

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu

FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA

**Validação do Immunoblot para detecção do *H. pylori* e avaliação da
resposta humoral à infecção em uma comunidade urbana de Fortaleza**

FORTALEZA

2012

FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA

Validação do Immunoblot para detecção do *H. pylori* e avaliação da resposta humoral à infecção em uma comunidade urbana de Fortaleza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Orientadora:

Profª. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O47v Oliveira, Francisco Josemar Alves de.
Validação do Immunoblot para detecção do H. pylori e avaliação da resposta humoral à infecção : em uma comunidade urbana de Fortaleza / Francisco Josemar Alves de Oliveira. – 2012.
67 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo.

1. H. pylori. 2. Immunoblot. 3. Proteínas VacA e CagA. I. Título.

CDD 617

FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA

Validação do *Immunoblot* para detecção do *H. pylori* e avaliação resposta humoral à infecção em uma comunidade urbana de Fortaleza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Márcia Maria de Negreiros Pinto Rocha
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

*Agradeço a Deus por todas as realizações de minha vida.
Aos meus pais, pelo exemplo de vida, ensinamentos e amor incontestável.
Aos meus irmãos e irmã, por torcerem pelo meu sucesso.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. LÚCIA LIBANEZ BESSA CAMPELO, Professora Titular do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, pela confiança depositada, orientação, competência e dedicação.

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, professor associado do Departamento de Cirurgia e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), por sua admirável doação à Pós-Graduação.

Aos membros da banca, pela avaliação deste estudo.

Ao amigo e companheiro de profissão Sr. CÍCERO IGOR SIMÕES MOURA SILVA, farmacêutico, doutorando em cirurgia, pela ajuda nos ensaios laboratoriais e as relevantes orientações para o desenvolvimento deste estudo.

A minha querida irmã, Sra. MARIA APARECIDA ALVES DE OLIVEIRA, enfermeira, doutorando em cirurgia, pela contribuição para conclusão desse estudo.

A Sra. MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES, enfermeira, doutorando em cirurgia, pela parceria no laboratório.

A Sra. BRUNA DEISE GURGEL MAIA pela ajuda nas atividades diárias no laboratório.

Aos acadêmicos de Medicina, RAFAEL ALMEIDA ALCÂNTARA e FERNANDO KENNEDY PEREIRA CHAVES, pela parceria no laboratório.

Às Sras. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-graduação em Cirurgia da UFC, pelo carinho dispensado e amizade construída.

A todos aqueles, que de alguma forma, participaram e contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Validação do *Immunoblot* para detecção do *H. pylori* e avaliação resposta humoral à infecção em uma comunidade urbana de Fortaleza. FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo.

A infecção por *H. pylori* se apresenta como uma das infecções mais prevalentes no mundo, infectando cerca de metade da população mundial, e está relacionada diretamente com as principais afecções gástricas. Sabe-se que a infecção é adquirida ainda na infância e tem longo curso de duração. O *Immunoblot* é um método imunoenzimático, não invasivo, que se mostra como uma ferramenta importante para estudar a resposta humoral contra patógenos, inclusive o *H. pylori*, essa técnica é muito relevante em estudos epidemiológicos. O objetivo deste estudo foi validar a técnica de *Immunoblot*, para detecção de anticorpos contra os antígenos do *H. pylori*, utilizando como padrão ouro o Teste Respiratório (TRU-¹³C) e o PCR, e avaliar o perfil da resposta humoral em indivíduos residentes na comunidade Parque Universitário. Os antígenos foram extraídos de cepas isoladas e purificadas a partir de biópsias gástricas de pacientes dispépticos. O *Immunoblot* foi validado com soro de 46 indivíduos, que tinham realizado previamente TRU-¹³C e PCR para os genes ureA, vacA e cagA. A sensibilidade foi de 100,0%, Especificidade de 83,3%, Valor Preditivo Positivo de 97,6%, Valor Preditivo Negativo de 100%, *Likelihood ratio* positivo: 6,00, *Likelihood ratio* negativo: 0,00. Após o método ser validado, foi verificada a imunoreatividade ao *H. pylori* em 108 indivíduos, onde foi encontrada uma soroprevalência de 87,0%. Esta população apresentou 78,7% de soropositividade para a proteína VacA e 33,3% para a CagA. O *Immunoblot* mostrou-se uma excelente técnica para identificar infecções prévias ou ativas do *H. pylori*, por apresentar alta sensibilidade e especificidade. A soropositividade para a VacA foi alta e para a CagA foi moderada, revelando assim o perfil de expressão destas citotoxinas pelas cepas circulantes na população estudada.

Palavras-chave: *H. pylori*; *Immunoblot*; Proteínas VacA e CagA.

ABSTRACT

Validation Immunoblot for the detection of *H. pylori* and evaluation of humoral response to infection in an urban community in Fortaleza. FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA. Dissertation (Master Degree). Postgraduate *Stricto Sensu* in Surgery. Federal University of Ceará. Profa. Titular Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo.

Infection by *H. pylori* is presented as one of the most prevalent infections in the world, infecting nearly half the world population, and is directly related to the major gastric disorder. It is known that infection is acquired in infancy and have long duration course. The Immunoblotting is an enzyme immunoassay, noninvasive, which shows itself as an important tool to study the humoral immune response against pathogens, including *H. pylori*. This technique is very important in epidemiological studies. The aim of this study was to validate the Immunoblotting technique for detection of antibodies against the antigens of *H. pylori*, using the gold standard with ¹³C-urea breath test (¹³C-UBT) and PCR. And to evaluate the profile of the humoral immune response in individuals living in the community University Park. The antigens were extracted and purified from strains isolated from gastric biopsies of dyspeptic patients. The immunoblotting was validated with sera from 46 individuals who had previously conducted ¹³C-UBT and PCR for genes ureA, vacA and cagA. The sensitivity was 100.0%, specificity 83.3%, Positive Predictive Value 97.6%, Negative Predictive Value of 100%, Positive Likelihood ratio: 6.00, negative Likelihood ratio: 0.00. After the validated method was verified immunoreactivity to *H. pylori* in 108 patients, which found a prevalence of 87.0%. This population showed a 78.7% positive for VacA protein and 33.3% for CagA. The Immunoblotting was shown to be an excellent technique to identify active or previous infection of *H. pylori*, due to its high sensitivity and specificity. Seropositivity was high for VacA and the CagA was moderate, thus revealing the expression profile of these cytotoxins by strains circulating in the population studied.

Keywords: *H.pylori*; Immunoblot; VacA and CagA protein.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

babA – gene de ligação da adesina do *Helicobacter pylori*

cagA – gene associado à citotoxina A do *Helicobacter pylori*

CagA – citotoxina A do *Helicobacter pylori*

C¹³ - Carbono 13

C¹⁴ - Carbono 14

CO₂- gás carbônico

EPIYA- sequência codificadora dos aminoácidos dos sítios de fosforilação da proteína CagA

ERO's – Espécies reativas de oxigênio.

flaA – gene da flagelina do *Helicobacter pylori*

H. pylori - *Helicobacter pylori*

iceA – gene induzido por contato com epitélio.

IgA – Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL-4 - Interleucina-4

IL-5 - Interleucina-5

IL-6 - Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

IL-10 -Interleucina- 10

IL-12 – Interleucina-12

IFN – γ – interferon gama

KDa – Kilodaltons

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução Salina tamponada com Fosfato)

pH – Potencial de hidrogênio

Th1 - Células T *help* 1

Th2 - Células T *help* 2

TRU-¹³C – Teste da uréia marcada com carbono 13

UreA – Enzima urease A

UreB - Enzima urease B

vacA – gene da citotoxina vacuolizante

VacA – citotoxina vacuolizante

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Fluxograma de seleção da amostrade indivíduos da comunidade Parque Universitário. Fortaleza-CE, 2010.....30**
- Figura 2- Desenho esquemático da transferência de antígenos para a membrana de Nitrocelulose..... 35**
- Figura 3 – Distribuição dos 46 indivíduos que participaram da validação do *Immunoblot* segundo a faixa etária, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.37**
- Figura 5 – Fitas de soro de 09 indivíduos que participaram da validação do *Immunoblot* com resultados positivos e negativos para infecção pelo *H. pylori*..... 38**
- Figura 6 – Frequência da expressão dos genes *vacA* e *cagA* versos resposta imune do tipo IgG contra as proteínas *VacA* e *CagA* para os 46 indivíduo que participaram da validação do *Immunoblot*, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE..... 40**
- Figura 7 – Fitas de *Immunoblot* com resultados positivos para infecção pelo *H. pylori*, e mostram alguns soros que revelaram imunoreatividade as proteínas *VacA*, *CagA* e *UreA*..... 41**
- Figura 8 - Distribuição quanto ao gênero para 108 indivíduos que participaram da avaliação da resposta imune contra o *H. pylori*, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE..... 42**
- Figura 9 - Faixas etárias para 108 indivíduos que participaram da avaliação da resposta imune contra o *H. pylori*, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE. . 42**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência por faixa etária, para infecção pelo <i>H. pylori</i> dos 46 indivíduos selecionados para a validação do Immunoblot considerando o TRU-13 C e o PCR-ureA.	37
Tabela 2 – Acurácia do <i>Immunoblot</i> comparado aos testes TRU-13C e PCR-ureA.	38
Tabela 3 – Comparação entre a resposta imune anti-VacA (<i>Immunoblot</i>) vs a presença de gene vacA (PCR) nos 46 indivíduos inclusos na validação no <i>Immunoblot</i>.	39
Tabela 4 - Comparação entre a resposta imune anti-CagA (<i>Immunoblot</i>) versus a presença de gene cagA (PCR) nos 46 indivíduos inclusos na validação no <i>Immunoblot</i>, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.....	41
Tabela 5 – Soropositividade contra os antígenos do <i>H. pylori</i> de acordo com o gênero de 108 indivíduos da comunidade Parque Universitário.....	43
Tabela 6 - Prevalência da infecção pelo <i>H. pylori</i> para 108 indivíduos da comunidade Parque Universitário, por faixa etária, através do <i>Immunoblot</i>.	43
Tabela 7 – Soropositividade contra as proteínas VacA e CagA para 108 indivíduos da comunidade Parque Universitário através do <i>Immunoblot</i>.....	44

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	15
1.2. Epidemiologia da infecção pelo <i>H. pylori</i>	15
1.3. Afecções gástricas associadas ao <i>H. pylori</i>	16
1.4. Marcadores de virulência do <i>H. pylori</i>	18
1.5. Resposta imunológica ao <i>H. pylori</i>	21
1.5.1. Resposta Inata à infecção pelo <i>H. pylori</i>	21
1.5.2. Imunidade Adquirida à infecção pelo <i>H. pylori</i>	22
1.6. Métodos diagnósticos para infecção do <i>H. pylori</i>	23
1.6.1. Métodos Invasivos.....	23
1.6.2. Métodos Não-Invasivos.....	25
2. Justificativa.....	28
3. Objetivos.....	29
4. Materiais e Método.....	29
4.1. Casuística.....	29
4.2. Desenho do Estudo.....	30
4.3. Seleção dos Participantes.....	31
4.4. Critérios de positividade para a infecção pelo <i>H. pylori</i>	31
4.5. Teste Respiratório com Uréia marcada com ¹³ C.....	32
4.6. Produção e doseamento de antígenos.....	33
4.7. Western Blot.....	34
4.7.1. Eletroforese dos antígenos (PAGE).....	34
4.7.2. Eletrotransferência.....	34
4.8. <i>Immunoblot</i>	35
4.9. Análise estatística.....	36

5. RESULTADOS.....	36
5.1. Caracterização da amostra para validação do <i>Immunoblot</i> para o diagnóstico do <i>H. pylori</i>	36
5.2. Validação do <i>Immunoblot</i> para diagnóstico do <i>H. pylori</i>	37
5.3. Comparação entre a resposta imune contra a proteína VacA analisado pelo <i>Immunoblot</i> e o gene vacA analisado pelo PCR.....	39
5.4. Comparação entre a resposta imune contra a proteína CagA analisado pelo <i>Immunoblot</i> e o gene vacA analisado pelo PCR.....	39
5.5. Avaliação da prevalência da infecção pelo <i>H. pylori</i> utilizando <i>Immunoblot</i> de 108 indivíduos da comunidade Parque Universitário.....	41
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICES.....	65
Apêndice 1.....	65
Apêndice 2.....	66

1. Introdução

1.1. *Helicobacter pylori*.

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa, microaerófila e espiralada (LEVINSON; JAWETZ, 1994), em forma de S ou em bastonete curvo, que mede cerca de 3 a 5 μ de comprimento por 0,5 μ de largura, tem parede celular externa lisa e possui de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e com bulbo terminal (TONELLI; FREIRE, 2000).

Esta bactéria foi isolada pela primeira vez, em 1983, por Warren e Marshall, na Austrália, (Prêmio Nobel de Medicina – 2005) a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica. Entretanto, no século passado, já havia relatos de isolamento de bactérias espiraladas em animais. Krienitz (1906) foi o primeiro a observar “espiroquetas” no estômago humano (TONELLI; FREIRE, 2000).

Em 1994, a *Internacional Agency for Research on Cancer*, divisão da Organização Mundial de Saúde para o estudo do câncer, concluiu, com base em extensas pesquisas na área, que o *H. pylori* é um agente carcinógeno tipo I, com relação à carcinogênese gástrica (BLASER, 2001).

É o agente de infecção crônica mais comum em seres humanos, coloniza especificamente a mucosa gástrica e as microvilosidades gástricas das células epiteliais e acredita-se que contribua diretamente na destruição da célula gástrica por produção de uma citotoxina vacuolizante, bem como enzimas tóxicas, especialmente lipase, urease e proteases, desregulando os fatores defensivos do epitélio. Estando assim, relacionado com alguns processos patogênicos, sejam inflamatórios (gastrite crônica e doença ulcerosa péptica) ou neoplásicos (adenocarcinoma e linfoma MALT) (CORREA, 1992; MALATY, 2007).

1.2. Epidemiologia da infecção pelo *H. pylori*.

A prevalência da infecção pelo *H. pylori* varia de acordo com a região geográfica, idade, raça e condição socioeconômica das populações (BROWN, 2000). Estima-se que 50% da população mundial esteja infectada pela bactéria (MITCHELL *et al.*, 2003). A maioria dos indivíduos infectados permanece sem nenhuma evidência clínica de desenvolvimento da doença durante um longo período de suas vidas (WISNIEWSKI; PEURA, 1997) e, em torno de 3% dos infectados, desenvolvem neoplasias relacionadas à presença do *H. pylori*. A importância etiológica do *H. pylori* no desenvolvimento das afecções gástricas está nas

alterações histológicas causadas no trato gastrointestinal (HANSSON, 1993; WATANABE, 1997).

É amplamente aceito que a infecção é adquirida principalmente na infância (LINDKVIST, 1996) e, se não tratada, permanece na mucosa gástrica por toda a vida (TAYLOR, 1991). A taxa de aquisição da infecção varia muito entre as populações e regiões, e é muito maior em países em desenvolvimento do que em países industrializados (SILVA, *et al.*, 2004). A soroprevalência aumenta progressivamente com a idade (MITCHELL *et al.*, 2003), e não esboça diferença entre gêneros (MCCALLION *et al.*, 1995).

A transmissão ocorre de pessoa para pessoa, e as vias de transmissão aceitas são a fecal-oral e oral-oral (GOODMAN, 1996; LEE, 1991).

No Brasil, um estudo em crianças, jovens e adultos no estado de Minas Gerais, mostrou uma prevalência da infecção de 28,9% em crianças de 2 meses a 5 anos, e de 90% para adultos com mais de 40 anos (ROCHA, *et al.*, 2003).

Estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2004), em Fortaleza no estado do Ceará, em uma comunidade urbana de baixa renda, com crianças e adolescentes, mostrou prevalência de 30% nas crianças aos 2 anos de idade, e esta taxa aumenta para 74% aos 20 anos. Para indivíduos acima de 20 anos, nesta mesma comunidade, foi relatado por Braga *et al.* (1995) que a taxa de prevalência da infecção girava em torno de 82%. Em outro estudo mais recente, foi demonstrado que, em pacientes dispépticos, ela fica em torno de 82% (MOTA *et al.*, 2008). Outro estudo realizado por Fialho *et al.* (2010), também em Fortaleza, com 570 membros de 128 famílias revelou que 28,9% das crianças de 6 meses a 5 anos estão infectadas, e que em adultos acima de 40 anos, a prevalência aumenta para 82%. Este estudo, também mostrou evidências que a infecção pelo *H. pylori* é adquirida na infância, e a transmissão é intrafamiliar, e que as taxas de infecção são bem elevadas em país em desenvolvimento. Todos estes achados vem corroborar com que está descrito na literatura sobre a epidemiologia do *H. pylori*.

1.3. Afecções gástricas associadas ao *H. pylori*.

O *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica, em uma localização considerada hostil para colonização de outros microorganismos, e consegue manter sua sobrevivência no estômago através da produção de urease, como visto anteriormente (MOBLEY, 2001). Esta colonização, após um período variável de incubação, pode evoluir para gastrite crônica, úlcera péptica ou

câncer gástrico. O curso clínico da infecção pelo *H. pylori* também é influenciado por fatores inerentes ao microorganismo e ao hospedeiro (SUERBAUM & MICHETTI, 2002).

O processo inflamatório crônico derivado da colonização é considerado uma importante causa de gastrite (WATANABE et al., 1997). Alguns fatores ambientais também estão implicados na gênese da gastrite crônica, dentre eles, dieta pobre em vitamina C, alta ingestão de sódio, etilismo e tabagismo, além de fatores genéticos. Está caracterizado, também, o papel central da resposta imune do hospedeiro na definição da evolução da doença (BONNEY et al., 1986).

Um outro fator relevante é a presença de cepas de *H. pylori* CagA positivas. No decorrer da infecção com essas cepas, as células do epitélio gástrico são continuamente expostas à entrada da proteína CagA da bactéria. A ligação da proteína CagA e o processo de fosforilação intracelular gerado por ela desregula a sinalização molecular da célula, destruindo a arquitetura normal do epitélio da mucosa estomacal, gerando o processo inflamatório da gastrite e demais afecções gástricas decorrentes desse estímulo inflamatório (HATAKEYAMA, 2005).

A gastrite predominante na infecção pelo *H. pylori* é a antral, porém, mesmo em menor proporção, a bactéria também causa gastrite corporal e pangastrite com o progresso da infecção. Cerca de 50% dos pacientes com pangastrite crônica e *H. pylori* positivo evoluem para lesões precursoras do câncer gástrico (SIPPONEN et al., 1998).

A gastrite crônica com atrofia do estômago, denominada gastrite atrófica, começa geralmente como um processo multifocal na porção distal do estômago. Sua progressão se dá por cerca de duas a três décadas. Durante esse período, pode ocorrer coalescência dos focos iniciais e uma redução da produção da secreção de ácido clorídrico, chegando, em alguns casos, a acloridria. A gastrite crônica de padrão atrófico, bem como, a metaplasia intestinal, pode evoluir para displasia que dará início ao processo neoplásico nas células gástricas (SIPPONEN et al., 1992).

A associação da infecção pelo *H. pylori* e o desenvolvimento de úlcera péptica também é bastante notória. Estudos apontam que 90% dos casos de úlcera duodenal e 70 a 90% dos casos de úlcera gástrica em adultos decorrem da infecção pelo *H. pylori* (TYTGAT, 1993). A úlcera péptica é uma afecção heterogênea que envolve múltiplos fatores relacionados a gênese e desenvolvimento de doenças gástricas crônicas, ocorrendo em 5 a 10% da população mundial (CARVALHO, 2000). O que melhor evidencia a associação do desenvolvimento da úlcera com *H. pylori* é o fato de que ao se tratar o paciente, erradicando a bactéria, observa-se

uma aceleração no processo cicatricial da úlcera mesmo sem o uso de inibidores da secreção ácida (MARSHALL 1994).

A infecção pelo *H. pylori* é também apontada como indutora primária da doença gástrica metaplásica e neoplásica através da indução de uma acentuada resposta imune. Esta resposta se combina com os fatores de virulência bacterianos, os fatores hormonais e dietéticos do hospedeiro e outros fatores ambientais que resultarão na lesão e degeneração das células parietais do estômago, na estimulação compensatória ou independente de proliferação, gerando a atrofia, a metaplasia, a displasia e, por fim, o adenocarcinoma gástrico (CORREA, 1992).

1.4. Marcadores de virulência do *H. pylori*.

Os mecanismos pelos quais a bactéria produz diferentes quadros patológicos no estômago e no duodeno não são totalmente conhecidos. Presumivelmente, fatores da bactéria, do hospedeiro e ambientais contribuem para estabelecer evoluções clínicas diversas. Dentre os principais mecanismos patogênicos envolvidos estão os fatores de virulência do microrganismo e a resposta inflamatória do hospedeiro.

A bactéria tem uma potente atividade ureásica que participa da colonização gástrica, permitindo sua sobrevivência em um meio ácido. A urease hidrolisa a uréia, presente no estômago, em amônia e CO₂ (VOLAND et al., 2003). A amônia tem atividade citotóxica, aumentando a permeabilidade da célula epitelial para prótons, e talvez participe como mediador da resposta imune local, já que é potente ativador de monócito *in vitro* (GOBERT et al., 2002).

A produção de urease pelo *H. pylori* está relacionado com alteração de pH gástrico. A uréia é um hexadímero contendo níquel, composta de duas subunidades estruturais, que são UreA e UreB (27 e 60 KDa) (CLAYTON *et al* 1990; DUNN, *et. al*, 1990; LABIGNE *et al.*, 1991) . O genes ureA e ureB codificam as subunidades estruturais, enquanto que ureE, ureF, ureG e ureH codificam proteínas acessórias para assegurar a inserção do Ni₂⁺ que é necessário para ativação da urease (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995) .

A maioria destas proteínas codificadas por estes genes está no citoplasma da bactéria, embora em culturas antigas, crescidas *In vitro*, certas quantidades estejam na superfície bacteriana. A ativação da urease é aumentada de 10 a 20 vezes quando o pH do meio cai de

6,0 para 5,0, e depois se mantém constante até o pH baixar até 2,5 (REKTORSCHKEK *et al.*, 1998; SCOTT, *et al.*, 2000). A ativação ácida da urease citoplasmática é mediada pelo terceiro genes do conjunto de genes responsáveis pela codificação da urease, o ureI, ele codifica o canal de uréia H⁺ fechado. O ureI aumenta a permeabilidade da membrana da bactéria à ureia, em pelos menos, 300 vezes, quando o pH circulante está ácido (WEEKS *et al.*, 2000).

A presença deste canal uréia-ácido dentro da membrana de *H. pylori* é necessária para a utilização eficaz de uréia presente no suco gástrico. Estes dados explicam que urease e ureI são indispensáveis para a sobrevivência de *H. pylori* a um pH médio de 4,0, bem como para a colonização bem sucedida da bactéria no ambiente estomacal de modelos animais (SKOULOUBRIS *et al.*, 1998; EATON, *et al.*, 1994). Todas as espécies conhecidas de *Helicobacter sp.* possuem este mecanismos enzimático da urease e a estrutura primária desta enzima mostra pequena diferença entres as cepas do *H. pylori* (EVANS, *et al.*, 1991). Estas características vem a corroborar com a hipótese que a urease é de suma importância para a sobrevivência do *H. pylori* no ambiente agressivo do estômago de humanos e para o estabelecimento da infecção crônica.

Estudos de genotipagem mostram que o *H. pylori* apresenta uma grande variedade genética, que dificultou a caracterização dos marcadores genéticos relacionados com as várias doenças. Mesmo assim vários lócus foram identificados e associados com maior risco de desenvolvimento de doenças gatrointestinais, tais como, cagA, vacA, babA, flaA e iceA, entre outros (ISRAEL; PEEK, 2001).

A citotoxina vacuolizante (VacA) codificada pelo gene vacA, se expressa em aproximadamente 50% das cepas. Entretanto todas as cepas de *H. pylori* apresentam o gene vacA. Esta proteína é responsável pela vacuolização celular do epitélio gástrico, que causa um desarranjo no citoesqueleto e um conseqüente defeito nos mecanismos biocelulares (ITO *et al.*, 1997).

O gene vacA é dividido em duas partes variáveis, ou seja, as cepas do *H. pylori* apresentam duas seqüências sinais para este gene (s1 e s2) e também dois tipos de região média (m1 e m2) (ATHERTON *et al.*, 1995; VAN DOORN *et al.* 1998). A associação entre estes vários alelos é que define a produção da citotoxina e está relacionada com a patogenicidade da bactéria (PAGLIACCIA *et al.*, 1998).

A Ilha de patogenicidade cag (PAI), é responsável pela codificação de uma citotoxina que atua como antígeno de superfície imunodominante desta bactéria, a proteína CagA, que está presente em aproximadamente 60-70% das cepas e possui alto peso molecular, variando de 120 a 140 KDa (COVER; DOOLEY; BLASER, 1990)(RIBEIRO, 2003; ISRAEL; PEEK, 2001). A proteína cagA é altamente imunogênica e se apresenta com importante fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico e úlcera duodenal (CENSINI *et al.*, 1996).

A proteína cagA do *H. pylori* revela na sua estrutura uma região 5' altamente conservada, mas com uma região 3' com número variável de sequências repetitivas, o que leva à variação do comprimento da proteína, sendo que qualquer variação em seu comprimento pode levar a diferentes respostas do hospedeiro, com vários graus de resposta inflamatória (ARGENT *et al.*, 2004).

O *H. pylori* contém genes homólogos aos de outras bactérias, na ilha de patogenicidade cag, que codificando os componentes do sistema de secreção do tipo IV, que irá injetar moléculas efetoras da bactéria na célula do hospedeiro, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular, incluindo a expressão de proto-oncogenese (COVACCI *et al.*, 1999).

Pesquisadores demonstraram que componentes do *H. pylori* induzem a alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, o que resultará em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas que estimulam a célula a se espalhar e se alongar de maneira idêntica à produzida pelo fator de crescimento de hepatócitos (STEIN; RAPPUOLI; COVACCI, 2000). Outros fatores da bactéria induzem a desfosforilação de proteínas normalmente fosforiladas (CHEN-WUN, CHIN-WEN; WEN-CHANG, 2002).

As cepas que expressam cagA tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como IL-1b e IL-8. Segundo Parsonnet *et al.* (1991) indivíduos infectados por cepas que expressam cagA têm três vezes maior chance de adquirir câncer gástrico.

1.5. Resposta imunológica ao *H. pylori*.

A resposta às infecções bacterianas dá-se por mecanismos imunológicos inatos e adquiridos, formando um sistema integrado de defesa contra o microrganismo invasor, onde diversas células e moléculas atuam mutuamente.

A resposta imune à maioria das bactérias que se fixam no ambiente extracelular dá-se através do recrutamento de clones de células T, que expressam resposta T-helper 2 (Th-2), com liberação de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e ativação de células B, com consequente produção de anticorpos.

O *H. pylori* apresenta um perfil diferente de resposta do hospedeiro para um patógeno extracelular, uma vez que a maioria dos clones de células T CD4⁺ isoladas de pacientes infectados pelo *H. pylori* e portadores de gastrite crônica secretam altos níveis de interferon (IFN – γ), e secretam IL-4 em menor quantidade, o que indica um perfil de resposta T-helper (Th1) (Bamford, 1998). Estudos também mostraram que o *H. pylori* induz a produção de IL-12, citocina que também está relacionada à resposta Th1 (ISRAEL; PEEK, 2001).

1.5.1. Resposta Inata à infecção pelo *H. pylori*

A resposta imune inicial à infecção pelo *H. pylori* em adultos se dá por uma intensa infiltração neutrofílica, associada a períodos de acloridria. Cepas CagA positivas (CagA⁺) induzem a produção de níveis elevados de citocinas proinflamatórias IL-1 β e IL-8. A injeção da proteína CagA nas células epiteliais gástricas está associada com a liberação de IL-8 que funciona como fator quimiotático para neutrófilos e leucócitos mononucleares, como macrófagos e monócitos para o sítio da infecção (RAD *et. al*, 2002), nesta fase ocorre uma redução na produção de ácido, o que facilita a colonização da bactéria no estômago (KONONOV, 2006).

A persistente migração neutrofílica mostra-se ineficaz para a erradicação da bactéria, pois o *H. pylori* possui mecanismos de proteção enzimáticos que neutralizam a ação efetora das células imunológicas. Algumas enzimas que participam deste mecanismo de proteção são a catalase e a superóxido dismutase (KONONOV, 2006).

As células mononucleares e os neutrófilos liberam Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) que, juntamente com a redução nos níveis de antioxidantes, levam ao stress com

lesão oxidativa, que é importante na modificação estrutural do DNA e no desequilíbrio do sistema de transdução de sinais das células epiteliais gástricas, que é considerado carcinogênico (RIBEIRO, 2003).

1.5.2. Imunidade Adquirida à infecção pelo *H. pylori*

Embora a reposta imune inata seja predominante na infecção pelo *H. pylori*, é observada também, uma reposta imune humoral, sistêmica e estável, com produção, principalmente, de anticorpos tipo IgG. Na infecção crônica observa-se, também, a presença de anticorpos específicos, tipo IgA, contra o patógeno. Estes anticorpos têm sido usados como indicadores específicos, da presença de infecção por *H. pylori*, em métodos de diagnóstico sorológico (SHIMOYAMA; CRABTREE, 1998). Esta produção de anticorpos não conduz a erradicação da infecção, mas pode contribuir para danos no epitélio gástrico. Alguns pacientes infectados apresentam reposta autoimune direcionada contra a H^+/K^+ -ATPase das células parietais gástricas, que está relacionada com o aumento da atrofia do corpo gástrico (NEGRINI; SAVIO; APPELMELK, 1997).

Após a inflamação aguda e as alterações na permeabilidade do epitélio gástrico, haverá uma exposição contínua de antígeno, que implicará em recrutamento de células T e uma indução na produção de anticorpos pelas células B. Estas células ajudam a distinguir bactérias patogênicas de bactérias da flora normal. Células imaturas Thelper (Th0) expressão CD4, que podem se diferenciar em dois subtipos funcionais. As células Th1, que são secretoras de IL -2 e interferon- γ (IFN $-\gamma$), e as células Th2, que secretam IL-4, IL-5 e IL-10. Células Th1 e Th2 estimulam diferentemente a resposta das células B contras os microrganismos invasores. Enquanto que na maioria das vezes, as células Th1 estimulam respostas a agente patógenos intracelulares, as células Th2 apresentam resposta a patógenos extracelulares.

O *H. pylori* é uma bactéria extracelular e induz uma forte resposta humoral, portanto esperava-se uma reposta com células Th2, mas paradoxialmente, cepas da mucosa gástrica, geralmente apresentam resposta imune com células T com fenótipo Th1 (HARRIS *et al.*, 2000). Estudo genético em camundongos mostrou que as citocinas produzidas pelas células Th1 promovem gastrite, enquanto que as de origem Th2 têm um papel protetor contra a inflamação gástrica (SMYTHIES *et al.*, 2000). A reposta do tipos Th1 contra o *H. pylori*,

combinada com a apoptose mediada por clone células T específicas, podem favorecer a infecção crônica por esta bactéria (WANG *et al.*, 2001).

