre 45 e 70 e, finalmente dois pontos dispersos entre 90 e 125mg/dL de albumina. Na diluição de 1:200 (figura 19b) a distribuição dos títulos de IgG, concentra-se sobretudo entre 1 e 25mg/dL de albumina, redistribuindo-se os demais ao longo das concentrações que vão de 50 a 190. Deduz-se que nesta análise não há qualquer correlação.

Ainda na diluição de 1:200, conforme enfatizado anteriormente, o número de positivos é bem maior, cerca de 19, mas sem qualquer silhueta gráfica que delimite a presença de uma reta que esteja associada aos valores uniformes. De fato chega-se a detectar valores bem mais altos de IgG associados a valores baixíssimos de albumina, quadro verificado também em 19a mas com menor intensidade.

a



b

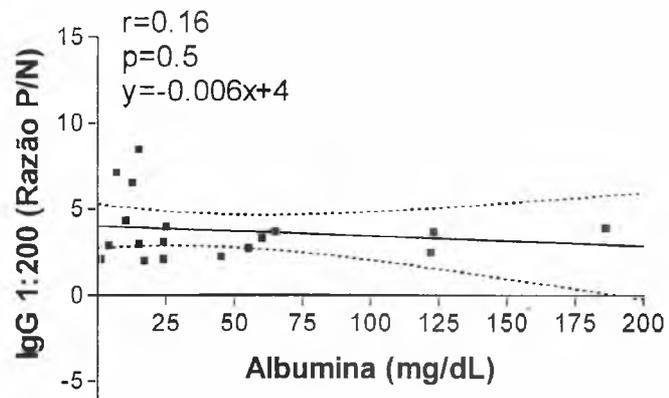


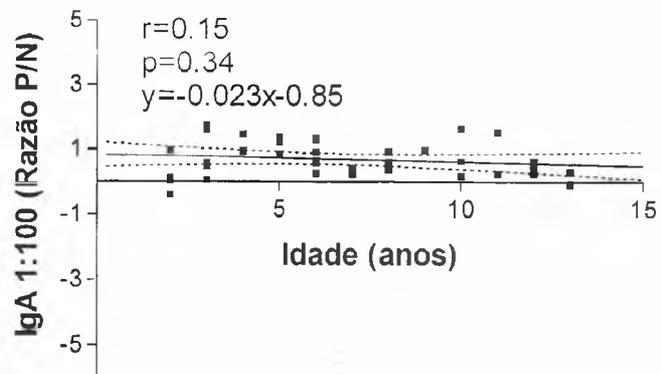
Figura 19. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de crianças da comunidade Parque Universitário.

i) IgA Salivar Negativo versus Faixa Etária

O gráfico correspondente a figura 20a demonstra, para os valores negativos de IgA (1:100) uma distribuição de idades no período de 10 anos, sem qualquer correlação de linearidade entre os dois parâmetros. O gráfico demonstra também que encontramos valores negativos ao longo de quase todas as idades dos infantes estudados.

A figura 19b aponta uma visão de como as crianças negativas se distribuem por faixa etária ao longo das diversas idades. Além de não haver qualquer correlação linear entre os níveis de IgA e distribuição etária, pode-se detectar também neste gráfico que os pacientes negativos representam um espectro muito bem distribuídos de 2 a 12,5 anos de idade, numa reta que acompanha o eixo das abcissas, como na diluição menor. Aí, chega-se a mesma conclusão de que o gráfico da figura 20b, no tocante as comparações etárias têm distribuição semelhantes a anterior, exceto que a distribuição de idades se faz num intervalo menor, entre 2 e 12 anos. Aqui neste mesmo gráfico encontra-se talvez a melhor correlação linear deste estudo que se aproxima muito do valor mínimo de significância.

a



b

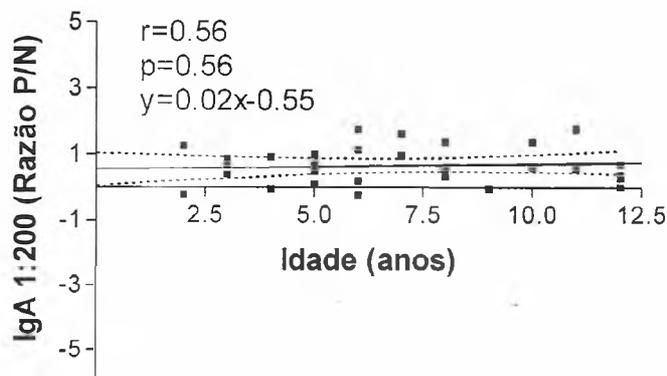
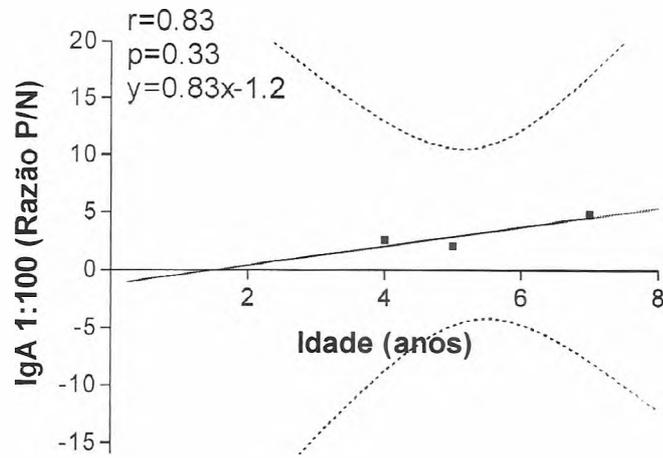


Figura 20. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade das crianças da comunidade Parque Universitário.

j) IgA Salivar Positivo versus Faixa Etária

A correlação entre crianças IgA positivas nas diluições 1:100 e 1:200 com os grupos etários estão expressos nas figuras 22a e 21b. Na primeira diluição são apenas 3 casos positivos, que devido ao próprio tamanho da amostra, não apresentam significância e estão distribuídos entre 4 e 7 anos. Já na diluição maior, encontramos a melhor significância deste estudo. As idades se distribuem entre 2 e 10 anos crescendo escalonadamente os seus títulos a medida que as crianças adquirem idade maior. A equação da reta está muito bem delineada com um $p=0.0008$, portanto altamente significativo. Aqui o gráfico demonstra de maneira inequívoca que existe um aumento dos valores de IgA com a idade, crescendo os títulos de IgA dos 2 aos 10 anos e portanto gerando-se uma reta de caráter ascendente.

a



b

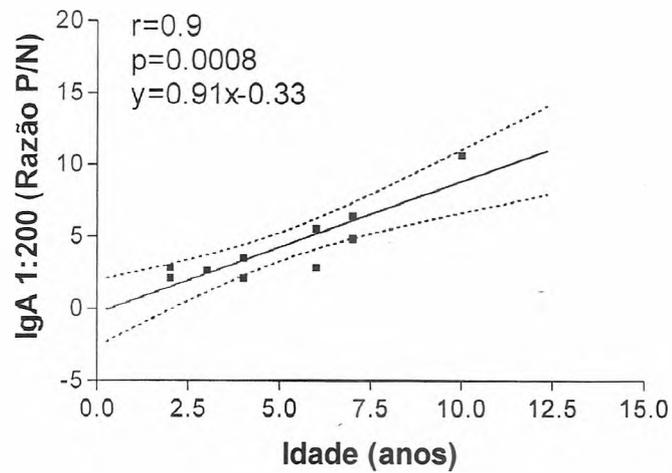
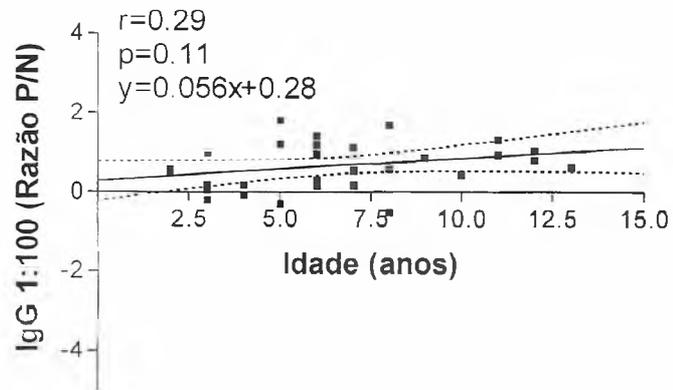


Figura 21. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de crianças positivas para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com a idade das crianças da comunidade Parque Universitário.

k) IgG Salivar Negativo versus Faixa Etária

A figura 22 demonstra como se distribuem em relação as idades as crianças com títulos negativos para IgG. Percebe-se um adensamento maior de 2 e 3 anos; os outros valores se espalham para as direções dos dois anos ou para o limite maior de cerca de 13 anos. Na diluição de 1:200 figura 22b, observa-se em essência a mesma tendência. Nos dois casos não se verifica correlação linear significativa, demonstrando que a positividade para IgG salivar contra *H.pylori* se distribui ao longo de vários grupos etários da infância. A distribuição é quase paralela ao eixo das abcissas, mas sem nenhuma relação linear, mostrando que pacientes negativos estão distribuídos ao longo de todas as idades e sem formação de adensamentos etários.

a



b

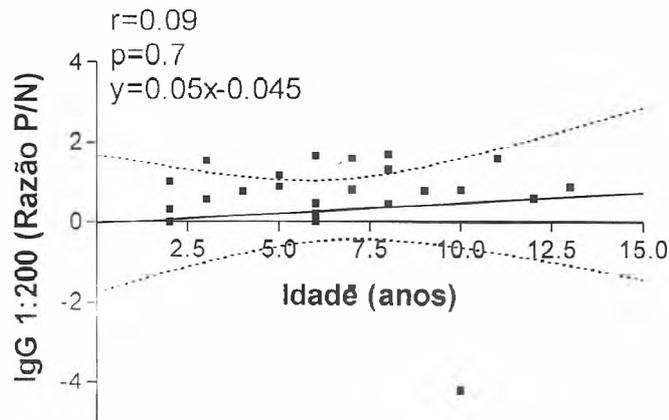


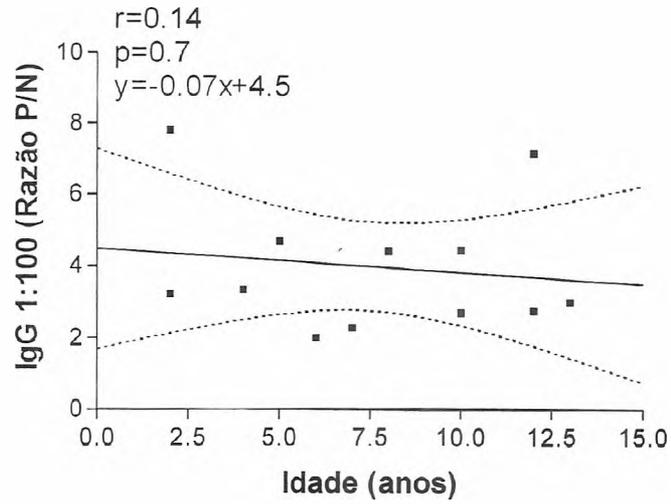
Figura 22. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade das crianças da comunidade Parque Universitário.

l) IgG Salivar Positivo versus Faixa Etária

Na figura 23 avalia-se as relações entre títulos de crianças IgG positivas e as suas idades, como já verificado não se observa nenhum “cluster” mas uma dispersão entre 2 e 13 anos. Não há uma expressão de linearidade significativa na figura 23a. Na diluição de 1:200 o quadro de distribuição mantém relação semelhante (figura 23b), observando-se títulos altos ao longo de toda a faixa etária estudada.

A distribuição das idades das crianças positivas para IgG está portanto constituída de maneira caótica sem expressão de correlação de linearidade.

a



b

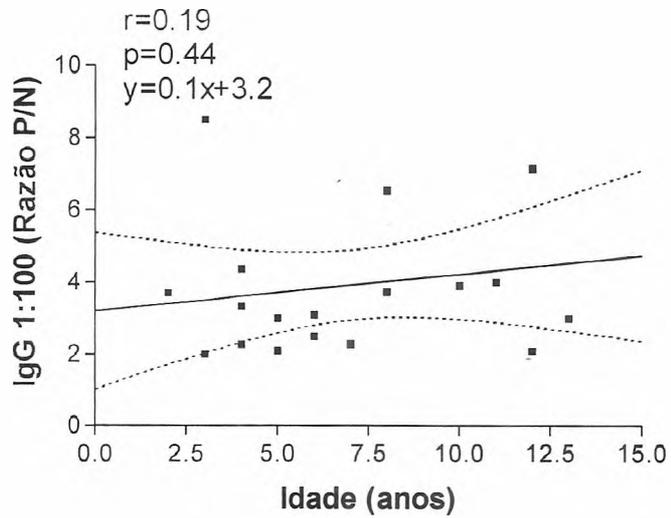


Figura 23. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade das crianças da comunidade Parque Universitário.

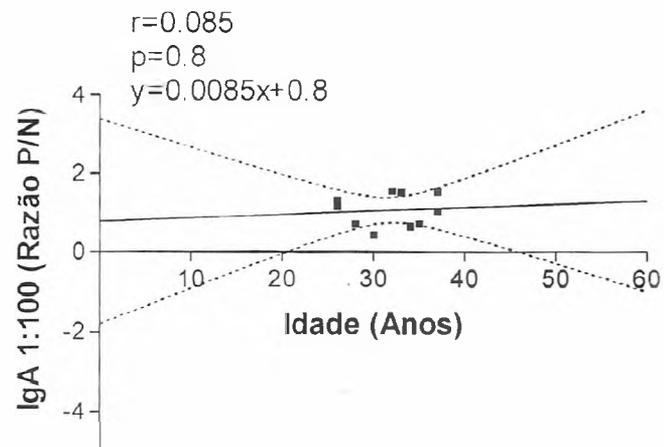
4.4 ANÁLISE DAS MÃES:

a) IgA Salivar Negativo versus Faixa Etária

Passou-se a seguir a avaliar os pacientes residentes nas habitações das crianças estudadas, ou seja, os seus “contactos,” epidemiologicamente falando. Iniciou-se pelo estudo da distribuição das idades, por estabelecerem uma linha de “corte” entre a população infantil e a adulta, aqui se referindo às mães.

