



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU

TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO

**RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA DO *H.pylori* À CLARITROMICINA E
ASSOCIAÇÃO COM GENÓTIPOS DE VIRULÊNCIA DO *H.pylori* NO NORDESTE DO
BRASIL**

FORTALEZA

2020

TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO

RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA DO *H.pylori* À CLARITROMICINA E
ASSOCIAÇÃO COM GENÓTIPOS DE VIRULÊNCIA DO *H.pylori* NO NORDESTE DO
BRASIL

Tese 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 Doutor em
Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Lúcia Libanez Bessa Campelo

FORTALEZA

2020

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)

G618r Gomes da Silva Benigno, Tiago.
RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA DO H.pylori À CLARITROMICINA E ASSOCIAÇÃO
COM
GENÓTIPOS DE VIRULÊNCIA DO H.pylori NO NORDESTE DO BRASIL / Tiago Gomes
da Silva Benigno. – 2020.
82 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Profª. Drª. Lúcia Libanez Bessa Campelo .

1. H.pylori, fatores de virulência, claritromicina, mutações pontuais. I. Título.

CDD 617

TIAGO GOMES DA SILVA BENIGNO

RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA DO *H.pylori* À CLARITROMICINA E
ASSOCIAÇÃO COM GENÓTIPOS DE VIRULÊNCIA DO *H.pylori* NO NORDESTE DO
BRASIL

Tese 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 Doutor em
Ciências Médico-cirúrgicas.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Libanez Bessa Campelo
Universidade Federal do Ceará (UFC) (Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Alves de Oliveira Serra
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^ª. Dr. Orleânicio Gomes Ripardo de Azevedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Regina Fátima Gonçalves Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr. Fred Olavo Aragão Andrade Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Primeiramente agradeço a DEUS por me dar a força necessária para superar os obstáculos da vida. Aos meus pais e meu filho por ter me apoiado nos momentos mais difíceis dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga, Professora Titular do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade concedida, por sua orientação constante, pelo incentivo e competência com que exerce a vida acadêmica.

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 dedicação à Pós-Graduação.

À Srta. Roberta Taiane Germano de Oliveira, bióloga, doutoranda em ciências médicas, pela parceria na rotina laboratorial para a realização deste estudo.

À Srta. Michelle Soeiro de Oliveira, enfermeira, doutoranda em cirurgia, pelo companheirismo e dedicação na conclusão deste estudo.

Ao Sr. Ederson Luiz de Oliveira, farmacêutico, doutorando em cirurgia, pela parceria na rotina laboratorial para a realização deste estudo.

À Srta. Francisca Antônia do Vale Gomes, enfermeira, mestranda em cirurgia, pelo companheirismo e dedicação na conclusão deste estudo.

Às Sras. Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenelle, secretárias do Programa de Pós-graduação em Cirurgia da UFC, pela presteza e auxílio no desempenho das atividades letivas deste programa.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC, pelas disciplinas ministradas e conhecimentos partilhados para a execução do método científico.

A todos que participaram, contribuíram e viabilizaram a realização deste trabalho.

“Sempre parece impossível até que seja”
Nelson Mandela.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C13: Carbono 13

C14: Carbono 14

ACG: American College of Gastroenterology

Cag A: Citotoxina A do *Helicobacter pylori*

cagPAI : Ilha de patogenicidade Cag

cagA : Gene associado à citotoxina A do *Helicobacter pylori*

Cag E: Citotoxina E do *Helicobacter pylori*

cagE: Gene associado à citotoxina E do *Helicobacter pylori*

CC: Controle

Epiya: Sequência codificadora dos aminoácidos dos sítios de fosforilação da proteína Cag A

GC: Câncer gástrico

Ice A: proteína produzida pelo gene *iceA* *Helicobacter pylori*

iceA: gene induzido pelo contato com células epiteliais gástricas

iceA1: Alelo 1 do gene *iceA*

iceA2: Alelo 2 do gene *iceA*

EDA: Endoscopia Digestiva Alta

FRLP: Técnica do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de limitação

G: Gastrite

p: índice de significância

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial de hidrogênio

ptlC: similar on the toxin-secretion gene *Bordetella pertussis*

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

T4SS: Sistema de secreção tipo IV

Vac A: Citotoxina vacuolizante

vacA: Gene produtor da citotoxina vacuolizante

TRU: Teste Rápido da Urease

U: Úlcera

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ponto de mutação mais comumente encontrado: A2143G.....	24.
Figura 2- Mecanismo de resistência do <i>H.pylori</i> ponto de mutação do gene 23s rRNA.....	24.
Figura 3- Mecanismo de alterações: bioquímicas, morfológicas e fisiopatológicas a partir da infecção pelo <i>H. Pylori</i>	27.
Figura 4- Mosaico do gene <i>vacA</i>	30.
Figura 5- Cápsula para coleta do suco gástrico (enteroteste)	37.
Figura 6- Gráfico da expressão qualitativa da presença de mutação pontual pelo RT-PCR.....	43.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos brasileiros avaliando resistência à claritromicina por métodos genotípicos...	23.
Tabela 2- Primers utilizados para cada marcador.....	40.
Tabela 3- Primers e sondas utilizadas para cada mutação pontual no gene 23S rRNA do <i>H.pylori</i>	42.
Tabela 4-Distribuição dos pacientes por sexo, idade (média e desvio-padrão), procedência e afecção gástrica (N= 198), Fortaleza, CE, 2020.....	45.
Tabela 5-Distribuição dos pacientes por sexo, idade (média e desvio-padrão) dos indivíduos assintomáticos residentes na comunidade (N= 24), Fortaleza, CE, 2020.....	46.
Tabela 6-Suscetibilidade do <i>H.pylori</i> à claritromicina utilizando RT-PCR segundo sexo, procedência e afecções gástricas nos adultos, (N= 198), Fortaleza, CE, 2020.....	47.
Tabela7-Perfil das mutações no gene 23s rRNA do <i>H.pylori</i> pelo método RT-PCR por gênero, status resistência e afecções gástricas nos adultos (N=198), Fortaleza, CE, 2020.....	49.
Tabela 8-Perfil das mutações no gene 23S rRNA do <i>H.pylori</i> pelo método RT-PCR por gênero, status resistência e idade nos indivíduos assintomáticos residentes na comunidade (N= 24), Fortaleza, CE, 2020.....	50.
Tabela 9-Perfil das mutações no gene 23S rRNA pelo método Taq Man RT-PCR e genótipos <i>cagA</i> , <i>cagE</i> e <i>iceA1</i> , <i>iceA2</i> do <i>H.pylori</i> (222), Fortaleza, CE ,2020.....	51.
Tabela 10-Perfil das mutações no gene 23s rRNA pelo método RT-PCR do <i>vacA</i> e mosaicos do <i>H.pylori</i> (222), Fortaleza, Ceará ,2020 Fortaleza,CE, 2020.....	53.
Tabela11: Custo financeiro para investigação da resistência genotípica primária por amostra.....	82.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18.
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	18.
1.2. Tratamento do <i>H.pylori</i>	20.
1.3. Resistência do <i>H.pylori</i> à Claritromicina.....	21.
1.4. Fatores de virulência.....	26.
1.4.1. Sistema de secreção tipo IV(T4SS) e A ilha de patogenicidade <i>cag</i> (<i>cag pai</i>).....	26.
1.4.2. Gene <i>cagA</i>	26.
1.4.3. Gene <i>cagE</i>	28.
1.4.4. Gene <i>vacA</i>	29.
1.4.5. Gene <i>iceA</i>	31.
2. Justificativa.....	32.
3. Objetivos.....	32.
3.1. Objetivos específicos.....	32.
4. Materiais e Métodos.....	33.
4.1. Desenho do estudo.....	30.
4.2. Casuística.....	30.
4.3. Critérios de inclusão e exclusão.....	34.
4.4. Métodos.....	36.
4.4.1. Teste rápido da urease.....	36.
4.4.2. Enteroteste.....	36.
4.4.3. Análise histopatológica.....	37.
4.4.4. Cultura e antibiograma do <i>H.pylori</i>	37.
4.4.5. Extração de DNA genômico.....	38.
4.4.6. Detecção de fator de virulência.....	40.
4.4.7. Otimizando a quantidade de DNA por amostra.....	40.
4.4.8. Caracterização de controles positivos e negativos.....	41.
4.4.9. PCR em Tempo real para polimorfismo do gene 23 s rRNA (A2142G e A2143G).....	41.
5. Análise estatística.....	43.

6. Considerações éticas.....	44.
7. Resultados.....	44.
7.1. Características gerais da amostra analisada.....	44.
7.2. Prevalência de resistência genotípica à claritromicina.....	46.
7.3. Mutações pontuais do gene 23S rRNA do <i>H.pylori</i>.....	48.
7.4. Correlação dos genótipos de virulência do <i>H.pylori</i> com as mutações pontuais do gene 23s rRNA que conferem resistência à claritromicina.....	50.
8. Discussão.....	54.
9. Conclusões.....	61.
10. Referências.....	62.
12. Apêndice A.....	73.
13. Apêndice B.....	77.
14. Anexo A.....	82.

RESUMO

A resistência do *H.pylori* à claritromicina é considerada um dos principais fatores responsáveis pela falha na erradicação do *H.pylori*. A prevalência de resistência à claritromicina pode variar de acordo com a região analisada. Esse trabalho busca avaliar a prevalência da resistência genotípica primária do *H. pylori* à claritromicina através do método molecular RT-PCR e verificar a sua associação com genótipos de virulência das cepas do *H.pylori* no Nordeste do Brasil. Esse estudo foi realizado no Hospital Universitário Walter Cantídeo da Universidade Federal do Ceará e na comunidade urbana, Parque Universitário. Foram avaliados 260 pacientes dispépticos que realizaram endoscopia e foram positivos para *H.pylori* através de histologia, urease e PCR (biópsia gástrica). Nesse estudo também participaram 40 indivíduos residentes na comunidade assintomáticos com idade ≤ 18 anos e positivos para *H.pylori* pelo teste respiratório e PCR (suco gástrico obtido pelo enteroteste). Todos os indivíduos não tratados. Sendo incluídos aqueles em que o gene 23s rRNA estivesse presente no PCR. A resistência à claritromicina foi identificada através dos pontos de mutação A2143G e A2142G no gene 23s rRNA pelo RT-PCR. Já os genes *cagA*, *cagE*, *vacA* (alelos) e *ice A*(alelos) do *H.pylori* foram identificados por PCR utilizando primers específicos. Dos 300 indivíduos positivos para *H.pylori*, 222 (74%) foram positivas para 23s rRNA. Sendo 198 adultos (56,06% feminino e 43,94% masculino, idade $47,95 \pm 14,53$ anos) e 24 assintomáticos da comunidade (50% masculino e 50% feminino, idade de $12,92 \pm 03$ anos). Verificamos que a resistência primária à claritromicina foi de 14,4% (32/222). Sendo 14,2% nos adultos e 12% nas crianças. Não houve associação das mutações pontuais com sexo, idade ou afecção gástrica. A mutação pontual mais comum foi A2143G/A2147G (62,50%), seguida de A2142G/A2146G (37,5%) e 12,5% de mutação dupla. Foram heterorresistentes (cepas com alelo mutante e selvagem) 43,75%(14/32). A prevalência das cepas *cagA* foi de 75,5% (167/222). As mutações pontuais estavam presentes em 11% (19/167) das cepas *cagA* positivas e 23% (13/55) das *cagA* negativas. A resistência estava significante associação com status *cagA* negativas (p 0,025 OR: 0,4; I.C 95% 0,189-0,909). A prevalência do gene *cagE* foi de 61% (136/222). As mutações pontuais estavam presentes em 10% (14/136) das cepas *cagE* positivas e 21% (18/85) das *cagE* negativas. A resistência estava significante associação com status *cagE* negativas (p 0,025 OR: 0,4; I.C 95% 0,200-0,913). Não houve associação entre genes *iceA1*, *iceA2*, *vacA* e alelos com as mutações pontuais do gene 23s rRNA. Concluimos que a resistência genotípica primária do *H. pylori* à claritromicina foi de 14,41% e

que está dentro da faixa para o uso empírico da terapia tripla contendo claritromicina. O ponto de mutação mais prevalente foi A2143G. As cepas status *cagA* e *cagE* positivas apresentaram menor prevalência de resistência à claritromicina. Logo, a resistência do *H.pylori* à claritromicina foi mais frequentemente encontrada nos indivíduos colonizados com cepas menos virulentas.

Palavras-chave: *H.pylori*, fatores de virulência, claritromicina, mutações pontuais.

ABSTRACT

H.pylori resistance to clarithromycin is considered to be one of the main factors responsible for failure to eradicate *H.pylori*. The prevalence of resistance to clarithromycin may vary according to the region analyzed. This work seeks to assess the prevalence of primary genotypic resistance of *H. pylori* to clarithromycin using the RT-PCR molecular method and to verify its association with virulence genotypes of *H.pylori* strains in Northeastern Brazil. This study was carried out at the Walter Cantídeo University Hospital of the Federal University of Ceará and in the urban community, Parque Universitário. 260 dyspeptic patients who underwent endoscopy and were positive for *H.pylori* through histology, urease and PCR (gastric biopsy) were evaluated. This study also involved 40 asymptomatic community residents aged ≤ 18 years and positive for *H.pylori* by breathing test and CRP (gastric juice obtained by enterotest). All untreated individuals. Including those in which the 23s rRNA gene was present in the PCR. Resistance to clarithromycin was identified through mutation points A2143G and A2142G in the 23s rRNA gene by RT-PCR. The genes *cagA*, *cagE*, *vacA* (alleles) and *ice A* (alleles) of *H.pylori* were identified by PCR using specific primers. Of the 300 individuals positive for *H.pylori*, 222 (74%) were positive for 23s rRNA. 198 adults (56.06% female and 43.94% male, age 47.95 ± 14.53 years) and 24 asymptomatic in the community (50% male and 50% female, age 12.92 ± 03 years). We found that the primary resistance to clarithromycin was 14.4% (32/222). 14.2% in adults and 12% in children. There was no association of point mutations with sex, age or gastric disease. The most common point mutation was A2143G / A2147G (62.50%), followed by A2142G / A2146G (37.5%) and 12.5% double mutation. They were heteroresistant (strains with mutant and wild allele) 43.75% (14/32). The prevalence of *cagA* strains was 75.5% (167/222). Point mutations were present in 11% (19/167) of positive *cagA* strains and 23% (13/55) of *cagA* negative strains. Resistance was significantly associated with negative *cagA* status (p 0.025 OR: 0.4; I.C 95% 0.189-0.909). The prevalence of the *cagE* gene was 61% (136/222). Point mutations were present in 10% (14/136) of the *cagE* positive strains and 21% (18/85) of the *cagE* negative strains. Resistance was significantly associated with negative *cagE* status (p 0.025 OR: 0.4; I.C 95% 0.200-0.913). There was no association between *iceA1*, *iceA2*, *vacA* and alleles with point mutations in the 23s rRNA gene. We concluded that the primary genotypic resistance of *H. pylori* to clarithromycin was 14.41% and that it is within the range for the empirical use of

triple therapy containing clarithromycin. The most prevalent mutation point was A2143G. The positive *cagA* and *cagE* strains had a lower prevalence of resistance to clarithromycin. Hence, *H.pylori* resistance to clarithromycin was most often found in individuals colonized with less virulent strains.

Keywords: *H.pylori*, virulence factors, clarithromycin, point mutations.

1. Introdução

1.1. *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa em espiral cujo nicho ecológico é o estômago humano. A bactéria tem evoluído com os seres humanos, migrou junto com a humanidade para fora da África a cerca de 58.000 anos atrás e provavelmente tenha acompanhando o homem em toda a sua evolução (YAMAOKA, 2010).

A infecção por *H.pylori* é umas das infecções crônicas mais comuns em humanos afetando mais da metade da população mundial. Podendo a prevalência da infecção pela bactéria oscilar entre 28% a 84% (HOOI; LAI; NG; SUEN *et al.*, 2017). Variando entre países e entre regiões de um mesmo país (PEREZ-PEREZ; ROTHENBACHER; BRENNER, 2004) (HOOI; LAI; NG; SUEN *et al.*, 2017).