1.6. Métodos diagnósticos para infecção do *H. pylori*.

São conhecidos vários métodos para o diagnóstico do *H. pylori*, e estes podem ser divididos em dois grupos, os invasivos e os não-invasivos. Os invasivos são aqueles que necessitam de uma endoscopia para serem realizados, pois precisam de coleta de biópsia, por exemplo, histológico, cultura, teste da uréase e PCR. Para os não-invasivos podemos citar os métodos sorológicos, teste respiratório com uréia marcadas com isótopos de carbono (^{13}C e ^{14}C) (CUTLER *et al.*, 1998), e também mais recentemente o Enteroteste que é uma alternativa para coleta de material biológico (GARCÍA; GISBERT, 2006; GONÇALVES, 2010).

1.6.1. Métodos Invasivos.

Histológico

Este método consiste da visualização direta da bactéria em um fragmento da mucosa gástrica. Além da identificação da bactéria, também pode ser verificado o grau de inflamação do tecido. Possui alta sensibilidade e especificidade, mas não está ausente de erros. A bactéria pode ser identificada por diversas colorações histológicas, por exemplo, Giemsa, hematoxilina e eosina Warthin-Starry, Steiner e carbolfucsina.

Pode se ter resultados falso negativos quando há falhas na visualização da bactéria ou quando a coleta do fragmento foi feito em local inadequado, pois a bactéria possui uma distribuição irregular mucosa gástrica (ROCHA, 1996).

Cultura

O *H. pylori* é uma bactéria microaerófila que necessita de condições especiais para seu crescimento. Portanto alguns fatores podem afetar a sua viabilidade. São de extrema importância os cuidados com a temperatura, meio e tempo de transporte da biópsia. Vários meios podem ser utilizados para o cultivo do *H. pylori*, como o Brain Heart Infusion (BHI) agar, Brucella agar, Columbia Agar ou Skirrow's Agar suplementado com sangue de cavalo, soro de cavalo, ou sangue de carneiro. A utilização de agentes antimicrobianos no meio de cultura torna-o mais seletivo para o *H. pylori*, pois as amostras podem vir contaminadas por outras bactérias e fungos, que irão competir com o *H. pylori*, e dificultar seu isolamento (HOLTON, 1999). Na incubação, o *H. pylori* necessita de uma atmosfera microaerofílica com 5-6% de O₂, 8-10% de CO₂, 80-85% de N₂, realizada em jarra específica para crescimento deste tipo de microrganismo. O crescimento é observado em aproximadamente sete dias. São necessários coloração de Gram e testes bioquímicos (uréase, catalase e oxidase) para finalizar a identificação do *H. pylori*. A cultura é o método mais específico para identificação e o único utilizado para determinação da sensibilidade a antimicrobianos (MALFERTHEINER *et al.*, 2002). Este método é caro, e geralmente realizado em laboratórios especializados. Nos estudos dos fatores de virulência e tipagem genética tem um papel relevante (TONELLI; FREIRE, 2000).

Teste Rápido da Urease.

O Teste Rápido da Urease (TRU) baseia-se na característica que o *H. pylori* tem de hidrolisar a uréia em amônia, CO₂ e água, através da enzima ureáse. Um fragmento de biópsia do antro ou um do antro e outro corpo gástrico são colocados, imediatamente após a coleta, em uma solução de uréia com indicador de pH (vermelho fenol). Se houver presença de *H. pylori* iniciará a quebra da uréia com consequente formação de amônia, que torna o pH da solução alcalina, o aumento do pH faz com que o indicador passe da cor amarela para rosa, mostrando assim que há presença de *H. pylori* na biópsia. Se a mudança ocorrer nas primeiras 24 horas, o teste é considerado positivo (ORNELLAS *et al.*, 2000). Alguns fatores podem influenciar na acurácia do TRU, por exemplo tamanho das biópsias, temperatura durante a leitura (LAINE L, 1996), tempo e temperatura de estocagem (NG, 1997). Existem alguns inconvenientes para este método, como a contaminação por bactérias produtoras de ureáse, por exemplo, *Proteus sp* e *Pseudomonas sp*, que podem alterar a cor da solução durante a estocagem (NG, 1997). Recomenda-se o preparo diário da solução de uréia ou estocagem a

4°C para realização do teste, para que sejam mantidas a sensibilidade e especificidade do método. O TRU é muito usado na clínica por apresentar baixo custo, e ter uma boa acurácia (ORNELLAS *et al.*, 2000).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O PCR apresenta uma alta sensibilidade e especificidade para a identificação do *H. pylori*. São amplificadas sequências específicas do DNA da bactéria, com a finalidade de reproduzir uma quantidade suficiente de um fragmento para ser avaliado. É uma técnica muito utilizada para identificação de microrganismos de difícil cultivo em *in vitro*. Como o *H. pylori* requer condições microaerofílicas, o PCR se torna menos oneroso que a identificação por cultura (VALENTINE, 1991). Na amplificação do material genético são utilizados oligonucleotídeos sintéticos, que agem como “primers” para a replicação enzimática das seqüências de DNA definidas (CLAYTON *et al.*, 1990).

1.6.2. Métodos Não-Invasivos.

Teste Respiratório com uréia marcadas com isótopos de carbono (TRU- ¹³C ou ¹⁴C).

Este método diagnóstico fundamenta-se no mesmo princípio do TRU, com a diferença que a uréia utilizada contém isótopo ¹³C ou ¹⁴C de carbono na sua estrutura molecular, o que possibilita a identificação do CO₂ produzido pela hidrólise da uréia, realizada pelo *H. pylori* com o auxílio da uréase. O paciente ingere uma solução com uréia marcada e o CO₂ produzido pela ação da uréase é absorvido pelo pulmão. Após um determinado tempo o paciente expira em um balão, nesta amostra de ar pode ser identificada a presença do carbono marcado, por cintilação ou espectrografia (PETERSON *et al.*, 2001; CZINN, 1999). O ¹⁴C é radioativo e contra indicado seu uso em crianças e mulheres grávidas. O método possui uma alta sensibilidade e especificidade, e por não ser invasivo é utilizado para o acompanhamento da eficácia do tratamento com antimicrobianos, e em estudos epidemiológicos (CARDINALI, *et al.*, 2003). No estudo de validação realizado em Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, o teste respiratório da uréia marcado com ¹³C se mostrou com alta sensibilidade (94,3%) e especificidade (100%), mesmo para crianças com idade inferior a seis anos (CARDINALI, *et*

al., 2003). Em outro estudo para avaliar o teste rápido de antígeno do *H. pylori* em fezes, o TRU-¹³C foi usado como padrão ouro, o que mostra a grande eficiência do método em diagnosticar a presença da infecção pelo *H. pylori* (SILVA *et al.*, 2010).

Enteroteste.

Trata-se de uma técnica alternativa à endoscopia digestiva alta, para obtenção de material biológico do estômago. Foi primeiramente proposta por Perez-Trallero *et al.* (1995).

A técnica consiste na ingestão de uma cápsula contendo um fio no seu interior. Ao final de um determinado tempo a cápsula é digerida e o fio entra em contato com o suco gástrico, e absorve o mesmo. O fio é retirado, a partir do suco gástrico obtido pode-se detectar o *H. pylori* por cultura e PCR.

Esta técnica apresentou altos valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico do *H. pylori*, em alguns países onde ela foi realizada (SAMUELS *et al.*, 2000) (TORRES *et al.*, 2001).

No Brasil, em Fortaleza estado do Ceará, o Enteroteste, utilizando cultura e PCR, foi validado e apresentou valores de sensibilidade de 86% e 77%, respectivamente, e especificidade de 100% em ambos os testes (GONÇALVES, 2010).

Sorológicos.

A infecção pelo *H. pylori* é crônica, pois a bactéria pode ficar aderida ao epitélio do estômago do hospedeiro por toda sua vida, com uma abundante liberação de substâncias altamente imunogênicas. A resposta imunológica do hospedeiro é intensa, mas insuficiente para eliminar a bactéria. Os principais anticorpos produzidos em resposta ao *H. pylori* são IgG, IgA e IgM (LEAL *et al.*, 2008). Inicialmente temos um aumento transitório de IgM, seguido de um aumento de IgG e IgA, onde estes dois últimos persistem durante toda a infecção. Como os anticorpos IgM são expressos transitoriamente, eles têm uma baixa importância para os testes diagnósticos (HERBRINK, 2000). A maioria dos métodos sorológicos para o diagnóstico do *H. pylori* baseiam-se na identificação de anticorpos específicos IgG ou

IgA contra a bactéria. Podemos destacar duas técnicas ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e o *Immunoblot*.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

É um teste imunoenzimático, baseado na ligação específica entre anticorpo e antígeno. Os antígenos específicos são fixados em uma placa de poliestireno, daí o método segue em três etapas. Primeira, contato do soro a ser analisado com os antígenos (primeiro anticorpo). Segunda, lavagem para retirada do primeiro anticorpo que não foram incorporados, e terceiro tratamento com o anticorpo secundário, que se constitui de um anticorpo para o anticorpo primário, e que possui uma enzima acoplada a sua estrutura que produzirá uma substância colorida. Após a ligação do anticorpo secundário ao primário, a coloração só aparecerá quando a enzima encontrada no anticorpo secundário é tratado com um substrato para o aparecimento da coloração. Pela intensidade da coloração é possível quantificar e verificar a substância de interesse.

Estudos realizados em países desenvolvidos com adultos, o ELISA apresentou alta sensibilidade e especificidade (Evans, 1989; Jones DM, 1986). Entretanto outros estudos realizados com crianças mostram baixa sensibilidade e especificidade para esta técnica diagnóstica (CZINN, 1999).

No Brasil, OLIVEIRA *et al.* (1999), mostraram que o ELISA apresenta baixa sensibilidade e especificidade para crianças com idade abaixo de 12 anos de idade. Outro estudo, também realizado com crianças e adolescentes, para avaliar a acurácia de um kit comercial de ELISA, para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, mostrou que para crianças com menos de 10 anos, a sensibilidade foi 71,4% com ponto de corte de 5 U/mL e 75,6% para 7 U/mL e especificidade de 70,2% e 75,6% com ponto de corte de 5 U/mL e 7 U/mL, respectivamente. No grupo com idade maior que 10 anos a sensibilidade e especificidade com ponto de corte de 5 U/mL foi de 96,8% e 61,9%, para 7 U/mL 90,6% e 71,0%, respectivamente (PORTORREAL e KAWAKAMI, 2002).

Immunoblot (Immunoblotting).

É também um imunoenensaio baseado na reação antígeno anticorpo, e difere do ELISA na fase sólida, no immunoblot esta reação se dá em uma membrana de nitrocelulose. Este ensaio é também chamado de “*Western Blotting*”, mas este termo é mais adequado aos procedimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e a eletrotransferência das proteínas, separadas no gel, para uma membrana de nitrocelulose. Portanto o termo immunoblot, se faz mais adequado as interações antígeno-anticorpo realizadas na segunda fase do ensaio (VAZ, 2007).

Desde a década de 80 o *Immunoblot* vem sendo usado na pesquisa, atualmente apresenta-se como uma importante ferramenta para o estudo epidemiológico da infecção pelo *H. pylori*, avaliando as taxa de prevalência da infecção, principalmente, em indivíduos assintomáticos (BRADEN, 2001) (LEAL *et. al.*, 2008). Com uma maior relevância para os anticorpos IgG, pois em um estudo realizado na Turquia, ensaios utilizado IgA, se mostraram com baixa sensibilidade para a identificação da infecção pelo *H. pylori*. (YILMAZ *et. al.*, 2006).

Como a maioria dos métodos sorológicos, utilizados para determinação da infecção pelo *H. pylori*, o *Immunoblot* não é indicado para monitoramento da erradicação recente da bactéria, após tratamento com antimicrobianos, pois os anticorpos mesmo com a eliminação da bactéria ficam circulantes no sangue (BLECKER *et al.*, 1994), podendo apresenta falsos positivos. Portanto o *Immunoblot*, como os outros métodos sorológicos refletem o contato crônico com a bactéria e não a infecção aguda.

Mas o *immunoblot* possui uma grande vantagem que é a possibilidade de avaliação de diferentes perfis antigênicos específicos, tanto para antígenos de baixo peso molecular como os de alto peso, os de baixo peso molecular podem ser observados na resposta imune de crianças e os de alto peso molecular em pacientes crônicos (LEAL, *et al.*, 2008). Além disso, o *Immunoblot* pode revelar os fatores de virulência da cepas infectante, por exemplo, se a bactéria expressa a proteína CagA, VacA, e etc. (MEYER *et al.*, 1991).

2. Justificativa

Tendo em vista a necessidade do estabelecimento de métodos diagnósticos acurados para a detecção do *H. pylori*, o immunoblot se revela uma importante ferramenta para o

diagnóstico da infecção, principalmente, quando realizado com antígenos produzidos em laboratório, devido à variação genética das cepas desta bactéria em diferentes regiões, conforme relatado previamente na literatura, o que leva a diferentes respostas imunológicas dos hospedeiros (RAMELAH *et. al*, 2005).

No Brasil, ainda não foi realizado nenhum estudo com *Immunoblot*, utilizando produção local de antígenos, em indivíduos infectados com *H. pylori*. Portanto, há necessidade de se validar este método no país, bem como, a realização de estudos em diversas faixas etárias para avaliação da acurácia do método.

3. Objetivos

Avaliar a acurácia do método *immunoblot* para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, utilizando antígenos produzidos em laboratório.

Estudar o perfil da resposta humoral contra os antígenos do *H. pylori* em indivíduos residentes na comunidade Parque Universitários em Fortaleza, no estado do Ceará.

4. Materiais e Método

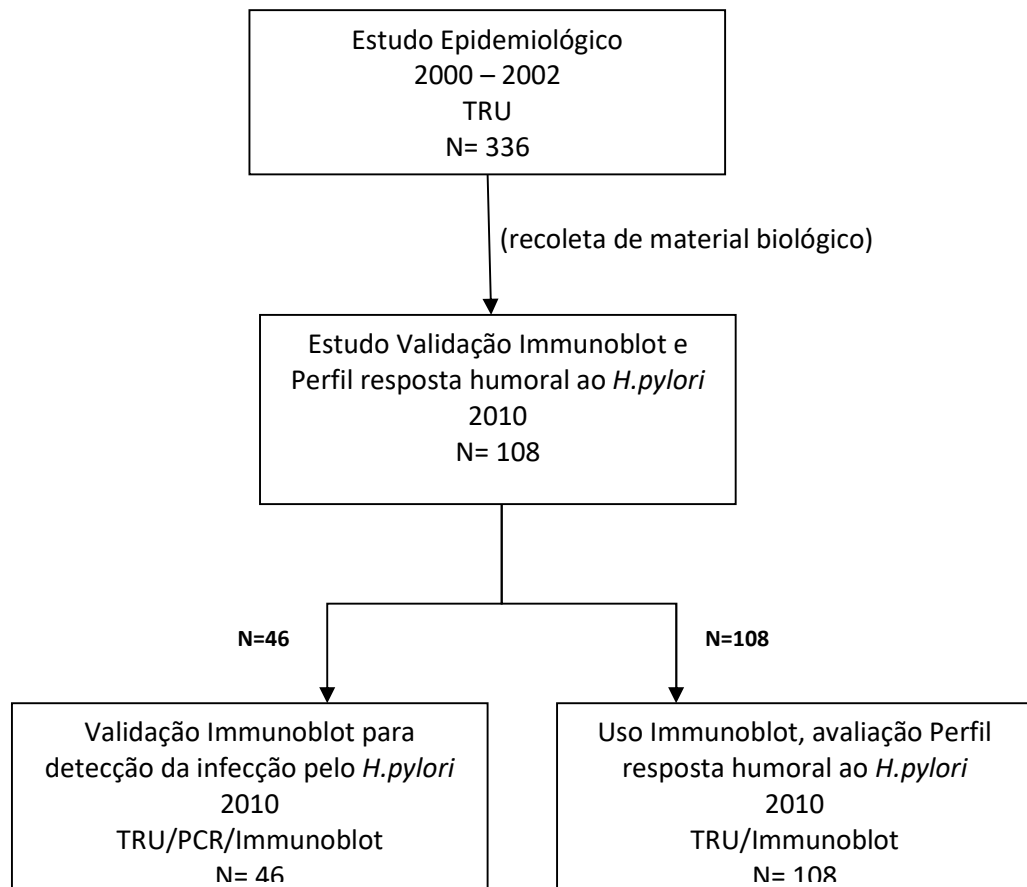
4.1. Casuística

Foram incluídos nesse estudo 108 indivíduos residentes na comunidade Parque Universitário, que haviam participado de estudo epidemiológico prévio realizado em 2000-2002. Após 8 anos, esses indivíduos foram localizados, e realizada nova coleta de material biológico (sangue e suco gástrico). Para detecção do *H. pylori* foram realizados, teste respiratório da ureia marcada com ¹³ C e *Immunoblot* de todas as crianças. PCR do suco gástrico obtidos a partir do Enteroteste, validado nessa comunidade por Gonçalves et al. (2010), também foram realizados. Foi aplicado questionário padronizado onde foram contemplados aspectos socioeconômicos sanitário da comunidade (Apêndice 1).