Foram considerados adultos pacientes a partir de 18 anos. Na figura 24a vê-se a relação entre os pacientes negativos para IgA salivar e suas idades na diluição de 1:100. Como seria antecipado, nesses pacientes, a distribuição é adensada entre 25 e 35 anos, com apenas duas mães com 37 anos; o mesmo perfil é observado para a diluição 1:200 (figura 24b) em que 7 adultos são considerados negativos. Não há correlação linear significativa nas duas condições.

a



b

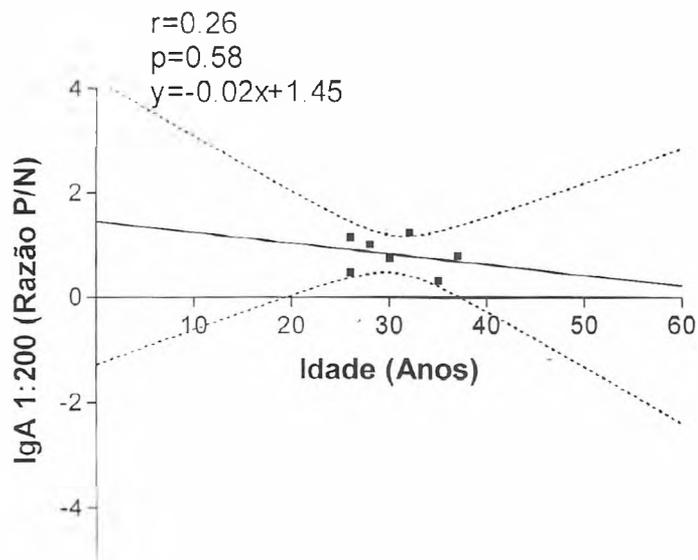
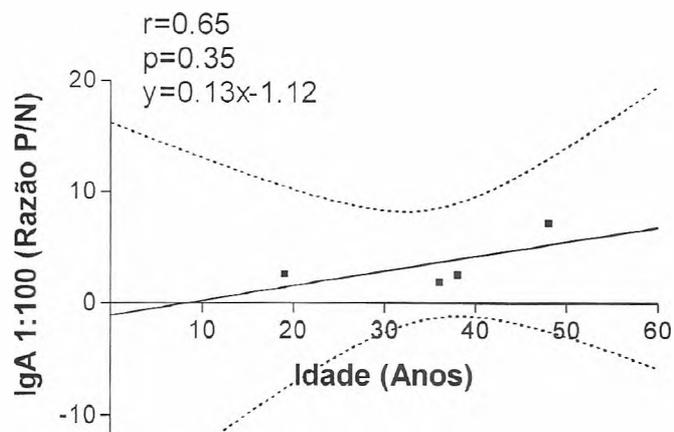


Figura 24. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário.

b) IgA Salivar Positivo versus Faixa Etária

Estudou-se logo após IgA na diluição de 1:100 (figura 25a). Os pacientes positivos adultos detectados nesta diluição foram de apenas 4; exceto pelo paciente mais idoso que apresentou o valor mais alto (mais de 7) com a idade quase 10 anos acima dos outros, os demais apresentam média muito semelhante, variando entre 19 e 40 anos. A correlação demonstra-se não linear como esperado. Na diluição de 1:200 (figura 25b), os números apontam para 7 adultos positivos que estão com igual situação, uma vez que a reta obtida demonstra uma pequena inclinação no sentido do eixo do x. Apenas 1 caso sofre uma tendência de valor mais distante da média geral. O número pequeno de casos contribui para a falta de correlação estatística.

a



b

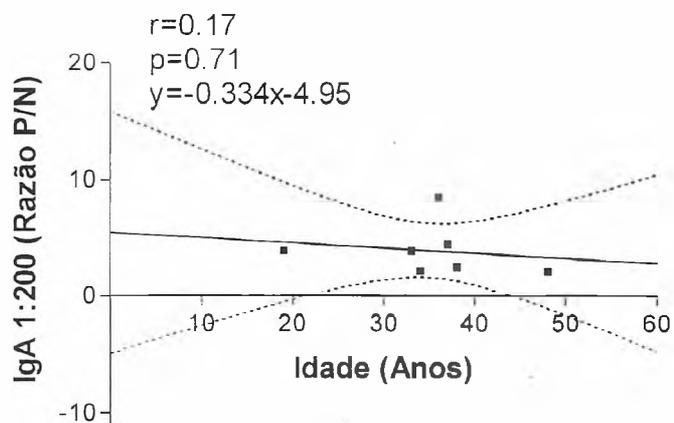


Figura 25. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário.

c) *IgG Salivar Negativo versus Faixa Etária*

Trata-se a seguir da relação entre IgG salivar e sua correlação com a idade, nos pacientes adultos pertencentes ao Parque Universitário. As idades dos negativos situam-se entre 19 e 36 anos. Já o número de negativos para IgG não apresenta relação linear favorável, situando-se numa reta que intercepta o eixo do x. Isso se deve ao fato dos negativos serem mais compactos. Essas distribuições expressas na figura 26a, configuram $p=0.08$, isto é próximo do nível de significância.

Na figura 26b, os quatro pacientes adultos negativos, já não apresentam a mesma distribuição e a reta demonstra ausência de correlação com a idade.

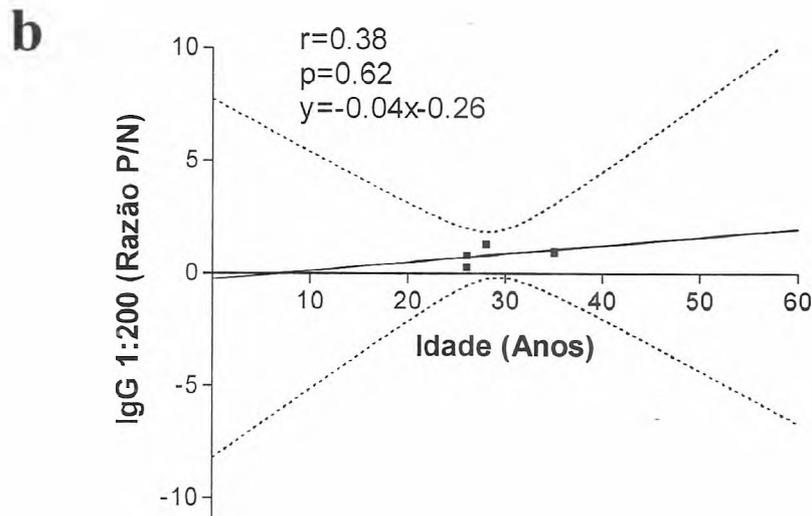
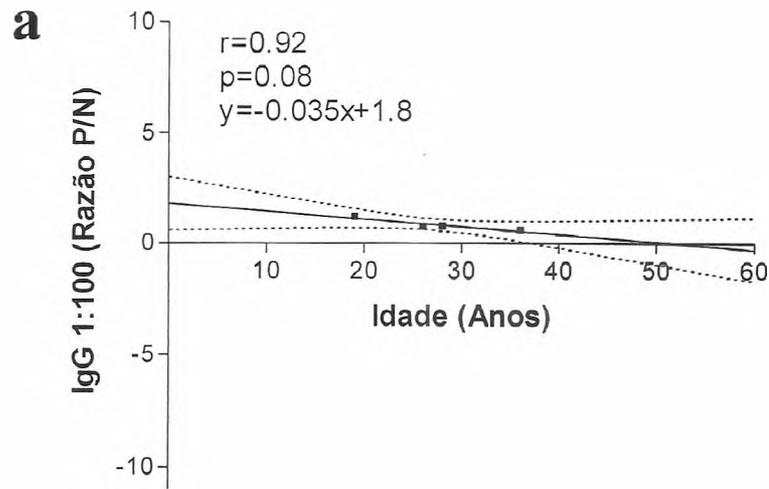
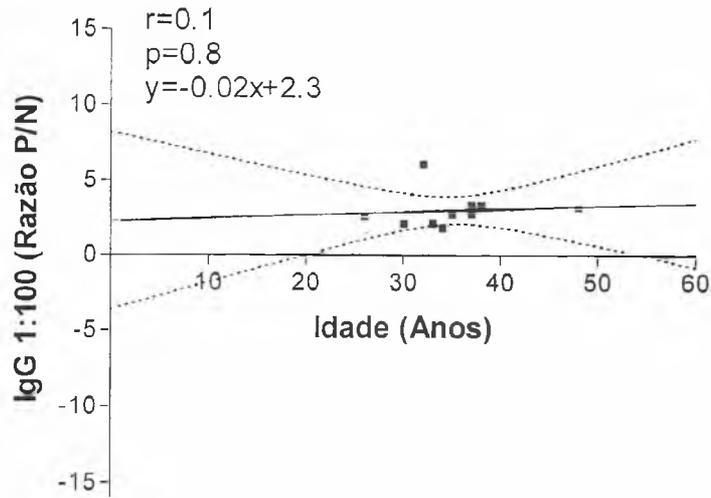


Figura 26. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário.

d) IgG Salivar Positivo versus Faixa Etária

A figura 27 trata deste mesmo grupo de pacientes, desta vez comparando aqueles considerados positivos comparados em as distribuições de suas idades. Em 27a os pacientes IgG positivos, em número de 10, formam um pequeno “cluster” distribuídos entre 30 e 40 anos. Na diluição de 1:200 (figura 27b), os pacientes positivos correspondem a 10 e se distribuem de maneira muito semelhante a 26a, com um caso positivo com menos de 20 anos. Em ambas as condições não houve correlação linear significativa, e em ambos os casos a reta tem um $p=0.8$, portanto muito alto.

a



b

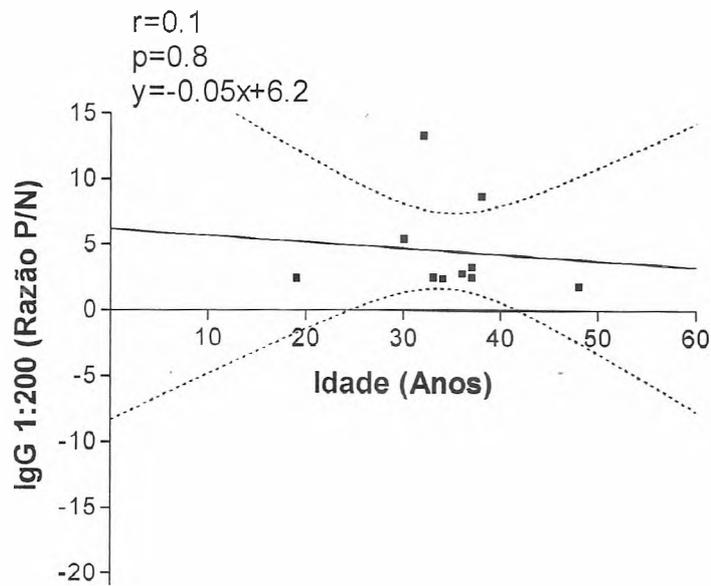


Figura 27. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (**a**) ou 1:200 (**b**) e controle negativo com idade de mães da comunidade Parque Universitário.

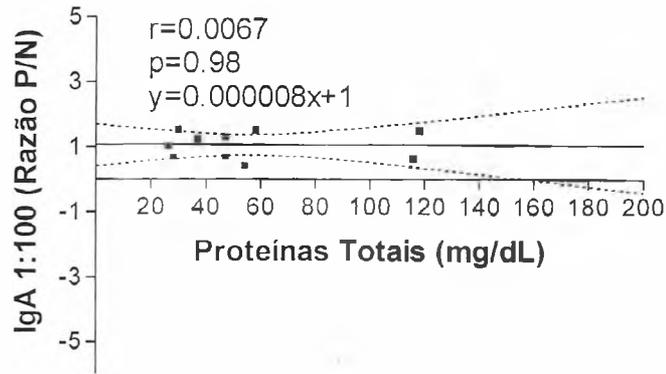
e) IgA Salivar Negativo versus Proteínas Totais

Quanto a distribuição dos pacientes negativos para IgA, embora o número de casos seja maior, é possível verificar que na diluição de 1:100 as proteínas totais salivares não se correlacionam com a imunoglobulina estudada.

Ao avaliar-se a figura 28a percebe-se que a maioria dos títulos negativos situa-se entre 25-60mg/dL de proteínas totais, com apenas 2 dosagens acima de 100mg/dL.

Em consequência não há, igualmente, nenhuma correlação linear entre os dois parâmetros, na outra diluição estudada (figura 28b). A distribuição dos títulos de IgA deste gráfico situa-se entre 25 e 60 mg/dl. Não há linearidade na correlação.

a



b

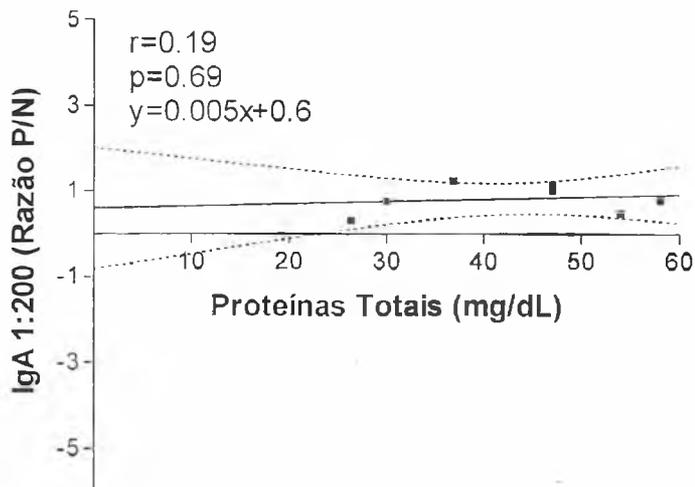
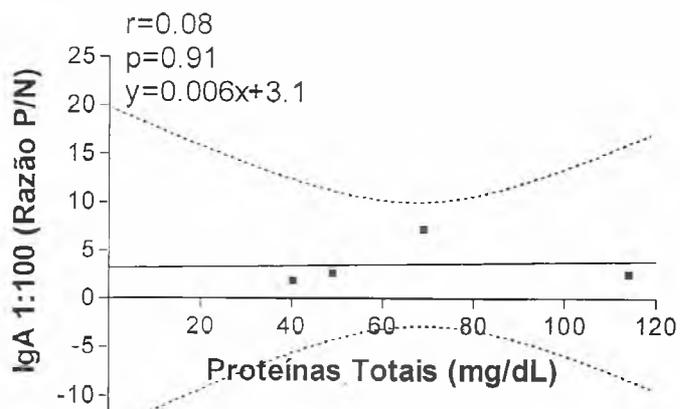


Figura 28. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

f) IgA Salivar Positivo versus Proteínas Totais

Em 29a, configuram-se os quadros já descritos: um grupo pequeno, no caso 4, pacientes positivos se distribuem entre 40 e 120 mg/dl de proteínas totais nas salivas; na maior sete pacientes se distribuem semelhantemente porém formando reta mais próxima do limite de significância.

a



b

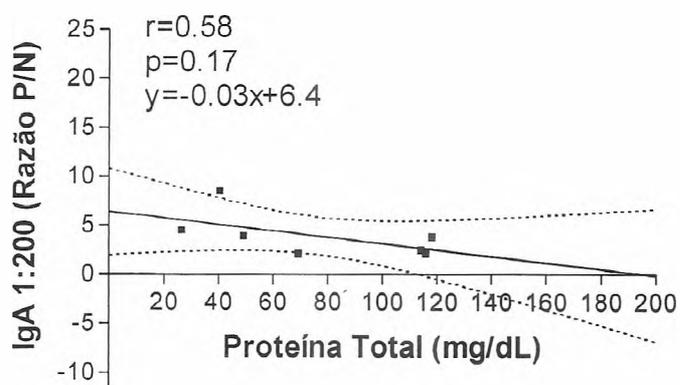


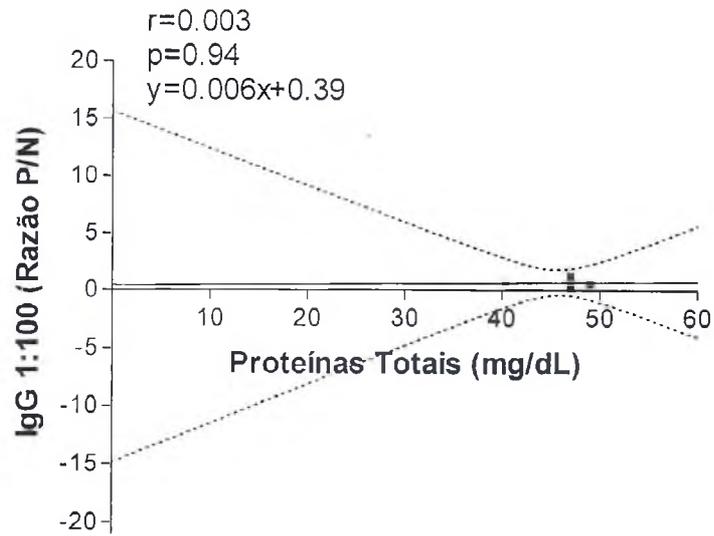
Figura 29. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

g) IgG Salivar Negativa versus Proteínas Totais

A figura 30 compara as imunoglobulinas G de mães negativas com a concentração de proteínas totais salivares. Na 30a é demonstrado a correlação, com as mesmas variações já descritas. Quatro pacientes apresentam valores entre 40-50 mg/dL de proteínas.