Um Estudo regional realizado em uma comunidade urbana mostrou uma prevalência de 82% de infecção (RODRIGUES; QUEIROZ; BEZERRA FILHO; PONTES *et al.*, 2004).

A infecção pelo *H.pylori* é considerada a principal causa de gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma associado a mucosas (MALT), pólipos e ainda é um importante fator de risco para o surgimento de câncer gástrico (MCCOLL, 2010) (GRAHAM, 2014) (CHOI; KIM; LEE; KIM *et al.*, 2020).

O *H. pylori* é uma bactéria altamente heterogênea. Ocorrendo variações na sua virulência de acordo com o ambiente geográfico. Esse alto grau de heterogeneidade genética ocorre pela mudança do material genético através de rearranjos, mutações pontuais, inserções de genes e/ou deleções (YAMAOKA, 2010) (MAIXNER; KRAUSE-KYORA; TURAEV; HERBIG *et al.*, 2016).

Determinadas mutações pontuais resultam no desenvolvimento de resistência do *H.pylori* a agentes antimicrobianos (STONE; SHORTRIDGE; FLAMM; VERSALOVIC *et al.*, 1996) (DE FRANCESCO; ZULLO; IERARDI; GIORGIO *et al.*, 2010).

A resistência do *H.pylori* aos antimicrobianos vem crescendo nos últimos anos (ZULLO; HASSAN; CRISTOFARI; ANDRIANI *et al.*, 2010) (CAMARGO, 2014) (ARENAS; SERRANO; QUINONES; HARRIS *et al.*, 2019). Sendo a resistência do *H.pylori* à claritromicina um dos principais fatores responsáveis pelo insucesso no tratamento da bactéria

(SAVOLDI; CARRARA; GRAHAM; CONTI *et al.*, 2018).

Consensos Mundiais e Nacionais são realizados periodicamente para definir métodos de diagnósticos, indicações e tratamento do *H.pylori* (COELHO; MARINHO; GENTA; RIBEIRO *et al.*, 2018).

A importância do tratamento do *H.pylori* é inequívoca em várias situações clínicas e a resistência da bactéria aos agentes antimicrobianos tem se tornado uma preocupação mundial (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; GISBERT *et al.*, 2017). Sendo o *H. pylori* incluído na lista de bactérias de alta prioridade. Recomendando-se que as indústrias farmacêuticas pesquisem e desenvolvam novos fármacos para erradicação da bactéria (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; GISBERT *et al.*, 2017).

A grande variação das cepas dificulta a observação de um fator específico para ser associado com determinadas doenças gástricas. No entanto, pontos específicos foram identificados e associados ao aumento no desenvolvimento de determinadas patologias gástricas como câncer gástrico e úlcera péptica (LIMA; SILVA-FERNANDES; ALVES; RABENHORST, 2011) (NOTO; PEEK, 2012) (BOYANOVA; MARKOVSKA; YORDANOV; GERGOVA *et al.*, 2016).

Temos como exemplos de fatores de virulência do *H.pylori*: as proteínas Cag A (associado à citotoxina), Vac A (toxina vacuolizante), Cag E, Ice A, Bab A e Oip A (ATHERTON; CAO; PEEK; TUMMURU *et al.*, 1995) (LIMA; SILVA-FERNANDES; ALVES; RABENHORST, 2011) (NOTO; PEEK, 2012).

Em um estudo onde foi estimulado a superexpressão da proteína Cag A em camundongos se observou a hiperproliferação de células epiteliais gástricas e o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico. Demonstrando-se assim o potencial oncogênico dessa proteína bacteriana (NOTO; PEEK, 2012).

O gene *vacA* presente em todas as cepas de *H. pylori*, mas apenas 50 a 65% das cepas expressam a citotoxina que induzir vacuolização celular. Essa proteína também está associada com reações inflamatórias mais severas nas células epiteliais gástricas (JANULAITYTE-GUNTHER; KUPCINSKAS; PAVILONIS; VALUCKAS *et al.*, 2007).

Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou uma maior prevalência de cepas mais virulentas. Ou seja, maior presença de cepas gene *cagA* e *vacAs1ml* positivas (BRAGA; OLIVEIRA; GONCALVES; CHAVES *et al.*, 2014).

Entretanto, o papel desses fatores de virulência na resistência da bactéria ainda não está bem determinado (GODOY; RIBEIRO; BENVENGO; VITIELLO *et al.*, 2003) (VEGA; CORTIÑAS; PUIG; SILVA, 2010) (KARABIBER; SELIMOGLU; OTLU; YILDIRIM *et al.*, 2014). Mostrando a necessidade de mais estudos, principalmente na nossa região que é escassa desse tipo de dado epidemiológico.

1.2. Tratamento do *H.pylori*

A terapia de erradicação da infecção pelo *H.pylori* é recomendada em todos os Consensos Mundiais e Nacionais para tratar diversas doenças associadas a essa bactéria como úlcera péptica, linfoma MALT de baixo grau, dispepsia não ulcerosa, gastrite, dentre outras. A terapia padrão mais utilizada como primeira opção é a terapia tríplice contendo amoxicilina, inibidor de bomba prótons e claritromicina por 14 dias (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; GISBERT *et al.*, 2017) (COELHO; MARINHO; GENTA; RIBEIRO *et al.*, 2018).

A claritromicina tem sido escolhido como fármaco base no tratamento do *H.pylori* devido a boa difusão na mucosa gástrica, baixa concentração mínima de inibição e menor interferência na acidez gástrica (MEGRAUD, 2013).

A terapia tripla primária é usada sem estudo prévio de sensibilidade, quando a resistência do *H.pylori* à claritromicina for menor ou igual a 15%. Quando a resistência a claritromicina é $> 15\%$ se recomenda um esquema triplo de antibióticos com metronidazol, claritromicina e amoxicilina por um período de 10 a 14 dias de acordo com ACG (American College of Gastroenterology) e de 14 dias segundo o consenso de Toronto e Maastricht V / consenso de Florença. Esse regime já é recomendado no caso de uma resistência dupla (resistente à claritromicina e metronidazol) (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; GISBERT *et al.*, 2017).

Em regiões onde a resistência ao metronidazol é insignificante, é o caso do Japão, recomenda-se a substituição da claritromicina por metronidazol (NISHIZAWA; MAEKAWA; WATANABE; HARADA *et al.*, 2015). Quando a resistência contra ambos os antibióticos é alta, é o caso da China, se recomenda o tratamento quádruplo com bismuto (CHINESE SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY; LIU; XIE; CHENG *et al.*, 2013).

Em uma meta-análise se comparou a taxa de erradicação entre dos grupos: um utilizando bismuto no protocolo de tratamento e outro não. O grupo com tratamento quádruplo com bismuto teve 85,8% de erradicação enquanto o outro com tratamento quádruplo sem bismuto teve 74,2%. Sendo essa diferença estatisticamente significativa (KO; KIM; CHUNG; LEE, 2019).

O crescente aumento da resistência do *H.pylori* aos antimicrobianos e a diminuição nas taxas de erradicação mostram a necessidade de estudos e dados epidemiológicos regionais. Permitindo assim o uso de protocolos mais adequados (THUNG; ARAMIN; VAVINSKAYA; GUPTA *et al.*, 2016). Evitando assim a ineficácia do tratamento e o desenvolvimento de resistência do *H.pylori* aos antimicrobianos no (LIOU; CHANG; CHEN; CHEN *et al.*, 2015) (MARQUES; VITOR; SANTOS; OLEASTRO *et al.*, 2020).

1.3. Resistência do *H.pylori* à Claritromicina

Inúmeros estudos relatam que a resistência bacteriana aos antimicrobianos é o principal fator responsável pela falha no tratamento das infecções (YEO; SHIU; HO; ZOU *et al.*, 2018).

A resistência do *H.pylori* aos antimicrobianos, principalmente a claritromicina, vem crescendo em vários locais do planeta (ALBA; BLANCO; ALARCON, 2017; MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; GISBERT *et al.*, 2017). Dependendo da região avaliada a resistência à claritromicina pode variar de 1 a 65% (HO; TAN; SAM; GOH, 2010) (WU; WANG; LEE; YAMAOKA *et al.*, 2014) (GEHLOT; MAHANT; MUKHOPADHYAY; DAS *et al.*, 2016) (ALARCON; URRUZUNO; MARTINEZ; DOMINGO *et al.*, 2017) (O'MORAIN; DORE; O'CONNOR; GISBERT *et al.*, 2018) (PARK; KIM; LEE; JEON *et al.*, 2018) (LAUENER; IMKAMP; LEHOURS; BUISSONNIERE *et al.*, 2019).

Dados epidemiológicos sobre a prevalência de resistência *H.pylori* à claritromicina é uma informação importante, uma vez que tem se mostrado como um dos principais fatores responsáveis pela falha de erradicação do *H.pylori* (BROUTET; TCHAMGOUE; PEREIRA; LAMOULIATTE *et al.*, 2003) (SAVOLDI; CARRARA; GRAHAM; CONTI *et al.*, 2018).

Na Europa a prevalência de resistência do *H.pylori* à claritromicina quase que duplicou em uma década passando de 9,9 % para 17,5 % (ZULLO; HASSAN; CRISTOFARI; ANDRIANI *et al.*, 2010).

Na América Latina, os trabalhos usando técnicas fenotípicas com concentração inibitórias mínimas (CIM) e genotípicas evidenciam elevada taxa de resistência, oscilando entre 2 a 46% (VALLEJOS; GARRIDO; CACERES; MADRID *et al.*, 2007) (TORRES-DEBAT; PEREZ-PEREZ; OLIVARES; FERNANDEZ *et al.*, 2009) (TRESPALACIOS-RANGEL; OTERO; AREVALO-GALVIS; POUTOU-PINALES *et al.*, 2016) (GONZALEZ-HORMAZABAL; MUSLEH; ESCANDAR; VALLADARES *et al.*, 2018) (MATTA; ZAMBRANO; PAZOS, 2018) (ARENAS; SERRANO; QUINONES; HARRIS *et al.*, 2019).

A resistência do *H.pylori* à claritromicina no Brasil, assim como no resto do mundo, apresenta variações. Podendo variar entre 2,5% a 27% dependendo da região analisada (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; ATHERTON *et al.*, 2012; SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016), (GARCIA; ARANDA; GONCALVES; CARDOSO *et al.*, 2010).

Garcia et al, na região sudeste, São Paulo, encontraram uma prevalência de 27% de resistência à claritromicina pelo método genotípico (PCR-FRLP) e fenotípico (cultura) (GARCIA; ARANDA; GONCALVES; CARDOSO *et al.*, 2010).

Lins et al, na região nordeste, Pernambuco, usando o método genotípico RT-PCR para investigar os pontos de mutação A2142G/A2146G e A2143G/A2147G em 494 amostras de biópsia, observaram uma presença de 16% das cepas mutantes sendo o ponto de mutação mais prevalente o A2143G/A2147G (LINS; LIMA; MAGALHAES, 2010).

Suzuki et al, na região sudeste, interior de São Paulo, pelo método genotípico FRLP observaram 2,5% de prevalência de resistência com maior percentual correspondente da mutação pontual A2143G/A2147G (SUZUKI; LOPES; DA CAMARA LOPES; HUNG HO *et al.*, 2013).

Sanches et al em um estudo multicêntrico envolvendo 490 pacientes dispépticos utilizou o método genotípico Helico DR para investigar a prevalência de resistência à claritromicina em diferentes regiões. Os estados (cidades) e os percentuais de prevalência de resistência à claritromicina foram respectivamente: em Minas Gerais (Belo Horizonte) (17,5%), na Bahia (Salvador) (16,6%), no Amazonas (Manaus) (14,5%), em Goiás (Goiânia) (19,2%) e no Rio Grande do Sul (Porto Alegre) (19,1%). O trabalho mostrou que a prevalência de cepas

mutantes pode variar de 14,5 a 19,5% dependendo da região. Sendo a média geral de 16,9%. Os pontos de mutação avaliados foram A2146G/A2142G e A2147G/A2143G. Sendo esse último o mais prevalente (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016).

Martins et al demonstraram uma taxa de 12,5% de mutações pontuais utilizando também a técnica genotípica HelicoDR. Nesse estudo 72 pacientes adultos e dispépticos participaram da pesquisa. Os pontos investigados foram A2147G e A2146G, anteriormente conhecidos, respectivamente, como (A2143G) e (A2142G). Sendo o mais prevalente o ponto A2147G correspondendo a 77,8% das mutações (MARTINS; SANCHES; MORETZSOHN; LIMA *et al.*, 2016).

Vianna et al, na região Sul, Rio Grande do Sul, pelo método PCR-FRLP, encontraram 8,7 % de cepas mutantes. Sendo o ponto A2143G/A2147G o mais prevalente (85,7%) (VIANNA; RAMIS; RAMOS; GASTAL *et al.*, 2018).

Na tabela 1 observamos a síntese dos estudos brasileiros mostrando a prevalência de resistência genotípica primária à claritromicina do *H.pylori*. Informando a região, estado, autor, ano da publicação e método de avaliação de cada estudo.

Tabela1 - Estudos brasileiros avaliando resistência à claritromicina por métodos genotípicos

Método	Região	Estado	Prevalência	Referência
PCR-FRLP	Sudeste	São Paulo	27%	Garcia et al., 2010
RT-PCR	Nordeste	Pernambuco	16%	Lins et al., 2010
PCR-FRLP	Sudeste	São Paulo (interior)	2,5%	Suzuki et al., 2013
Helico DR	Sudeste	Minas gerais	12,5%	Martins et al., 2016
Helico DR	Multicêntrico	Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Amazonas, Rio grande do Sul	16,9%	Sanches et al., 2016
PCR-FRLP	Sul	Rio grande do Sul	8,7%	Vianna et al., 2018

Fonte: Elaborado pelo autor.

A resistência à claritromicina é transmitida verticalmente, não ocorrendo transmissão horizontal por aquisição de plasmídeos. Existindo resistência cruzada dentro da mesma classe de antimicrobiano (MEGRAUD; LEHOURS, 2007).

A resistência ocorre em decorrência da mutação pontual no DNA, na sequência de nucleotídeos que codifica a proteína no domínio V da subunidade 23S rRNA. Essa alteração leva a inibição da síntese de proteínas na subunidade ribossômica (figura 1). (STONE; SHORTRIDGE; FLAMM; VERSALOVIC *et al.*, 1996).

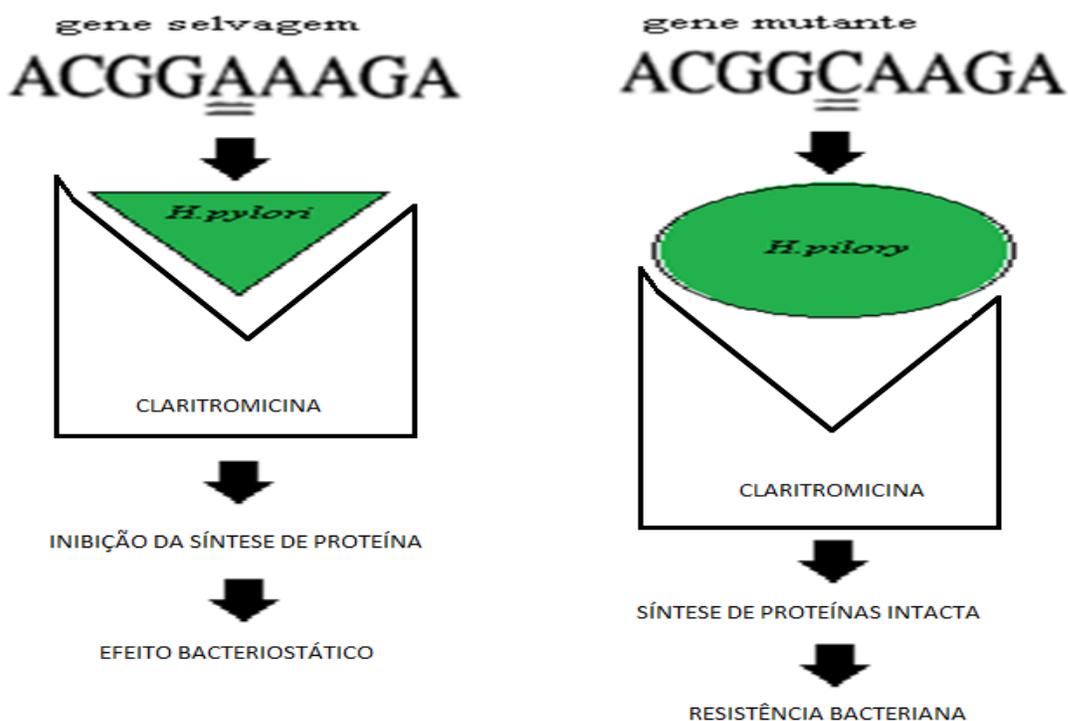
Figura 1: Ponto de mutação mais comumente encontrado: A2143G

23S rRNA alleles	clarithromycin	23S rRNA mutation
ACGG <u>AA</u> AAGA	S	wildtype
ACGG <u>CA</u> AAGA	R	A2143C

Fonte: (STONE; SHORTRIDGE; FLAMM; VERSALOVIC *et al.*, 1996).