Para validação do *Immunoblot* com a produção de antígenos local, foram selecionados 46 indivíduos que possuíam os três testes de detecção do *H. pylori*: teste respiratório, PCR e *Immunoblot*.

O estudo foi submetido à análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEPE – do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. Todos os participantes e/ou responsáveis por estes receberam informações sobre o estudo e forneceram consentimento por escrito para realização do mesmo.

Figura 1- Fluxograma de seleção da amostrade indivíduos da comunidade Parque Universitário. Fortaleza-CE, 2010.



4.2. Desenho do Estudo

Estudo observacional e analítico.

4.3. Seleção dos Participantes

Critérios de inclusão:

- 1) Participantes ou, responsável legal, que assinaram o termo de consentimento informado.
- 2) Indivíduos que tinham diagnóstico de *H. pylori* através do TRU-¹³C e/ou PCR.

Critérios de exclusão:

- 1) Indivíduos portadores de doenças prévias, tais como, Insuficiência Renal, Insuficiência Hepática e Insuficiência Cardíaca Congestiva.
- 2) Indivíduos que recusaram a participar do estudo.

Validação do *Immunoblot*.

Foram utilizadas amostras de sangue de 46 indivíduos que participaram do estudo de detecção do *H. pylori* pelo Enteroteste (GONÇALVES, 2010). Nesse estudo as cepas foram genotipadas por PCR para o genes ureA, vacA e cagA. Foram selecionados indivíduos positivos ou negativos para os dois teste, o TRU-¹³C e PCR-ureA.

Avaliação da soroprevalência contra os antígenos do *H. pylori* através do *Immunoblot*.

Foram incluídos 108 indivíduos da comunidade Parque Universitário que participaram de um estudo realizado entre 2000-2002 e que foram reavaliados em oito anos após.

No primeiro estudo foram randomizadas e coletadas amostras de aproximadamente 336 indivíduos e possível reavaliação de 133 e desses foram coletadas amostras de sangue de 108 indivíduos.

4.4. Critérios de positividade para a infecção pelo *H. pylori*.

TRU-¹³C

Foram considerados positivos para infecção, os indivíduos que apresentarem resultado positivo para o ^{13}C de acordo com as especificações do método.

PCR-ureA

Foram considerados positivo para a infecção os indivíduos que apresentarem o gene ureA de acordo com a método descrito.

Immunoblot

Foram considerados positivos soros que apresentem pelo menos uma banda de 136, 87 ou 66 KDa ou uma combinação com outras bandas de pelo menos duas bandas com peso molecular ≤ 33 KDa. Este critério foi descrito por Lepper *et al.* (2004).

As bandas proteicas 136 KDa e 87 KDa no sistema de Lepper *et al.* equivale bandas encontradas entre 150 e 100 KDa e 100 e 75 KDa, respectivamente, no sistema utilizado neste estudo. Portanto bandas proteicas visualizadas entre 150 e 100 KDa foram considerados bandas CagA, e bandas entre 100 e 75 KDa foram consideradas bandas VacA.

Para a avaliação da acurácia do *Immunoblot* foram considerados positivos indivíduos que também foram positivos no PCR e TRU- ^{13}C , e negativos os indivíduos que apresentaram resultados negativos para os dois testes.

Para controle das reações inespecíficas com a membrana de nitrocelulose, foram realizados testes em branco, um com uma fita com antígenos e sem soro e outro com uma fita sem antígeno e com soro.

Também foram realizados ensaios com controles negativos, utilizando soros de pacientes sabidamente negativos para a infecção pelo *H. pylori*, pelos testes da uréase, TRU- ^{13}C e histopatológico.

4.5. Teste Respiratório com Uréia marcada com ^{13}C .

O teste respiratório foi realizado com o participante em jejum de seis horas. No do procedimento o indivíduo sopra em um balão e logo em seguida ingere 200 mL de suco de laranja contendo uréia marcada com ^{13}C . Após 30 minutos da ingestão do suco ele deve soprar em outro balão. A concentração do ^{13}C respiratório foi determinada no Espectômetro Infravermelho não Dispersível (IRIS Analysator, Wagner Analysen Technik, Worpswede, Germany®) no Laboratório de Pesquisa Bacteriológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte - Brasil.

O teste foi realizado segundo as instruções do fabricante e os valores foram considerados positivos de acordo com protocolos validados previamente. O teste foi considerado positivo quando o valor do C^{13} sobre a linha de base era maior que 5% (HILDEBRAND et al., 1997). Este teste foi previamente validado para a população brasileira (CARDINALI, et al., 2003).

4.6. Produção e doseamento de antígenos

Os antígenos foram extraídos de cepas isoladas e purificadas de *H. pylori*, a partir de biópsias gástricas de pacientes dispépticos, atendidos no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento livre e esclarecido. As biópsias foram transportadas para o laboratório de Gastroenterologia, em meio PBS, com temperatura entre 2 e 8°C. As bactérias foram obtidas da biópsia por maceração com bisturi, em condições assépticas. Em seguida, o macerado foi inoculado em meio de cultura sólido, *Brain Heart Infusion* (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), adicionado de 5% de sangue de carneiro e *Skirrow* SR069 (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England). Posteriormente, as placas foram incubadas em condições microaerofílicas, em jarra de Gaspak, utilizando atmosferas Probac® (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂) à temperatura de 37°, por 7 dias. A manutenção do ambiente microaerofílico foi mantida através da troca das atmosferas a cada 2 dias.

Foram realizados vários repiques para obtenção de colônias puras de *H. pylori*. Selecionaram-se as colônias que apresentaram morfologia característica. Após a purificação, as cepas foram submetidas aos seguintes testes de identificação, Morfologia da colônia, Coloração de Gram, testes bioquímicos urease, catalase e oxidase.

Das cepas que apresentaram resultado positivo para todos os testes de identificação foram selecionadas as cepas HP 5, 6 e 33, que foram genotipadas para os genes *vacA* e *cagA* por PCR. As três cepas se apresentaram positivas para o gene *vacA*, enquanto que apenas as cepas 5 e 33 apresentaram o gene *cagA*.

Essas cepas foram utilizadas na preparação de um *pool* de antígenos para realização do Immunoblot. Elas foram suspensas em água destilada estéril, em seguida a suspensão foi sonicada por 6 (seis) vezes, seguindo o ciclo de 30 segundos de sonicação e 15 segundos de banho de gelo. Após a sonicação a suspensão foi centrifugada por 40 minutos a 10000 RPM.

Finalmente o sobrenadante, que contém as proteínas solúveis, foi separado para ser utilizado como antígenos.

Foi realizado, também, no sobrenadante final a quantificação de proteínas, ou seja, a quantificação da concentração de proteínas na solução, para que posteriormente fosse definido o volume de antígenos a ser utilizado na eletroforese. O doseamento foi realizado utilizando o *kit BCATM Protein Assay Kit* (Pierce[®]), onde foi construída curva de calibração, como padrões de Albumina, utilizando espectrofotômetro *Eppendorf[®] Biophotometer Plus* (Eppendorf[®] - Hamburg, DEU). A concentração final de proteínas encontrado foi de 657,5 ug/mL.

4.7. Western Blot

4.7.1. Eletroforese em gel de Poliacrilamida(PAGE). Perfil eletroforético das proteínas do *H.pylori*.

Amostra solubilizada em tampão de amostra foi fervida por 5 minutos para redução e desnaturação das proteínas. Após a centrifugação, a amostra foi aplicada nos respectivos poços na concentração de 15,2 uL de solução de antígenos e 10 uL de tampão de diluição, perfazendo um total de 25,2 uL de volume final por poço. A corrida eletroforética das proteínas foram fracionadas em gel de bis-acrilamida na concentração de 3% (gel de empilhamento) e gel de corrida a 12% com tensão de 120V no início da corrida e aumentando para 180V até o final da corrida. Foi utilizado o equipamento da *Biorad*, Mini-PROTEAN[®] Tetra System.

Os padrões proteicos utilizados como marcadores de massa molecular foi *Precision Plus Protein Standards (Kaleidoscope)* (Bio-Rad Laboratories, Inc).

4.7.2. Eletrotransferência

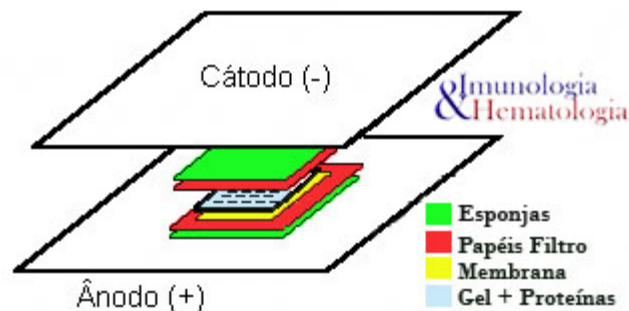
1°. As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45um.

2°. Para isso, foi montado um sanduíche com a membrana de nitrocelulose e o Gel onde os antígenos estão separados por peso molecular. A montagem do sanduíche inicia-se a partir do anodo(+) com esponja, papel de filtro, Nitrocelulose, Gel, papel de filtro e esponja catodo (-) (figura 1).

3°. A transferência foi realizado em temperatura de 4°C a 100V por 1 hora em tampão de transferência Tris/glicerina, 25 mM de Tris, 19,2 mM glicerina e 20% (v/v) de metanol.

4°. A membrana de nitrocelulose, contendo antígenos imobilizados, foram submetidos ao bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado a 3%.

Figura 2- Desenho esquemático da transferência de antígenos para a membrana de Nitrocelulose.



FONTE: imunologiahematologia.wordpress.com

4.8. Immunoblot.

Esta etapa é baseada na reação antígeno-anticorpo. A membrana de nitrocelulose com os antígenos imobilizados é cortada em fitas que correspondem aos poços onde os antígenos foram aplicados e separados por Peso Molecular no processo de eletroforese. Cada fita deve ser incubada com um soro.

A membrana foi incubada com soro do paciente (1° anticorpo) diluído de 1:100 por 18 horas a temperatura de 4°C sob agitação constante. Após esse período, a membrana foi submetida a 5 ciclos de lavagem de 10 minutos em tampão de lavagem para retirada do excesso de soro. Na etapa seguinte, a membrana foi incubada com 2° anticorpo, anti-IgG humana em TBS, o anti-IgG humana (*Goat Anti-Human IgG (H+L) AP conjugate; Bio-Rad Laboratories, Inc*) diluído de 1:400 por duas horas. Repeti-se os ciclos de lavagem. As bandas

de proteínas reativas foram reveladas com tampão contendo BCIP e NBT por 5 minutos. Após esse tempo, a reação é interrompida com água destilada

Para interpretação dos resultados, foi seguido o critério utilizado por Lepper *et al.* (2004), onde são considerados positivo para infecção pelo *H. pylori* pelo *immunoblot* os soros que apresentarem pelo menos uma banda de 136, 87 KDa ou uma combinação de pelos menos duas bandas de peso molecular ≤ 33 KDa.

4.9. Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS 16.0 *for Windows* para calcular as frequências, a acurácia do método *Immunoblot*, através da sensibilidade e especificidade. As demais variáveis foram analisadas pelo qui-quadrado, medindo-se os valores do Intervalo de Confiança.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da amostra para validação do *Immunoblot* para o diagnóstico do *H. pylori*.

Foram avaliados soros de 46 indivíduos pelo *Immunoblot*, onde 40/46 (87,0%) destes foram positivos para a infecção pelo *H. pylori* tanto para o TRU-¹³C como para o PCR para o gene *ureA* do *H. pylori* (PCR-*ureA*), e 6/46 (13,0%) foram negativos para os dois métodos citados. Com relação ao gênero, metade (23/46) era do gênero masculino. A média de idade foi de 13,30 \pm 3,69 anos, e a faixa etária variou de 7 a 25 anos. Os participantes foram divididos em duas faixas etárias, uma menor e igual a 14 anos, com 33/46 indivíduos (71,7%), e outra maior que 14 anos com 13/46 indivíduos (28,3%) (figura 02). Na primeira faixa etária 31/33 (93,9%) indivíduos eram positivos e 2/33 (6,1%) eram negativos, na segunda faixa etária 9/13 (69,2%) eram positivos e 4/13 (30,8%) eram negativos (tabela 01).

Figura 3 – Distribuição dos 46 indivíduos que participaram da validação do *Immunoblot* segundo a faixa etária, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

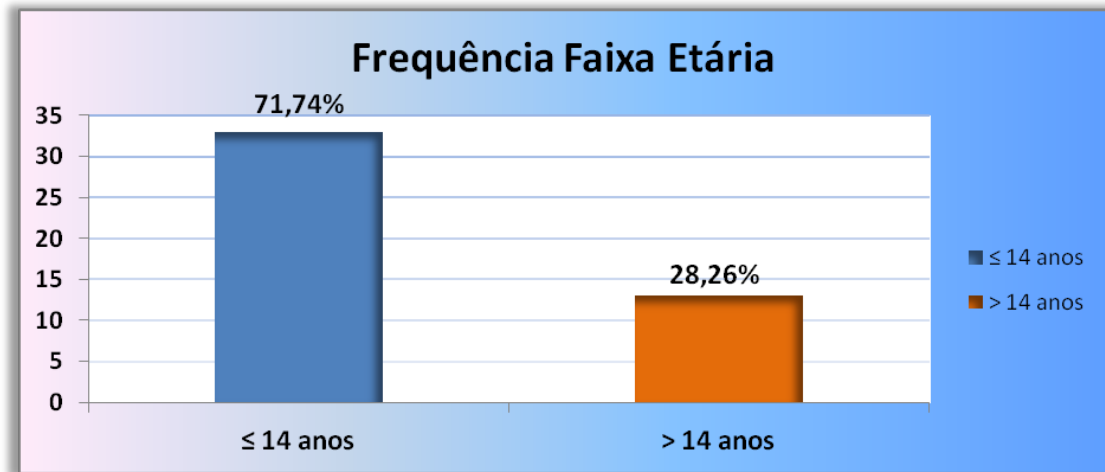


Tabela 1 – Frequência por faixa etária, para infecção pelo *H. pylori* dos 46 indivíduos selecionados para a validação do *Immunoblot* considerando o TRU-13 C e o PCR-ureA, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

Infecção <i>H.pylori</i>	positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
≤ 14 anos	31	93,9	2	6,1	33	71,7
> 14 anos	9	69,2	4	30,8	13	28,3
Total	40	87,0	6	13,0	46	100,00

5.2. Validação do *Immunoblot* para diagnóstico do *H. pylori*.

Todos os 40 indivíduos positivos para a infecção pelo TRU-¹³C e PCR-ureA, também foram positivos no *Immunoblot*, pelo critério de positividade adotado, enquanto que os seis indivíduos negativos no TRU-¹³C e PCR-ureA, um se apresentou positivo no *Immunoblot*. Estes resultados revelaram uma sensibilidade de 100,0% e especificidade de 83,3% para o *Immunoblot*, com Valor Preditivo Positivo (VPP) igual a 97,56% e Valor Preditivo Negativo (VPN) de 100,00 %. Também foram calculados *Likelihood ratio* positivo (LR +) que foi igual

a 6,00 e *likelihood ratio* negativo (LR -) que foi igual a 0,00. O *Immunoblot* apresentou apenas um falso positivo e nenhum falso negativo (tabela 2).