Na diluição de 1:200 ocorre praticamente a mesma distribuição, com 4 títulos entre 28 e 54 mg/dL. O gráfico 30b apresenta correlação semelhante $p=0.82$ e 0.94 , com uma reta paralela as abcissas. Os dois gráficos estão muito longe de uma correlação significativa.

a



b

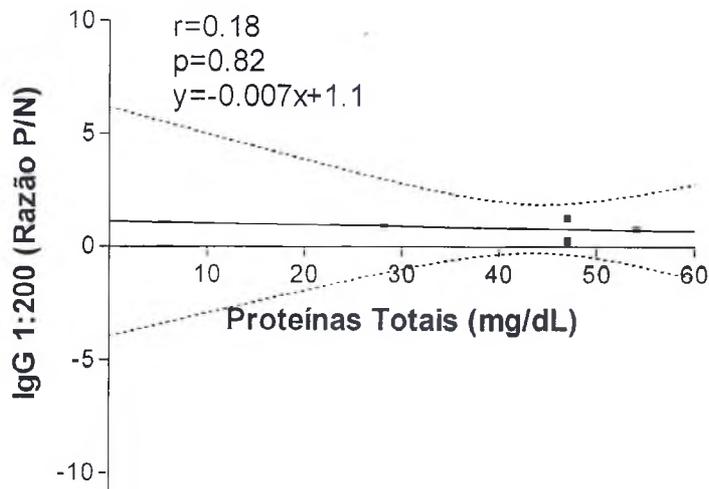
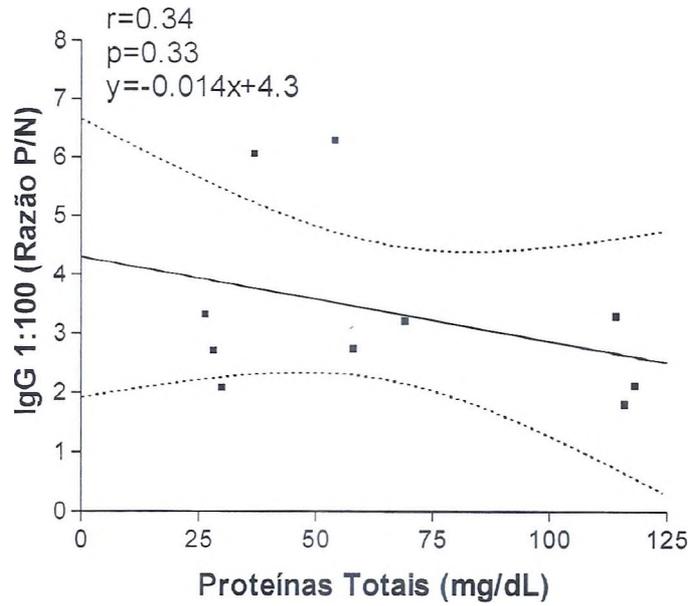


Figura 30. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

h) IgG Salivar Positivo versus Proteínas Totais

Como se percebe pelo gráfico da figura 31a, 10 pacientes adultos (mães) se apresentam positivos. Pela análise detecta-se uma certa confluência em torno das concentrações de 25 a 75, com três casos díspares que se distribuem próximos a 120 mg/dL. A figura 31b demonstra essa mesma correlação na diluição maior. Aqui a distribuição é diferente; sete pacientes se distribuem ao longo das abcissas, de maneira quase paralela com o eixo do x e com alguns títulos mais altos de IgG que fogem da média e tornam a reta sem significância estatística e portanto sem correlação.

a



b

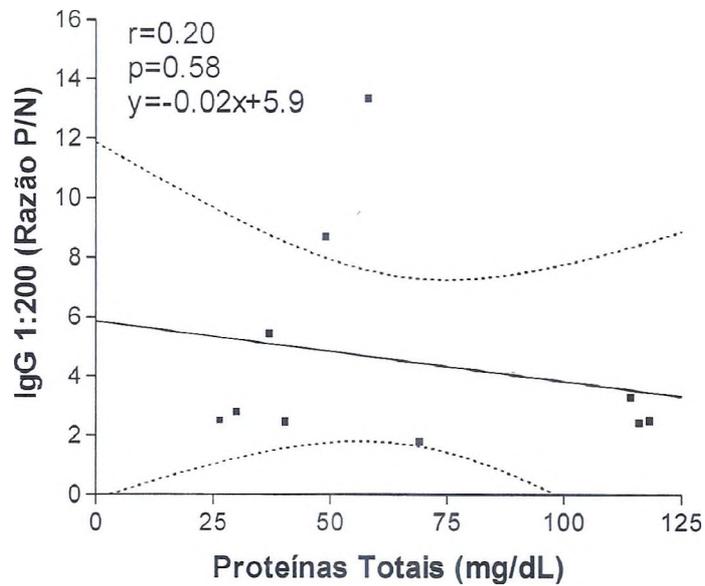
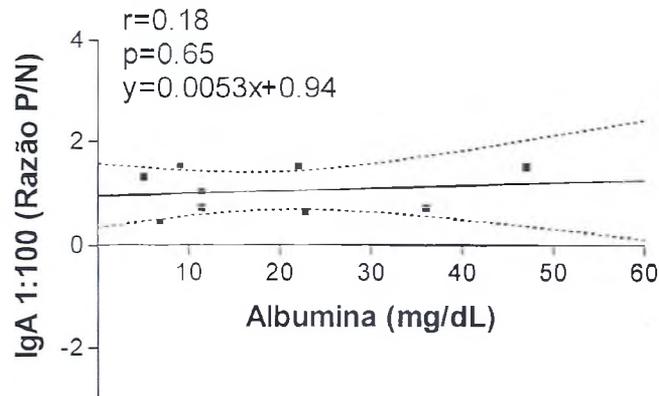


Figura 31. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

i) *IgA Salivar Negativo versus Albumina*

A figura 32 compara as correlações lineares entre IgA e albumina salivares. Em 32a percebe-se em 10 mães negativas uma distribuição ao longo do eixo do x, com um pequeno “cluster” entre 1.2 e 12 mg/dL de albumina, distribuindo-se os demais entre 20 e 50 mg/dL. Não há correlação linear. Na diluição de 1:200 (32b), 7 pacientes negativos tendem a se distribuir ao longo das abcissas, com 5 deles se agrupando entre 1.2 e 12 mg/dl de albumina, de modo muito semelhante a 32a, com uma tendência a homogeneização, separando-se as duas outras mães em torno de 20 e 37 mg/dL, respectivamente.

a



b

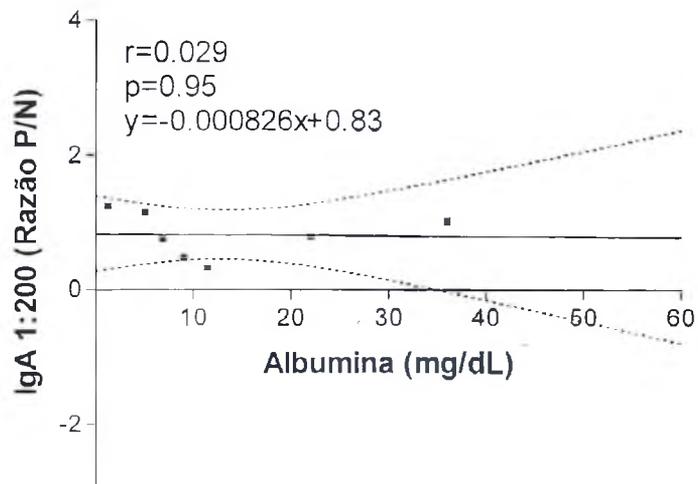
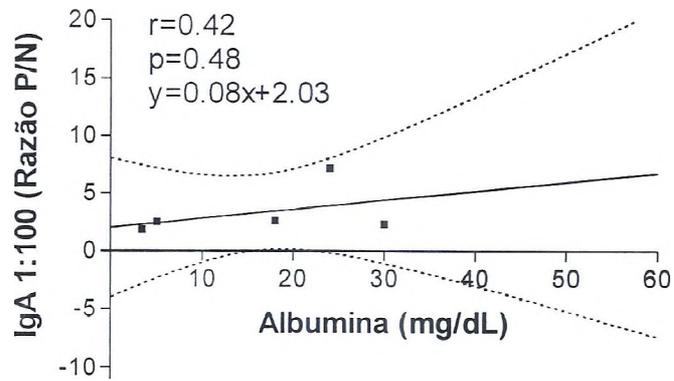


Figura 32. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

j) IgA Salivar Positivo versus Albumina

Esses resultados são comparados na figura 33. Na diluição menor em 4 mães positivas, os títulos salivares se distribuem de maneira ubíqua entre 3 e 25 mg/dL de albumina, sem nenhuma correlação de linearidade. A diluição maior figura 33b, demonstra um diferente perfil, só que com maior número de casos positivos, isto é, 7 mães. A análise distributiva mostra títulos de IgA ao longo de várias concentrações de albumina. A falta de correlação linear acompanha o mesmo raciocínio da figura 33a, e, de fato os valores de p estão muito próximos.

a



b

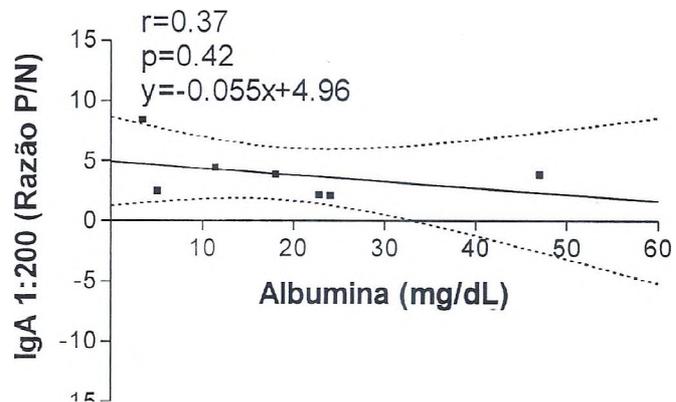
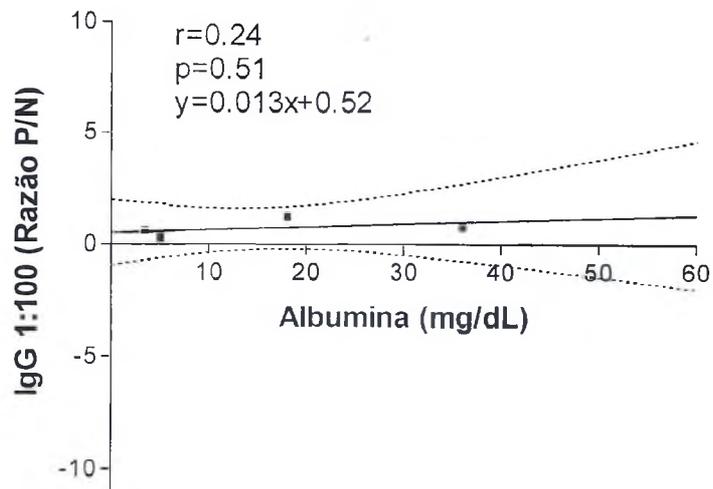


Figura 33. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

k) IgG Salivar Negativo versus Albumina

A seguir avalia-se a relação entre os títulos de IgG das mães negativas para *H. pylori* e os níveis salivares de albumina. Tanto na diluição de 1:100(figura 34a) quanto na de 1:200 (figura 34b) não se observa correlação linear. Aliás, os níveis de significância para p são dessemelhantes, ou 0.51 e 0.2 respectivamente. Isso demonstra falta de relação linear entre êsses dois parâmetros e, ao mesmo tempo a grande variabilidade das dosagens de albumina nessas pessoas, extendendo-se de 9.4 a 36 mg/dL.

a



b

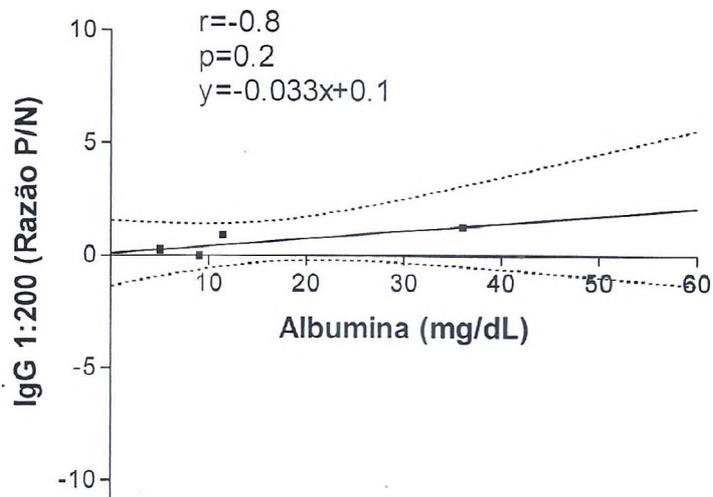
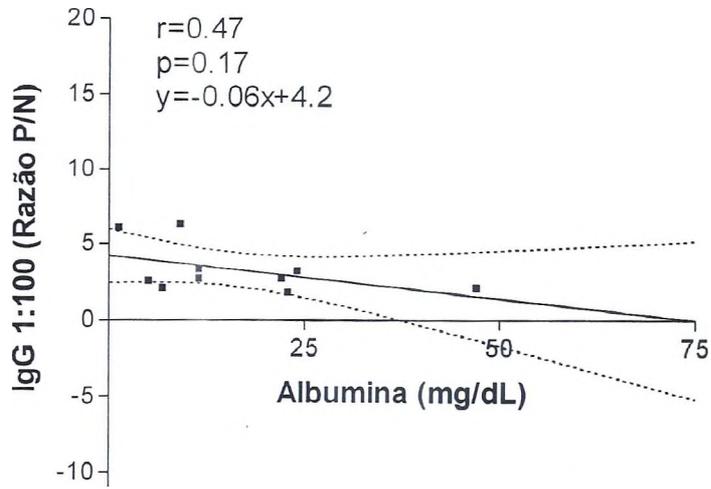


Figura 34. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

l) IgG Salivar Positivo versus Albumina

A figura 35 representa a relação entre títulos salivares de IgG nos pacientes adultos positivos para *H.pylori* comparados aos níveis de albumina detectados nas salivas. Na primeira diluição 10 pacientes se distribuem em reta que se inclina para as abcissas. Na primeira parte há um nincho de 6 títulos que se concentra entre 12 e 11mg/dL de albumina. Os demais se espalham até o limite de concentração próximo de 47mg/dL. Enquanto que o valor de p é de 17% em 1:100, na diluição de 1:200 é de quase 90%. Isso por si já explica a falta completa de correlação entre IgG e albumina, nesses ensaios.

a



b

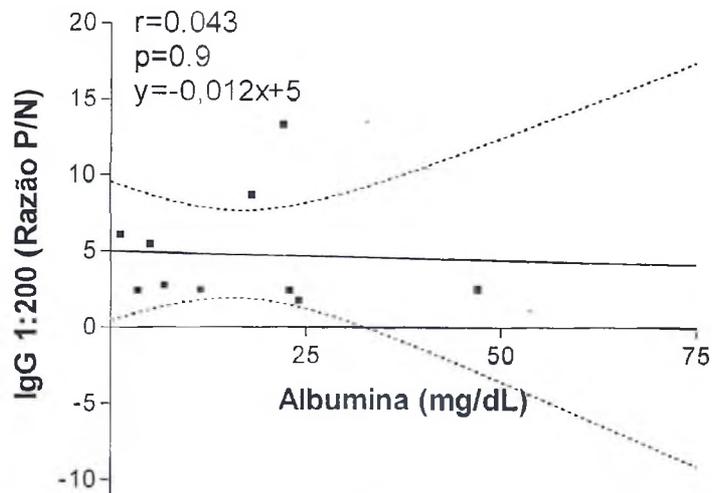


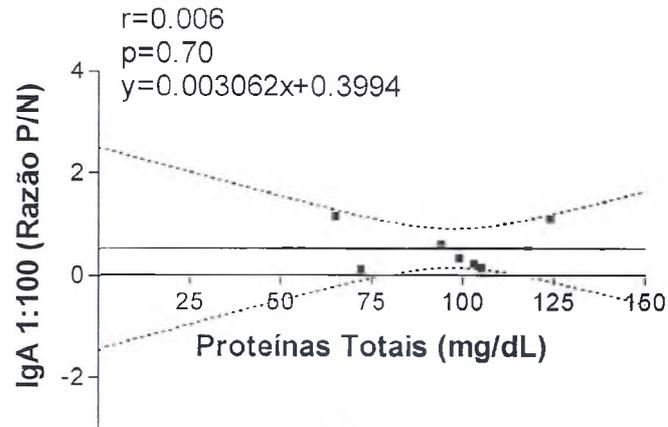
Figura 35. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de mães da comunidade Parque Universitário.

Grupo Controle Externo - Hospital Geral de Fortaleza (HGF)

a) IgA Salivar Negativo versus Proteínas Totais

Nas figuras 36a e b compara-se a correlação linear entre títulos de IgA e proteínas totais salivares dos pacientes do HGF. Como já mencionado, na diluição de 1:100, 8 pacientes são negativos, portanto com concentrações bem abaixo de 2 para a razão p/n, em pelo menos metade dos indivíduos estudados. Não se verifica nenhuma correlação tanto na diluição de 1:100 (figura 36a) quanto na de 1:200 (figura 36b). Há um pequeno adensamento de títulos de IgA em torno de 100mg/dL de proteínas totais nos gráficos supracitados.

a



b

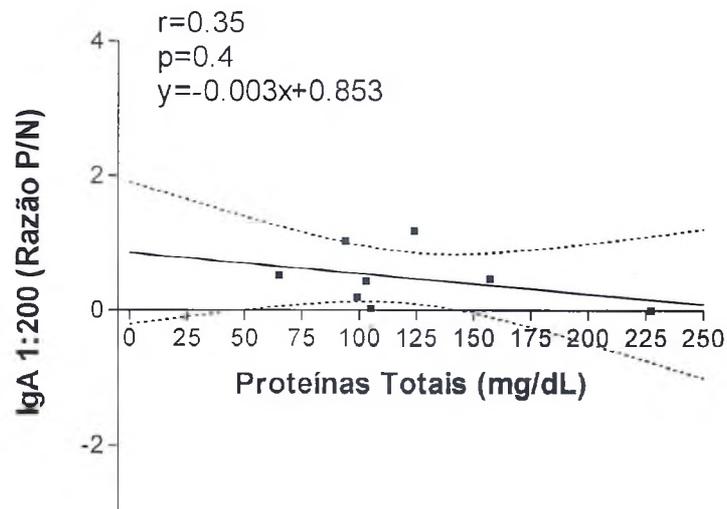


Figura 36. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

b) IgA Salivar Positivo versus Proteínas Totais

O número de pacientes positivos detectados por este método utilizando IgA, foi de apenas dois e portanto torna-se impossível fazer qualquer comparação com amostra tão pequena, seja na diluição de 1:100 ou na de 1:200. A figura não é demonstrada aqui.

c) IgG Salivar Negativo versus Proteínas Totais

Quanto a comparação dos pacientes negativos para IgG, em relação as proteínas totais na saliva, os resultados estão expressos na figura 37. Na diluição de 1:200 o número é pequeno e a reta não se aproxima de um valor significativo com um $p=0.8$. Não há portanto nenhuma linearidade estatisticamente significativa.