Com a mudança no sítio de ação do antimicrobiano a claritromicina passa a ser ineficaz (figura 2).

Figura 2-Mecanismo de resistência do *H.pylori* ponto de mutação do gene 23s rRNA



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os três pontos de mutação responsáveis por 90% das cepas resistentes presentes nos países ocidentais são: A2146C, A2146G e A2147G. Anteriormente descritas como A2142C, A2142G e A2143G (MEGRAUD, 2004) (MEGRAUD; LEHOURS, 2007).

Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de implementar métodos que sejam simples, rápidos e efetivos para detectar a resistência do *H.pylori* à claritromicina na prática clínica (PENG; SONG; HE; LIN *et al.*, 2017). Isso devido ao fato da cultura do *H.pylori* ser bastante laboriosa em comparação com a cultura de outras bactérias. Tornando assim os métodos fenotípicos praticamente inviáveis na clínica médica.

Os métodos moleculares são promissores, uma vez que, os pontos de mutação no gene 23s rRNA podem ser detectadas por várias técnicas tais quais RT-PCR, PCR-RFLP e Helico DR com boa acurácia (DE FRANCESCO; ZULLO; IERARDI; GIORGIO *et al.*, 2010; SAKINC; BAARS; WUPPENHORST; KIST *et al.*, 2012) (SMITH; O'MORAIN; MCNAMARA, 2014).

Dentre eles se destaca o Taq Man Real time PCR (RT-PCR). Esse método tem sido validado usando amostras de biópsias gástricas (incluindo biopsias em parafina), fezes e suco gástrico. O enteroteste, em particular, é um método minimamente invasivo com boa sensibilidade e especificidade (PENG; SONG; HE; LIN *et al.*, 2017).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo validaram o enteroteste para coleta de suco gástrico de crianças assintomáticas com finalidade de identificar e genotipar cepas de *H.pylori* (GONCALVES; SILVA; BRAGA-NETO; FIALHO *et al.*, 2013). Possibilitando assim avaliar a susceptibilidade do *H.pylori* à claritromicina nessas amostras de suco gástrico através do RT-PCR.

O papel dos genes de virulência do *H.pylori* tem sido associado às patologias gástricas em vários estudos, (LIMA; SILVA-FERNANDES; ALVES; RABENHORST, 2011) (NOTO; PEEK, 2012) (BOYANOVA; MARKOVSKA; YORDANOV; GERGOVA *et al.*, 2016). Entretanto, existe contradição em alguns estudos sobre a correlação entre o perfil de virulência do *H.pylori* e resistência bacteriana (GODOY; RIBEIRO; BENVENGO; VITIELLO *et al.*, 2003) (VEGA; CORTIÑAS; PUIG; SILVA, 2010) (KARABIBER; SELIMOGLU; OTLU; YILDIRIM *et al.*, 2014).

1.4. Fatores de virulência

1.4.1. Sistema de secreção tipo IV(T4SS) e A ilha de patogenicidade *cag* (*cag* pai)

Os T4SSs são sistemas complexos de transporte que estão presentes em muitas bactérias gram-negativas e que estão relacionados com ancestrais sistemas de conjugação. Estes transportadores apresentam diversas funções, dentre elas temos o transporte e recepção de proteínas e fragmentos de DNA. Essa interação pode ocorrer tanto em bactérias da mesma espécie, como de espécies diferentes (BACKERT; CHURIN; MEYER, 2002).

O sistema de secreção bacteriano do tipo IV é codificado pela ilha de patogenicidade *cag* (*cag* PAI) que contém aproximadamente 32 genes e é considerado um determinante de virulência do *H. pylori* (CENSINI; LANGE; XIANG; CRABTREE *et al.*, 1996). Bem caracterizado e que está presente em cerca de 60-70% das estirpes de *H. pylori* ocidentais e praticamente 100% das estirpes do leste asiático (NOTO; PEEK, 2012). Provavelmente essa sequência foi adquirida horizontalmente por um ancestral ainda desconhecido (AKOPYANTS; CLIFTON; KERSULYTE; CRABTREE *et al.*, 1998).

Tem sido mostrado que células epiteliais gástricas infectadas por cepas de *H.pylori* que apresentam o complexo *cag* PAI são induzidas a produzir a interleucina-8 (IL-8). A IL-8 induz infiltração de neutrófilos, o que pode levar ao desenvolvimento de úlcera péptica ou uma inflamação persistente que possivelmente resultará em um adenocarcinoma gástrico (ZHANG; NAKASHABENDI; MOKHASHI; DAWODU *et al.*, 1996).

A expressão de alguns genes do complexo *cag* PAI resulta na formação de uma estrutura em forma de agulha que permite à bactéria translocar a proteína Cag A em células hospedeiras (BACKERT; CHURIN; MEYER, 2002).

1.4.2. Gene *cagA*

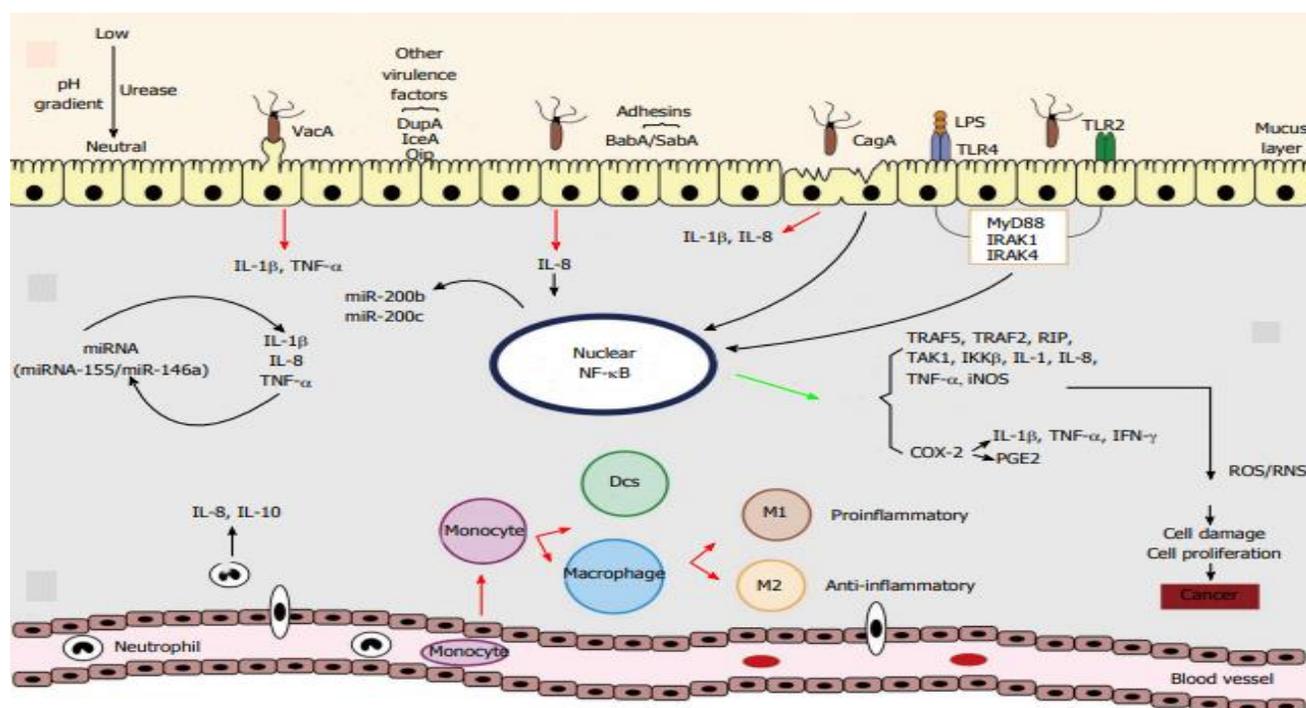
O gene *cagA* está localizado na ilha de patogenicidade *cag* (*cag* PAI), um segmento que codifica uma série de componentes necessários para forma o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) (HANDA; NAITO; YOSHIKAWA, 2007). Esse gene codifica a proteína citotoxina Cag

A que foi identificada como sendo potencialmente carcinogênica (BLASER; ATHERTON, 2004).

O gene *cagA*, geralmente, está presente nas estirpes virulentas e ausente nas cepas de *H.pylori* menos agressivas (CENSINI; LANGE; XIANG; CRABTREE *et al.*, 1996). Mais de 90% das cepas de *H.pylori* isoladas do Leste Asiático, incluindo a Coreia, Japão e China, são genotipadas como sendo *cagA* positivas, enquanto 50% à 60% das cepas isoladas nos países ocidentais são positivos para o mesmo gene (KIM; KIM; JUNG; SONG *et al.*, 2000).

A proteína Cag A é crucial para o desenvolvimento de alterações morfológicas como o alongamento celular conhecido como dispersão ou "beija-flor", um fenótipo adquirido pelas células epiteliais infectadas. Causando perturbação em componentes responsáveis pela junção célula-célula no epitélio gástrico. Essas alterações podem contribuir no desenvolvimento de câncer gástrico (BACKERT; CHURIN; MEYER, 2002). A proteína Cag A, primeiramente, causa alterações bioquímicas e, posteriormente, morfofisiopatológicas (CADAMURO; ROSSI; MANIEZZO; SILVA, 2014). figura 3.

Figura 3-Mecanismo de alterações: bioquímicas, morfológicas e fisiopatológicas a partir da infecção pelo *H. Pylori*



Fonte: (CADAMURO; ROSSI; MANIEZZO; SILVA, 2014).

Evidências apontam na possibilidade da proteína estimular a produção de gastrina. A gastrina, por sua vez, estimula a secreção de mais ácido na mucosa o que expõe a célula epitelial gástrica a mais um fator de pressão mutágena (ZHOU; XIE; ZHAO; WANG *et al.*, 2011).

A expressão de diferentes proteínas de diferentes cepas isoladas em pacientes com gastrite e pacientes com câncer gástrico indicou a presença de polimorfismo. O polimorfismo da proteína Cag A é um achado importante para se determinar uma relação histopatológica com o hospedeiro (YEH; CHANG; YANG; CHENG *et al.*, 2011).

A estrutura do gene revelou em estudos uma região altamente conservada e outra que apresenta variações que eram responsáveis pela variação de tamanho e, conseqüentemente, de peso molecular da proteína Cag A, isso ocorre devido à presença de diferentes tipos de seqüências correspondentes aos sítios de fosforilação classificados como Epiyas (YAMAOKA, 2010).

Quatro tipos de segmentos Epiya foram descritos: A, B, C e D. Cada sítio apresenta um diferente potencial de fosforilação. O principalmente alvo das epiyas na célula gástrica é a tirosina cinase (HIGASHI; TSUTSUMI; FUJITA; YAMAZAKI *et al.*, 2002).

A patogenicidade da cepa de *H.pylori* é diretamente proporcional à capacidade de fosforilação da tirosina cinase pela epiya presente no poliformo de cag A. As epiyas do tipo A e B são menos patogênicas e relacionadas a úlceras gástricas e as do tipo C e D são encontradas em processos inflamatórios mais graves como câncer gástrico (PANAYOTOPOULOU; SGOURAS; PAPADAKOS; KALLIAROPOULOS *et al.*, 2007).

Estudos mostram que a proteína cag A pode interagir com a proteína estimulante de apoptose (ASPP2). A ASPP2 induz a apoptose frente a algum dano no DNA, ativando o supressor de tumor p53. No entanto, a interação da ASSP2 com Cag A resulta em ASSP2 inativa, a consequência dessa interação é um efeito antiapoptótico (BUTI; SPOONER; VAN DER VEEN; RAPPUOLI *et al.*, 2011).

1.4.3. Gene *cagE*

Localizado na Ilha de patogenicidade (*cag PAI*), o gene *cagE*, também conhecido como ptlC (similar on the toxin-secretion gene *Bordetella pertussis*), produz a proteína Cag E que é um dos responsáveis por induzir a produção da IL-8 nas células do

hospedeiro. Desencadeando assim uma resposta imune com base na migração de neutrófilos (CENSINI; LANGE; XIANG; CRABTREE *et al.*, 1996) (SEGAL; CHA; LO; FALKOW *et al.*, 1999).

O gene *cagE* é considerado um dos marcadores de virulência para se identificar cepas *CagPAI* positivas (GONZÁLEZ-VÁZQUEZ R, 2016).

A presença do gene *cagE*, assim como o gene *cagA*⁺ e *vacA mIsI*⁺, indica a presença de cepas mais virulentas com maior potencial para desenvolver doenças gastrointestinais mais severas (FALLONE, 1998) (PODZORSKI; PODZORSKI; WUERTH; TOLIA, 2003) (GONZÁLEZ-VÁZQUEZ R, 2016).

1.4.4. Gene *vacA*

Em células epiteliais gástricas de pacientes infectados por *H. Pylori* é observada a presença de vacúolos citoplasmáticos (TRICOTTET; BRUNEVALL; VIRE; CAMILLERI *et al.*, 1986). Quando a proteína Vac A purificada é administrada em ratinhos causa danos nas células epiteliais gástricas semelhantes aos encontrados em pacientes colonizados por *H. pylori* (TELFORD; GHIARA; DELL'ORCO; COMANDUCCI *et al.*, 1994).

Estudos mostram que o processo de vacuolização dependente, estreitamente, da presença de um meio com um pH levemente básico. A amônia produzida pela urease, uma enzima presente nas cepas de *H. pylori* pode proporcionar esse meio básico necessário no processo de vacuolização celular (RICCI; SOMMI; FIOCCA; ROMANO *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos afirmam que a proteína Vac A atua como uma toxina multifatorial (pleitrópica), que pode ter efeito sobre as células e tecidos de mamíferos podendo agir tanto nas funções fisiológicas como nas funções imunocelulares das células epiteliais gástricas (ROMANO; RICCI; ZARRILLI, 2006).

A proteína Vac A atua como um agente responsável pela formação de canais aniônicos seletivos na membrana plasmática das células epiteliais gástricas. Esses ânions plasmáticos extravasados seriam coletados pela bactéria para utilidade própria como substrato de reações químicas (MONTECUCCO; RAPPUOLI, 2001).

Ela também tem a capacidade de induzir a apoptose através da permeabilização da membrana mitocondrial causando liberação do citocromo c (MANENTE; PERNA; BUOMMINO; ALTUCCI *et al.*, 2008).

O gene *vacA*, assim como gene *cagA*, apresenta natureza polimórfica onde se é possível a formação de diferentes proteínas Vac A. Estas áreas de variação são amplamente definidas como regiões s, m e i localizadas, respectivamente, nas extremidades, nas regiões medianas e intermediárias do gene.

As variações na região s são: *s1* e *s2*, na região i são: *i1*, *i2* e *i3*, e na região m temos: *m1* e *m2*. Várias combinações das regiões s, i e m estão presentes no interior de cada estirpe de *H. pylori*, para obter um determinado alelo *vacA* (Figura 4) (ATHERTON; CAO; PEEK; TUMMURU *et al.*, 1995) (CHUNG; OLIVARES; TORRES; YILMAZ *et al.*, 2010).