Na figura pode-se visualizar fitas de *Immunoblot* com resultados positivos e negativos para a infecção pelo *H. pylori*.

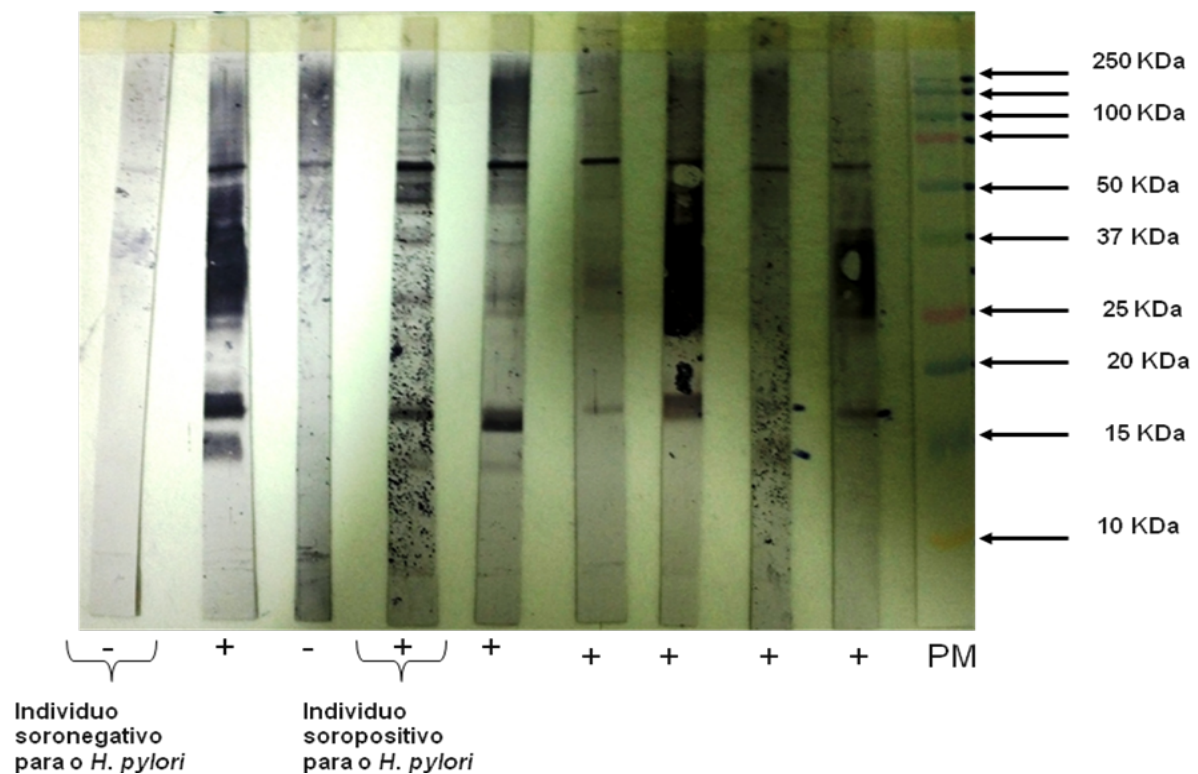
Tabela 2 – Acurácia do Immunoblot comparado aos testes TRU-13C e PCR-ureA, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

Immunoblot	<i>Helicobacter pylori</i> (TRU- ¹³ C + PCR) *			<i>p</i>
	Positivo	Negativo	TOTAL	
Positivo	40	1	41	1,000
Negativo	0	5	5	
Total	40	6	46	

Sensibilidade = 100%; Especificidade = 83,3%; VPP = 97,56%; VPN = 100%; LR+ = 6,00; LR- = 0,00.

*McNemar

Figura 4 – Fitas de soro de 09 indivíduos que participaram da validação do Immunoblot com resultados positivos e negativos para infecção pelo *H. pylori*.



5.3. Comparação entre a resposta imune contra a proteína VacA analisado pelo *Immunoblot* e o gene *vacA* analisado pelo PCR.

Dos 46 indivíduos estudados na validação do *Immunoblot*, 32/46 (69,6%) indivíduos apresentavam cepas positivas para a sequência sinal do gene *vacA* e 14/46 (30,4%) indivíduos eram negativos para este mesmo gene. Ao avaliarmos a resposta imune do tipo IgG contra as proteína VacA do *H. pylori*, ou seja, os anticorpos anti-VacA, pelo *Immunoblot*. Os 32 indivíduos que apresentaram cepas positivas para o gene *vacA*, 29/32 (90,63%) indivíduos também apresentaram anticorpos anti-VacA, e 3/32 (9,38%) indivíduos não apresentaram estes anticorpos. Dos 14/46 (30,43%) com cepas negativos para o gene *vacA*, 7/14 (50,00%) mostraram anticorpos anti-VacA (tabela 03).

Tabela 3 – Comparação entre a resposta imune anti-VacA (*Immunoblot*) versus a presença de gene *vacA* (PCR) nos 46 indivíduos incluídos na validação no *Immunoblot*, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

VacBlot	vacPCR					
	positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	29	90,6	7	50,0	36	78,3
	Negativo	9,4	7	50,0	10	21,7
Total	32	100,0	14	100,0	46	100,0

5.4. Comparação entre a resposta imune contra a proteína CagA analisado pelo *Immunoblot* e o gene *vacA* analisado pelo PCR.

Com relação à expressão do gene *cagA* para os 46 indivíduos estudados na validação do *Immunoblot*. Dos 22/46 (47,8%) indivíduos que apresentaram cepas com o gene, 15/22 (68,2%) indivíduos mostraram imunogenicidade contra proteína CagA do *H. pylori*, e para 7/22 (30,0%) indivíduos não mostraram anticorpos anti-CagA quando analisado os resultados do *Immunoblot*. E para os 24/46 (52,2%) que não apresentaram o gene *cagA* na análise de PCR, 19/24 (79,2%) também não expressaram anticorpos anti-CagA e 5/24 (20,8%) expressaram estes anticorpos (tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre a resposta imune anti-CagA (Immunoblot) versus a presença de gene cagA (PCR) nos 46 indivíduos incluídos na validação no Immunoblot, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

CagBlot	cagPCR					
	positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	15	68,2	5	20,8	20	43,5
negativo	7	31,8	19	79,2	26	56,5
Total	22	100,0	24	100,0	46	100,0

Na figura 03 é mostrado as frequências para as amostras que expressaram ou não o genes vacA ou cagA, e os respectivos resultados para a resposta imune com anticorpos IgG, contra as proteínas VacA e CagA do *H. pylori* dos 46 indivíduos que participaram da validação do *Immunoblot*.

Figura 5 – Frequência da expressão dos genes vacA e cagA versus resposta imune do tipo IgG contra as proteínas VacA e CagA para os 46 indivíduos que participaram da validação do Immunoblot, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

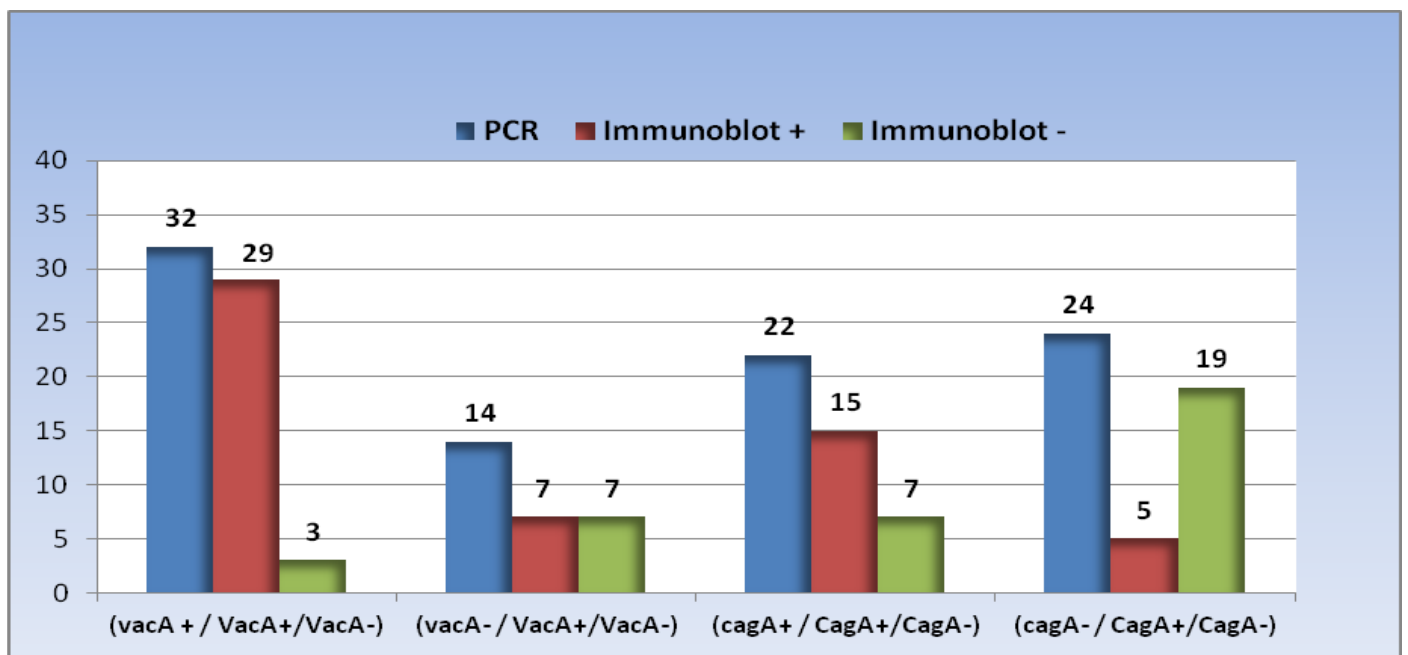
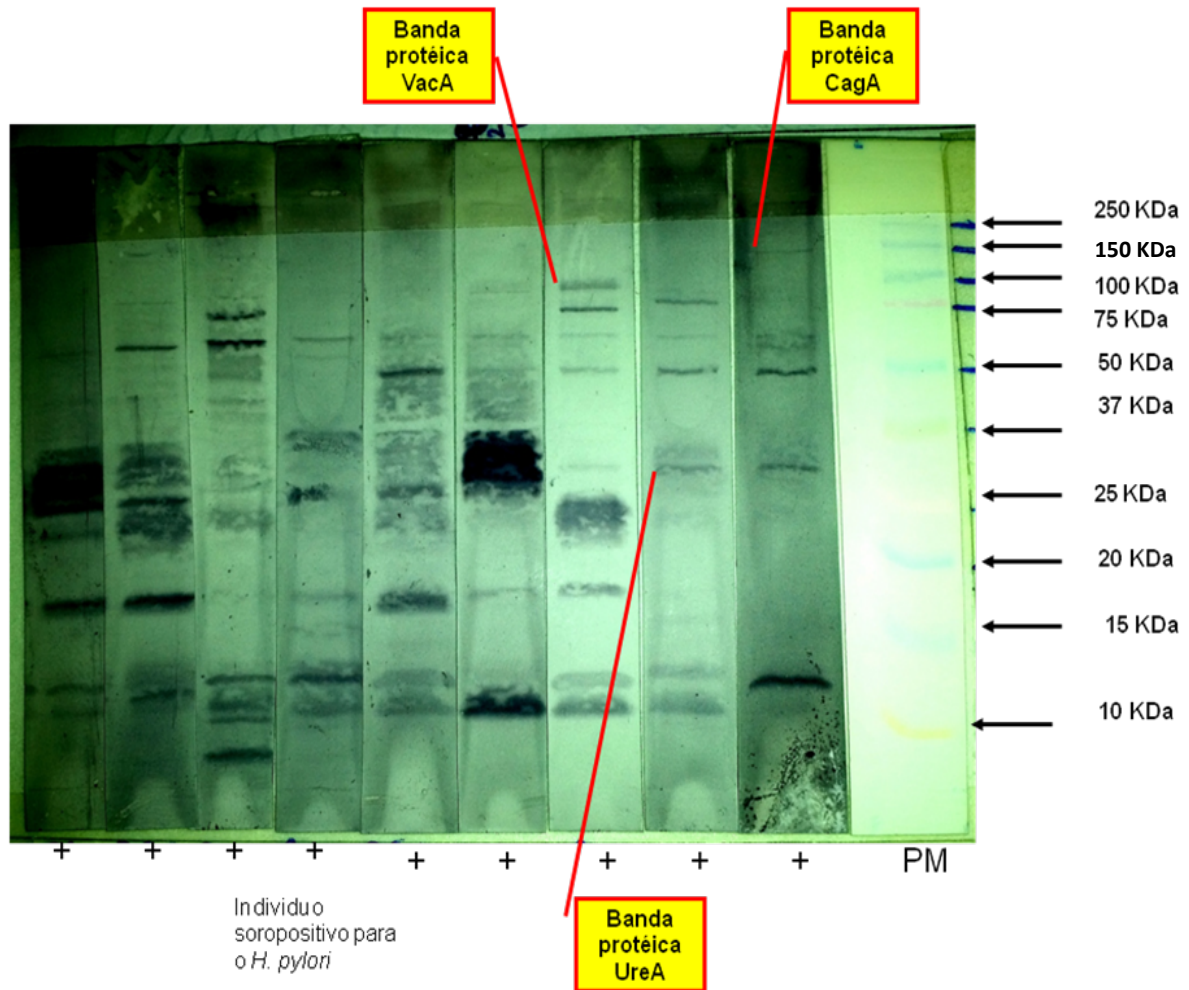


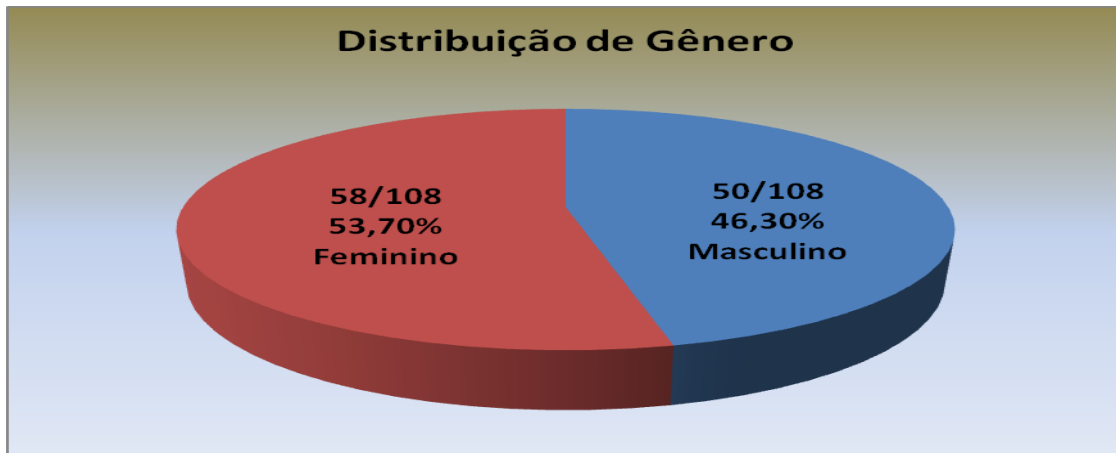
Figura 6 – Fitas de *Immunoblot* com resultados positivos para infecção pelo *H. pylori*, e mostram alguns soros que revelaram imunoreatividade as proteínas VacA, CagA e UreA.