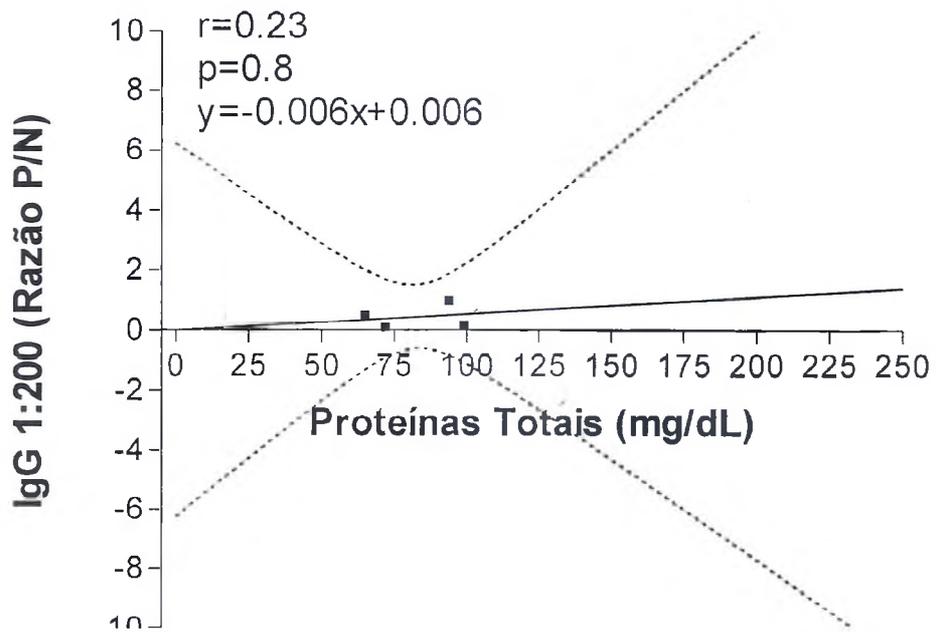
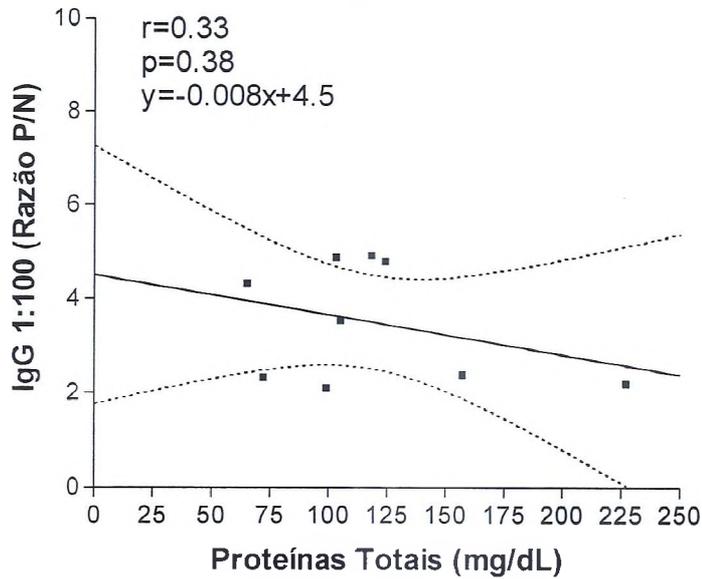


Figura 37. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

d) IgG Salivar Positivo versus Proteínas Totais

Na figura 38a observamos a correlação linear realizada entre títulos de IgG na diluição de 1:100 com as proteínas totais do grupo de pacientes do HGF. Verifica-se como em situações anteriores uma dispersão grande dos valores de proteínas totais numa faixa que vai de 60 a 220mg/dL desta relação. Na figura 38b verifica-se que há menos sensibilidade para IgG na concentração de 1:200; apenas seis casos foram positivos enquanto que na concentração de 1:100, foram positivos e “borderline” um total de 9. Existe um certo adensamento em torno de 100-125mg/dL aonde são verificados os valores maiores de IgG, mas no conjunto não é permitido verificar linearidade.

a



b

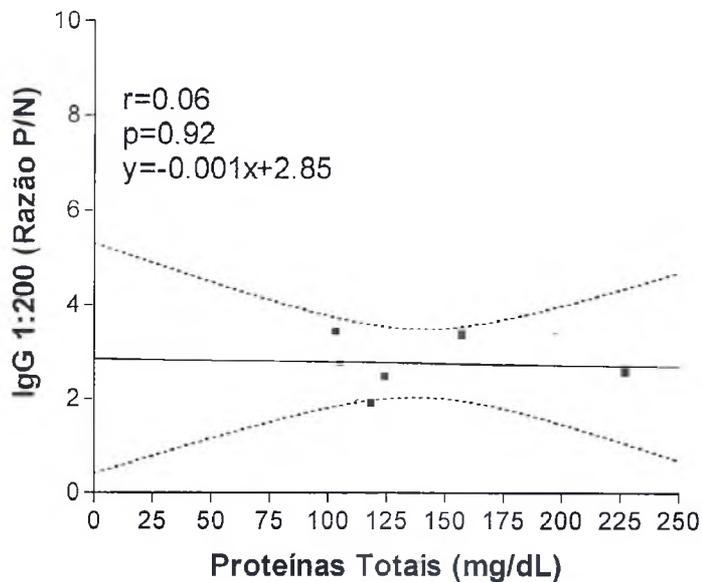
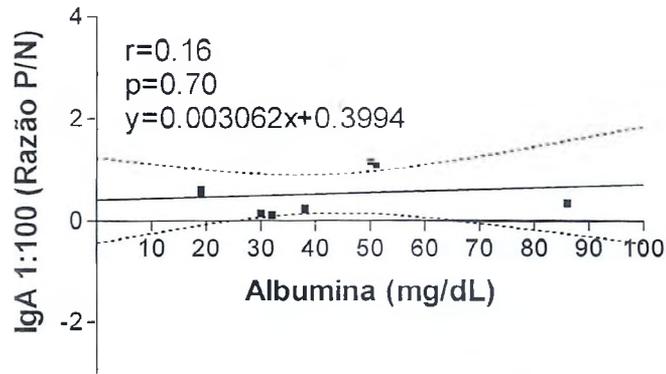


Figura 38. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

e) IgA Salivar Negativo versus Albumina

Sete pacientes negativos para IgA foram correlacionados com albumina, conforme expresso no gráfico da figura 39a. Quatro se distribuem entre 19 e 38 mg/dL em torno da concentração de 50 mg, dois outros valores se aglutinam e finalmente um deles em torno de 86 mg/dL de albumina. Como se percebe, não há correlação. Na diluição de 1:200 os diversos títulos se distribuem de maneira errática ao longo do eixo das abcissas sem qualquer significado estatístico que indique correlação.

a



b

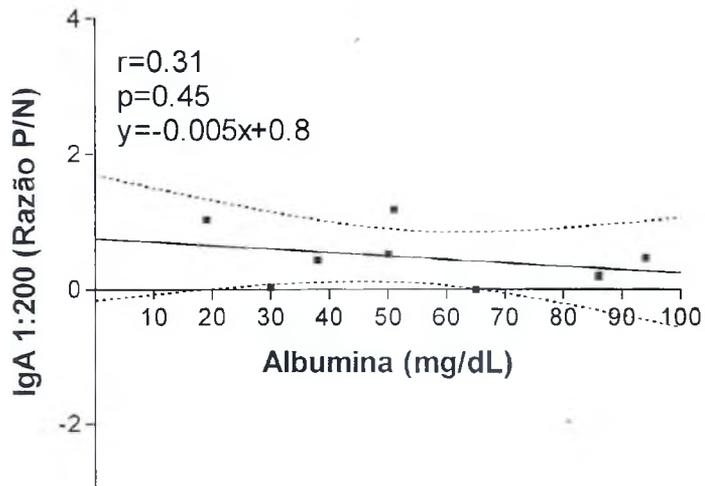


Figura 39 Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (**a**) ou 1:200 (**b**) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

f) IgG Salivar Negativo versus Albumina

Na diluição de 1:100 houve apenas 1 paciente negativo enquanto que na de 1:200, 4 pacientes negativos se distribuem numa certa linearidade que embora não determine um valor significativo, dado ao número pequeno de casos e ao fato de os títulos se distribuírem entre 19 e 86mg/dL de albumina, sem adensamento. Esses resultados encontram-se na figura 40.

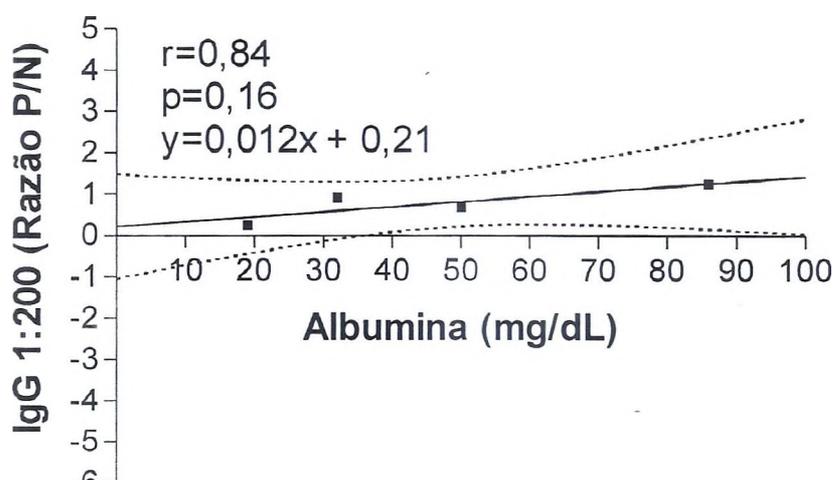
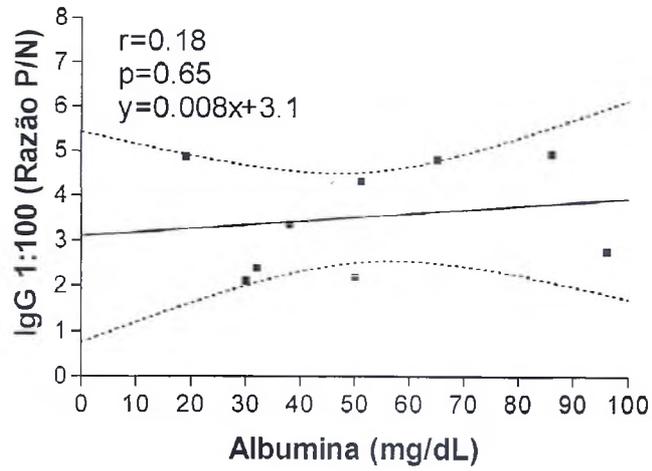


Figura 40. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com concentração de proteínas totais na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

g) IgG Salivar Positivo versus Albumina

Oito pacientes positivos para IgG foram correlacionados com albumina salivar. Não há adensamento em torno de uma concentração, distribuindo-se os títulos de maneira caótica, e portanto produzindo uma reta não significativa, para a diluição de 1:100, de acordo com a figura 41a. A figura 41b, que representa a diluição 1:200 revela apenas seis casos distribuídos com o mesmo perfil e produzindo reta também não significativa com valores de p muito semelhantes.

a



b

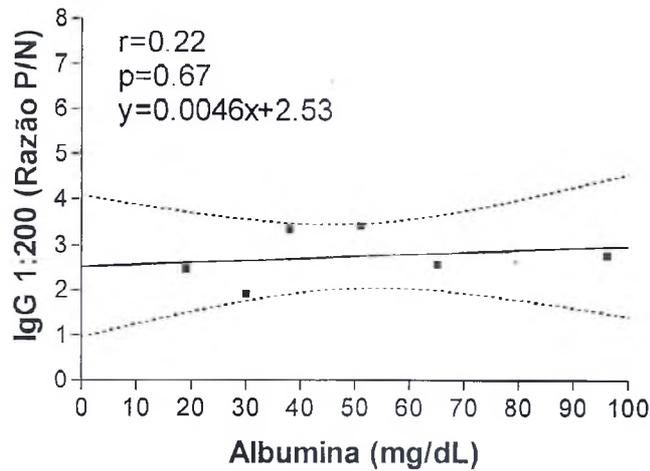
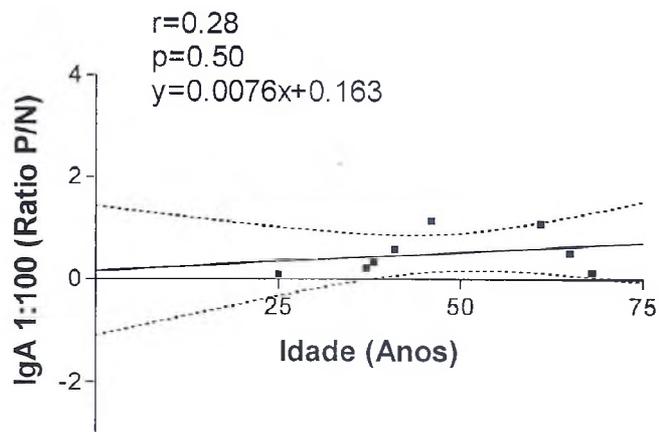


Figura 41. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com concentração de albumina na saliva de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

h) IgA Salivar negativo versus Faixa Etária

A figura 42 demonstra nas diluições estudadas até aqui que não existe prevalência de concentrações de IgA para uma idade particular. Em ambas as diluições (1:100 e 1:200) os títulos de IgA se espalham ao longo de todas as idades do grupo gerando uma distribuição muito semelhante e sem significado para a correlação estatística.

a



b

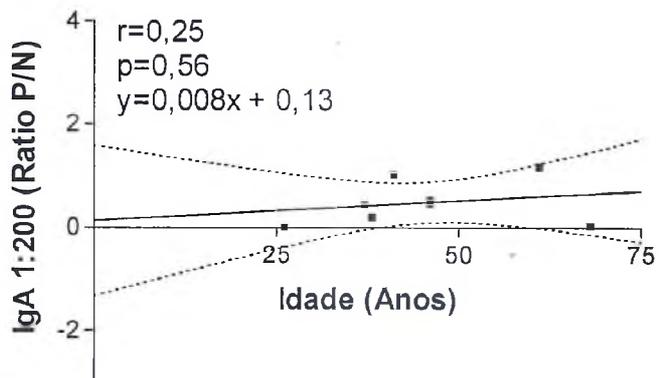


Figura 42. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgA 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

i) IgA Salivar positivo versus Faixa Etária

Apenas dois pacientes foram positivos em ambas as diluições, gerando portanto impossibilidade de construir-se qualquer correlação.

j) IgG Salivar Negativo versus Faixa Etária

Mostra-se aqui apenas as diluições de 1:200, expressos na figura 43. Com um número de pacientes pequeno, demonstra-se, mais uma vez, ausência de correlação, com uma reta paralela a \bar{x} , mas insignificante.