Figura 4- Mosaico do gene *vacA*



Fonte: (ATHERTON; CAO; PEEK; TUMMURU *et al.*, 1995).

Diferentes variações representam capacidades diferentes de vacuolização. As cepas que apresentam a combinação *s1*, *m1* e *i1* são as mais agressivas e tem maior capacidade de formar canais aniônicos nas células epiteliais gástricas. Resultando, conseqüentemente, em quadros patológicos mais graves (LETLEY; RHEAD; TWELLS; DOVE *et al.*, 2003; PODZORSKI; PODZORSKI; WUERTH; TOLIA, 2003).

1.4.4. Gene *iceA*

O gene *iceA* (gene induzido pelo contato com células epiteliais gástricas) tem dois alelos: *iceA1* e *iceA2* (PEEK; THOMPSON; DONAHUE; THAM *et al.*, 1998). A prevalência dos genes *iceA1* e *iceA2* oscila dependendo da região geográfica. Sendo que nos países asiáticos a maior prevalência é do gene *iceA1*(64.6%) e no ocidente do *iceA2* (82.4%) (YAMAOKA; KODAMA; GUTIERREZ; KIM *et al.*, 1999) (PODZORSKI; PODZORSKI; WUERTH; TOLIA, 2003) (SHIOTA; WATADA; MATSUNARI; IWATANI *et al.*, 2012).

Alguns autores afirmam que o gene *iceA1* estaria mais relacionado ao desenvolvimento de doenças gástricas mais severas (PEEK; THOMPSON; DONAHUE; THAM *et al.*, 1998) (SHIOTA; WATADA; MATSUNARI; IWATANI *et al.*, 2012) (DABIRI; JAFARI; BAGHAEI; SHOKRZADEH *et al.*, 2017).

Shiota *et al.*, em uma meta-análise, mostraram que as cepas *iceA1* correspondem ao maior risco de desenvolver úlcera e inversamente proporcional às cepas *iceA2* (SHIOTA; WATADA; MATSUNARI; IWATANI *et al.*, 2012). Contudo, outros estudos mostram que a presença do gene *iceA2* estaria mais relacionada às patologias gástricas (PODZORSKI; PODZORSKI; WUERTH; TOLIA, 2003) (SHIOTA; WATADA; MATSUNARI; IWATANI *et al.*, 2012).

2. Justificativa

Os Consensos Mundiais recomendam que o esquema padrão utilizando claritromicina não deva ser utilizado em regiões onde a resistência à claritromicina seja superior a 15% (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; ATHERTON *et al.*, 2012).

Recomenda-se que se avalie a susceptibilidade do *H.pylori* localmente para que se possam adotar outras diretrizes de tratamento mais efetivas. A resistência primária do *H.pylori* à claritromicina tem sido avaliada em vários estados brasileiros. Contudo, no Ceará não existe nenhum estudo.

Alguns estudos mostram que cepas mais virulentas de *H. pylori* são mais susceptíveis à claritromicina sendo esse um ponto controverso. Além do mais, poucos estudos correlacionaram à susceptibilidade do *H.pylori* à claritromicina com genótipos de virulência do *H.pylori* no Brasil.

3. Objetivo Geral

Avaliar a prevalência da resistência genotípica primária do *H. pylori* à claritromicina em amostras de biópsias e de suco gástrico através de método molecular Taq Man RT-PCR e verificar se existe correlação entre a susceptibilidade das cepas e os genótipos de virulência do *H.pylori*.

3.1. Objetivos específicos

1-Avaliar o perfil genotípico de resistência do *H.pylori* à claritromicina através da investigação das mutações pontuais A2142G/A2146G e/ou A2143G/A2147G;

2-Descrever as mutações mais frequentemente encontradas;

3-Verificar se os genótipos *cagA*, *cagE*, *vacA* e alelos, *iceA* estão associados com a susceptibilidade do *H.pylori* à claritromicina.

4- Analisar a prevalência de cepas de *H.pylori* heterorresistentes;

5-Correlacionar a susceptibilidade do *H.pylori* à claritromicina com sexo, procedência, idade e afecções gastrointestinais.

4. Materiais e Métodos

4.1. Desenho do Estudo

Estudo observacional e transversal realizado no Hospital Universitário Walter Cantídeo da Universidade Federal do Ceará e em uma comunidade urbana Parque Universitário.

Para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizada fórmula para populações infinitas superiores a 100.000. Consideramos o nível de confiança de 95% e erro máximo permitido de 5%.

A resistência primária à claritromicina em nosso meio foi estimada em 14,4% baseando-se em estudos realizados em estados da região Nordeste, tais quais Recife (LINS; LIMA; MAGALHAES, 2010) (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016).

Utilizando-se esses parâmetros foi possível verificar que 185 amostras atendem aos cálculos necessários para o presente estudo.

As análises moleculares foram realizadas nos Laboratórios de Pesquisa em Gastroenterologia Instituto de Biomedicina (genotipagem das cepas de *H.pylori*) e o Taq Man RT-PCR no Centro de Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará.

4.2. Casuística

No presente estudo foi utilizado amostra de conveniência (não probabilística). Foram incluídos pacientes dispépticos que iriam se submeter à endoscopia digestiva alta por solicitação do médico assistente.

Nos pacientes portadores de câncer gástrico a biópsia foi coletada da peça cirúrgica. Já nos Indivíduos da comunidade Parque Universitário a amostra foi coletada através do enteroteste.

Na comunidade as casas foram randomizadas e os indivíduos convidados a participar do estudo.

4.3. Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

- Indivíduos de ambos os sexos que não foram tratados para *H.pylori*;
- Idade acima de 18 anos a 80 anos (pacientes adultos);
- 8 até 18 anos indivíduos residentes na comunidade urbana parque universitário;
- Pacientes *H. pylori* positivo e que apresentassem também PCR positivo para o gene 23s rRNA;
- Pacientes que concordaram em assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE –APÊNDICE).

Critérios de exclusão

- Pacientes previamente tratados para *H.pylori*;
- Pacientes com relato de uso de antimicrobianos inibidores da bomba de prótons nos 30 dias anteriores;
- Pacientes em uso de anticoagulantes, com distúrbios hemorrágicos, portadores doenças crônicas como cirrose hepática, cirurgia gástrica, neuropatia, pacientes gestantes.

4.4. Obtenção de amostras

Foram coletados cinco fragmentos (duas do antro, duas do corpo e uma de incisura) dos pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta para investigação de sintomas dispépticos.

As Biópsias dos pacientes portadores de câncer gástrico foram obtidas durante procedimento cirúrgico e o diagnóstico para câncer gástrico foi confirmado por método histopatológico de acordo com a classificação de Lauren (LAUREN, 1965).

O suco gástrico foi coletado das crianças e dos jovens da comunidade através do enteroteste que foi validado no nosso grupo de pesquisa (GONCALVES; SILVA; BRAGA-NETO; FIALHO *et al.*, 2013).

As amostras coletadas foram enviadas ao laboratório de gastroenterologia e armazenadas em freezer -80° C até a realização dos protocolos moleculares (GONCALVES; SILVA; BRAGA-NETO; FIALHO *et al.*, 2013).

A infecção por *H.pylori* foi considerada positiva quando as bactérias foram detectadas por histopatologia, teste rápido da urease e biologia molecular (ATHERTON; CAO; PEEK; TUMMURU *et al.*, 1995) (DIXON; GENTA; YARDLEY; CORREA, 1996).

A triagem selecionou as amostras com material genético mais bem preservado. Impedindo assim falsos negativos e o gasto desnecessário dos reagentes no RT-PCR.

4.5. Métodos

4.5.1. Teste rápido da urease

O teste rápido da urease se baseia na característica que o *H. pylori* tem de hidrolisar a uréia em amônia, CO_2 e água por meio da ação da enzima urease. Um fragmento de biópsia do antro e outro do corpo gástrico são colocados, imediatamente após a coleta, em uma solução de ureia com indicador de pH (vermelho fenol).

Caso haja a presença de *H. pylori* ocorre uma quebra da ureia 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 o *H. pylori* está presente na biópsia. Se a mudança ocorrer nas primeiras 24 h o teste é considerado positivo (MARSHALL; BARRETT; PRAKASH; MCCALLUM *et al.*, 1990).

4.5.2. Enteroteste

Uma Cápsula de gelatina acoplada a um fio de algodão absorvente de 90 cm de comprimento foi deglutida com 200 ml de água. Após uma hora, o fio foi removido e os 30 cm proximais foram descartados.

O segmento do fio impregnado com suco gástrico foi lavado com 5 ml de solução salina e colocado em frasco estéril. Em seguida foi encaminhado ao laboratório para processamento. O líquido no frasco foi centrifugado a 13.000 r.p.m por 10 minutos e processado para extração de DNA. As amostras foram armazenadas a -70°C.

Esse método foi previamente validado por nosso grupo onde mostrou boa acurácia em comparação com o PCR (GONCALVES; SILVA; BRAGA-NETO; FIALHO *et al.*, 2013).
Figura 5.

Figura 5- Cápsula para coleta do suco gástrico (enteroteste)



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.3. Análise histopatológica

Os espécimes para histologia foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e, posteriormente, cortadas em secções de 5 mm para confecção de lâminas histológicas.

As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina para detecção do *H. pylori*. Os achados histológicos da mucosa gástrica foram interpretados de acordo com a classificação de Sidney (DIXON; GENTA; YARDLEY; CORREA, 1996).

4.5.4. Cultura e antibiograma do *H.pylori*

a) Cultura

As Culturas de *H.pylori* foram realizadas para serem utilizadas como controle no RT-PCR. O *H. Pylori* foi cultivado a partir de biópsia gástrica. As biópsias da mucosa foram trituradas com triturador automático (Tissue master 125) em meio de tampão PBS.

O caldo foi inoculado nas placas de Petri contendo meio não seletivo ágar sangue base (Sigma-Aldrich) a 5% (sangue de carneiro) e seletivo (*Helicobacter pylori* Selective Supplement- DENT) (HOLTON, 1997) e submetidas à condição microaeróbica (5% O₂; 10% de CO₂; 85% N₂) durante 3-7 dias.

b) Antibiograma

As cepas de *H. pylori* foram definidas com base na morfologia das colônias (puntiformes e translúcidas) que eram oxidase, catalase e urease positivos nas provas bioquímicas (NDIP; MACKAY; FARTHING; WEAVER, 2003).

As colônias isoladas foram colhidas em 2 mL de solução salina e ajustadas para turbidez equivalente ao padrão de turbidez N° 4 MacFarland. O inóculo suspenso foi aplicado uniformemente em toda a superfície de placas de Ágar Mueller-Hinton contendo 5% de sangue de carneiro. As placas foram cobertas com 0,3 a 0,5 mL de cada inóculo suspenso para produzir um crescimento bacteriano uniforme. O antibiograma feito com discos de difusão (CLSI, 2013).

4.5.5. Extração de DNA genômico

O DNA do *H. pylori* foi extraído de amostras de tecido gástrico, suco gástrico e cultura. O DNA foi obtido usando o kit de extração de DNA QIAamp (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) e seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas para amplificação do gene

A princípio foi realizada a digestão do material tecidual. Onde as amostras foram colocadas em tubos de 2 ml com 180µL de tampão ATL e 20µL de proteinase K e submetidos a banho-maria a 56°C por vinte e quatro horas. Após a digestão, segue-se com a lise celular onde deverão ser adicionados 200µL de tampão AL e novamente as amostras foram incubadas no banho-maria a 70°C por dez minutos. Em seguida, adiciona-se 200µL de etanol 100%.

O material da lise celular foi transferido para coluna Spin QIAamp® para filtrar o conteúdo celular. O primeiro filtrado foi obtido pela centrifugação do material a 8.000 rpm por 1 minuto em tubo de microcentrífuga de 2 mL, depois descartado e então adiciona-se 500µL de tampão AW1 (QIAGEN®) e é feita a eluição por centrifugação a 8.000 rpm por um minuto. Em seguida, foram colocados 500µL de tampão AW2 (QIAGEN®) com centrifugação a 14.000 r.p.m por três minutos. Por fim, adiciona-se 200µL de tampão AE, centrifugando-se a 8.000 r.p.m por um minuto. Repetindo-se essa última etapa para extração do material genético. Após a extração do DNA as amostras foram estocadas no freezer a -20°C até o seu processamento.

4.5.6. Detecção do fator de virulência

As biópsias retiradas do freezer -80° C, foram trituradas utilizando-se um bisturi cirúrgico em placa de Petri limpa. Em seguida os tecidos foram colocados em tubos de *ependorf* identificados, em seguida adicionado uma alíquota de 180µl de tampão de lise e 20µl de proteinase K e os tubos deixados no banho-maria durante 24 horas a 56° C.

Os marcadores de virulência foram determinados por reações de PCR realizadas no Termociclador Thermal Cycler 2400 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). Em resumo, a solução “Master mix” para amplificação gênica consistia em: 5,5 µl de dH₂O, 12,5 µl da enzima Taq-DNA polimerase (GoTaq green - Promega®, Madison, Wisconsin, EUA); 1,0µL

dos "primers" (Carlsbad, Califórnia, EUA) específicos para cada gene, partindo da terminação 5 'a 3', em ambas as direções (Forward e Reverse Primer).

As reações ocorreram separadamente para cada gene. Em cada microtubo, 5,0µL do DNA extraído foram adicionados em microtubos específicos de 200µL. Os fragmentos amplificados foram desenvolvidos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Para a amplificação do gene foram utilizados os seguintes primers previamente descritos na literatura: gene 23s (Clayton et al., 1992), *cagA* (Kelly et al. 1994, Peek et al.1995), *vacAs1*, *vacAs2*, *vacAm1*, *vacAm2* (Atherton et al., 1995), *cag E* (Sozzi et al., 2005), *Ice A e ice A2* (Peek et al., 1998). Tabela 2.

Tabela 2 – Primers utilizados para cada marcador

<i>Gene</i>	<i>Sequência</i>	<i>Amplicon</i>	<i>Referência</i>
<i>23 s</i>	F - GCCAATGGTAAATTAGTT R- CTCCTTAATTGTTTTTAC	411pb	(Clayton et al., 1992)
<i>Cag A</i>	F- TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT R- ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA	298pb	(Kelly et al. 1994) (Peek et al., 1998)
<i>Vac A s1</i>	F-ATGGAAATACAACAAACACAC R-CTGCTTGAATGCGCCAAAC	259 pb	(Atherton et al., 1995)
<i>Vac A s2</i>	F-ATGGAAATACAACAAACACAC R-CTGCTTGAATGCGCCAAAC	286 pb	(Atherton et al., 1995)
<i>Vac A m1</i>	F-GGTCAAAATGCGGTCATGG R-CCATTGGTACCTGTAGAAAC	290 pb	(Atherton et al., 1995)
<i>Vac A m2</i>	F-GGAGCCCCAGGAAACATTG R-CATAACTAGCGCCTTGCAC	352 pb	(Atherton et al., 1995)
<i>Cag E</i>	F-TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC R-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC	509 bp	(Sozzi et al., 2005)
<i>Ice A1</i>	F-GTGTTTTTAACCAAAGTATC R-CTATAGCCATTATCTTTGCA	247 bp	(Peek et al., 1998)
<i>Ice A2</i>	F-GTTGGGTATATCACAATTTAT R-TTCCCTATTTCTAGTAGGT	229/334 bp	(Peek et al., 1998)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.7. Otimizando a quantidade de DNA por amostra

O DNA foi quantificado por absorvância ultravioleta a 260 nm. Para determinar a quantidade ideal de DNA para o ensaio. Diluições seriadas entre 10 ng e 50 ng foram feitas para avaliar o melhor perfil de leitura do dispositivo. A quantidade de DNA de cada amostra foi ajustada para 30 ng com base nas observações já feitas em trabalhos anteriores (OLEASTRO; MENARD; SANTOS; LAMOULIATTE *et al.*, 2003) (DE FRANCESCO; MARGIOTTA; ZULLO; HASSAN *et al.*, 2006).