5.5. Avaliação da prevalência da infecção pelo *H. pylori* utilizando *Immunoblot* de 108 indivíduos da comunidade Parque Universitário.

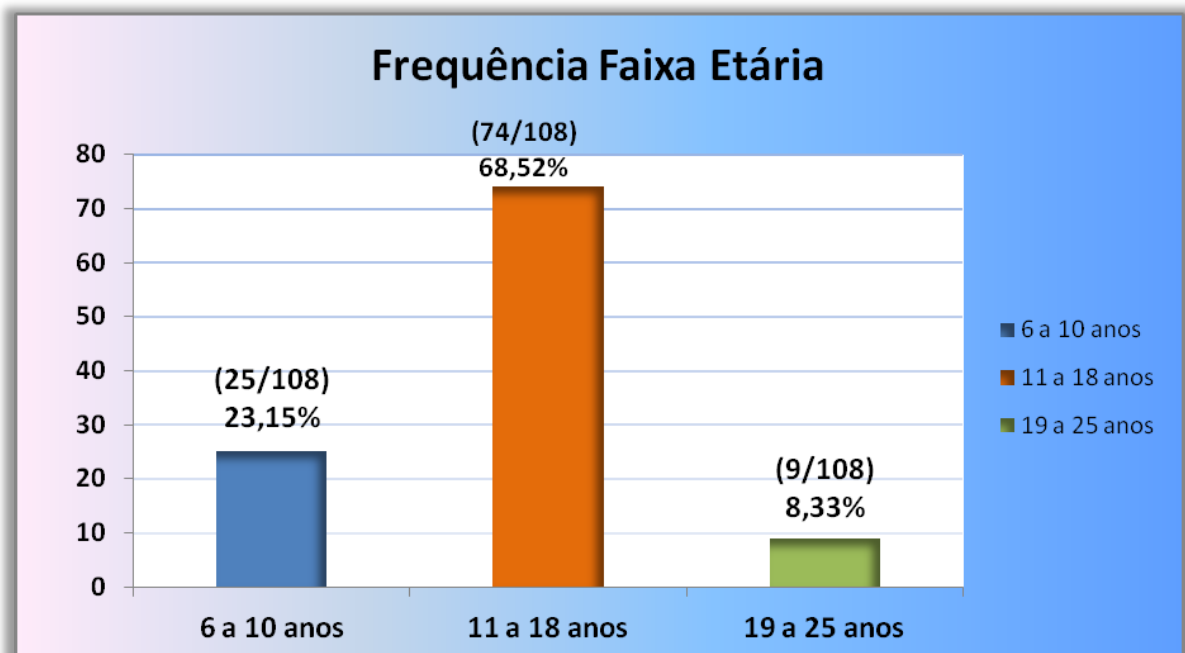
Foram analisados soros 108 indivíduos, para avaliar a soroprevalência da infecção pelo *H. pylori*, utilizando a técnica de *Immunoblot* previamente validada neste estudo. Destes, 50/108 (46,30%) eram do gênero masculino e 58 (53,70%) do gênero feminino (Figura 5).

Figura 7 - Distribuição quanto ao gênero para 108 indivíduos que participaram da avaliação da resposta imune contra o *H. pylori*, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.



A idade variou de 6 a 25 anos, com média de $13,41 \pm 3,85$ anos. Com relação às faixas etárias, 25/108 (23,15%) indivíduos tinham de 6 a 10 anos de idade, 74/108 (68,52%) tinham de 11 a 18 anos e 9/108 (8,33%) de 19 a 25 anos (Figura 06).

Figura 8 - Faixas etárias para 108 indivíduos que participaram da avaliação da resposta imune contra o *H. pylori*, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.



Considerando-se apenas o TRU-¹³C, observou-se que 74/108 (68,5%) eram positivos e 34/108 (31,5%) eram negativos para a infecção.

Entre os que apresentaram sorologia positiva, 44/94 (46,8%) eram do gênero masculino e 50/94 (53,2%) feminino. Entre os negativos, 6/14 indivíduos (42,9%) eram do gênero masculino e 8/14 (57,1%) do gênero feminino (tabela 05).

Tabela 5 – Soropositividade contra os antígenos do *H. pylori* em 108 indivíduos de acordo com o gênero, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

Gênero	Presença de soropositividade contra <i>H. pylori</i>				Total
	positivo	%	negativo	%	
Masculino	44	46,81	6	42,86	50
Feminino	50	53,19	8	57,14	58
Total	94	100,00	14	100,00	108

Quiquadrado = 0,077 p= 0,782

Dos 108 indivíduos, 94/108 (87,0%) apresentaram sorologia positiva para infecção pelo *H. pylori*, e 14/108 (13,0%) foram negativos. Entre as faixas etárias, quando se analisou apenas os resultados do TRU-¹³C a que apresentou maior prevalência para a infecção foi a de 11 a 18 anos com 52/74 (70,3%), enquanto que no *Immunoblot* a faixa etária que apresentou a maior prevalência foi 19 a 25 22/25 (88,89%). O que revela que as maiores faixas etárias tem ou tiveram a infecção pelo *H. pylori* (tabela 06).

Tabela 6 - Prevalência da infecção pelo *H. pylori* em 108 indivíduos por faixa etária, através do *Immunoblot*, em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

Faixa etária	Infecção <i>H.pylori</i>					
	positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
6 a 10 anos	22	88,00	3	12,00	25	23,15
11 a 18	64	86,49	10	13,51	74	68,52
19 a 25	8	88,89	1	11,11	9	8,33
Total	94	87,04	14	12,96	108	100,00

A soropositividade de anticorpos anti-CagA para os 108 indivíduos foi de 33,3% (36/108), e para anti-VacA foi de 78,7% (85/108). Entre os anti-CagA positivos 19 indivíduos eram do gênero masculino e 17 feminino. Para os anti-VacA 36 eram masculino e 49 eram femininos. Não houveram diferenças estatísticas entre os gêneros tanto para as respostas anti-

CagA e anti-VacA, com quiquadrado igual a 0,912 ($p=0,339$) e 2,946 ($p=0,114$), respectivamente (tabela 7).

Tabela 7 – Soropositividade contra as proteínas VacA e CagA em 108 indivíduos, através do *Immunoblot* em uma comunidade urbana de Fortaleza-CE.

	Proteína VacA		Proteína CagA	
	n	%	n	%
Positivo	85	78,70	36	33,33
Negativo	23	21,30	72	66,67
Total	108		108	

6. DISCUSSÃO

A validação de métodos não invasivos para detecção do *H. pylori*, principalmente em crianças, tem uma importância relevante para o diagnóstico da infecção. Pois, como já descrito na literatura, a infecção pelo *H. pylori* é adquirida na infância e no seio familiar. Portanto, se faz necessário métodos diagnósticos eficazes nesta faixa etária, pois esta população representa-se ideal para estudos epidemiológicos. O *Immunoblot* apresenta-se como uma boa alternativa para estudar a infecção em crianças, pois é um método não invasivo e apresentou elevados valores de sensibilidade e especificidade.

A produção de antígenos em laboratório a partir de cepas cultivadas em determinada área geográfica, fornece um perfil da expressão proteica completa dessas cepas e, conseqüentemente, da resposta imunológica às mesmas por parte de seus hospedeiros, tornando-se assim muito mais específicos e representativos do perfil imunogênico em uma determinada população.

No presente estudo, foram utilizados dois métodos de detecção do *H. pylori*, o TRU-¹³C e PCR para determinar a presença do gene ureA, e assim, validar o *Immunoblot* com produção de antígenos em laboratório. Estudos prévios demonstraram uma alta sensibilidade e especificidade do *immunoblot* com produção local de antígenos, quando foram observadas as respostas imunes mediadas por anticorpos IgG para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* (FAULDE et al. 1992, KLAAMAS et al. 1996, KARVAR et al. 1997, NILSSON et al. 1997, HOLTSMANN et al. 1998, SARKER, 2004).

Nesse estudo, a sensibilidade encontrada foi de 100,0%, a especificidade de 83,3 % e os valores Preditivos Positivo e Negativo foram respectivamente de 97,6% e 100,0%. O LR+ foi de 6,00 e o LR- igual a zero. Não houve diferença estatística entre a eficiência do *Immunoblot*, do PCR e do TRU-¹³C quando se utilizou o teste estatístico McNemar ($p=1,000$) (Tabela 2). O resultado falso positivo encontrado no *Immunobot* pode ser resultado de uma eliminação espontânea do *H. pylori* por mecanismos imunes específicos, fato frequentemente observado em crianças em estudos anteriores (KLEIN et. al 1994, SARKER et. al 1997, PERRI et. al, 1998). O valor da especificidade do *Immunoblot* no presente estudo sofreu diminuição por conta desse resultado.

Os parâmetros foram avaliados segundo os critérios de positividade definidos por LEPPER *et al.*, que, em estudo conduzido na Alemanha, com 294 indivíduos infectados, sintomáticos e assintomáticos, encontraram uma sensibilidade de 95,9%, especificidade de 85,7%, Valor Preditivo Positivo de 97,2% e Valor Preditivo Negativo de 82,4%. Outro estudo realizado em crianças assintomáticas, em Bangladesh, comparando o *Immunoblot* com TRU-¹³C, verificou uma sensibilidade de 94,0%, especificidade de 68,0% e Valor Preditivo Positivo de 92,0% e Valor Preditivo Negativo de 96,0% para o *Immunoblot* (SARKER, 2004). Estes valores são semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Valores similares também foram encontrados por Faulde *et al.* (1993) e Nilsson *et al.* (1997), em estudos realizados em adultos utilizando *Immunoblot*, com antígenos produzidos em laboratório, apresentando sensibilidade de 100,0% e 97,5%, respectivamente.

Aucher *et al.* 1998, em estudo avaliando os parâmetros diagnósticos do *immunoblot* em portadores de úlcera péptica na França, encontraram uma sensibilidade de 83,0% e uma especificidade de 69,0%, abaixo dos valores aqui encontrados.

Rocha *et al.* (2000), em estudo conduzido, no sudeste do Brasil, em crianças, observaram uma sensibilidade de 95,5%, especificidade de 85,7%, VPP de 88,7% e VPN de 94,1%. Em outro estudo, coordenado pelo mesmo grupo, avaliando adultos, obteve-se uma sensibilidade de 93,9%, especificidade de 92,6%, VPP de 98,7% e VPN de 71,4% (ROCHA *et al.*, 2004). Os valores encontrados em ambos os estudos são similares aos encontrados nesse estudo. Contudo, em sua metodologia, os estudos anteriores utilizaram kits de *immunoblot* comerciais. Não existem trabalhos que utilizem a técnica de *Immunoblot* com produção local de antígenos, para o diagnóstico do *H. pylori*, no Brasil.

Entre os soros que eram sabidamente negativos para a infecção do *H. pylori* foram visualizadas bandas protéicas com peso molecular entre 75 e 37 KDa. Estas proteínas não são específicas para o *H. pylori*, ou seja, representam uma resposta imune ao complexo flagelar de outras bactérias ou do *H. pylori*. Reações cruzadas entre a resposta imune mediada por anticorpos IgG aos antígenos do *H. pylori* e outras infecções por bactérias flageladas, como *T. pallidum* e *Borrelia burgdorferi*, já foram relatadas em outros estudos e estão em consonância com os achados nesse estudo (BAZILLOU *et al.*, 1994; NILSSON *et al.* 1997).

Como já descrito na literatura, os fatores de virulência VacA e CagA tem uma grande relevância no desenvolvimento de doenças gastrointestinais, e poucos estudos foram realizados em indivíduos assintomáticos para revelar a expressão destas duas proteínas

utilizando immunoblot com antígenos produzidos em laboratório. (LEPPER *et al.*, 2003, NILSSON *et al.* 1997, SARKER, 2004).

Com relação à soroprevalência das proteínas imunogênicas, 78,7% dos indivíduos expressaram anticorpos contra a proteína VacA. A soroprevalência da proteína VacA foi alta em relação ao relatado em estudos anteriores. Xiang *et al.* (1995), em estudo conduzido na Itália, acharam uma soropositividade de 65,1% para a proteína VacA, valor aproximado ao encontrado nesse estudo. Já, Lepper *et al.* (2004) e Aucher *et al.* (1998), acharam baixas soropositividades para VacA, com valores de 10% e 36,7%, respectivamente. Os estudos avaliando a soroprevalência de VacA no Brasil, também acharam uma baixa soropositividade em relação ao presente estudo, sendo relatadas soropositividades de 44,4% e 36% nos estudos anteriores, realizados na região Sudeste do país (ROCHA *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2004). Esses achados são sugestivos de que as cepas circulantes na comunidade estudada tenham um perfil imunogênico diferente do relatado em outras regiões.

A soropositividade para a proteína CagA foi de 33,3% na população estudada. Esse achado é similar aos encontrados por Aucher *et al.* (1998), que encontraram uma imunorreatividade de 40,8% para CagA. Lepper *et al.* (2004), encontraram 31,5% de soropositividade para CagA. Já Xiang *et al.* (1995), acharam uma prevalência de 67,4% de proteína CagA. Os estudos prévios relatados também foram realizados com produção local de antígenos. Nos estudos conduzidos no Brasil, a soroprevalência da proteína CagA foi diferente do presente estudo, sendo relatado 66,7% de CagA no estudo em crianças e 60% no estudo com adultos.

Nesse estudo, foram avaliados 108 indivíduos assintomáticos, residentes em uma comunidade urbana de Fortaleza, quanto à presença da infecção pelo *H. pylori*. Todos os indivíduos realizaram TRU-¹³C previamente, que é um teste padrão ouro (CARDINALI *et al.*, 2003). A maioria dos indivíduos analisados era adolescente e a idade apresentou uma distribuição normal pelo teste estatístico *Kolmogorov-Smirnov*. Não foi observada diferença estatística entre os gêneros, quanto à presença da infecção ($p=0,782$) (tabela 05).

Existem poucos estudos da resposta imune humoral contra a infecção pelo *H. pylori* em indivíduos assintomáticos residentes em áreas urbanas. Torres *et al.*(1998), em estudo de avaliação sorológica da população do México, acharam uma prevalência de 66,0% da infecção e não houve diferença estatística entre os gêneros. Em um estudo de coorte com crianças e adolescentes nos E.U.A, Malaty *et. al* (2007), acharam uma baixa prevalência (24,5%) e também não relatam diferenças significantes entre os gêneros.

O estudo da resposta imune humoral à infecção pelo *H. pylori*, através do *Immunoblot* utilizando cepas locais para produção de antígenos, favorece a elucidação do perfil antigênico das cepas circulantes na comunidade. No entanto, a maioria dos trabalhos realizados utilizaram kits comerciais (YILMAZ, *et al.*, 2006; ABASIYANIK *et al.* (2004) MINI *et al.* 2006; ROCHA *et al.* 2000, ROCHA *et al.* 2004), o que restringe a visualização do perfil completo de proteínas expressas pela bactéria. Neste estudo, os antígenos foram produzidos a partir de um *pool* de cepas sonicadas. O uso de lisados de células inteiras de mais de uma cepa favorece a visualização de um maior número de proteínas, bem como um melhor controle qualitativo e quantitativo das proteínas (MINI *et al.*, 2006).