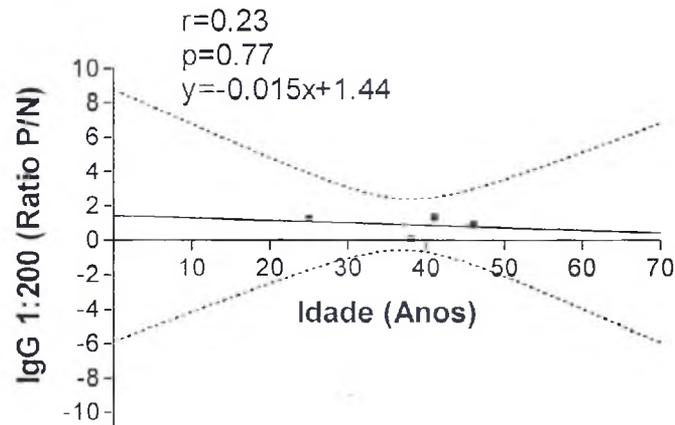
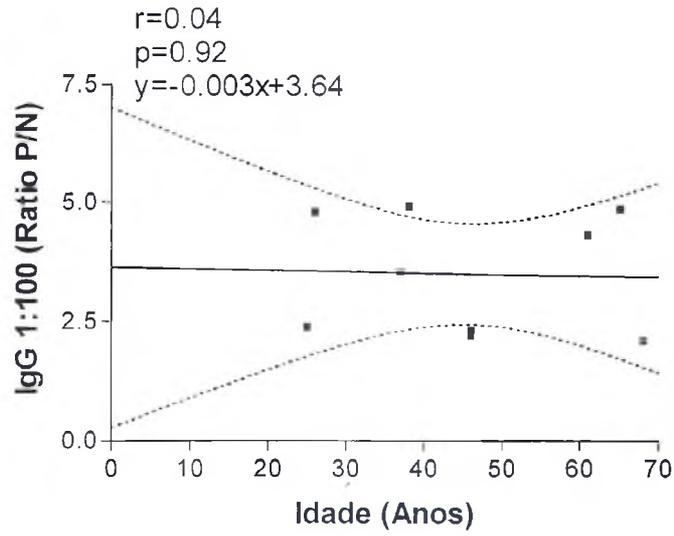


Figura 43. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes negativos para IgG 1:200 e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

k) IgG Salivar Positivo versus Faixa Etária

A figura 44, mostra as últimas análises de regressão linear entre títulos de IgG e idade dos pacientes do HGF; as duas figuras, em ambas as diluições apontam valores de concentrações de IgG se distribuindo ao longo de todas as idades, não formando “clusters” e se distribuindo de maneira aleatória ao longo de todas as idades.

a



b

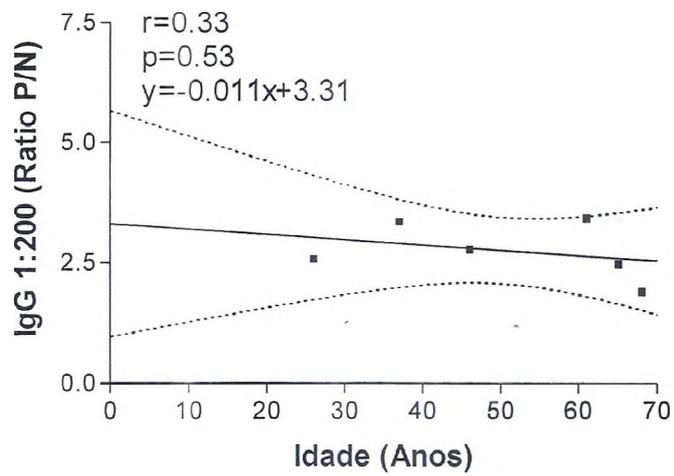


Figura 44. Correlação linear entre razão da densidade ótica (D.O) das amostras de pacientes positivos para IgG 1:100 (a) ou 1:200 (b) e controle negativo com idade de pacientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza.

DISCUSSÃO

O significado verdadeiro da infecção por *Helicobacter pylori* tem tomado rumos novos por volta da última década do século passado, incluindo a sua associação com o cancer gastro-intestinal (Rivas-Travasso e Hernandez, 2000) sobretudo em áreas endêmicas para esta patologia. No Ceará, a frequência de câncer gástrico é muito alta, sendo prognosticados para o ano de 2002, 600 novos casos por 100.000 habitantes, segundo relatório do Instituto Nacional do Câncer, 2003. Dados anteriores de Juaçaba et al., (1977) já demonstravam a alta prevalência desta forma de câncer em Fortaleza. Isso levou ao interesse maior desse estudo, numa comunidade definida e estudada pela Unidade de Pesquisas Clínicas, durante os últimos anos, no caso do Parque Universitário, uma população controlada desde o nascimento à idade adulta (Projeto ICIDR), financiado em grande parte pelo NIH, em financiamentos subsequentes que vêm sendo renovados nos últimos 20 anos, tendo se fixado nos primeiros 10 anos na favela Gonçalves Dias, uma comunidade considerada hoje em processo de urbanização, localizada próxima a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, no bairro do Porangabuçu, em Fortaleza.

O próprio descobridor da bactéria, como agente patológico, Prof. Barry Marshall, em meados da década de 80 visitou a cidade de Fortaleza para avaliar a presença deste agente, através de biópsias gástricas que foram seguidas de exames histopatológicos realizados no Hospital Universitário Walter Cantídio. Um apanhado de suas observações em Fortaleza encontra-se descrito por Braga et al., 1996.

Associando-se a alta prevalência de positivities para *H.pylori*, à alta incidência de câncer gástrico já mencionada, pensou-se em utilizar um método não invasivo, mais simples, econômico e prático que permitisse

sobretudo o diagnóstico em crianças, como forma de prevenir as suas infecções continuadas pela adultícia causando sintomas e doenças como a úlcera péptica, incomum em crianças de um modo geral. Daí o emprego de um método não-invasivo para detecção de anticorpos na saliva realizado neste estudo de maneira padronizada e sistemática.

A idéia inicial de fazer da saliva objeto deste estudo fundamentou-se em trabalho realizado com lactoferrina salivar em pacientes portadores de doença periodontal (Martins et al., 1995). Procurou-se então na literatura trabalhos que revelassem a presença de anticorpos salivares em quadros infecciosos conhecidos. Detectou-se na publicação de del Muro et al. (1990), no diagnóstico de amebíase, através da detecção de anticorpos anti IgA, na saliva de crianças portadoras de *Entamoeba histolítica*, com alto grau de sensibilidade (85%) e especificidade (98%), o modelo ideal, na perspectiva de desenvolver-se um método eficaz, também para *Helicobacter pylori*. Êsses resultados foram logo corroborados por Aceti et al. em 1991, que concluíram que os casos positivos eram detectados sobretudo em pacientes soropositivos assintomáticos. A partir deste modelo iniciou-se os primeiros testes, a partir da produção artesanal do antígeno para *H.pylori*, oriundo de casos cultivados na Universidade da Virgínia. Já em 1993 obteve-se os primeiros resultados conforme demonstrado na figura 1 deste trabalho. Embora com rendimentos inicialmente baixos, quando cotejados aos valores positivos determinados pelo uso do teste respiratório, ainda usando como marcador o C¹⁴. Continuou-se montando o presente projeto que tinha como fulcro o apoio da literatura sobre a relação de IgA com mecanismo estratégico de defesa das superfícies mucosas, já que a literatura definiu que, sobretudo os linfócitos B estão vinculados a produção de imunoglobulinas A, que tendem a se abrigarem sobretudo em sítios mucosos (Bienenstack e Befus, 1980) e mais anteriormente Husband e Gowans em 1978, demonstrando a origem e distribuição antigênica-

dependente de células contendo IgA no intestino. Mais tarde Underdown e Schiff (1986) reafirmaram as relações dessas imunoglobulinas na biologia de defesa das superfícies mucosas. Mais recentemente Goldblum (1990) reafirmou o papel de IgA na proteção imune local, dando conta que IgA é o principal isotipo encontrado nas secreções que banham muitas superfícies mucosa. Isso por si só, justifica a pesquisa inicial de IgA salivar, já que seria esperado que esse anticorpo fosse encontrado em abundância nesta secreção. Daí então, o projeto atual ter início pelo estudo de população controlada, envolvendo crianças e adultos da comunidade Parque Universitário.

As primeiras observações foram feitas de maneira aleatória em pacientes sabidamente positivos por biópsia ou teste respiratório e os dados da figura 1 apontam para uma certa confirmação que foi reafirmada nos pacientes negativos. Obviamente que a população estudada inicialmente foi muito pequena, de cerca de 7 pacientes adultos, 4 dos quais positivos.

Quando a população de crianças começou a ser testada, dentre 44 casos estudados, 10 foram positivos na diluição de 1:200, por conseguinte cerca de 23% apresentavam-se positivos ao teste. Não há uma explicação por que na diluição menor houve menos casos positivos detectados a não ser que tenha havido uma otimização da reatividade entre os diversos reagentes. Seguindo uma tendência da literatura que apontava o controle pós-tratamento de *H.pylori*, na primeira metade dos anos 90, através da dosagem de IgG no soro dos pacientes, sendo essa uma das maneiras de acompanhamento da recuperação desses pacientes ou mesmo as suas curas, optou-se também na presente pesquisa pela medida de IgG salivar, como um novo método que poderá ser cotejado com os níveis de IgA. Os resultados foram surpreendentes já que o número de pacientes positivos aumentou quatro vezes, na primeira diluição e quase duplicou na segunda diluição (figura 3). Com êsses achados percebe-se que cerca de 43% da

população infantil estudada é positiva; mais uma vez a diluição ótima foi a de 1:200, com maior número de positivos dos valores observados para as crianças infectadas, em outros estudos. No Brasil, Oliveira et al.(1994) estudando uma população de classe média baixa observaram uma prevalência de 34 %, com uma distribuição semelhante entre machos e fêmeas 35,8 versus 32,2 % respectivamente. Êsses autores não verificaram diferenças relacionadas ao estado nutricional dos mesmos o que é importante dado a origem do material da presente pesquisa já que se trabalhou com uma população caracteristicamente pobre, embora a faixa salarial da população de Belo Horizonte estudada seja um pouco maior. Outro estudo realizado mais recentemente por Bardahan em Bangladesh, em 1997, dá conta de que cerca de 50% das crianças são infectadas por *H. pylori* até aos 5 anos de idade, taxa que não difere muito daquela obtida pelo presente estudo. Interessantes foram as observações de Klein et al. em 1994 os quais fizeram uma análise da infectividade por *H. pylori* em crianças peruanas na faixa etária de 6 a 30 meses os quais devem apresentar um processo reversível em várias crianças, ao longo do seu crescimento. A nossa pesquisa não teve, entretanto o objetivo de estudar êste fato, já que o acompanhamento temporal, embora possa ainda ser feito, transcende o tempo em que o mesmo poderia ser realizado, ao longo de estudos complementares, já que a população está em grande parte fixada nesta comunidade. Entretanto, Pounder e Ng (1995), distinguiram dois tipos de populações de crianças que são infectadas durante a infância em diversos países . No primeiro grupo há aqueles que se infectam e de algum modo, a infecção não persiste, e um outro cuja infecção permanece até a idade adulta. Isso tem muita importância no nosso meio devido a alta prevalência de carcinoma gástrico. Já no estudo da comunidade Parque Universitário, não se pôde distinguir diferenças significantes, uma vez que tomando por base os estudos de IgG sorológico, detectou-se 13 meninas soropositivas

contra 11 meninos. A diferença é, portanto pequena para indicar uma tendência definida.

Na análise dos estudos realizados com as mães positivas para IgA detectou-se um fenômeno interessante. Na diluição de 1:100 os valores negativos, em sua grande maioria estão muito próximos da linha de corte, apresentando um erro padrão muito pequeno, o que não ocorre na diluição maior, a qual apresenta um número maior de casos positivos (7), com número semelhante para os negativos. No primeiro caso, é possível que muitas das mães estejam sofrendo um processo de soro-conversão para positividade ou, também, o oposto, que elas estejam negativando. Esse é um ponto a ser esclarecido pelo acompanhamento desta população por um prazo maior, que foge ao alcance temporal desta tese.

Já as dosagens de IgG salivares na comunidade de adultos, caminhou para os mesmos resultados, com 10 casos positivos e apenas 4 negativos. Se for feita uma análise percentual, verifica-se que 75% das mães estão contaminadas, o que representa um índice bem maior que aquele descrito nas crianças, sugerindo que a contaminação das crianças procede provavelmente dos adultos. Todavia Alfonso e col (1995) sugerem quando estudando a prevalência de anticorpos IgG para *H.pylori* em comunidade definida espanhola, na cidade de Valência, que não havia contaminação de pessoa a pessoa, entre familiares, e que provavelmente outros fatores ambientais contribuiriam para o contágio. Estudando dados mais antigos de soropositividade de crianças da comunidade Gonçalves Dias, Mitchell e col (2003) observaram em recente publicação a ausência de correlação entre a soropositividade das mães e os de suas crianças. Nascimento et al (2002) estudando a soroprevalência de pacientes chagásicos e não chagásicos, comparando esses pacientes de comunidades urbana e rural de uma população em Urbelândia, concluíram por uma soroprevalência maior nos portadores de doença de Chagas, compreendendo uma abrangência de

idades que variam de 21 a 50 anos. Esse trabalho é importante por demonstrar que outras patologias são capazes de conferir uma maior sensibilidade nos pacientes para a infecção por *H. pylori*. É evidente que não se pôde conferir fatos como esse na comunidade Parque Universitário.

De Oliveira et al, 1999 avaliaram um método de ELISA de segunda geração em soro de crianças portadoras ou não de úlceras duodenais e observaram que o método era mais sensível naqueles em que foram detectados úlceras duodenais (100%), do que nos não portadores (70%). A maior sensibilidade foi detectada em crianças de maior idade, isto é, com detecção de 93.1% entre 12 e 16 anos. Souto e col (1998) ao estudarem a prevalência de *H. pylori* numa população rural em Mato Grosso (Nossa Senhora do Livramento), observaram também um aumento de anticorpos contra a bactéria, à medida que as crianças amadureçam para a idade adulta, sendo de 84.7% entre adultos e 77.5% em crianças. Neste estudo a prevalência foi tão alta quanto aquela dos países em desenvolvimento.

No grupo externo constituído por pacientes oriundos do ambulatório de gastroenterologia do HGF, o número de pacientes positivos para IgA foi de apenas 2, contrastando com as informações dos testes de urease medidas pelas análises das biópsias tissulares gástricas, pós endoscopia. Enquanto isso, um máximo de 9 positivos para IgG foi detectado na diluição salivar menor obtendo-se pelo menos seis pacientes positivos, na diluição maior. Portanto, considerou-se quase todos os pacientes reativos. Não se tem um indicativo preciso para explicar a menor sensibilidade dessas salivas a IgA, nessa amostra de população adulta, já que resultados da literatura inicial do assunto apontam IgA como um bom marcador para estudos sobretudo do acompanhamento imunológico desta infecção sobretudo para verificação de cura após o tratamento, já que IgG é a imunoglobulina mais sensível para fins diagnósticos, mas IgA parece ser um indicador melhor para antecipação de cura, segundo Hirschl e col (1993). Todavia, o presente

achado não é de nenhuma forma distinto de outros estudos; por exemplo, Patel e seus colaboradores em 1994, estudando testes diagnósticos em saliva, verificaram que IgG salivar distinguia significativamente casos negativos de casos positivos ($p < 0.0001$), enquanto IgA não fazia distinção. De fato esses autores perceberam que a diferença percentual entre discriminação de positividade no soro e na saliva foi apenas de 5%. Essas observações do grupo de Patel não foram confirmadas por Gosciniak em 1997, que verificou altos títulos no soro e saliva de pacientes positivos para *H.pylori*, os quais se diferenciavam claramente dos negativos. Esse autor, que avaliou pacientes poloneses, também observou que os títulos salivares de IgA foram maiores do que aqueles de IgG.

Na causuística presente, fica ainda claro, conforme a figura 8, que a sensibilidade a IgA é muito menor que a de IgG e que IgG do soro está muito próximo dos percentuais salivares, diferindo em cerca de 5%, como descrito pelo grupo de Patel. A este respeito vale salientar as observações de Sean et al (1994) que ao estudarem a secreção de IgA na saliva de crianças recém-nascidas, comparativamente aos níveis salivares maternos, e no leite de mães em fase de amamentação, observaram que as crianças já começam a secretar esta imunoglobulina após os três primeiros dias de nascimento, crescendo rapidamente até aos seis meses, seguindo-se um período de estabilização, em 1/6 dos valores maternos. Daí porque foi resolvido estudar-se a reatividade imunológica, a contaminação de *H. pylori*, durante o período mais estável. No soro, segundo esses autores, IgA somente se equivale a concentrações adultas, por volta da puberdade. Luzza et al em 1994, descreveram que os títulos de IgG sorológico para *H. pylori* são maiores do que os de IgA, mas no tocante as concentrações salivares, esses últimos títulos (IgA) eram mais altos que os de IgG. Na corrente pesquisa ficou claro a prevalência de sensibilidade a IgG, comparativamente a IgA.