4.5.8. Caracterização de controles positivos e negativos

As cepas usadas como controle positivo e negativo nos ensaios de RT-PCR foram cultivadas no nosso laboratório. As cepas foram classificadas como resistentes e sensíveis por método fenotípico. O DNA bacteriano foi extraído, quantificado e amplificado para detectar a presença do gene 23 s rRNA e, posteriormente, dos pontos de mutação pelo RT-PCR usando iniciadores e sondas específicos. Tabela 3.

4.5.9. PCR em Tempo real para polimorfismo do gene 23 s rRNA (A2142G e A2143G)

A discriminação alélica do gene 23 s rRNA (A2142G e A2143G) foi realizada usando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) realizada pelo dispositivo 7500 Real-Time PCR system® (Applied Biosystems, inc. Foster City, CA, EUA) disponível no laboratório de citogenômica do câncer, localizado no Centro de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará. As reações foram preparadas usando o kit Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA, EUA) otimizado para reações com a sonda TaqMan assay® e contendo a polimerase de DNA AmpliTaq Gold.

A preparação e o armazenamento dos materiais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, exceto o volume final de cada reação que foi otimizado para 10 μ l. A mistura preparada para RT-PCR consistiu em 5,0 μ l de Universal Master Mix mais 4,5 μ l de solução de DNA contendo 30 ng e 0,5 μ l de ensaio preparado contendo: 36 μ M (iniciador direto e reverso) e concentração de sondas TaqMan MGB 8 μ M (FAM e VIC) (DE FRANCESCO; MARGIOTTA; ZULLO; HASSAN *et al.*, 2006). Tabela 3.

Tabela 3- Primers e sondas utilizadas para cada mutação pontual no gene 23S rRNA do *H.pylori*

23SA2142G-2142F	TCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAA	
23SA2142G-2142R	CAGTGCTAAGTTGTAGTAAAGGTCCA	
	VIC: AAGACGGAAAGACC	Sonda DNA selvagem
	FAM: AAGACGGGAAGACC	Sonda DNA mutante
23SA2143G-2143F	TCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAA	
23SA2143G-2143R	CAGTGCTAAGTTGTAGTAAAGGTCCA	
	VIC: AAGACGGAAAGACC	Sonda DNA selvagem
	FAM: CAAGACGGAGAGACC	Sonda DNA mutante

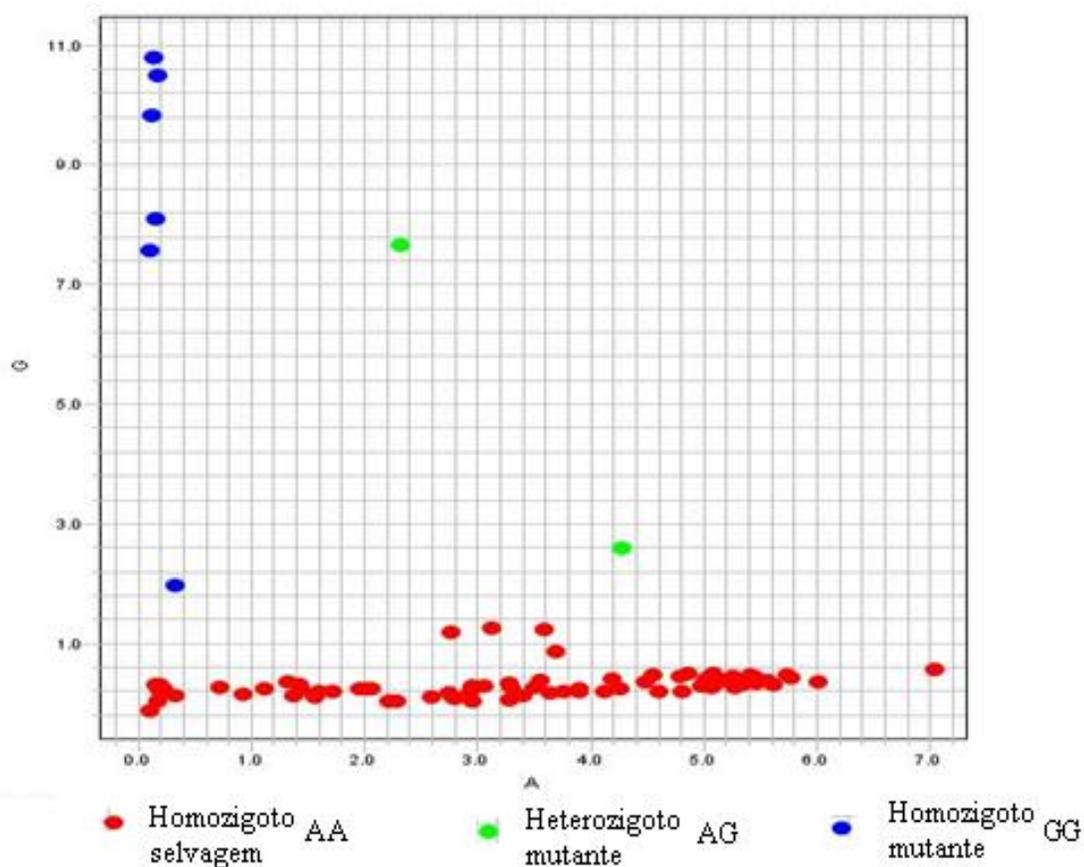
Fonte: (DE FRANCESCO; MARGIOTTA; ZULLO; HASSAN *et al.*, 2006).

As placas de reação foram centrifugadas por 1 min a 4500 r.p.m. As condições de amplificação para PCR foram: pré-aquecimento a 50°C por 2 min, ativação da polimerase a 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação de 15 s 92°C e 1 min a 60 °C por extensão e recozimento.

As Placas de reação de polipropileno para 96 reações (placas MicroAmp de 96 poços, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EUA) foram cobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a altas temperaturas e álcool (filme adesivo óptico, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Em todas as etapas, as amostras foram imersas em gelo e com pouca exposição à luz. Cada amostra foi avaliada em duplicado e apenas amostras cujas diferenças de amplificação não excederam 0,8 ciclos ($\Delta C_q \leq 0,8$) foram consideradas para análise. Em todas as placas os controles negativos e positivos foram realizados. O procedimento para detectar uma mutação no gene 23 s rRNA do *H.pylori* foi realizado de acordo com o relatado por Wada et al., (WADA; MAEDA; TAMARU; IMAI *et al.*, 2004). O aumento da fluorescência do corante FAM ou VIC indica um genótipo homozigoto (mutação ou silvestre), enquanto um aumento em ambos os sinais indica um genótipo heterozigoto (heterorresistentes) (LEE; CONNELL; BLOCH, 1993).
 Figura 6.

Figura 6- Gráfico da expressão qualitativa da presença de mutação pontual pelo RT-PCR



Fonte: Elaborado pelo autor.

5. Análise Estatística

Para os cálculos estatísticos foi usado SPSS (Statistical Package for the Social Science) (versão 21.0, IBM Corp, Armonk, NY, EUA). Os testes de qui-quadrado e exato de Fisher foram usados para determinar a significância estatística das diferenças entre as variáveis categóricas. Na associação entre resistência bacteriana e idade, utilizou-se o teste T-Student. Odds ratio e intervalo de confiança de 95% foram usados como estimativas de risco. É considerada a significância estatística se $p < 0,05$.

6. Considerações éticas

O protocolo do estudo foi aprovado em 07 de abril de 2014 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (UFC) e protocolado sob o número 628.750. Os consentimentos informados foram obtidos de todos ou de seus responsáveis legais antes da coleta da amostra.

Todos os pacientes responderam a um questionário sobre sintomas clínicos, dados demográficos como idade, sexo, área de residência. Os pacientes foram recrutados de agosto de 2014 a 2017.

7. Resultados

7.1. Características gerais da amostra analisada

Das 300 amostras positivas para *H.pylori* (260 amostras de biópsias e 40 de suco gástrico) 74% (222/300) apresentavam o gene 23S rRNA. Nas biópsias 76,15% (198/260) e nas amostras de suco gástrico 60% (24/40).

Foram incluídos para análise 198 adultos sendo 56,06% (111/198) do gênero feminino e 43,94% (87/198) masculino, média de idade e desvio padrão de $47,95 \pm 14,53$; variando de 19 a 89 anos. Pacientes procedentes do interior representavam 60,60% (120/198) da amostra e da capital 39,40% (68/198). O grupo dos adultos é composto por 24 pacientes portadores de câncer gástrico (10,81%), 21 portadores de úlcera péptica (09,45%) e 153 pacientes com gastrite (77,27%). Tabela 4.

Tabela 4-Distribuição dos pacientes por sexo, idade (média e desvios-padrão), procedência e afecção gástrica (N= 198), Fortaleza, CE, 2020

Idade	47,95 ± 14,53 (19 a 89 anos)
Gênero	
Masculino	43,94% (87)
Feminino	56,06% (111)
Procedência	
Interior	60,60% (120)
Capital	39,40% (68)
Afecção gástrica	
Câncer Gástrico	12,12% (024)
Úlcera péptica	10,60% (021)
Gastrite	77,27% (153)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos 24 indivíduos assintomáticos e residentes na comunidade 50% (12/24) eram do sexo masculino e 50% (12/24) do feminino com média de idade e desvio padrão de $12,92 \pm 03,04$ e variando entre 8 a 18 anos, todos procedentes da capital (Tabela 5). No grupo das crianças não foi encontrada diferença entre sexo. Dos 12 indivíduos do sexo masculino 8%

(1/12) apresentavam cepas mutantes e dos 12 indivíduos do sexo feminino 16% (2/12) apresentavam mutação.

Tabela 5-Distribuição dos pacientes por sexo, idade (média e desvios-padrão) dos indivíduos assintomáticos residentes na comunidade (N= 24), Fortaleza, CE, 2020

Idade	12,92 ± 03,04 (8 a 18 anos)
Gênero	
Masculino	50% (12/24)
Feminino	50% (12/24)

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.2. Prevalência de resistência genotípica à claritromicina

No geral, a resistência genotípica primária à claritromicina foi detectada em 32 (14,4%) indivíduos (mutações pontuais A2142G e/ou A2143G). Sendo a resistência genotípica à claritromicina de 14,2% nos adultos e 12% nas crianças e adolescentes assintomáticos da comunidade. Não foi encontrada diferença com relação a gênero, procedência e idade.

Com relação às afecções gástricas foi observada uma maior prevalência de resistência à claritromicina nos pacientes portadores de gastrite que foi de 16,4% (25/153) seguido, respectivamente, pelos portadores de câncer gástrico com 12,50 %, (3/24) e pacientes com úlcera péptica com 5% (1/21). Quando comparamos gastrite versus úlcera péptica e gastrite versus câncer gástrico não encontramos diferença estatística entre os grupos como é observado na Tabela 6.

Tabela 6-Suscetibilidade do *H.pylori* à claritromicina utilizando RT-PCR segundo sexo, procedência e afecções gástricas nos adultos, (N= 198), Fortaleza, CE, 2020

	Resistente, n (%)	Susceptível, n (%)	<i>p value</i>
Gênero			
Masculino (86)	13 (15)	73 (85)	0,870
Feminino (112)	16 (14)	96 (86)	
Procedência			
Interior (113)	19 (17)	94 (83)	0,320
Capital (85)	10 (12)	75 (88)	
Afecção gástrica			
Câncer Gástrico (24)	3 (12,5)	21 (87,5)	0,126
Úlcera péptica (21)	1(05)	20 (95)	
Gastrite (153)	25 (16)	128 (84)	
Câncer gástrico e Gastrite			
Câncer Gástrico (24)	3 (20)	21 (80)	0,858
Gastrite (153)	25 (16)	128 (84)	
Úlcera péptica e Gastrite			
Úlcera péptica (21)	1 (05)	20 (95)	0,285
Gastrite (153)	25 (16)	128 (84)	

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.3. Mutações pontuais do gene 23S rRNA do *H.pylori*

Das 32 mutações encontradas na amostra avaliada 25 % (8/32) eram A2142G, 62,5% (20/32) A2143G, 12,5% (4/32) mutação pontual dupla (A2143G e A2142G). O A2143G (único ou combinado com A2142G) foi a mutação pontual mais prevalente respondendo por um total de 68,75% (22/32) cepas resistentes à claritromicina.

Das 32 cepas que apresentaram mutação, 14 (4,75%) eram heterorresistentes, ou seja, apresentaram um alelo mutante e outro selvagem (tabela 7).

Dos 198 adultos, 29 apresentaram mutação 14,6 %, sendo 24% (07/29) mutações A2142G, 62% (18/29) A2143G e 14% (04/29) mutações duplas.

Com relação ao gênero, encontramos no feminino 16 mutações: 3 A2142G, 12 A2143G e 1 dupla. No masculino 13 mutações: 4 A2142G, 6 A2143G e 3 duplas.

Nos portadores de câncer gástrico a taxa de prevalência foi 12,5% (3/24), sendo 2 mutações A2142G e 1 mutação dupla.

Nos pacientes com úlcera péptica a taxa de prevalência foi 5% (1/21) sendo 1 ponto de mutação A2142G.

Nos pacientes com gastrite a taxa de prevalência foi 16% (25/153), sendo 4 mutações A2142G, 18 mutações A2143G e 3 mutações dupla (tabela 7).

Das 29 cepas provenientes dos adultos que apresentaram mutação, em 12 (41%) foi observado heterorresistentes sendo 6 mutações A2142G, (6/7) 85,7% e 6 A2143G (6/18) 33% (tabela 7).

Tabela7-Perfil das mutações no gene 23s rRNA do *H.pylori* pelo método RT-PCR por gênero, status resistência e afecções gástricas nos adultos (N=198), Fortaleza, CE, 2020

	Mutação A2142G (07)	Mutação A2143G (18)	Mutação Dupla (4)
Gênero			
Masculino	57% (04)	33% (06)	75% (03)
Feminino	43% (03)	67% (13)	25% (01)
Status Resistência			
Homozigotos	14% (01)	67% (12)	-
Heterorresistentes	86% (06)	33% (06)	-
Afecção gástrica			
Câncer Gástrico	25% (02)	-	25% (01)
Úlcera	12,5% (01)	-	-
Gastrite	50% (04)	100% (18)	75% (03)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos 24 indivíduos assintomáticos residentes na comunidade 12% (3/24) apresentaram mutação sendo 33% (1/3) mutação A2142G e 67% (2/3) A2143G (tabela 8). Das 3 mutações duas eram heterorresistentes. Sendo 1 indivíduo de 10 anos homozigoto A2143G, 1 indivíduo de 12 anos heterozigoto A2142G e 1 indivíduo de 16 anos heterozigoto A2143G (tabela 8).

Tabela 8- Perfil das mutações no gene 23S rRNA do *H.pylori* pelo método RT-PCR por gênero, status resistência e idade nos indivíduos assintomáticos residentes na comunidade (N= 24), Fortaleza, CE, 2020

	Mutação A2142G (01)	Mutação A2143G (02)	Mutação Dupla (00)
Gênero			
Masculino	-	01 (50 %)	-
Feminino	01 (100 %)	01 (50 %)	-
Status Resistência			
Homozigotos	-	01 (50 %)	-
Heterorresistentes	01 (100 %)	01 (50 %)	-
Faixa etária			
≤ 13 anos	01 (100 %)	01 (50 %)	-
> 13 anos	-	01 (50 %)	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4. Correlação dos genótipos de virulência do *H.pylori* com as mutações pontuais do gene 23s rRNA que conferem resistência à claritromicina.

O gene *cagA* estava presente em 75,5% (167/222) da amostra avaliada. A prevalência de mutação nas cepas *cagA* positivas foi de 11,4% (19/167) e nas cepas *cagA* negativas foi de 23,6% (13/55) sendo essa diferença significativa estatisticamente ($p=0,025$ OR: 0,4 IC: 0,189-0,909). A mutação mais prevalente nas cepas *cagA* positivas e negativas foi A2143G (47% nas cepas *cagA* positivas e 85% *cagA* negativas) (tabela 9).

A prevalência do gene *cagE* foi de 61,26% (136/222). Das 136 cepas *cagE* positivas 14 (10,29%) apresentaram mutação e das 85 cepas *cagE* negativo 18 (21,17%) eram mutantes. Sendo essa diferença significativa estatisticamente ($p=0,025$ OR: 0,4 I.C:0,200-0,913). A mutação A2143G foi a mais prevalente estando presente em 7 das 14 *cagE* positivas e em 13 das 18 negativas (tabela 9).