No estudo de metanálise realizado por LEAL *et al* (2008), o *Immunoblot* se mostrou muito eficaz para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* em crianças, mostrando altos valores de sensibilidade, especificidade, e valor moderadamente elevado de *Likelihood Ratio* positivo (LR+) e baixo valor de *Likelihood Ratio* negativo (LR-).

A taxa de soropositividade global pelo *Immunoblot*, nesse estudo, foi de 87,0%. Entre os indivíduos TRU-¹³C positivos, a soropositividade foi de 98,6%. Entre os TRU-¹³C negativos foi de 61,8%. LEPPER *et al.*, em estudo conduzido na Alemanha, com um grupo de 130 indivíduos assintomáticos, encontraram uma soropositividade de 87,2% para os pacientes *H. pylori* positivo para cultura bacteriana, histopatológico e teste da urease, enquanto que para os *H. pylori* negativos a soropositividade foi de 41,0%, resultado semelhante ao encontrado na soroprevalência geral deste estudo.

Resultados diferentes foram encontrados por NILSSON *et al.*, em estudo realizado na Suécia com 100 indivíduos assintomáticos e 120 pacientes dispépticos, onde a soroprevalência foi de 24,0% no grupo dos assintomáticos e de 52,5% no grupo dos dispépticos. No grupo dos dispépticos, neste mesmo estudo, quando se avaliou separadamente, os que eram positivo para o *H. pylori* na cultura, a soroprevalência foi para 97,5%, enquanto que aqueles que apresentaram resultado negativo a soroprevalência foi de 7,5%.

Em estudo conduzido no Brasil, ROCHA *et. al*, no Estado de Minas Gerais, com *Immunoblot* comercial, encontraram uma soroprevalência de 95,4% em 66 crianças infectadas pelo *H. pylori*. Nesse mesmo estudo, também foi encontrado soropositividade em 14,3% das crianças não infectadas.

Ao se comparar a prevalência da infecção pelo TRU-¹³C (68,5%) e *Immunoblot* (87,0%), nos 108 indivíduos deste estudo, observou-se uma diferença de 18,5%. Essa

discrepância deve-se ao fato do teste *Immunoblot* refletir a resposta imune de memória do hospedeiro, revelando prévio contato deste com a bactéria. O que vem a corroborar com a hipótese que a infecção, em países em desenvolvimento, é adquirida na infância, e que pode sofrer uma eliminação espontânea, que pode ser potencializada, além dos mecanismos imunológicos, pelo uso de antibióticos não específicos. Deve-se, também, ser tomada em consideração que o TRU-¹³C pode apresentar resultados incoerentes, quando é utilizado, após uso de antibióticos, inibidores da bomba de prótons, cirurgia gástrica e em crianças (CHEY, 2000). O TRU-¹³C apresenta alto custo, que pode limitar o uso desta técnica em estudos epidemiológicos, em países em desenvolvimento.

Neste panorama, o *Immunoblot* se apresenta como uma excelente ferramenta para estudos epidemiológicos e abre a perspectiva para o entendimento do perfil antigênico das cepas do *H. pylori* e outros microorganismos circulantes nas diferentes populações e áreas geográficas, contribuindo assim, para o desenvolvimento de protocolos clínicos específicos de prevenção.

7. CONCLUSÕES

O immunoblot mostrou-se como um excelente método para estudo epidemiológico com alta sensibilidade e especificidade para detecção da infecção pelo *H. pylori*.

O Immunoblot pode muito bem ser utilizado como método diagnóstico primário, pois apresentou alta sensibilidade.

O perfil da resposta imune humoral contra a infecção pelo *H. pylori* em indivíduos assintomáticos da comunidade urbana estudada, demonstrou uma alta soropositividade para a proteína VacA e uma moderada soroprevalência de CagA, diferentemente do relatado em estudos feitos em outras regiões do país, sugerindo que o perfil de cepas circulantes na região do presente estudo seja diferente de outros lugares do Brasil.

REFERÊNCIAS

ABASIYANIK, M.F.; TUNC, M.; SALIH BA. Enzyme immunoassay and immunoblotting analysis of *Helicobacter pylori* infection in Turkish asymptomatic subjects. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 50. n. 3: p. 173-7, 2004

ARGENT, R. H.; KIDD, M.; OWEN, R. J.; THOMAS, R. J.; LIMB, M. C.; ATHERTON, J. C. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 127: p. 514-523, 2004.

AUCHER, P.; PETIT, M. L.; MANNANT, P. R.; PEZENNEC, L.; BABIN, P.; FAUCHERE, J. L. Use of Immunoblot Assay To Define Serum Antibody Patterns Associated with *Helicobacter pylori* Infection and with *H. pylori*-Related Ulcers, **Journal of Clinical Microbiology**; V. 36, p. 931–936, 1998.

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

BAMFORD, K.B.; FAN, X.; CROWE, S.E.; LEARY, J.F.; GOURLEY, W.K.; LUTHRA, G.K.; BROOKS, E.G.; GRAHAM, D.Y.; REYES, V.E.; ERNST, P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterology**; v.114: p.482-492, 1998.

BAZILLOU, M.; FENDRI, C.; CASTEL, O.; INGRAND, P.; FAUCHERE. J. L. Serum antibody response to the superficial and released components of *Helicobacter pylori*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**; v.1: p.310–347, 1994.

BLASER, M.J.; BERG, D.E. *Helicobacter pylori* diversidade genética eo risco de doenças humanas. **J. Clin. Invest**; v.107: p.767–773, 2001.

BLECKER, U.; LANCIERS, S.; HAUSER, B.; VANDENPLAS, Y. The prevalence of *Helicobacter pylori* positivity in a symptom-free population, aged 1 to 40 years. **J Clin Epidemiol**; v.47: p.1095-8, 1994.

BRADEN, B.; CASPARY, W.F. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? **Ann Med.**, v . 33: p. 91-97, 2001.

BRAGA, L. L. B. C.; MARSHAL, B. J.; GUERRANT, R. L. *H. pylori*: Gastritis, Peptic Ulcer and Gastric Cancer in Developing Countries. **Edge Develop.**, p.127-144, 1995.

BONNEY, G.; ELSTON, E.; CORREA, P.; HAENZEL, W.; ZAVALA, D.E.; ZARAMA, G.; COLLAZOS, T.; CUELLO, C. Genetic etiology of gastric carcinoma I: Chronic gastritis. **Genet. Epidemiol.**, v. 3, p. 213-224, 1986.

BROWN, L.M.; *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemol**; v. 22: p. 283-97, 2000.

CARDINALI, L. C. C. ; ROCHA, G. A. ; ROCHA, A. M. C. ; MOURA, S. B. ; SOARES, T. F. ; ESTEVES, A. M. B. ; NOGUEIRA, A. M. M. F. ; CABRAL, M. M. D. A. ; CARVALHO, A. S. T. ; BITTENCOURT, P. F. S. ; FERREIRA, A. R. ; QUEIROZ, D. M. M. . Evaluation of [¹³C] urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a Developing Country. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p. 3334-3335, 2003.

CARVALHO, A. S. T. Peptic ulcer. **Jornal de Pediatria**, supl. 2/ S127, 2000

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANGZY, et al. CagA pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.93: p.14.648-53, 1996.

CHEN-WUN, W.; CHIN-WEN, C.; WEN-CHANG, L. Gastric cancer: prognostic and diagnostic advance. **Exp Rev Mol Med**, v. 21, p.5-110, 2002.

CLAYTON, C.L.; PALLEEN, M.J.; KLEANTHOUS, H., et al. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. **Nucl Acids Res**; v.18: p.362, 1990.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. **Cancer.**, v.52, p. 6735 – 6740, 1992.

COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; DEL GIUDICE, G.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**; v.284: p.1328-33, 1999.

COVER, T. L.; DOOLEY, C. P.; BLASER, M. J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 3: p. 603-610, Mar., 1990.

CUTLER, A.F.; PRASAD, V.M.; SANTOGADE, P. Four-year trends in *Helicobacter pylori* IgG serology following successful eradication. **Am J Med.** v.105: p.18-20, 1998.

CZINN, S.; Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in pediatric patients. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**; v.28: p.132-134, 1999.

DRUMM, B.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J.; SHERMAN, P.M. Intrafamilial Clustering of *Helicobacter pylori* infection. **The new England Journal of Medicine**; v.322: n°6, 1990.

DUNN, B.E.; CAMPBELL, G.P.; PEREZ-PEREZ, G.I., et al. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem**; v.265: p.9464-9, 1990.

EATON, K.A.; KRAKOWKA, S. Effect of gastric pH on urease dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. **Infect Immunol**, v.62: p.3604±7, 1994.

ESLICK, G. Sexual transmission of *Helicobacter pylori* via oral-anal intercourse. **Int. J. Std. Aids**, v.13: p.7-11, 2001.

EVANS, D.J. JR; EVANS, D.J.; GRAHAM, D.Y.; KLEIN, P.D. A sensitive and specific serological test for detection of *Campylobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.96: p.1004-8, 1989.

EVANS, D.J. JR; EVANS, D.G; KIRKPATRICK, S.S, et al. Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits. **Microb Pathog**, v.10: p. 15-26, 1991.

FAULDE, M.; SCHRÖDER, J. P.; SOBE, D. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections by detection of immunoglobulin G antibodies using an immunoblot and enzyme immunoassay technique. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**, V.11: p.589–594, 1992.

FAULDE, M.; CREMER, J.; ZÖLLER, L.. Humoral immune response against *Helicobacter pylori* as determined by immunoblot. **Electrophoresis**, v.14: p.945–951, 1993.

FIALHO, A.M.N.; BRAGA, A.B.C.; NETO, M.B.B.; CARNEIRO, J.G.; ROCHA, A.M.C.; RODRIGUES, M.N.; QUEIROZ, D.M.M.; BRAGA, L.L.B.C. Younger Siblings Play a Major Role in *Helicobacter pylori* Transmission Among Children From a Low-Income Community in the Northeast of Brazil; **Helicobacter**, 2010.

GARCÍA, A. J. P.; GISBERT, J. P. Is the string test a useful alternative to gastroscopy with biopsy for *H. pylori* identification?. **Rev Esp Enferm Dig**, Madrid, v.98, nº 7: p. 542-549, 2006.

GOBERT, A.P.; MERSEY, B.D.; CHENG, Y.; BLUMBERG, D.R.; NEWTON, J.C.; WILSON, K.T. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. **J Immunol**, v. 168: p. 6002-6, 2002.

GONÇALVES, M. H. R. B. **Genótipos das cepas de *H. pylori* vacA e alelos, cagA e sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de Fortaleza, utilizando método não endoscópico**: Fortaleza: UFC, 2010. f.66. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Programa de Pós-graduação em Cirurgia. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GOODMAN, K.J.; CORREA P.; TENGANA AUX,H.J; RAMÍREZ H.; DELANY, J.P.;

GUERRERO PEPINOSA, O.G.; *et al.* *Helicobacter pylori* infection in Colombian Andes: a population-based transmission pathways. **Am J Epidemiol.** 144:290-9, 1996.

HANSSON, L. E. *et al.* *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. **Gastroenterology**; v.105: p.1098-1103, 1993.

HARRIS, P.R.; SMYTHIES, L.E.; SMITH, P.D.; DUBOIS, A. Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. **J Infect Dis**; v.181: p.783-6, 2000.

HATAKEYAMA, M.; HIGASHI, H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. **Câncer Sci.** V. 96, n. 12: p. 835-843, dec. 2005.

HERBRINK, P.; VAN DOORN, L.J. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; v.19: p.164–173, 2000.

HILDEBRAND, P.; BEGLINGER, C. Nondispersive Infrared Spectrometry: A New Method for the Detection of *Helicobacter pylori* Infection with the C 13 – Urea- Breath Test. **Clinical Infectious Diseases**; v.25: p.1003-1005, 1997.

HOLTMANN, G.; TALLEY, N.J.; MITCHELL, H.; HAZELL, S. Antibody response to specific *H. pylori* antigens in functional dyspepsia, duodenal ulcer disease, and health. **Am J Gastroenterol**; v.93: p.1222-1227, 1998.

ISRAEL, D. A.; PEEK, R. M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* - induced gastric inflammation; **Aliment Pharmacol Ther**; v.15: p.1271-1290, 2001.

ITO, Y.; AZUMA, T.; ITO, S.; MIYAJI, H.; HIRAI, M.; YAMAZAKI, Y.; SATO, F.; KATO, T.; KOHLI, Y.; KURIYAMA, M. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. **J Clin Microbiol** v.35: p.1710–1714, 1997.

JONES, D.M.; ELDRIDGE, J.; FOX, A.J.; SETHI, P.; WHORWELL, P.J. Antibody to the gastric *Campylobacter*-like organism (“*Campylobacter pyloridis*”) – clinical correlation and distribution in the normal population. **J Med Microbiol**; v.22: p.57-62, 1986.

LABIGNE, A.; CUSSAC, V.; COURCOUX, P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. **J Bacteriol.** v.173: p.1920±31, 1991.

LAINE, L.; ESTRADA, R.; LEWIN, D.N.; COHEN, H. The influence of warning on rapid urease test results: a prospective evaluation. **Gastrointest Endosc**; v.44: p.429, 1996.

LEAL, Y. A.; FLORES, L. L.; GARCÍA-CORTÉS, L. B.; CEDILLO-RIVERA, R.; TORRES J. Antibody-Based Detection Tests for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children: A Meta-Analysis. **Plos one**; v. 3, 2008.

LEE, A.; FOX, J.G.; OTTO, G.; DICK, E.H.; KRAKOWKA, S. Transmission of *Helicobacter* spp. A challenge to the dogma of faecal-oral spread. **Epidemiol Infect.**; v.107: p.99-109, 1991.

LEPPER, P.M.; MORICKE, A.; VOGT, K.; BODE, G.; TRAUTMANN, M. Comparison of different criteria for interpretation of immunoglobulin G immunoblotting results for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Diagn Lab Immunol**; v. 11: p. 569–576, 2004.

LEVINSON, W.E.; JAWETZ, E. Pathogenesis. In: Levinson WE, Jawetz E, editors. Medical microbiology and immunology. 3. ed. East Norwalk: Appleton & Lange; p. 23 33, 1994.

LINDKVIST, P.; ASRAT, D.; NILSSON, I.; TSEGA, E.; OLSSON, G.L.; WRETLIND, B; GIESECKE, J. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: comparison of high and lowprevalence country. **Scand. J. Infect. Dis**; v.28, p.181–184, 1996.

KARVAR, S.; KARCH, H.; FROSCH, M.; BURGHARDT, W.; GROSS, U. Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. **J Clin Microbiol**; v.35: p.3058-3061, 1997.

KLAAMAS, K.; HELD, M.; WADSTRÖM, T.; LIPPING, A.; KURTENKOV, O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and Immunoblotting. **Int J Cancer**; v.67: p.1-5, 1996.

KLEIN, P. D.; GILMAN, R.H.; LEON-BARUA, R.; DIAZ, F.; SMITH, E. A.; GRAHAM, D. Y.. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age, **Am. J. Gastroenterol.**; v.12: p.2196–2200, 1994.

KONONOV, A.V. Inflammation as a basis for *Helicobacter pylori*-associated diseases. **Arkh Patol**; v.68: p.3-10, 2006.

MALATY, H.M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v.21: p.205-14, 2007.

MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; O'MORAIN, C. et al. and the European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht 2–2000 consensus report. **Aliment Pharmacol Ther**; v.16: p.167-80, 2002.

MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori*. **The American Journal of Gastroenterology**; v.89: p. 116-128, 1994.

MCCALLION, W.A; ARDILL, J.E.S; BAMFORD, K.B; POTTS, S.R; BOSTON, V.E. Age dependent hypergastrinaemia in children with *Helicobacter pylori* gastritis – evidence of early acquisition of infection. **Gut**. 37:35-38, 1995.

MEYER, B.; WERTH, B.; BEGLINGER, C.; DILL, S.; DREWE J.; VISCHER, W. A.; R. H.; EGGERS, BAUER, F. E.; STALDER, G. A. *Helicobacter pylori* infection in healthy people: a dynamic process? **Gut**; v.32: p.347–350, 1991.

MINI, R.; ANNIBALE, B.; LAHNER, E.; BERNARDINI, G.; FIGURA, N.; SANTUCCI, A. Western Blotting of Total Lysate of *Helicobacter pylori* in Cases of Atrophic Body Gastritis, **Clinical Chemistry**; v. 52: n°. 2: p. 220-226, 2006.

MITCHELL, A.; SILVA T.M.; BARRETT L.J.; LIMA A.A.; GUERRANT R.L. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. **Clin Microbiol**; V. 4: 1326-8, 2003.

MOBLEY, H.L.; ISLAND, M.D.; HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol Rev.** p.59: v.451±80, 1995.

MOBLEY, H. L. T. *Helicobacter pylori* urease. In: ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. (Ed.). ***Helicobacter pylori: molecular and cellular biology***. Wymondham: Horizon Scientific Press, p. 155-170. 2001.

MOTTA, C. R. A.; CUNHA, M. P. S. S.; QUEIROZ, D. M. M.; CRUZ, F. W. S.; GUERRA, E. J. C.; MOTA, R. M. S.; BRAGA, L. L. B. C. Gastric precancerous lesions and *Helicobacter pylori* infection in relatives of gastric cancer patients from northeastern Brazil. **Digestion.**, v. 78: p. 3-8, 2008.

NEGRINI, R.; SAVIO, A.; APPELMELK B.J. Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**; v.2:Suppl 1: p.S13-S16, 1997.

NG, F.H.; WONG, S.Y.; NG, W.F. Storage temperature of the unbuffered rapid urease test. **Am J Gastroenterol.** V.92; p.2230, 1997.

NILSSON, I.; LJUNGH, A.; ALELJUNG, P.; WASTRÖM, T. Immunoblot assay serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. **J. Clin. Microbiol**, p.35: v.427-432, 1997.

OLIVEIRA, A.M.R.; ROCHA, G.A.; QUEIROZ D.M.M.; MENDES, E.N.; CARVALHO, A.S.T.; Ferrari, T.C.A.; Nogueira, A.M.M.F. 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 Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v.28, p. 157-61, 1999.

ORNELLAS, L.C.; CURY, M. DE S.; LIMA, V.M. DE; FERRARI. JR A.P. Avaliação do teste rápido da urease conservado em geladeira. **Arq Gastroenterol.** v.37: p.1555-157, 2000.

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

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G. D.; VANDERSTEEN, D. P. *et al.* *Helicobacter pylori* and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v.325: p. 1127-1131, 1991.

PEREZ- TRALLERO, E.; MONTES, M.; ALCORTA, M.; ZUBILLAGA, P.; TELLERIA, E. Non-endoscopic method to obtain *Helicobacter pylori* for culture. **Lancet**. 345:622-3, 1995.

PERRI, F.; PASTORE, M.; CLEMENTE, R.; FESTA, V.; QUITADAMO, M.; NIRO, G.; CONOSCITORE, P.; RUTGEERTS, P.; ANDRIULLI, A. *Helicobacter pylori* infection may undergo spontaneous eradication in children: a 2-year follow-up study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** v.27: p.181–183. 1998.

PETERSON, W. L.; FENDRICK, A. M.; CAVE, D. R.; PENRA, D. A.; CARABEDIAN, R. S. M.; LAINE, L. Doença relacionada ao *Helicobacter pylori*: Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento. **JAMA Brasil**. 5, 1: 60-68, 2001.

PORTORREAL, A.; KAWAKAMI, E. Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes, **Arq Gastroenterol**, V. 39: p. 3, 2002.

RAD, R.; GERHARD, M.; LANG, R.; SCHONIGER, M.; ROSCH, T.; SCHEPP, W.; BECKER, I.; WAGNER, H.; PRINZ, C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. **J Immunol**, v.168: p. 3033-3041, 2002.

RAMELAH, M.; AMINUDDIN, A.; ALFIZAH, H.; ISA, M.R.; JASMI, A.Y. *et al.* cagA gene variants in Malaysian *Helicobacter pylori* strains isolated from patients of different ethnic groups. **FEMS. Immunol Med Microbiol**, v. 44: p. 239–242, 2005.

REKTORSCHKE, M.; WEEKS, D.; SACHS, G.; et al. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.115: p.628±41, 1998.

RIBEIRO, ML.; VITIELLO, L.; MIRANDA, MC.; BENVENGO, YH.; GODOY, AP.; MENDONCA, S.; PEDRAZZOLI JR.; J. Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 2003.

ROCHA, A.F.G. *Helicobacter pylori* – Diagnóstico pelo teste Respiratório. A C. **Gastroenterol**, p.12: v. 4-13, 1996.

ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.; QUEIROZ, D.M.; CARVALHO, A.S.; NOGUEIRA, A.M. Immunoblot analysis of humoral immune response to *Helicobacter pylori* in children with and without duodenal ulcer. **J Clin Microbiol**, v.38: p. 1777–1781, 2000.

ROCHA, G.A.; ROCHA, A.M.C.; SILVA, L.D.; SANTOS, A.; BOCEWICZ, C.; QUEIROZ, R.M., et. al. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. **Trop Med Int Health.**; v.8: p.987, 2003.

ROCHA, A.M.C.; ROCHA, G.A.; LEITE, J.L.; LISBOA, R.L.L.; SILVA, P.V.O.; QUEIROZ, D.M.M. Immunoblotting for the Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Brazilian Patients with and without Gastric Carcinoma. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, V. 99(2): p. 189-193, 2004.

RODRIGUEZ, M.N.; QUEIROZ, D.M.; BEZERRA, F.J.G. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. **Eur. J. Gastroenterol.Hepatol.** v.16: p. 201-205, 2004.

SAMUELS, A.L.H.M.; WINDSOR, H.M.; HO, G.Y.; GOODWIN, L.D.; MARSHALL, B.J. Culture of *Helicobacter pylori* from a gastric string may be an alternative to endoscopic biopsy. **J Clin Microbiol.** v.38: p.2438-2439, 2000.

SARKER, S.A.; MAHALANABIS, D.; HILDEBRAND, P; RAHAMAN, M.M.; BARDHAN, P.K.; FUCHS, G. et al. *Helicobacter pylori*: prevalence, transmission, and serum pepsinogen II: concentrations in children of a poor peri-urban community in Bangladesh. **Clin. Infect. Dis.**; v.25: p.990–5, 1997.

SARKER, S.A.; NAHAR, S.; RAHMAN, M.; BARDHAN, P.K.; NAIR, G.B.; BEGLINGER, C.; GYR, N. High prevalence of *cagA* and *vacA* seropositivity in asymptomatic Bangladeshi children with *Helicobacter pylori* infection. **Acta Paediatr.** V.93: p.1432-1436, 2004.

SCOTT, D.R.; MARCUS, E.A.; WEEKS, D.L. et al. Expression of the *Helicobacter pylori* *ureI* gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. **Infect Immunol**, v.68: p.470±7, 2000.

SILVA, J. M. K.; VILLARES, C. A.; MONTEIRO, M. S.; COLAÚTO, C.; SANTOS, A. F.; MATTAR R. Validação de teste rápido de antígeno fecal para diagnóstico de infecção por *Helicobacter pylori*, **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** v.52: n.3, São Paulo, 2010.

SILVA L.B.L; GONÇALVES T.M; ALENCAR J.S; NUNES O.S; ASCONCELLOS A.C.A; SANTANA. Atenção farmacêutica a pacientes com gastrite *Helicobacter pylori* positivo. **Infarma.** V. 16(7/8): p.70-73, 2004.

SIPPONEN, P.; HYVARINEN, H.; SEPPALA, K.; BLASER, M.J. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. **Aliment Pharmacol Ther**, v.12(suppl 1): p.61-71, 1998.

SIPPONEN, P.; KOSUNEN, T. U.; VALLE, J.; RIIHELÄ, M.; SEPPÄLÄ, K. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 319-323, 1992.

SHIMOYAMA, T.; CRABTREE, J.E. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. **GUT**; v.43: p.S2-5S, 1998.

SKOULOUBRIS, S.; THIBERGE, J.M.; LABIGNE, A. et al. The *Helicobacter pylori* *UreI* protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. **Infect Immunol.** v. 66: p.4517±21, 1998.

SMYTHIES, L.E.; WAITES, K.B.; LINDSEY, J.R.; HARRIS, P.R.; GHIARA, P.; SMITH, P.D. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. **J Immunol**; v.165: p.1022-9, 2000.

STEIN, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* *cagA* antigen after *cag*-driven host cell translocation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97: p.8-1263, 2000.

SUERBAUM, M. D. S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* Infection. Review Article. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n.15: p.1175-1186, Oct. 2002.

TAYLOR, D.N.; BLASER, M.J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol. Rev.** 13, p. 42–59, 1991.

TONELLI, E.; FREIRE, L.M.S.; Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência. São Paulo: **Medsa**; p.656-657, 2000.

TORRES, J.; LEAL, H. Y.; PEREZ, P.G.; GOMEZ, A.; CAMORINGA, P.M.; CEDILLO, R.R. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. **J Infect Dis**; 178:1089-94, 1998.

TORRES, J.; CAMORLINGA, M.; PÉREZ-PERÉZ, G.; GONZALEZ, G.; MUÑOZ, O. Validation of the string test for the recovery of **Helicobacter pylori** from gastric secretions and correlation of its results with urea breath test results, serology, and gastric pH levels. **J Clin Microbiol.**, 2001.

TYTGAT, G. N. J.; LEE, A.; GRAHAM, D. J.; DIXON, M. F.; ROKKAS, T.; The role of infection agents in peptic ulcer disease. **Gastroenterol. Int.**, v. 6: p. 76-89, 1993.

VALENTINE J, ARTHUR R, MOBLEY H, DICK J. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**; v. 29: p. 689-695, 1991.

VAN DOORN, L.J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PENA, S.; MIDOLO, P.; NG, E.K.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; QUINT, W.G. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. **J Clin Microbiol.**; v.36: p.2597– 2603, 1998.

VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VOLAND, P.; WEEKS, D.L.; MARCUS, E.A.; PRINZ, C.; SACHS, G.; SCOTT, D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 284: p. 96–106, 2003.

WANG, J.; BROOKS, E.G.; BAMFORD, K.B.; DENNING, T.L.; PAPPO, J.; ERNST, P.B. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. **J Immunol;** v.167: p.926-34, 2001.

WATANABE, Y. et al. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan. **Dig. Dis. Sci.**, v.42: p.1383–1387, 1997.

WATANABE, Y.; OZAWA, K.; HIGASHI, A . ET AL.: *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis: a case-control study in a rural town of japan. **J. Clin. Gastroenteroly**, V. 25: P. 391-394, 1997.

WEEKS, D.L.; ESKANDARI, S.; SCOTT, D.R. et al. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. **Science.** v. 287: p.482±5, 2000.

WIDMER, M.; KORWIN, J. D.; AUCHER, P.; THIBERGUE, J. M.; LABIGNE, A.; FAUCHE`RE, J. L. Performance of native and recombinant antigens for *Helicobacter pylori* serology, abstr. 4C:47. **In Proceedings of the IX International Workshop on Gastroduodenal Pathology and Helicobacter pylori.** (Gut 39 (Suppl. 2.), 1996.

WISNIEWSKI, R.M.; PEURA, D.A.; *Helicobacter pylori*: beyond peptic ulcer isease. **Gastroenterologist.** V.5: p.295-305,1997.

XIANG, Z; CENSINI, S; BAYELI, P.F TELFORD, J.L; FIGURA, N; RAPPUOLI, R; COVACCI, A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. **Infect. Immun;** v. 63.; n.: 1: p. 94-98, 1995.

YILMAZ, Ö.; SEN, N.; KÜPELIOGLU, A. A.; SIMSEK, İ. Detection of H pylori infection by ELISA and Western blot techniques and evaluation of anti CagA seropositivity in adult Turkish dyspeptic patients; **World J. Gastroenterology**; v.12: p. 5375-5378, 2006.

APÊNDICES

Apêndice 1

Questionário – Avaliação do perfil da resposta imune humoral à infecção pelo *H. Pylori* em uma comunidade urbana de Fortaleza

IDENTIFICAÇÃO

1. Código _____

2. Nome _____

3. Data de Nascimento ___ / ___ / ___

4. Sexo: ___ (1=masculino; 2= feminino)

5. Endereço: _____

HISTÓRIA PSICO-SOCIAL

6. Tipo de Moradia ___ (1=alvenaria; 2=taipa; 3=mista)

7. N° de pessoas no domicílio ___

8. N° de compartimentos ___

9. N° de crianças na casa ___

10. N° de adultos na casa ___

11. Origem da água consumida ___ (1=CAGECE; 2= bomba; 3=cacimba; 4=chafariz; 5=poço; 6=lagoa; 7=açude; 8=outro)

INFORMAÇÃO CLÍNICA

(1=sim; 2=não)

12. Dor Abdominal ___

13. Vômitos ___

14. Diarréia ___

15. Usa algum medicamento ou usou durante os últimos 6 meses (1=sim; 2=não)

Antibiótico ___ Antiinflamatório ___ Antiácido ___ Outros _____

Apêndice 2

Termo de Consentimento livre esclarecido

Título: Estudo Clínico, Epidemiológico do H. Pylori na região Nordeste do Brasil.

Introdução: Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Sua participação é importante, portanto é fundamental que você compreenda as explicações sobre os procedimentos propostos. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos, precauções do estudo e o seu direito de desistir do estudo a qualquer momento.

Resumo: O *H.pylori* é uma bactéria que causa gastrite e úlcera péptica e atualmente existem fortes evidências de que a infecção é adquirida na infância. Como a infecção pelo *H. pylori* acomete cerca de 50% das crianças, é muito importante esclarecer os aspectos relacionados com a transmissão da infecção e determinação dos fatores envolvidos na aquisição da bactéria.

Objetivo: Validar o *Immunoblot* com produção de antígenos a partir de cepas locais e verificar a soroprevalência da infecção contra *H. pylori* na comunidade Parque Universitário. .

Procedimento

Riscos : Esse método é confiável, e não apresenta riscos, apenas será necessário a coleta de sangue endovenoso.

Benefícios: A sua participação será muito importante para o conhecimento da infecção pelo *Helicobacter pylori* e poderá contribuir no futuro para melhoria do controle da infecção em nosso país.

Confidencialidade: Os seus resultados serão mantidos em sigilo. Qualquer publicação dos dados não identificará o participante.

Desligamento: poderá se afastar a qualquer momento do estudo sem prejuízo para sua saúde.

Contato com o pesquisador: Dra Lucia Libanêz B.C. Braga pode ser feito pelos telefones 085 33668052. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC no número (08533.66.8338).

Consentimento: Li e entendi as informações acima. E estou ciente de que não haverá nenhum pagamento pela participação no estudo. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para que meu filho participe do estudo, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Nome do participante

Assinatura

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador

Assinatura

Nome de quem obteve o TCCE

Assinatura