Estudou-se a seguir as proteínas totais salivares e suas possíveis correlações com os títulos de IgG e IgA, para adultos e crianças, positivos e negativos. A idéia inicial foi a de pesquisar possíveis correlações entre essas substâncias, na saliva, com as imunoglobulinas per si. Então, um conjunto de regressões lineares foi construído de maneira sistemática e em todas as diluições. No primeiro grupo de regressões situam-se dados contidos nas figuras 12 a 15 e refletem a completa ausência de correlação entre IgA, IgG e proteínas totais salivares dessas crianças, com valores protéicos geralmente dispersos em faixas muito variáveis de concentração, com alguns adensamentos dos valores mais baixos e vários, bem fora das médias.

Um outro método de encontrar um marcador, que pudesse ficar de certo modo ligado aos valores das imunoglobulinas salivares, foi tentado mediante a dosagem de albumina. Êsses dados estão expressos nas figuras 16 a 19. Neste conjunto, apenas duas correlações foram significativas e estão expressas nas figuras 16a ($p < 0.05$) e 18b ($p = 0.03$).

Talvez, não por mera coincidência, nos dois casos, êsses gráficos expressavam dois subconjuntos de pacientes cujas salivas eram negativas para IgA e IgG respectivamente, e aonde as secreções salivares dessas duas imunoglobulinas não haviam sido estimulados por antígenos de *H. pylori*. Isso demonstra que nessas condições a albumina, mas não as proteínas totais, poderá ser um marcador natural dentro dos limites da normalidade, mas não quando IgA ou IgG forem recrutados para êste flúido, em que não há um crescimento relativo de albumina. Não foram encontrados, dados na literatura que pudessem ser cotejados com as presentes análises, por que aparentemente ninguém fez essas comparações dentro da temática estudada aqui.

A dosagem isolada da proteína total tem pouco valor, porque a alteração em uma das frações pode ser compensada por alteração oposta de

outra fração, como ocorre nas doenças crônicas, em que há diminuição de albumina com aumento da gamaglobulina. Naturalmente esse aumento protéico sanguíneo termina tendo efeitos nos níveis salivares.

As proteínas estão aumentadas em algumas neoplasias, especialmente no mieloma múltiplo; macroglobulinemia, doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, e lupus eritematoso sistêmico; doenças granulomatosas, como a sarcoidose, leishmaniose viscerar (calazar); endocardite bacteriana sub-aguda e linfogranuloma venéreo; em alguns casos de doença hepática crônica, como hepatite autoimune e na desidratação (Robbins, 1968).

As proteínas estão diminuídas na gravidez, hiperhidratação, como nas nefropatias, desnutrição grave, cirrose e outras doenças hepáticas, perdas excessivas incluindo alcoolismo crônico; imobilização prolongada; insuficiência cardíaca; hipertireoidismo; deficiência de cálcio e vitamina D e na síndrome de má absorção. Isso naturalmente deverá ser levado em consideração, quando da avaliação das proteínas salivares ou em estados nutricionais graves como o kwashiorkor, doença bastante difundida na Ásia (Índia e China), África e na América do Sul (Robbins, 1968). Isso naturalmente deverá ser levado em consideração quando da avaliação das proteínas salivares. Em 15 a 20 % dos indivíduos com hepatopatias são observadas ascite com dosagem de proteínas superior a 2,5 g/dL.

O contrário pode ser observado em resposta de fase aguda, tais como infecções ou traumas, ocasião em que muitas proteínas plasmáticas derivadas do fígado aumentam de concentração, enquanto a albumina reduz, mantendo a concentração protéica inalterada. Naturalmente esse aumento protéico sanguíneo termina tendo efeitos nos níveis salivares. Por isso a saliva se torna um fluido importante para avaliação nutricional (Robbins, SL, 1968).

Outro ponto importante foram as regressões lineares das variações de IgA e IgG nas crianças em função de suas idades, fixando-se as observações a partir dos dois anos de idade. Verifica-se aqui a única regressão linear cuja reta foi significativa, ao analisar-se as figuras 20 e 23; a observação deste fato está contida na figura 21b, cujo valor de p foi altamente significativo (0.0008) com um $r=0.9$

Qual o significado da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças? Em primeiro lugar devemos considerar a alta prevalência de câncer gástrico no Ceará, o que geralmente indica mortalidade de mais de 90% dos casos diagnosticados. Enquanto a prevalência de *H.pylori* nos países desenvolvidos em crianças é de 10%, nos países de baixo nível socioeconômico, é de 30-40% (Rowland e Drumm,1998). Por isso a validação de um teste de fácil determinação (ELISA) não invasivo, pode transformar-se numa ferramenta ideal para fazer-se um acompanhamento de cura e controle da infecção, com provavelmente, grande impacto na prevenção e controle do câncer gástrico, a longo termo.

Como nos blocos anteriores estudados, procedeu-se uma análise de diversas regressões lineares, no tocante as mães das crianças conforme discutidas anteriormente. Por uma questão de lógica, inverteu-se a tendência de analisar-se imunoglobulina versus albumina e proteínas totais e iniciou-se uma avaliação pelas idades, o que faria mais sentido do ponto de vista da epidemiologia como ponto primeiro, para se verificar a cadeia de transmissão no ambiente doméstico. Este bloco como um todo está contido nas figuras 24 a 35.

No que tange a idade, existe uma ausência completa de níveis de correlação entre IgA e IgG salivares maternos e suas respectivas idades, o que é muito importante para admitir-se como hipótese primeira que provavelmente, uma grande maioria delas é portadora crônica da infecção desde a infância. Outro ponto importante a deduzir-se dessas observações e

considerando-se o que já foi apontado ao longo deste trabalho, há aqui mais uma vez uma maior positividade detectada por IgG do que por IgA salivares (figuras 25 e 27). Usando esses achados, pode-se compará-los aos da literatura inicial desta matéria, que demonstra que IgG tem papel mais relevante na detecção da infecção por *H.pylori*, que IgA (Rathbone et al, 1986; Perez-Perez et al 1988), embora como já mencionado, IgA tenha um papel no controle da cura.

Por outro lado o aumento proporcional de adultos contaminados segue uma tendência de saúde pública recentemente descrita entre nós, por Mitchell et al. (2003) que analisando a soropositividade a *H. pylori* na Comunidade Gonçalves Dias, verificaram um aumento de 39 % em torno de 10 anos e cerca de 80% à medida que a população atingia a maturidade. Percebe-se ainda no gráfico apresentado por esses autores que 23% já estão contaminados, com menos de 1 ano de idade. Isso reforça a tese de que a contaminação ocorre no habitat. Acompanham o mesmo raciocínio populações estudadas na Índia por Graham et al. em 1991 e Webb et al. (1991) que estudaram as relações da infecção por *H. pylori*, as condições de vida na infância e evidenciaram o contacto de pessoa a pessoa como modo de transmissão nos primeiros meses de idade.

Ainda no tocante as mães comparou-se os diversos níveis salivares de IgA e IgG com as proteínas totais e albumina desta secreção. Os gráficos estão contidos nas figuras 28 a 35. Nenhuma das regressões lineares apresenta reta significativa, demonstrando que nenhuma das dosagens seja de proteínas totais ou albumina serve como marcador de referência para as imunoglobulinas estudadas na saliva. Um levantamento da literatura sobre a matéria apresenta ausência de dados para comparações com os resultados obtidos por outros até aqui.

Finalmente nas figuras 36 a 44 correlacionam-se, de modo semelhante proteínas totais, albumina e idade, na população externa, de um

grupo de pacientes adultos, do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Geral de Fortaleza. Não há correlação em nenhuma das regressões lineares estudadas, que compõem essas séries de figuras supramencionadas. Deste modo, se por um lado não se encontrou um bom marcador que pudesse acompanhar as variações de IgA e IgG, sobretudo nos adultos, é possível, por outro lado demonstrar-se que os valores obtidos tanto para proteínas totais, quanto para albumina, servem como aferidores de que nas três populações estudadas não se detectou carência protéica, comparável aquelas descritas sobretudo nos continentes asiático e africano. Apesar de estar-se diante de uma população pobre como a do Parque Universitário, não se pode definir nas carências protéico-calórica, quando se compara os níveis de proteínas totais e albumina na saliva.

Cohen e Levine (1989), estudaram de maneira intensiva diversas proteínas salivares, principalmente o grupo das glicoproteínas, que são aquelas frequentemente associadas a algum tipo de açúcar. Destacou-se as mucinas, as ricas em prolina, α -amilases, peroxidases, anidrase carbônica, as ricas em fucose, calicreína, ticoneletina, IgA e lactoferrina. Essa última foi por mim e colaboradores estudada há algum tempo (Martins et al, 1995). Pela variedade percebe-se, que a grande maioria delas, tem efeitos variados, podendo exercer ações antimicrobianas, digestivas e/ou enzimáticas; entre as imunoglobulinas destaca-se IgA secretória já comentada anteriormente. Mas a propósito desta proteína Brandtzaeg et al. (1970) descreveram uma proporção muito grande de formas polimerizadas na saliva o que talvez explique que em algumas observações da pesquisa em discussão, observa-se melhores resultados em diluição maior ou, ainda, que certas leituras mais baixas possam representar dificuldades cinéticas de associação de complexos protéicos mais pesados com o antígeno detector.

Segundo alguns autores, a maioria das IgA presentes na saliva tem produção local estando associadas a secreção de imunócitos, a maioria

linfócitos específicos ao nível das glândulas salivares ou fluido gengival (Delacroix e Vermom, 1983; Kubajawa et al., 1987), ao invés de derivarem do soro; mas não se deve esquecer que o agente produtor celular é sempre o mesmo, que pode sofrer diferenciação celular local em interação com os tecidos, notadamente os linfócitos B para IgA (Brandzaeg, 1970).

É importante observar que IgA, que corresponde a cerca de 10% de todas as imunoglobulinas é encontrada em grande quantidade na saliva oriunda da glândula parótida (Tenevuo, 1984). E como trabalhou-se com saliva é preciso entender isso em essência para o seu uso na corrente pesquisa. Contrariamente a IgA, IgG tem muito poucas células produtoras sendo encontrada em pequenina quantidade no fluido da glândula salivar; a maioria estando localizada no tecido conjuntivo. IgG salivar, portanto, alcança a cavidade oral através de escape de vários epitélios e é sobretudo adicionado à saliva através do fluido gengival. Tanto é assim que IgG sérica e salivar possuem o mesmo peso molecular e espera-se que as suas funções séricas sejam as mesmas de sua forma circulante (Brandtzaeg, 1971 e Brandtzaeg, 1978).

Assim a secreção da glândula parótida quando estimulada por vários fatores tem níveis de IgG negligenciáveis em relação aos de IgA (Örstavik e Brandtzaeg, 1975). Como até aqui existiam poucas informações da literatura sobre proteínas de uma maneira geral, decidiu-se pela análise extensiva de proteínas totais e albumina na saliva, e estudando de maneira exhaustiva todas as suas relações com as imunoglobulinas responsivas ao *H. pylori*, em todos os extratos populacionais aqui avaliados. Conclui-se mencionando-se que *H. pylori* é também encontrado na secreção salivar (Ferguson et al., 1999) e na placa dentária.

Resta saber se o organismo bacteriano é capaz de induzir respostas imunológicas expressas por IgG e IgA, por interações locais. Isso, entretanto foge aos objetivos do corrente trabalho.

5. CONCLUSÕES

- A corrente pesquisa consolida o uso de uma técnica não invasiva, capaz de diagnosticar a infecção por *Helicobacter pylori*, prestando-se sobretudo para uso em crianças;

- O estudo conduzido em população definida do Parque Universitário, constituída de mães e filhos, determinou de maneira inequívoca, uma grande prevalência de *H. pylori*, já muito cedo nos primeiros anos de vida. IgA foi positiva em 22,72 % das crianças enquanto IgG foi em 43,18%;

- Quanto as mães, conclui-se que 50% são positivas salivares para IgA e 41 % para IgG, indicando portanto, uma prevalência maior de infecção do que em crianças;

Dez pacientes adultos externos, 70 % positivos pelo teste da urease foram positivos para IgA e 20% para IgG, contrastando com os 90% para IgG, confirmando, portanto os dados obtidos das biópsias pelo teste rápido da urease e convalidando os presentes achados de concordância diagnóstica de IgA salivar com outros métodos;

A comparação de PCR fecal, IgG sorológica e teste respiratório, com IgA e IgG salivares, permite igualmente concluir-se que PCR é o mais sensível, seguindo-se o IgG do soro e o teste respiratório. Este último, o mais usado habitualmente compara-se à sensibilidade obtida com os dados de IgG salivar;

Finalmente pode-se concluir que IgA embora menos sensível em adultos e crianças é de muita importância para diagnóstico infantil em tenra idade, por ser a primeira imunoglobulina a ser secretada;

Sua dosagem é importante para comparar com a evolução da infecção.

7. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alfonso, V., Gonzalez-Granada, D., Alonso, C., Ponce, J., Bixquert, M., Oltra, C., Ortuño, J.A., 1995. Los pacientes con úlcera duodenal transmiten el *Helicobacter pylori* a sus familiares?. *Rev. Esp. Enf. Digest.* 87(2):109-113.
2. Argyros, F. C., Ghosh, M., Huang, L., et al. 200. Evaluation of a primer based on isocitrate dehydrogenase gene for detection of *Helicobacter pylori* in feces. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3755-3758.
3. Aceti, Antonio., Pennica, A., Celestino, D., Caferro, M., et al. 1991. Salivary IgA antibody detection in invasive amebiasis and asymptomatic infection. *J. Infect. Dis.* 164: 613-614.
4. Bizzozero, G. 1893. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch Mikr Anat.* 42:82. h
5. Blaser, Martin J. 1992. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* - induced inflammation. *Gastroenterol.* 102:720-727.
6. Bienenstock, J., Befus, A.D., 1980. Mucosal immunology. *Immunol.* 41:249.
7. Bardhan, P.K., 1997. Epidemiology features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin. Infect. Dis.* 25 (5):973-978.
8. Boren, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G., Normak, S. 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium by blood group antigens. *Sci.* 262: 1892-1895.
9. Braga, L. L., Marshall, B. J., Moreno, H., Lima, A. A. M., Menezes, D., Zu, S. X. 1996. *Helicobacter pylori*: gastritis, peptic ulcer and gastric cancer in developing countries. In: *The Edge of Development Health Crises in a Transitional Society*. Guerrant RL, Souza, M. A., Nations M. K. (editors). North Carolina: Caroline Academic Press; pp. 127-147.
10. Brandtzaeg, P., Fjellanger, I., and Gjeruldsen, S. T., 1970. Human secretory immunoglobulin. I. Salivary secretions from individuals with normal or low levels of serum immunoglobulins. *Scand. J. Haematol. Suppl.*, 12: 1-83.

11. Brandtzaeg, P., 1971. Human secretory immunoglobulins. VII. Concentrations of parotid IgA and other secretory proteins in relation to the rate of flow and duration of secretory stimulus. *Arch. Oral Biol.* 16, 1295.
12. Cooper, T.G. 1977. *The tools of Biochemistry.* John Wiley & Sons Publ. New York.
13. Cover, T. L., Dooley, C. P., Blaser, M. J., 1990. Characterization and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolization cytotoxin activity. *Infect. Immunol.* 58: 603-610.
14. Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., 1991. Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Infect. Immunol.* 59(4): 1264-1270.
15. Czinn, Steven G., Speck, William T. 1989. *Campylobacter pylori: A new pathogen.* *J Pediat.* 114(4):670-671.
16. Cohen, R. E., Levine, M. J., 1989. Salivary Glicoproteins, In J. Tenovuo (ed.), *Human saliva: Clinical Chemistry and Microbiology.* vol. I, chapter 4, CRS Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp 101-130.
17. Dial, E. J., Hall, L. R., Romero et al., 1994. An explanation for enhanced gastrin response to a meal in patients with *elicobacter pylori* infection. *Gastroenterol.* 106,4(2 suppl.): 70.
18. del Muro, Rúben, Acosta, E., Merino, E., Glender, W., Ortiz-Ortiz, L. 1990. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *J. Inf. Dis.* 162:1360-1364.
19. Doengs, L.S. 1939. Spirochetes in the glands of *Macacus rhesus* and of man without related disease. *Arch Pathol.* 27:469-477.
20. Dunn, B. E., Campbell, G. P., Perez-Perez, G.I. et.al. 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *. iol. hem.* 265: 9464.
21. Dickey, W., Collins, J.S., Watson, R.G., et al. 1993. Secretor status and *Helicobacter pylori* infection are independent risk factors for gastroduodenal disease. *Gut.* 34: 351-353.