A prevalência das cepas *iceA1* e *iceA2* foi de 14,86% (33/222) e 69,81% (155/222), respectivamente. No geral observamos uma maior prevalência de cepas mutantes nas cepas *iceA1* negativas 16% (30/189) do que nas cepas *iceA1* positivas 6% (2/33), mas sem

significância estatística (tabela 9). Nas cepas *iceA2* observamos praticamente a mesma prevalência de mutação pontual entre as cepas *iceA2* positivas (14%) e cepas *iceA2* negativas (15%) (tabela 9).

Tabela 9- Perfil das mutações no gene 23S rRNA pelo método Taq Man RT-PCR e genótipos *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2* do *H.pylori* (222), Fortaleza, CE, 2020

	Mutação Geral	Mutação A2142G(08)	Mutação A2143G (20)	Mutação Dupla (04)
<i>cag A</i> +(167)	19 (11,4%)	7 (4%)	9 (5%)	3 (1.8%)
<i>cag A</i> -(55)	13 (23,6%)	1 (2%)	11 (20%)	1 (1.8%)
<i>p value</i>	0,025	0,413	0,003	0,992
<i>OR (I.C 95%)</i>	0,7 (0,567-1,025)	-	-	-
<i>cag E</i> + (136)	14 (10%)	4 (3%)	7 (5%)	3 (2%)
<i>cag E</i> - (85)	18 (21%)	4 (5%)	13 (15%)	1 (1%)
<i>p value</i>	0,025	0,754	0,021	0,968
<i>OR (I.C 95%)</i>	0,6 (0,451-1,018)	-	-	-
<i>IceA1</i> +(33)	2 (6%)	0 (0%)	2 (6%)	0 (0%)
<i>IceA1</i> - (189)	30 (16%)	8 (4%)	18 (9,5%)	4 (2%)
<i>p value</i>	0,139	0,485	0,755	0,893
<i>OR (I.C 95%)</i>	-	-	-	-
<i>IceA2</i> + (155)	22 (14%)	5 (3%)	13 (8%)	4 (2%)
<i>IceA2</i> - (67)	10 (15%)	3 (5%)	7 (10,5%)	0 (0%)
<i>p value</i>	0,887	0,646	0,813	0,437
<i>OR (I.C 95%)</i>	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

No geral, o gene *vacA* não apresentou associação estatisticamente significativa em relação as cepas mutantes. Contudo, observamos uma maior tendência da mutação pontual A2143G nas cepas *vacAs2* e *vacAm2* positivas. A prevalência dessa mutação pontual nas cepas *vacAs1* positivas foi 7,5% (13/173) e negativas 14% (7/49). Nas cepas *vacAs2* positivas foi de 15% (4/26) e negativas de 8% (16/196). Nas cepas *vacAm1* positivas foi de 8,4% (15/178) e negativas de 11% (5/44). Nas cepas *vacAm2* positivas foi de 12% (5/42) e negativas de 8% (15/180).

Quanto aos mosaicos do gene *vacA*, o mais prevalente foi *s1m1* em 65% (145/222) seguido por *s1m2* 13,5% (30/222), *s2m1* 9% (20/222) e *s2m2* 8% (18/222) (tabela 8).

As cepas *vacA s1m1* (mais virulentas) apresentaram menor taxa de resistência, porém, sem significância estatística, onde a prevalência da mutação pontual A2143G nas cepas *vacA s1m1* positivas e negativas foi, respectivamente, 6% (9/145) e negativas 14% (11/77).

As cepas *vacAs2m2* (menos virulentas) apresentaram maior taxa de resistência, porém, sem significância estatística, onde a prevalência da mutação pontual A2143G nas cepas *vacA s2m2* positivas e negativas foi, respectivamente, 12% (3/18) e 8% (17/204).

Tabela 10- Perfil das mutações no gene 23s rRNA pelo método RT-PCR do vacA e mosaicos do *H.pylori* (222), Fortaleza, Ceará ,2020 Fortaleza,CE, 2020

	Mutação Geral	Mutação A2142G	Mutação A2143G	Mutação Dupla
<i>VacAs1</i> +(173)	24(14%)	7 (4%)	13 (7,5%)	4 (2%)
<i>VacAs1</i> -(49)	8(16%)	1 (2%)	7 (14%)	0 (0%)
<i>p value</i>	0,666			
<i>VacAs2</i> +(26)	4(15%)	0 (0%)	4(15%)	0 (0%)
<i>VacAs2</i> -(196)	28(14%)	8 (4%)	16 (8%)	4 (2%)
<i>p value</i>	0,999			
<i>VacAm1</i> +(178)	25 (14%)	6 (3%)	15 (8,4%)	4 (2%)
<i>VacAm1</i> -(44)	7 (16%)	2 (4,5%)	5 (11%)	0 (0%)
<i>p value</i>	0,941			
<i>VacAm2</i> +(42)	5(12%)	0 (0%)	5(12%)	0 (0%)
<i>VacAm2</i> -(180)	27 (15%)	8 (4,5%)	15 (8%)	4 (2,2%)
<i>p value</i>	0,787			
<i>VacAs1m1</i> +(145)	19 (13%)	6 (4%)	9 (6%)	4 (3%)
<i>VacAs1m1</i> -(77)	13 (17%)	2 (2,6%)	11 (14%)	0 (0%)
<i>p value</i>	0,574			
<i>VacAs1m2</i> +(30)	4(13%)	0 (0%)	4(13%)	0 (0%)
<i>VacAs1m2</i> -(192)	28 (14,5%)	8 (4%)	16 (8%)	4 (2%)
<i>p value</i>	0,999			
<i>VacAs2m1</i> +(20)	3 (15%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
<i>VacAs2m1</i> -(202)	29 (14,4%)	7 (3,5%)	19 (9,4%)	3 (2,6%)
<i>p value</i>	0,999			
<i>VacAs2m2</i> +(18)	3(17%)	0	3(17%)	0
<i>VacAs2m2</i> -(204)	29 (14%)	8 (4%)	17 (8%)	4 (2%)
<i>p value</i>	0,999			

Fonte: Elaborado pelo autor.

8. Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar a resistência do *H.pylori* à claritromicina através do método molecular RT-PCR em pacientes adultos (amostras de biópsias gástricas) e em uma amostra populacional (piloto) de crianças assintomáticas da comunidade (amostras de suco gástrico). Além do mais, avaliamos a correlação entre fatores de virulência do *H.pylori* e a resistência à claritromicina. Esse é o primeiro estudo realizado no Ceará, nordeste do Brasil, avaliando susceptibilidade de cepas do *H.pylori* à claritromicina.

Apesar da importância do tratamento do *H.pylori* e a crescente resistência da bactéria aos antimicrobianos, a maioria das diretrizes publicadas sobre o manejo da infecção por *H. pylori* não recomenda a realização de testes de suscetibilidade antes de tratar pacientes infectados pelo *H.pylori* (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; GISBERT *et al.*, 2017) (COELHO; MARINHO; GENTA; RIBEIRO *et al.*, 2018). A principal razão decorre do fato da cultura de *H. pylori* com pesquisa de CIM serem laboriosas, levar muito tempo para serem realizadas, terem baixa sensibilidade e maior custo-efetividade.

Tem sido publicado diversos estudos avaliando testes moleculares para detectar os pontos de mutação no gene *23S rRNA* que confere resistência do *H.pylori* à claritromicina. Dentre eles temos o Helico DR, PCR- RFLP e RT-PCR. Nesse trabalho utilizamos o Taq Man RT-PCR teste bastante utilizado na prática clínica para diagnóstico de diversos microrganismos como hepatite B, COVID-19 dentre outros.

A leitura dos pontos de mutação automatizada torna o teste mais simples e rápido de executar, evita erros de leitura, permite avaliar muitas amostras de uma só vez, e diminui o custo do teste. Além disso, temos vários laboratórios de referência que dispõe de equipamentos e pessoal treinado para realizar a técnica de RT-PCR.

O RT-PCR foi validado em vários estudos para detecção de resistência do *H.pylori* à claritromicina em biópsias gástricas, suco gástrico e fezes tendo sido demonstrado boa sensibilidade e especificidade quando comparado com a cultura e antibiograma (DE FRANCESCO; MARGIOTTA; ZULLO; HASSAN *et al.*, 2006) (SCALETSKY; ARANDA; GARCIA; GONCALVES *et al.*, 2011) (PENG; SONG; HE; LIN *et al.*, 2017).

No Brasil foi validado em biópsia gástrica de pacientes dispépticos e em fezes

provenientes de crianças que se submeteram à endoscopia com boa acurácia (LINS; LIMA; MAGALHAES, 2010) (SCALETSKY; ARANDA; GARCIA; GONCALVES *et al.*, 2011).

A prevalência de resistência à claritromicina ao *H.pylori* nas amostras obtidas dos adultos foi de 14,2%. O resultado é mais elevado que o reportado em estudo de metanálise na América Latina (12%) (CAMARGO; GARCIA; RIQUELME; OTERO *et al.*, 2014), porém, inferiores aos encontrados no Chile 31,3% (ARENAS; SERRANO; QUINONES; HARRIS *et al.*, 2019).

No Brasil, vários estudos têm avaliado a resistência à claritromicina através de métodos genotípicos. Nossos resultados são próximos aos encontrados em Recife (16%), Nordeste do Brasil, onde foram avaliadas 111 amostras utilizando RT-PCR mutação pontual A2142G e A2143G e A2142C (LINS; LIMA; MAGALHAES, 2010).

Em Belo Horizonte, estudo avaliando 72 amostras de pacientes adultos dispépticos através do PCR-RFLP encontrou uma taxa de 12,5% (MARTINS; SANCHES; MORETZSOHN; LIMA *et al.*, 2016).

Nossos resultados estão abaixo da prevalência geral de 16,9% relatada em estudo brasileiro avaliando amostras de quatro regiões diferentes no Brasil usando pontos de mutação pelo método PCR-RFLP A2142G e A2143G. Nesse estudo foram encontrados prevalência de 17,5% em Belo Horizonte; 16,6% em Salvador; 14,5% em Manaus; 19,2% em Goiânia e 19,1% em Porto Alegre (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016).

Ao contrário do que foi encontrado no presente estudo, Suzuki et al, em Marília-SP, foi relatado uma taxa prevalência de resistência à claritromicina de 2,46% utilizando RT-PCR (SUZUKI; LOPES; DA CAMARA LOPES; HUNG HO *et al.*, 2013).

A mutação A2143G/ A2147G foi a mais prevalente (62,5%) no presente estudo, seguida por A2142G (25%) e 12,5% de mutação dupla. Esses resultados são similares aos reportados por Prazeres Magalhães et al, em Belo Horizonte, onde foi encontrado 60% de mutações A2147G, 15% de A2146G e de 15% de ambas mutações (PRAZERES MAGALHAES; DE MAGALHAES QUEIROZ; CAMPOS BARBOSA; AGUIAR ROCHA *et al.*, 2002).

Estudo realizado, em Marília, São Paulo, também observou o predomínio da mutação A2147G (58%), seguida pela mutação A2146G em 25% dos casos resistentes à claritromicina (SUZUKI; LOPES; DA CAMARA LOPES; HUNG HO *et al.*, 2013). Um estudo realizado em

Recife e outro multicêntrico nacional também encontraram uma prevalência mais elevada da mutação A2143G, respectivamente, de 71,3% e de 90,4% (LINS; LIMA; MAGALHAES, 2010) (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016).

Outros países, como Bélgica (MIENDJE DEYI; BURETTE; BENTATOU; MAAROUFI *et al.*, 2011) e Coreia (HWANG; KIM; KIM; LEE *et al.*, 2010) (LEE; KIM; NAM; PARK *et al.*, 2014) também observaram maior prevalência da mutação A2143G. Entretanto, um estudo egípcio relata que a mutação A2142G foi mais frequente que a A2143G (HANSOMBURANA; ANANTAPANPONG; SIRINTHORNPUNYA; CHUENGYONG *et al.*, 2012).

As cepas heterorresistentes à claritromicina (presença de cepas selvagens e mutantes) representavam 43,75% (14/32) das cepas resistentes. Esse achado também tem sido registrado em outros estudos no Brasil. Em Recife 77,8% de cepas mutantes eram heterorresistentes (LINS; LIMA; MAGALHAES, 2010) e no estudo multicêntrico nacional 73,5% (61/83) (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016).

Na Espanha foi detectada heterorresistência em 51,3% das cepas mutantes (NAVARRO-JARABO; FERNANDEZ-SANCHEZ; FERNANDEZ-MORENO; HERVAS-MOLINA *et al.*, 2015) e na Itália em 76,3% das amostras resistentes (DE FRANCESCO; ZULLO; IERARDI; GIORGIO *et al.*, 2010).

Os estudos realizados no Brasil avaliando a resistência primária do *H.pylori* à claritromicina têm encontrado diferenças consideráveis que podem ser decorrentes do tamanho da amostra e/ou método utilizado.

Um Estudo realizado na cidade de Marília-SP, utilizando RT-PCR, apresentou taxa de prevalência de resistência à claritromicina de 2,46%, a mais baixa do país (SUZUKI; LOPES; DA CAMARA LOPES; HUNG HO *et al.*, 2013). Outro Estudo, em Porto Alegre, analisando 80 amostras relatou uma prevalência de 8,7% com métodos genotípicos (VIANNA; RAMIS; RAMOS; GASTAL *et al.*, 2018). Por outro lado, outro estudo realizado no mesmo centro utilizando o método molecular Helico DR relatou uma taxa de 19,1% de resistência primária à claritromicina (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016).

Importante ressaltar que podem existir discordâncias entre métodos genotípicos e fenotípicos de cultura com CIM. Esse fato pode ocorrer em decorrência de heterogeneidade das amostras (misto de resistência e susceptibilidade na mesma amostra) (DE FRANCESCO;

MARGIOTTA; ZULLO; HASSAN *et al.*, 2006). Assim como podem ser atribuídas a alterações genotípicas sem expressão no fenótipo, resistência fenotípica por mutações pontuais não pesquisadas, outros mecanismos genotípicos responsáveis pela resistência bacteriana como bombas de efluxo associadas ao gene *hefA* (ZHANG; LIU; ZHENG; TANG *et al.*, 2010) e metilação de RNA (LECLERCQ; COURVALIN, 1991).

Com relação aos métodos genotípicos é importante ressaltar as mutações pontuais nas posições 2143 (A a G) e 2142 (A a G ou C) que são responsáveis por 90% dos casos de resistência à claritromicina (OLEASTRO; MENARD; SANTOS; LAMOULIATTE *et al.*, 2003).

Além disso, a presença da mutação A2143G está fortemente associada à falha da terapia de erradicação do *H.pylori* (DE FRANCESCO; ZULLO; IERARDI; GIORGIO *et al.*, 2009).

Na maioria dos trabalhos a prevalência da mutação pontual A2142G é mais baixa (LINS; LIMA; MAGALHAES, 2010) (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016) (MATTA; ZAMBRANO; PAZOS, 2018). Contudo, tanto a mutação A2142G como a A2143G, avaliadas no presente estudo, são comumente encontradas em pacientes os quais a base do tratamento é a claritromicina e que, posteriormente, continuaram infectados por falha no esquema terapêutico (MEGRAUD, 2004) (DE FRANCESCO; ZULLO; IERARDI; GIORGIO *et al.*, 2010) (SAKINC; BAARS; WUPPENHORST; KIST *et al.*, 2012) (SMITH; O'MORAIN; MCNAMARA, 2014).

A resistência à claritromicina foi mais prevalente em pacientes portadores de gastrite 16% (25/153) que nos pacientes com úlcera péptica 5% (1/21), mas sem significância estatística. A prevalência nos portadores de câncer gástrico foi de 12,5 % (03/24), similar a prevalência dos portadores de gastrite. Também sem diferença estatística.

Estudo realizado por Baglan *et al.* encontraram maior prevalência de resistência entre pacientes portadores de úlcera péptica 40,9% (9/22) do que na dispepsia funcional 24,6% (16/65) (BAGLAN; BOZDAYI; OZKAN; AHMED *et al.*, 2006).

No atual trabalho não houve diferença estatística entre o gênero e faixa etária em relação à resistência à claritromicina. Martins *et al.*, Belo Horizonte, Brasil, analisando uma amostra com 47 (65%) mulheres e 25 (35%) homens, também obtiveram resultados semelhantes (MARTINS; SANCHES; MORETZSOHN; LIMA *et al.*, 2016). No entanto, Sanches *et al.*, em um estudo multicêntrico, Brasil, não encontraram diferença entre faixas etárias, mas sim entre

gêneros, onde avaliando uma amostra de 314 (64%) mulheres e 176 (36%) homens observaram cepas mais resistentes no gênero feminino (SANCHES; MARTINS; LIMA; COTA *et al.*, 2016).

O presente estudo é o primeiro a avaliar resistência à claritromicina em crianças assintomáticas da comunidade através da análise de suco gástrico obtido por enteroteste. A resistência do *H.pylori* à claritromicina estava presente em 12% das cepas sem diferença estatística com relação ao percentual encontrado nos adultos (14,2%).

Essa prevalência está abaixo da reportada em estudos realizados em São Paulo, sudeste do Brasil, utilizando métodos fenotípicos e genotípicos, onde foram encontradas taxas de 27% (12/45) de cepas resistentes em biópsias gástricas por Garcia et al (GARCIA; ARANDA; GONCALVES; CARDOSO *et al.*, 2010), de 26,7% (12/45) em amostras de fezes por Scaletsky et al (SCALETSKY; ARANDA; GARCIA; GONCALVES *et al.*, 2011) e de 19,5% (15/77) também em biópsias gástricas por Ogata et al (OGATA; GALES; KAWAKAMI, 2014). Todos esses estudos foram realizados em crianças e adolescentes com sintomas gastrointestinais que se submeteram a endoscopia para elucidação diagnóstica.

Supõe-se que a prevalência de resistência à claritromicina seja maior nas crianças com sintomas gastrointestinais, estudadas em São Paulo, pelo fato da possível utilização prévia de antibióticos nessa faixa etária. Possivelmente a menor prevalência encontrada nas crianças do atual estudo se deva ao fato de ter sido incluído crianças assintomáticas da comunidade.

A associação entre fatores de virulência de *H.pylori* e resistência à claritromicina foi avaliada em várias pesquisas. Apresentando resultados divergentes (GODOY; RIBEIRO; BENVENGO; VITIELLO *et al.*, 2003) (VEGA; CORTIÑAS; PUIG; SILVA, 2010) (KARABIBER; SELIMOGLU; OTLU; YILDIRIM *et al.*, 2014).

Neste estudo, a prevalência geral de cepas *cagA* positivas foi de 75,5%. A mutação do gene 23S rRNA foi encontrada em 11% das cepas *cagA* positivas, enquanto que nas cepas *cagA* negativas foi de 23%. Sendo esse dado foi estatisticamente significante. Logo, a susceptibilidade à claritromicina está mais presente nas cepas *cagA* positivas. Outros trabalhos também corroboram com esse achado (BRENNAN; DOWD; O'MORAIN; MCNAMARA *et al.*, 2018) (VIANNA; RAMIS; RAMOS; GASTAL *et al.*, 2018), enquanto outros estudos encontraram que a presença do gene *cagA* não está associado à susceptibilidade das cepas à claritromicina (GODOY; RIBEIRO; BENVENGO; VITIELLO *et al.*, 2003) (KARABIBER; SELIMOGLU; OTLU; YILDIRIM *et al.*, 2014).

Em um trabalho de revisão, Sugimoto et. al, mostraram que a eficácia do tratamento foi menor em pacientes infectados com cepas gene *cagA* negativos e *vacAs2* positivos. Eles concluíram que o sucesso do tratamento é maior naqueles infectados com cepas mais virulentas (SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009).

Tem sido postulado que cepas *cagA* positivas, genótipo mais virulento, podem alterar em uma proporção maior o epitélio gástrico sendo possível que os antibióticos atinjam maiores concentrações na mucosa inflamada (KHAN; FAROOQUI; MANZOOR; AKHTAR *et al.*, 2012). Outra hipótese é que cepas mais virulentas se replicam mais rapidamente e assim estão mais susceptíveis ao mecanismo de ação do antimicrobiano (SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009).

No nosso estudo a prevalência do gene *cagE* foi de 61,26% (136/222). As cepas gene *cagE* positivas foram significativamente associadas com a ausência das mutações pontuais que conferem resistência à bactéria, ou seja, são mais susceptíveis à claritromicina. Em contraste, Karabiber et al, na Turquia, avaliando 98 cepas em crianças por método fenotípico observaram que as cepas *cagE* positivas estavam associadas a resistência à claritromicina (KARABIBER; SELIMOGLU; OTLU; YILDIRIM *et al.*, 2014). No entanto, Godoy et al, São Paulo, Brasil, analisando 23 cepas resistentes à claritromicina por método fenotípico em adultos não achou associação entre gene *cagE* e susceptibilidade à claritromicina (GODOY; RIBEIRO; BENVENGO; VITIELLO *et al.*, 2003).

Com relação ao gene *iceA*, nossos resultados mostram uma maior prevalência de cepas *iceA2* (82,44%). Yamaoka et al, já haviam relatado em estudos prévios que as cepas ocidentais tinham maior prevalência do gene *iceA2* e nos países asiáticos a prevalência de cepas *iceA1* (YAMAOKA; KODAMA; GUTIERREZ; KIM *et al.*, 1999). Quando correlacionamos cepas *iceA2* positivas com as mutações pontuais A2142G e A2143G, não observamos associação estatisticamente significativa, similarmente ao que é reportado em outros estudos conduzidos na Turquia (BAGLAN; BOZDAYI; OZKAN; AHMED *et al.*, 2006), e no sudeste do Brasil (GODOY; RIBEIRO; BENVENGO; VITIELLO *et al.*, 2003).

No presente estudo não foi encontrada associação entre os genótipos *vacA* e alelos com pontos de mutação que conferem resistência às cepas. Resultado similar foi reportado no sudeste do país utilizando método fenotípico (GODOY; RIBEIRO; BENVENGO; VITIELLO *et al.*, 2003). Por outro lado, outros estudos mostram que pacientes infectados com cepas gene *vacAs1* positivas estão associados com maior índice de erradicação do *H.pylori* (GARCIA;

ARANDA; GONCALVES; CARDOSO *et al.*, 2010) (KARABIBER; SELIMOGLU; OTLU; YILDIRIM *et al.*, 2014).

Esse estudo tem algumas limitações. O número de crianças envolvidas é pequeno, porém trata-se de amostras de crianças assintomáticas da comunidade.

Apesar da detecção molecular do *H.pylori* no suco gástrico ter sido validado previamente pelo nosso grupo, não validamos a detecção da resistência à claritromicina na amostra estudada. Contudo, tem sido demonstrada na literatura completa concordância nas prevalências encontradas pelo RT-PCR nas amostras coletadas em suco gástrico, nas biópsias e na cultura (PENG; SONG; HE; LIN *et al.*, 2017).

Outro ponto não ter comparado a detecção da resistência da claritromicina com métodos fenotípicos, entretanto a acurácia do RT-PCR na detecção da resistência da claritromicina já foi amplamente avaliada em outros estudos. Além do mais o método RT-PCR que utilizamos foi devidamente padronizado com cepas resistentes e sensíveis à claritromicina por método fenotípico.

Esse estudo demonstra que a taxa de resistência à claritromicina ainda está em nível aceitável para se utilizar, empiricamente, o esquema padrão contendo claritromicina para erradicação do *H.pylori* na nossa região. Contudo, está próximo do limite de 15% estipulado pelos consensos (MALFERTHEINER; MEGRAUD; O'MORAIN; GISBERT *et al.*, 2017).

Lembrando que a tendência é um aumento dessa prevalência como é observado em outras partes do mundo (ALBA; BLANCO; ALARCON, 2017). E como a claritromicina é a base no tratamento do *H.pylori* a tendência é uma pressão seletiva para o desenvolvimento de cepas mais resistentes a esse antimicrobiano (MARQUES; VITOR; SANTOS; OLEASTRO *et al.*, 2020).

Necessitando assim de estudos futuros para uma análise comparativa e provável mudança de protocolo de tratamento do *H.pylori* na nossa região.

Nossos resultados estão de acordo com alguns trabalhos achados na literatura que mostram que cepas mais virulentas do *H.pylori* (gene *cagA* e *cagE* positivas) têm menos mutações pontuais que conferem resistência da bactéria à claritromicina.

Possivelmente esses indivíduos infectados com cepas virulentas são mais susceptíveis ao tratamento anti-*H.pylori* contendo claritromicina. Outros estudos serão

necessários para se avaliar o uso do enteroteste e o RT-PCR na detecção de resistência à claritromicina na prática clínica.

9. Conclusões

A mutação pontual mais predominante foi a A2143G (62,5%) seguida de A2142G (25%). A mutação pontual dupla foi encontrada (A2143G e A2142G) em 12,5% das cepas resistentes.

Foi observada resistência genotípica primária do *H.pylori* à claritromicina em 14,4% das cepas analisadas. Sendo 14,2% provenientes de adultos e 12% de crianças da comunidade.

As cepas mais virulentas do *H.pylori* (gene *cagA* e *cagE* positivas) apresentaram menor prevalência das mutações pontuais A2143G e A2142G que conferem resistência do *H.pylori* à claritromicina.

Não foi encontrada associação entre mutações pontuais A2143G e A2142G com os genótipos *vacA* e alelos, *iceA1* e *iceA2*.

As cepas heterorresistentes (misto de cepas selvagens e mutantes) foram encontradas em 43,75% das cepas de *H.pylori*.

Não foi observado correlação entre sexo, idade, procedência e afecções gástricas com susceptibilidade das cepas de *H.pylori* à claritromicina nos adultos.

Nas crianças não teve correlação com relação ao gênero.

10. Referências

AKOPYANTS, N. S.; CLIFTON, S. W.; KERSULYTE, D.; CRABTREE, J. E. *et al.* Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol**, 28, n. 1, p. 37-53, Apr 1998. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

ALARCON, T.; URRUZUNO, P.; MARTINEZ, M. J.; DOMINGO, D. *et al.* Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 35, n. 5, p. 278-282, May 2017.

ALBA, C.; BLANCO, A.; ALARCON, T. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Curr Opin Infect Dis**, 30, n. 5, p. 489-497, Oct 2017.

ARENAS, A.; SERRANO, C.; QUINONES, L.; HARRIS, P. *et al.* High prevalence of clarithromycin resistance and effect on *Helicobacter pylori* eradication in a population from Santiago, Chile: cohort study and meta-analysis. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 20070, Dec 27 2019. Research Support, Non-U.S. Gov't.

ATHERTON, J. C.; CAO, P.; PEEK, R. M., JR.; TUMMURU, M. K. *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem**, 270, n. 30, p. 17771-17777, Jul 28 1995. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

BACKERT, S.; CHURIN, Y.; MEYER, T. F. *Helicobacter pylori* type IV secretion, host cell signalling and vaccine development. **Keio J Med**, 51 Suppl 2, p. 6-14, Dec 2002. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

BAGLAN, P. H.; BOZDAYI, G.; OZKAN, M.; AHMED, K. *et al.* Clarithromycin resistance prevalence and IcaA gene status in *Helicobacter Pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. **J Microbiol**, 44, n. 4, p. 409-416, Aug 2006. Research Support, Non-U.S. Gov't.

BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J Clin Invest**, 113, n. 3, p. 321-333, Feb 2004. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
Review.

BOYANOVA, L.; MARKOVSKA, R.; YORDANOV, D.; GERGOVA, G. *et al.* Clarithromycin Resistance Mutations in *Helicobacter pylori* in Association with Virulence Factors and Antibiotic Susceptibility of the Strains. **Microb Drug Resist**, 22, n. 3, p. 227-232, Apr 2016.

BRAGA, L. L.; OLIVEIRA, M. A.; GONCALVES, M. H.; CHAVES, F. K. *et al.* CagA phosphorylation EPIYA-C motifs and the vacA i genotype in *Helicobacter pylori* strains of asymptomatic children from a high-risk gastric cancer area in northeastern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 109, n. 8, p. 1045-1049, Dec 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

BRENNAN, D. E.; DOWD, C.; O'MORAIN, C.; MCNAMARA, D. *et al.* Can bacterial virulence factors predict antibiotic resistant *Helicobacter pylori* infection? **World J Gastroenterol**, 24, n. 9, p. 971-981, Mar 7 2018.

BROUTET, N.; TCHAMGOUE, S.; PEREIRA, E.; LAMOULIATTE, H. *et al.* Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy--results of an individual data analysis of 2751 patients. **Aliment Pharmacol Ther**, 17, n. 1, p. 99-109, Jan 2003. Meta-Analysis
Research Support, Non-U.S. Gov't.

BUTI, L.; SPOONER, E.; VAN DER VEEN, A. G.; RAPPUOLI, R. *et al.* *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 22, p. 9238-9243, May 31 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CADAMURO, A. C.; ROSSI, A. F.; MANIEZZO, N. M.; SILVA, A. E. *Helicobacter pylori* infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs. **World J Gastroenterol**, 20, n. 6, p. 1424-1437, Feb 14 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

CAMARGO, M. C., A. GARCIA, A. RIQUELME, W. OTERO, C. A. CAMARGO, T. HERNANDEZ-GARCIA, R. CANDIA, M. G. BRUCE, AND C. S. RABKIN. . 'The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America'. **Am J Gastroenterol**, 109, p. 485-495, 2014.

CAMARGO, M. C.; GARCIA, A.; RIQUELME, A.; OTERO, W. *et al.* The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. **Am J Gastroenterol**, 109, n. 4, p. 485-495, Apr 2014. Meta-Analysis
Research Support, N.I.H., Intramural
Review
Systematic Review.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J. E. *et al.* cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 25, p. 14648-14653, Dec 10 1996. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHINESE SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY, C. S. G. O. H. P.; LIU, W. Z.; XIE, Y.; CHENG, H. *et al.* Fourth Chinese National Consensus Report on the management of

Helicobacter pylori infection. **J Dig Dis**, 14, n. 5, p. 211-221, May 2013. Consensus Development Conference
Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHOI, I. J.; KIM, C. G.; LEE, J. Y.; KIM, Y. I. *et al.* Family History of Gastric Cancer and Helicobacter pylori Treatment. **N Engl J Med**, 382, n. 5, p. 427-436, Jan 30 2020. Randomized Controlled Trial
Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHUNG, C.; OLIVARES, A.; TORRES, E.; YILMAZ, O. *et al.* Diversity of VacA intermediate region among Helicobacter pylori strains from several regions of the world. **J Clin Microbiol**, 48, n. 3, p. 690-696, Mar 2010. Comparative Study
Research Support, N.I.H., Extramural.

COELHO, L. G. V.; MARINHO, J. R.; GENTA, R.; RIBEIRO, L. T. *et al.* Ivth Brazilian Consensus Conference on Helicobacter Pylori Infection. **Arq Gastroenterol**, 55, n. 2, p. 97-121, Apr-Jun 2018. Consensus Development Conference.

DABIRI, H.; JAFARI, F.; BAGHAEI, K.; SHOKRZADEH, L. *et al.* Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, oipA, iceA, babA2 and babB genotypes in Iranian dyspeptic patients. **Microb Pathog**, 105, p. 226-230, Apr 2017.

DE FRANCESCO, V.; MARGIOTTA, M.; ZULLO, A.; HASSAN, C. *et al.* Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of Helicobacter pylori. **Ann Intern Med**, 144, n. 2, p. 94-100, Jan 17 2006. Multicenter Study
Randomized Controlled Trial
Research Support, Non-U.S. Gov't.

DE FRANCESCO, V.; ZULLO, A.; IERARDI, E.; GIORGIO, F. *et al.* Phenotypic and genotypic Helicobacter pylori clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. **J Antimicrob Chemother**, 65, n. 2, p. 327-332, Feb 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

DE FRANCESCO, V.; ZULLO, A.; IERARDI, E.; GIORGIO, F. *et al.* The A2143G point mutation of clarithromycin resistance affects Helicobacter pylori eradication. **J Clin Gastroenterol**, 43, n. 4, p. 386, Apr 2009. Letter.