22. de Oliveira, A. M., Queiroz, D. M., Rocha, G. A., Mendes, E. N., 1994. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. 89 (12): 2201-2204.
23. de Oliveira, A. M., Rocha, G. A., Queiroz, D. M., Mendes, E. N., et al. 1999. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. J. Ped. Gastroenterol. Nutrit. 28: 157-161.
24. Delacroix, D. L., Vaerman, J. P., 1983. Function of the human liver in IgA homeostasis in plasma. Ann. N. Y. Acad. Sci. 409, 383.
25. Engstrand, L., Scheynius, A., Pahlson, C., Grimelius, L., Schwan, A., Gustavsson, S., 1989. Association of *Campylobacter pylori* with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells. Infect. Immun. 57(3): 827-832.
26. Faisal, M. A., Russel, R. M., Samloff, I. M., Holt, P.R., 1990. *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis in the elderly. Gastroenterol. 99(5): 1543-1544.
27. Ferguson DA Jr, Li C, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. J Clin Microbiol. 1993 Oct; 31(10):2802-4.
28. Fox, J. G., Lee, A., 1989. Gastric *Campylobacter*-like organisms: their role in gastric disease in laboratory animals. Lab. Anim. Sci. 30: 543-553.
29. Fox, G. J., Perkins, S., Yan, L., Shen, Z., Attardo, L., Pappo, J. 1996. Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *Helicobacter pylori* in saliva, gastric fluid and faeces. Immunol 88: 400-406.
30. Fox, J. G., Correa, P., Taylor, N. S., Lee, A., Otto, G., Murphy, J., Rose, R., 1990. *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in humans. Gastroenterol. 99: 352-361.
31. Fox, J. G., Correa, P., Taylor, N. S., Lee, A., et al. 1990. *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets. An animal model of *Helicobacter pylori* in humans. Gastroenterol. 99: 352-361.

32. Fitzsimmons, S. P., Evans, M. K., Pearce, C. L., et al. 1994. Immunoglobulin A subclasses in infants' saliva and in saliva and milk from their mothers. *J. Pediatr.* 124: 566-573.
33. Gilman, R. H., Leon-Barua, R., Koch, J., et al. 1986. Rapid identification of pyloric *Campylobacter* in Peruvians with gastritis. *Dig. Dis. Sci.* 31: 1089-1094.
34. Gold, Benjamin D., et al. 1995. Comparison of *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* adhesion to eucaryotic cells in vitro. 1995. *Gastroenterol.* 109: 692-700.
35. Gold, B., Huesca, M., Sherman, M., Lingwood, P. 1993. *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* bind to common lipid receptors in vitro. *Infect. Immunol.* 61: 2632-2638.
36. Goldblum, Randall M. 1990. The role of IgA in Local Immune Protection. *J. Clin. Immunol.* 10(6): 64S-69S.
37. Gosciniak, G. 1997. IgG and IgA antibodies in *Helicobacter pylori* infections. *Zentralbl. Bakteriol.* 286(4):494-502.
38. Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Shilvers, T., Peters, M., Collins, M. D. Sly, L., et al. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. As *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 397-405.
39. Goggin, P. M., Northfield, T. C., Spychal, R. T. 1991. Factors affecting gastric mucosal hydrophobicity in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 181 (suppl): 65-73.
40. Graham, D. Y., Borsch, G. M., 1990. The who's and when's of therapy for *Campylobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 85: 1552-1555.
41. Graham, D. Y., Malaty, H. M., Evans, D. G., Evans, D. J. Jr., Klein, P. D., and Adam Ervin. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterol.* 100:1495-1501.
42. Graham, D. Y., Adam, E., Reddy, G. T., Agarwal, Jai P., Agarwal, R., Evans, D. J. Jr., Malaty, H. M., Evans, D. G., 1991. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. *Dig Dis Sci* 36(8): 1084-1088.

43. Harris, Adam. 1998. Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Br. Med. Bull.* 54(1): 195-205.
44. Hazel, S. L., Lee, A., Brady L., Hennessey W., 1986. *Campylobacter pyloridis*: association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Inf. Dis*153:658-663.
45. Hesse, S. J., Wyatt, J. I., et al. 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter*-associated chronic gastritis. *Gut*.31:134-138.
46. Hildelbrand, P., Beglinger, C. 1997. Nondispersive infrared spectrometry: a new method for the detection of *Helicobacter pylori* with the ¹³C-urea breath test. *Clin. Infect. Dis.*, 25 (5):1003-1005.
47. Hirschl, A. M., Brandstätter, G., Dragosics, B., et al. 1993. Kinetics of specific IgG antibodies for monitoring the effect of anti- *Helicobacter pylori* chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 168:763-766.
48. Husband, A. J., Gowans, J.L. 1978. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J. Exp. Med.* 148: 1146-1160.
49. Instituto Nacional de Câncer (INCA)-2003, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
50. Juaçaba. H. G., Andrade, A. C. F., Macedo, J. E., Teixeira, C. E., Muniz, E. L. 1977. Câncer Gástrico. *Rev. Med. da UFC.* 17: 11-14.
51. Karnes, W. E., Samloff, I. M., Siurala, M. et al. 1991. Positive serum antibodies and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterol.* 101: 167-174.
52. Karnes, W. E., Ohning, G. V., Sytnik, B., Kim, S. W. R., Walsh, S. H., 1991. Preservation of pH inhibition of gastrin released in subjects with *Helicobacter pylori*. *Rev. Infect. Dis.* 13: s665-s670.
53. Kawano, S., Tsujii, M., Fusamoto, H., et al. 1991. Chronic effect of intragastric ammonia on mucosal structures in rats. *Dig. Dis. Sci.* 36: 33-38.

54. Kelly, S. M., Crampton, J. R., Hunter, J. O., 1993. *Helicobacter pylori* increases gastric antral juxtamucosal pH. *Dig. Dis. Sci.* 38: 129- 131.
55. Kekki, M., Villako, K., Tamm, A., Siurala, M., 1977. Dynamics of antral and fundal gastritis in an estonian rural population sample. *Scand. J. Gastroenterol. et al.* 1977. 12(3): 321-324.
56. Klein, P.D., Graham, D.Y., 1989. *Campylobacter pylori* detection by the ¹³C-urea breath test. In: Rathbone B., Heatley V, eds. *Campylobacter pylori and gastrointestinal disease*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 94-110.
57. Klein, P. D., Gilman, R. H., Leon-Barua, R., Diaz, F., Smith, E. O., Graham, D.Y., 1994. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am. J. Gastroenterol.* 89(12): 196-200
58. Krakowka, S., Morgan, D. R., Kraff, W. G., Leunk, R. D., 1987. Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect. Immunol.* 55: 2789-2796.
59. Krajden, S. Fuksa, M., Anderson, J., Kempston, J., Boccia, A., Petrea, C., et al. 1989. Examination of human stomach, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 27(6): 1397-1398.
60. Krienitz, W. 1906. Ueber das auftreten von mageninhalt bei carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr.* 32:872.
61. Kubagawa, H., Bertoliu, L.F., Barton, J.C., Koopman, W.J., Mestecky, J., Kupper, M.D. 1987. Análisis of paraprotein transport into the saliva by using anti-idiotypic antibodies, *J. Immunol.*, 138: 435.
62. Kulusi, S., Mendall, M. A., Patel, P., et al. 1994. Is there a quantifiable difference in *Helicobacter pylori* density between DU and non DU patients? *Gastroenterol.* 106,4(2suppl.):106.
63. Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B. C., Kraft, W.G., Morgan, D.R. 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 26: 93-99.
64. Lewis, J. J., Goldenring, J.R., Asher, V.a., Modlin, I. M., 1989. Pancreastatin: a novel peptide inhibitor of parietal cell signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15;163(2):667-673

65. Luzzi, F., Imeneo, M., Maletta, M., Monteleone, G., Doldo, P., Biancone, L., Pallone, F., 1994. Isotopic analysis of specific antibody response in serum, saliva, gastric and rectal homogenates of *Helicobacter pylori* infected patients. *Gastroenterol.*106:A724
66. Murakami, M., Yoo, J. K., Teramura, S., et al. 1990. Generation of ammonia and mucosal lesion formation following hydrolysis of urea by urease in the rat stomach. *J. Clin. Gastroenterol.* 12: S104-109
67. Martins, C. A. P., Guerrant, R., Barret, L., Fonteles, M.G. 1995. Correlation of lactoferrin with neutrophilic inflammation in body fluids.2(6):
68. Mitchell, H. M., Lee, A., Berkowicz, J., Barody, T. 1988. The use of serology to diagnose active *Campylobacter pylori* infection. *Med. J. Aust.* 149:604-609.
69. Mitchell, H. M., Lee, A., Carrick, J., 1989. Increased incidence of *Campylobacter pylori* infection in gastroenterologists: further evidence to support person-to-person transmission of *Campylobacter pylori*. *Gastroenterol.* 24: 396-400.
70. Mitchell, A., Silva, T.M.J., Barrett, L., Lima, A.A.M., Guerrant, R.L., 2003. Aged-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. *J. Clin. Microbiol.* (3): 1326-1328.
71. Morris, A., Nicholson, G., 1987. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol.* 82: 192-199.
72. Morris, A., et al 1989. Experiment accidental *Campylobacter pylori* infection of humans. In: Blases M. J., ed C. P. New York.: Igaku Shoin. 73-97.
73. Majmudar, P., Shah, S. M., Dhujibhoy, K. R., Desai, H.G., 1990. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in health volunteers. *Indian J. Gastroenterol.* 9: 271-272.
74. Marshall, B. J., Warren, J. R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* i: 1311-1315.

75. Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. D., Glancy, R. J. 1985. Attempt to fulfill Koch's postulates for *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 142: 436-439.
76. Marshall, B. J., Warren, J. R., Francis, G. J., Langton, S. R., et al. 1987. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Lancet. Am. J. Gastroenterol.* 82: 200-210.
77. Marshall, B. J., Goodwin, C. S., Warren, J. R., et al. 1990. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. 2: 1437-1442.
78. Marshall BJ. Treatment strategies for *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin North Am.* 1993 Mar;22(1):183-98. Review.
79. Mégraud, F., 1989. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Oxford: Blackwell Sci Public. 39-47.
80. Mégraud, F., Bonnet, F., Garnier, M., Lamouliatte, H. 1985. Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content. *J. Clin. Microbiol.* 22: 1007-1010.
81. Mai, M., Omote, K., Minamoto, T., Fujioka, N., Yasumoto, K., Dong, H. C., Takahashi, Y., 1992. Controversy between endoscopic and surgical treatment against early gastric and colorectal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* sept. 93(9):1075-1078.
82. Mai, U.E.H., Pérez-Pérez, G.I., Wahl, L.M., Wahl, S.M., Blaser, M.J., Smith, P.D., 1991. Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* active monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. *J. Clin. Invest.* 87:894-900.
83. Nascimento, R. S., Valente, S. R., Oliveira, L. C., 2002. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chronic chagasic patients, in the rural and urban population from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 44 (5): 251-254.
84. Nguyen, Anne-Marie H., Engstrand, L., Genta, R. M., Graham, D.Y., El-Zaatari, F.A.K. 1993. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. 31(4):783-787.

85. Örstavik, D., Brandtzaeg, P., 1975. Secretion of parotid IgA in relation to gingival inflammation and dental caries experience in man. *Arch. Oral Biol.* 20:701.
86. Patel P., Mendall, M. A., Khulusi, S., Northfield, T. C., Strachan, D. P., 1994. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. *Br Med. J.* 309: 1119-1123.
87. Patel, P., Mendall, M. A., Khulusi, S., Molineaux, N., Levy, J., Maxwell, J. D., Northfield, T. C., 1994. Salivary antibody to *Helicobacter pylori*: screening dyspeptic patients before endoscopy. *Lancet.* 344:511-512.
88. Perez-Perez, G. I., Dworkin, B. M., Chodos, J. E., Blaser, M. J. 1988. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann. Int. Med.* 109:11-17.
89. Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., 1987. Conservation and diversity of *Campylobacter pyloridis* major antigens. *Infect. Immunol.* 55 (5): 1256-1263.
90. Pounder, R., Ng, D. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Therp.* (9 suppl)2: 33-39.
91. Rivas-Travasso, F., Hernandez, F., 2000. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patologia y diagnóstico. *Rev. Biomed.* 7. Enfermedades metabólicas generales. 198-199.
92. Ricci, V., Sommi, P., Cova, E., et al. 1994. *Helicobacter pylori*-induced cell vacuolation: cytotoxin potentiates the action of ammonia. *Gastroenterol.* 106,4(2 suppl.):65.
93. Rathbone, B. J., Wyatt, J. I., Heatley, R. V., 1986. *Campylobacter pyloridis* a new factor in peptic ulcer disease. *Gut.* 27:635-641.
94. Rowland, M., Drumm, B. 1998. Clinical significance of infection in children. *Br. Med. Bul.* 54:95-103
95. Shahamat, M., Vives-Rego, J., Paszko-Kolva, C., Pearson, A. D., Colwell, R. R., 1989. Survival of *Campylobacter pylori* in river water: ³H-thymidine uptake and viability under simulated environmental conditions. *Klin. Wochensch.* 67(SXVIII):63

96. Siurala, M., Varis, K., Wiljasalo, M. 1966. Studies of patients with atrophic gastritis: a 10-15-year follow-up. *Scand. J. Gastroenterol.* 1966. 1(1):40-48.
97. Siurala, M., Isokoski, M., Varis, K., Kekki, M. 1968. Prevalence of gastritis in a rural population. Bioptic Study of subjects selected at random. *Scand. J. Gastroenterol.* 3: 211-213.
98. Souto, F.J., Fontes, C. J., Rocha, G. A., de Oliveira, A. M., Mendes, E. N., Queiroz, D. M. 1998. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of state of Mato Grosso, Brazil., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93(2):1171-174.
99. Salomon, H. 1896. Ueber das Spirillum des Saugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentrabl Bakteriolog.* 19:433-442.
100. Shames, B., Kradjen, S., Fuksa, M., Babida, C., Penner, J.L. 1989. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J. Clin. Microbiol.* 27(12):2849-2850
101. Steer, H.W., Collin-Jones, D.G., 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut.* 16: 590-597.
102. Smith, D.J., King, W.F., Taubman, M.A. 1989. Isotope subclass and molecular size of immunoglobulins in salivas from young infants. *Clin. Exp. Immunol.* 76: 97-102.
103. Smith, J. T. L., Pounder, R. E., Evans, D. J., Graham, D. Y., Evans, D. C., 1989. Inappropriate 24 hour hypergastrinemia in asymptomatic *Campylobacter pylori* infection. *Gut.* 30:A732-A733.
104. Smith, P. D., Gillin, F. D., Brown, W. R., Nash, T. E., 1981. IgG antibody to *Giardia lamblia* selected by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterol.* 80: 1476-1480.
105. Slomiany, B.L., Piotrowski, J., Samanta, A., VanHorn, K., Murty, V.L., Slominy, A. 1989. *Campylobacter pylori* colonization factor shows specificity for lactosylceramide sulfate and GM3 ganglioside. *Biochem. Int.* 19: 929-936.
106. Tenovuo, J.O., D. Odont., Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology -, *CRC Press, Inc.*, 1984, vol. II, pg. 24.

107. Tumuru, M. K. R., Cover, T. L., Blaser, M. J., 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immunol.* 61: 1799-1809.
108. Underdown, Brian J., Schiff, J. M., 1986. Immunoglobulin A: Strategic defense initiative at the mucosal surface. *Ann. Rev. Immunol.* 4:398-417.
109. Vira, D., Holton, J., Cairns, S. R., Falzon, M., Polydorou, A., Salmon, P. R., 1988. Antibody titers to *Campylobacter pylori* after treatment of gastritis. *B. M. J.* 297: 397.
110. Watanabe, T., Tomita, S., Kudo, M., et al. 1998. Detection of *Helicobacter pylori* gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in feces. *Scand. J. Gastroenterol.* 33: 1140- 1143. Abstract.
111. Warren, J.R. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1:1273-1275.
112. Webb, P. M., Knight, T., Greaves, S., Wilson, A., Newell, D. G., Elder, J., Forman, D. 1994. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. *B. M. J.* 308:750-753

8. ANEXO

Tabela 1. Resultado de Testes diagnósticos para detecção de *H. Pylori* a partir de amostras de saliva das mães das crianças, que participaram do teste, da comunidade Parque Universitário, Fortaleza, Ceará no ano de 2000.

Nome	Idade (anos)	Saliva Albumina (mg/dL)	Saliva PT (mg/dL)	Saliva IgG (1:100)	Saliva IgG (1:200)	Saliva IgA (1:100)	Saliva IgA (1:200)	Soro	PCR	TR
A. B-A	35	11,4	28,1	+	-	-	-	NR	-	SR
B M. N. -B	38	5	114	+	+	+	+	NR	SR	SR
F. A G -C	37	22	58	+	+	-	-	R	SR	+
K. L. F.-D	32	1,2	36,8	+	+	-	-	R	+	+
M. A. M.-E	30	6,8	29,9	+	+	-	-	R	SR	-
M. A. S-F	19	18	49	-	+	+	+	R	+	SR
M. G. A. -G	48	24	69	+	+	+	+	R	+	+
M. do S. F. -H	26	5	47	-	-	-	-	R	+	+
M. E.. A. -I	26	9	54	+	-	-	-	R	+	+
M. H. A. -J	28	36	47	-	-	-	-	R	SR	-
M. L. H. -L	34	22,8	115,8	+	+	-	+	R	+	+
S. A. S. -M	37	11,4	26,3	+	+	-	+	R	SR	+
S. H. P. R. -N	36	3,4	40,3	-	+	+	+	R	SR	+
T. M. O. M. -O	33	47	118	+	+	-	+	R	+	+
Amostragem Total	14	14	14	14	14	14	14	14	8	11
Total de Positivos				10	10	4	7	12	7	9
Média	34,2	15,9	64,5							
Desvio padrão da Média	8,6	13,3	45,3							
Erro padrão da Média	2,3	3,6	12,1							
Intervalo de Confiança de 95%	29,2-39,2	8,2-23,6	38,3-90,7							
Limites	19-52	1,2-47	26,3-188							

a) μ = proteínas totais; PCR=reação em cadeia da DNA polimerase (“Polymerase Chain Reaction”); TR=teste respiratório.

b) NR=não-reagente; SR=sem resultado (teste ainda por ser realizado).

c) + = resultado positivo; - = resultado negativo e _ = não se aplica.

d) As letras maiúsculas em negrito ao lado do nomes das mães representam o código de identificação das mesmas para correlação com as letras minúsculas que identificam seus respectivos filhos (nas tabelas posteriores). Obs: Algumas crianças foram incluídas no estudo e os pais não, portanto nem todas as crianças podem ser correlacionadas com suas respectivas mães.

Tabela 2. Resultado de Testes diagnósticos para detecção de *H. Pylori* a partir de amostras de saliva de crianças do sexo feminino da comunidade Parque Universitário, Fortaleza, Ceará no ano de 2000.

Nome	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	Saliva Albumina (mg/dL)	Saliva PT (mg/dL)	Saliva IgG (1:100)	Saliva IgG (1:200)	Saliva IgA (1:100)	Saliva IgA (1:200)	Soro	PCR	TR
A. A. j	5	15,8	1,10	46	122,8	-	-	-	-	NR	SR	+
A. D. P -	6	27	1,26	24	58	+	+	-	+	NR	-	-
A. G. -n	10	39	1,45	1,2	22,8	-	-	-	-	NR	-	-
B. S. R. -	3	18,2	1,05	5	11	-	-	-	-	NR	SR	+
C. C. L.	5	19	1,15	2	40,3	-	-	-	-	R	-	-
D. F. R. -d	6	23	1,27	4,6	7	-	-	-	-	R	-	-
D. S. P. -m	13	39	1,42	25,0	43,8	+	+	-	-	R	+	+
F. A. M. P. -o	8	22,4	1,23	30	56	-	-	-	-	NR	-	-
F. A. -e	5	22,2	1,24	15	18	+	+	+	-	R	+	+
F. L. -e	4	26,4	1,22	10,2	24,6	-	+	-	+	NR	+	-
F. R. M. -o	2	13,2	0,94	31,9	65	-	-	-	-	R	+	+
F. R. -l	8	42	1,42	12,5	82,4	-	+	-	-	NR		-
G. S. R. -n	12	44,4	1,63	6,8	10,5	+	+	-	-	R	SR	-
J. C. -	6	23,6	1,28	15,9	38,6	-	-	-	-	R	SR	-
J. S. R. -	7	25,6	1,35	5,7	33,3	-	-	-	-	R	+	-
J. S. R. -	11	37,8	1,49	12	15	-	-	-	-	R	-	-
K. C. -j	8	24,5	1,23	65	75	+	+	-	-	NR	SR	-

L. B. - b	3	18,8	1,17	29	80	-	-	-	-	NR	-	-
M. P. -	8	27,4	1,34	18,2	73,7	-	-	-	-	NR	SR	+
M. C. - f	11	37	1,38	186	21	-	+	-	-	R	+	+
M. - f	10	28	1,14	93	122	+	+	-	-	R	+	+
M. S. F. - m	6	25,4	1,24	10,2	29,8	-	-	-	-	NR	+	+
P. A. - c	8	41,8	1,39	11,4	14	-	-	-	-	NR	+	-
P. A. - c	5	21,7	1,21	1	32	-	+	-	-	R	SR	-
R. B. A. - g	7	38,4	1,31	5,7	36,8	-	-	-	-	R	-	-
R. B. A. - g	12	45,2	1,63	7	50	-	-	-	-	NR	+	+
V. A. - i	2	17	1,03	123	135	+	+	-	+	NR	-	+
V. S. - i	6	17	1,15	3	17,5	-	-	-	+	NR	+	+
Amostragem Total	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	21	28
Total de Positivos						7	11	1	4	13	11	12
Média	7,0	27,9	1,28	28,6	47,7							
Desvio padrão da Média	3,1	9,7	0,16	41,9	35,6	-	-	-	-	-	-	-
Erro padrão da Média	0,6	1,8	0,03	7,9	6,7							
Intervalo de Confiança de 95%	5,8-8,2	24,1-31,6	1,21-1,34	12,3-44,8	33,9-61,5	-	-	-	-	-	-	-
Limites	2-13	13,2-45,2	0,94-1,63	1-186	7-135	-	-	-	-	-	-	-

a)PT=proteínas totais; PCR=reação em cadeia da DNA polimerase (“Polymerase Chain Reaction”); TR=teste respiratório.

b)NR=não-reagente; SR=sem resultado (teste ainda por ser realizado).

c)+ = resultado positivo; - = resultado negativo e _ = não se aplica.

d) As letras minúsculas em negrito ao lado do nomes das crianças representam o código de identificação das mesmas com suas respectivos mães (na tabela anterior). Obs: Algumas crianças foram incluídas no estudo e os pais não, portanto nem todas as crianças podem ser correlacionadas com suas respectivas mães.

Tabela 5. Resultado de testes diagnósticos para detecção de *H. Pylori* a partir de amostras de saliva de crianças do sexo masculino da comunidade Parque Universitário, Fortaleza, Ceará no ano de 2000.

Nome	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	Saliva Albumina (mg/dL)	Saliva PT (mg/dL)	Saliva IgG (1:100)	Saliva IgG (1:200)	Saliva IgA (1:100)	Saliva IgA (1:200)	Soro	PCR	TR
A. S. R. -	6	21,8	1,2	122	357	-	+	-	-	R	-	-
A. A. -j	3	17,6	1,03	15	147	-	+	-	-	R	SR	+
E. B. -a	7	28,7	1,28	45	100	+	+	+	+	R	SR	-
F. A. G. -c	4	21,6	1,21	17	60	-	+	-	-	NR	-	-
F. B. F. N. -b	13	46,8	1,50	8	17	-	-	-	-	R	+	+
F. B. F. N. -b	12	35	1,43	24	33	-	+	-	-	R	+	+
F. L. M. -o	4	18	1,08	19	34	-	-	-	-	R	SR	+
F. N. P. -o	7	20,8	1,22	18	58	-	-	-	+	R	+	+
F. V. S. F. -m	12	38,6	1,42	55	124	+	+	-	-	R	+	-
I. F. -d	2	18,8	1,14	5,7	30,7	+	-	-	+	NR	-	-
I. F. -d	9	30	1,36	10,2	10,5	-	-	-	-	R	+	+
J. -m	4	22,8	1,19	60	234	+	+	+	+	NR	+	+
L. F. -h	3	16,7	0,96	4	50,9	-	+	-	+	R	+	+
M. F. -h	2	13,5	0,91	5,7	35,1	-	-	-	-	NR	+	+
P. D. -f	3	14,8	0,98	18	47	-	-	-	-	R	+	+
R. S. F. -m	10	41,6	1,48	6,8	26,3	+	-	-	+	NR	+	+
Amostragem Total	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	13	16
Total de Positivos						5	8	2	6	11	10	11
Média	6,3	25,4	1,21	27,1	85,3	-	-	-	-	-	-	-
Desvio padrão da Média	3,8	10,2	0,19	30,8	93,1	-	-	-	-	-	-	-
Erro padrão da Média	0,9	2,5	0,05	7,7	23,3	-	-	-	-	-	-	-
Intervalo de Confiança de 95%	4,3-8,3	20-30,9	1,11-1,31	10,7-43,5	35,7-134,9	-	-	-	-	-	-	-
Limites	2-13	13,5-46,8	0,9-1,5	4-122	10,5-357	-	-	-	-	-	-	-

a)PT=proteínas totais; PCR=reação em cadeia da DNA polimerase (“Polymerase Chain Reaction”); TR=teste respiratório.

b)NR=não-reagente; SR=sem resultado (teste ainda por ser realizado).

c)+ = resultado positivo; - = resultado negativo e _ = não se aplica.

d) As letras minúsculas em negrito ao lado do nomes das crianças representam o código de identificação das mesmas com suas respectivos mães (na tabela anterior). Obs: Algumas crianças foram incluídas no estudo e os pais não, portanto nem todas as crianças podem ser correlacionadas com suas respectivas mães.

Tabela 4. Resultado de Testes diagnósticos para *H. Pylori* de pacientes do Hospital Geral de Fortaleza

Nome	Idade	Urease	Albumina (mg/dL)	PT (mg/dL)	Saliva IgG (1:100)	Saliva IgG (1:200)	Saliva IgA (1:100)	Saliva IgA (1:200)
A. B. S.	61	+	51	124	+	+	-	-
E. A. S.	46	+	96	157	+	+	+	-
C. N. M.	68	+	30	105	+	+	-	-
B. F. S.	65	-	19	118	+	+	-	+
A. I. M.	37	-	38	103	+	+	-	-
A. L. R. J.	41	+	19	94	-	-	-	-
D. C.	38	+	86	99	+	-	-	-
E. M. S.	26	+	65	227	+	+	+	-
H. A. G.	25	-	32	72	+	-	-	+
M. A. M. C.	46	+	50	65	+	-		
Amostragem Total	10	10	10	10	10	10	10	10
Total Positivos		7			9	6	2	2
Média	45,3		48,6	116,4				
Desvio Padrão da Média	15,2		26,7	46,8				
Erro Padrão da Média	4,8		8,4	14,8				
Intervalo de Confiança de 95%	34,4-56,2		29,5-67,7	83-150				
Limites	25-68		19-96	65-227				

a)PT=proteínas totais; urease=teste de urease a partir de biópsias gástricas obtidas por gastroduodenoscopia.

b)+ = resultado positivo; - = resultado negativo e _ = não se aplica.

Questionário infantil

QUESTIONÁRIO INFANTIL
Código da Ficha:
Data:

A Dados Demográficos:
1.Nome (mãe ou responsável):
2.Idade (mãe):
3.Nome (criança):
4.No de filhos: 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, ...
5.Data de nascimento (criança)
6.Sexo da criança: (1 = masculino, 2 feminino)
7.Peso atual: Kg
8.Estatura atual: cm
9.Estado nutricional: (1=eutrófico, 2=subnutrido, 3=desnutrido)
10.Endereço atual:
11.Código do distrito:
12.Quanto tempo mora no endereço atual: (A=anos, M=meses)

B. Informações da família:
1.Quantas pessoas na casa ?
2.Quantos compartimentos têm a casa ?
2.1.Pessoas/compartimento:
3.Quantos compartimentos são usados para dormir ?
3.1.Quantas pessoas dormem no mesmo leito?
4.Tipo de casa: (1=taipa; 2=alvenaria; 3=mista)
5.Água para beber é proveniente de onde ?
5.1.Encanada em casa (CAGECE)
5.2.Bomba
5.3.Poço
6.A água utilizada no banho da criança é proveniente de onde ?
6.1.Encanada em casa (CAGECE):
6.2.Bomba:
6.3.Poço:

<p>7.A água consumida pela criança procede diretamente da torneira ? (1=sim; 2=não) Se não, indicar uma das procedências abaixo listadas: 1=de recipiente com água filtrada; 2=de recipiente com água não filtrada; 3=de recipiente com água fervida; 4=de recipiente com água não fervida.</p>
<p>8.Existe recipiente para guardar água de beber? (1=sim; 2=não) Se sim, está o mesmo normalmente coberto ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>9.As crianças usam o mesmo copo para beber água que as demais pessoas da casa ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>10.Quem prepara os alimentos, você costuma lavar as mãos ? (1=mãe; 2=empregada; 3=outros)</p>
<p>11.Antes de preparar os alimentos, você costuma lavar as mãos ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>12.As crianças normalmente se alimentam de: Dieta geral Dieta mista Dieta Láctea</p>
<p>13.Usou antibiótico ou outras drogas nos últimos 3 meses ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>14.A criança tem diarreia ? (1=sim; 2=não; 3=raramente)</p>
<p>15.Perguntas sobre condições hidro sanitárias: a)Há rede de esgoto em seu bairro ? (1=sim; 2=não) b)Tipo de sanitário (1=com descarga; 2=sem descarga; 3=latrina; 4=sem sanitário) c)Onde esta localizado o sanitário da família ? 1. dentro de casa 2. fora de casa Qual a frequência com que crianças < 5 anos defecam ao redor da casa ? (1=geralmente; 2=usualmente;3=nunca)</p>

<p>16. Existe água para lavar as mãos no banheiro ou próximo ao mesmo ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>17. Quando a criança defeca e você a limpa, você lava suas mãos em seguida ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>18. Após usar o sanitário você lava suas mãos ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>19. Você usa algum outro papel (que não papel higiênico) para a limpeza pessoal e da criança no sanitário ? (1=sim; 2=não)</p>
<p>20. Na casa existe algum animal ? (1=sim; 2=não) Se sim, assinale o tipo de animal: Cachorro () Gato () Outro (), especificar _____ Quantidade: _____</p>
<p>21. Qual o grau de instrução da mãe ou responsável ? 1. Analfabeto 2. 1º grau menor 3. 1º grau maior 4. 2º grau 5. Superior</p>
<p>22. Qual é aproximadamente a renda da família (em salários mínimos) ? (1=até 1 salário; 2=de um a dois salários; 3=dois ou mais salários)</p>
<p>Entrevistador (a):</p>

8. Anexo 2: Termo de consentimento

Termo de consentimento para participação no estudo sobre *Helicobacter pylori*

Convidamos você e seu filho(a) _____
a participar de um estudo sobre a infecção do *Helicobacter pylori*.

A infecção pelo *Helicobacter pylori* é causa freqüente de gastrite e úlcera péptica, sendo importante a avaliação da prevalência desta infecção na população. Vários aspectos relacionados com a epidemiologia da infecção não tem sido completamente esclarecido. Nós gostaríamos de convidar a você e sua família para participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a prevalência (ou o número de pessoas infectadas por esta bactéria). Estar infectado não significa, em todos os casos, que haja necessidade de instituir um tratamento. Se por acaso for encontrada a presença da bactéria associada a alguma doença que exija tratamento, será realizado atendimento e assistência médica no ambulatório de gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo.

De todos os participantes será colhido uma amostra de sangue por uma profissional, técnica treinada, com todos os cuidados necessários. Nas crianças, além da coleta de soro, será realizado um teste respiratório. Para isto a criança tomará um suco de laranja contendo uma substância (uréia marcada com o 13C) que não tem atividade patológica para o organismo. Após alguns minutos a criança soprará em um balão, em cujo ar será também pesquisada a presença da bactéria. Em caso de dúvidas contactar a Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, telefone: 223-6982.

Você poderá deixar o estudo quando desejar sem nenhum prejuízo para sua saúde, apenas comunicando a um dos responsáveis pelo projeto.

Local: _____

Data: _____

Assinatura do participante

Assinatura do membro do estudo

Assinatura da testemunha

LISTA DE ABREVIATURAS

HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano classe II
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
PBS	solução salina tamponada
BSA	albumina sérica bovina
IgG	imunoglobulina G
IgA	imunoglobulina A
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
HABA	ácido 4'-hidroxiazobenzeno-2-carboxílico
VBC	verde de bromo cresol
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
PCR	reação em cadeia da polimerase
HBAP	human B-cell receptor associated protein
TR	teste respiratório
O.D	densidade óptica
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos E.U.A