DIXON, M. F.; GENTA, R. M.; YARDLEY, J. H.; CORREA, P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol**, 20, n. 10, p. 1161-1181, Oct 1996. Consensus Development Conference
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

FALLONE, C. A., BEECH R, BARKUN A, ET AL. The Helicobacter pylori cagE gene is associated with gastroduodenal disease [abstract]. **Can J Gastroenterol**, 12, p. 111A, 1998.

GARCIA, G. T.; ARANDA, K. R.; GONCALVES, M. E.; CARDOSO, S. R. *et al.* High prevalence of clarithromycin resistance and *cagA*, *vacA*, *iceA2*, and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian children. **J Clin Microbiol**, 48, n. 11, p. 4266-4268, Nov 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

GEHLOT, V.; MAHANT, S.; MUKHOPADHYAY, A. K.; DAS, K. *et al.* Low prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolates with A2143G point mutation in the 23S rRNA gene in North India. **J Glob Antimicrob Resist**, 6, p. 39-43, Sep 2016.

GODOY, A. P.; RIBEIRO, M. L.; BENVENGO, Y. H.; VITIELLO, L. *et al.* Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. **BMC Gastroenterol**, 3, p. 20, Aug 11 2003. Research Support, Non-U.S. Gov't.

GONCALVES, M. H.; SILVA, C. I.; BRAGA-NETO, M. B.; FIALHO, A. B. *et al.* *Helicobacter pylori* virulence genes detected by string PCR in children from an urban community in northeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, 51, n. 3, p. 988-989, Mar 2013. Research Support, Non-U.S. Gov't.

GONZALEZ-HORMAZABAL, P.; MUSLEH, M.; ESCANDAR, S.; VALLADARES, H. *et al.* Prevalence of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* in Santiago, Chile, estimated by real-time PCR directly from gastric mucosa. **BMC Gastroenterol**, 18, n. 1, p. 91, Jun 20 2018.

GONZÁLEZ-VÁZQUEZ R, C.-E. M., ESCAMILLA-GUTIÉRREZ A, ET AL. . Frequency of virulence genes in mixed infections with *Helicobacter pylori* strains from a Mexican population. **Rev Gastroenterol Mex.**, 81, p. 11–20, 2016.

GRAHAM, D. Y. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 20, n. 18, p. 5191-5204, May 14 2014.

HANDA, O.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. CagA protein of *Helicobacter pylori*: a hijacker of gastric epithelial cell signaling. **Biochem Pharmacol**, 73, n. 11, p. 1697-1702, Jun 1 2007.

HANSOMBURANA, P.; ANANTAPANPONG, S.; SIRINTHORNPUNYA, S.; CHUENGYONG, K. *et al.* Prevalence of single nucleotide mutation in clarithromycin resistant gene of *Helicobacter pylori*: a 32-months prospective study by using hybridization real time polymerase chain reaction. **J Med Assoc Thai**, 95 Suppl 3, p. S28-35, Mar 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

HIGASHI, H.; TSUTSUMI, R.; FUJITA, A.; YAMAZAKI, S. *et al.* Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 22, p. 14428-14433, Oct 29 2002. Research Support, Non-U.S. Gov't.

HO, S. L.; TAN, E. L.; SAM, C. K.; GOH, K. L. Clarithromycin resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia. **J Dig Dis**, 11, n. 2, p. 101-105, Apr 2010.

HOLTON, J. Clinical relevance of culture: why, how, and when. **Helicobacter**, 2 Suppl 1, p. S25-33, Jul 1997. Review.

HOOI, J. K. Y.; LAI, W. Y.; NG, W. K.; SUEN, M. M. Y. *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, 153, n. 2, p. 420-429, Aug 2017.

HWANG, T. J.; KIM, N.; KIM, H. B.; LEE, B. H. *et al.* Change in antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea. **J Clin Gastroenterol**, 44, n. 8, p. 536-543, Sep 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

JANULAITYTE-GUNTHER, D.; KUPCINSKAS, L.; PAVILONIS, A.; VALUCKAS, K. *et al.* Combined serum IgG response to *Helicobacter pylori* VacA and CagA predicts gastric cancer. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 50, n. 2, p. 220-225, Jul 2007. Research Support, Non-U.S. Gov't.

KARABIBER, H.; SELIMOGLU, M. A.; OTLU, B.; YILDIRIM, O. *et al.* Virulence factors and antibiotic resistance in children with *Helicobacter pylori* gastritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 58, n. 5, p. 608-612, May 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

KHAN, A.; FAROOQUI, A.; MANZOOR, H.; AKHTAR, S. S. *et al.* Antibiotic resistance and *cagA* gene correlation: a looming crisis of *Helicobacter pylori*. **World J Gastroenterol**, 18, n. 18, p. 2245-2252, May 14 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

KIM, J. M.; KIM, J. S.; JUNG, H. C.; SONG, I. S. *et al.* Virulence factors of *Helicobacter pylori* in Korean isolates do not influence proinflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human gastric epithelial cells, nor do these factors influence the clinical outcome. **J Gastroenterol**, 35, n. 12, p. 898-906, Dec 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't.

KO, S. W.; KIM, Y. J.; CHUNG, W. C.; LEE, S. J. Bismuth supplements as the first-line regimen for *Helicobacter pylori* eradication therapy: Systemic review and meta-analysis. **Helicobacter**, 24, n. 2, p. e12565, Apr 2019. Meta-Analysis Systematic Review.

LAUENER, F. N.; IMKAMP, F.; LEHOURS, P.; BUISSONNIERE, A. *et al.* Genetic Determinants and Prediction of Antibiotic Resistance Phenotypes in *Helicobacter pylori*. **J Clin Med**, 8, n. 1, Jan 7 2019.

LAUREN, P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**, 64, p. 31-49, 1965.

LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrob Agents Chemother**, 35, n. 7, p. 1267-1272, Jul 1991. Review.

LEE, J. W.; KIM, N.; NAM, R. H.; PARK, J. H. *et al.* GenoType HelicoDR test in the determination of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea. **Scand J Gastroenterol**, 49, n. 9, p. 1058-1067, Sep 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

LEE, L. G.; CONNELL, C. R.; BLOCH, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Res**, 21, n. 16, p. 3761-3766, Aug 11 1993.

LETLEY, D. P.; RHEAD, J. L.; TWELLS, R. J.; DOVE, B. *et al.* Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem**, 278, n. 29, p. 26734-26741, Jul 18 2003. Research Support, Non-U.S. Gov't.

LIMA, V. P.; SILVA-FERNANDES, I. J.; ALVES, M. K.; RABENHORST, S. H. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. **Cancer Epidemiol**, 35, n. 5, p. e32-37, Oct 2011.

LINS, A. K.; LIMA, R. A.; MAGALHAES, M. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Recife, Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. **Arq Gastroenterol**, 47, n. 4, p. 379-382, Oct-Dec 2010.

LIU, J. M.; CHANG, C. Y.; CHEN, M. J.; CHEN, C. C. *et al.* The Primary Resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan after the National Policy to Restrict Antibiotic Consumption and Its Relation to Virulence Factors-A Nationwide Study. **PLoS One**, 10, n. 5, p. e0124199, 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MAIXNER, F.; KRAUSE-KYORA, B.; TURAEV, D.; HERBIG, A. *et al.* The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman. **Science**, 351, n. 6269, p. 162-165, Jan 8 2016. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C. A.; ATHERTON, J. *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. **Gut**, 61, n. 5, p. 646-664, May 2012. Consensus Development Conference
Practice Guideline
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C. A.; GISBERT, J. P. *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. **Gut**, 66, n. 1, p. 6-30, Jan 2017. Consensus Development Conference
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MANENTE, L.; PERNA, A.; BUOMMINO, E.; ALTUCCI, L. *et al.* The Helicobacter pylori's protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. **J Cell Physiol**, 214, n. 3, p. 582-587, Mar 2008. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MARQUES, A. T.; VITOR, J. M. B.; SANTOS, A.; OLEASTRO, M. *et al.* Trends in Helicobacter pylori resistance to clarithromycin: from phenotypic to genomic approaches. **Microb Genom**, 6, n. 3, Mar 2020. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

MARSHALL, B. J.; BARRETT, L. J.; PRAKASH, C.; MCCALLUM, R. W. *et al.* Urea protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of acid. **Gastroenterology**, 99, n. 3, p. 697-702, Sep 1990.

MARTINS, G. M.; SANCHES, B. S.; MORETZSOHN, L. D.; LIMA, K. S. *et al.* Molecular Detection of Clarithromycin and Fluoroquinolones Resistance in Helicobacter Pylori Infection, Directly Applied to Gastric Biopsies, in an Urban Brazilian Population. **Arq Gastroenterol**, 53, n. 2, p. 113-117, Apr-Jun 2016.

MATTA, A. J.; ZAMBRANO, D. C.; PAZOS, A. J. Punctual mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori in Colombian populations. **World J Gastroenterol**, 24, n. 14, p. 1531-1539, Apr 14 2018.

MCCOLL, K. E. Clinical practice. Helicobacter pylori infection. **N Engl J Med**, 362, n. 17, p. 1597-1604, Apr 29 2010. Review.

MEGRAUD, F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. **Gut**, 53, n. 9, p. 1374-1384, Sep 2004. Review.

MEGRAUD, F. Current recommendations for Helicobacter pylori therapies in a world of evolving resistance. **Gut Microbes**, 4, n. 6, p. 541-548, Nov-Dec 2013. Review.

MEGRAUD, F.; LEHOURS, P. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**, 20, n. 2, p. 280-322, Apr 2007. Review.

MIENDJE DEYI, V. Y.; BURETTE, A.; BENTATOU, Z.; MAAROUFI, Y. *et al.* Practical use of GenoType(R) HelicoDR, a molecular test for Helicobacter pylori detection and susceptibility testing. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 70, n. 4, p. 557-560, Aug 2011. Comparative Study Evaluation Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MONTECUCCO, C.; RAPPUOLI, R. Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2, n. 6, p. 457-466, Jun 2001. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

NAVARRO-JARABO, J. M.; FERNANDEZ-SANCHEZ, F.; FERNANDEZ-MORENO, N.; HERVAS-MOLINA, A. J. *et al.* Prevalence of Primary Resistance of *Helicobacter pylori* to Clarithromycin and Levofloxacin in Southern Spain. **Digestion**, 92, n. 2, p. 78-82, 2015. Multicenter Study.

NDIP, R. N.; MACKAY, W. G.; FARTHING, M. J.; WEAVER, L. T. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 36, n. 5, p. 616-622, May 2003. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

NISHIZAWA, T.; MAEKAWA, T.; WATANABE, N.; HARADA, N. *et al.* Clarithromycin Versus Metronidazole as First-line *Helicobacter pylori* Eradication: A Multicenter, Prospective, Randomized Controlled Study in Japan. **J Clin Gastroenterol**, 49, n. 6, p. 468-471, Jul 2015. Comparative Study
Multicenter Study
Randomized Controlled Trial
Research Support, Non-U.S. Gov't.

NOTO, J. M.; PEEK, R. M., JR. The *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island. **Methods Mol Biol**, 921, p. 41-50, 2012. Review.

O'MORAIN, N. R.; DORE, M. P.; O'CONNOR, A. J. P.; GISBERT, J. P. *et al.* Treatment of *Helicobacter pylori* infection in 2018. **Helicobacter**, 23 Suppl 1, p. e12519, Sep 2018. Review.

OGATA, S. K.; GALES, A. C.; KAWAKAMI, E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. **Braz J Microbiol**, 45, n. 4, p. 1439-1448, 2014. Comparative Study
Evaluation Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

OLEASTRO, M.; MENARD, A.; SANTOS, A.; LAMOULIATTE, H. *et al.* Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, 41, n. 1, p. 397-402, Jan 2003.

PANAYOTOPOULOU, E. G.; SGOURAS, D. N.; PAPADAKOS, K.; KALLIAROPOULOS, A. *et al.* Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. **J Clin Microbiol**, 45, n. 2, p. 488-495, Feb 2007. Evaluation Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

PARK, C. G.; KIM, S.; LEE, E. J.; JEON, H. S. *et al.* Clinical relevance of point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* eradication: A prospective, observational study. **Medicine (Baltimore)**, 97, n. 33, p. e11835, Aug 2018.

PEEK, R. M., JR.; THOMPSON, S. A.; DONAHUE, J. P.; THAM, K. T. *et al.* Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated

with clinical outcome. **Proc Assoc Am Physicians**, 110, n. 6, p. 531-544, Nov-Dec 1998.
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

PENG, X.; SONG, Z.; HE, L.; LIN, S. *et al.* Gastric Juice-Based Real-Time PCR for Tailored Helicobacter Pylori Treatment: A Practical Approach. **Int J Med Sci**, 14, n. 6, p. 595-601, 2017.

PEREZ-PEREZ, G. I.; ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, 9 Suppl 1, p. 1-6, 2004.

PODZORSKI, R. P.; PODZORSKI, D. S.; WUERTH, A.; TOLIA, V. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in Helicobacter pylori from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 46, n. 2, p. 83-88, Jun 2003.
Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

PRAZERES MAGALHAES, P.; DE MAGALHAES QUEIROZ, D. M.; CAMPOS BARBOSA, D. V.; AGUIAR ROCHA, G. *et al.* Helicobacter pylori primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, 46, n. 6, p. 2021-2023, Jun 2002.
Research Support, Non-U.S. Gov't.

RICCI, V.; SOMMI, P.; FIOCCA, R.; ROMANO, M. *et al.* Helicobacter pylori vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. **J Pathol**, 183, n. 4, p. 453-459, Dec 1997.
Research Support, Non-U.S. Gov't.

RODRIGUES, M. N.; QUEIROZ, D. M.; BEZERRA FILHO, J. G.; PONTES, L. K. *et al.* Prevalence of Helicobacter pylori infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 16, n. 2, p. 201-205, Feb 2004.

ROMANO, M.; RICCI, V.; ZARRILLI, R. Mechanisms of disease: Helicobacter pylori-related gastric carcinogenesis--implications for chemoprevention. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, 3, n. 11, p. 622-632, Nov 2006. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

SAKINC, T.; BAARS, B.; WUPPENHORST, N.; KIST, M. *et al.* Influence of a 23S ribosomal RNA mutation in Helicobacter pylori strains on the in vitro synergistic effect of clarithromycin and amoxicillin. **BMC Res Notes**, 5, p. 603, Oct 30 2012.

SANCHES, B. S.; MARTINS, G. M.; LIMA, K.; COTA, B. *et al.* Detection of Helicobacter pylori resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: A national survey. **World J Gastroenterol**, 22, n. 33, p. 7587-7594, Sep 7 2016.

SAVOLDI, A.; CARRARA, E.; GRAHAM, D. Y.; CONTI, M. *et al.* Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. **Gastroenterology**, 155, n. 5, p. 1372-1382.e1317, 2018/11/01/ 2018.

SCALETISKY, I. C.; ARANDA, K. R.; GARCIA, G. T.; GONCALVES, M. E. *et al.* Application of real-time PCR stool assay for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in Brazilian children. **Helicobacter**, 16, n. 4, p. 311-315, Aug 2011. Evaluation Study Research Support, Non-U.S. Gov't.

SEGAL, E. D.; CHA, J.; LO, J.; FALKOW, S. *et al.* Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96, n. 25, p. 14559-14564, Dec 7 1999. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

SHIOTA, S.; WATADA, M.; MATSUNARI, O.; IWATANI, S. *et al.* *Helicobacter pylori* iceA, clinical outcomes, and correlation with cagA: a meta-analysis. **PLoS One**, 7, n. 1, p. e30354, 2012. Meta-Analysis
Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.

SMITH, S. M.; O'MORAIN, C.; MCNAMARA, D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. **World J Gastroenterol**, 20, n. 29, p. 9912-9921, Aug 7 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

STONE, G. G.; SHORTRIDGE, D.; FLAMM, R. K.; VERSALOVIC, J. *et al.* Identification of a 23S rRNA gene mutation in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, 1, n. 4, p. 227-228, Dec 1996.

SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 57, n. 1, p. 45-56, Jan-Feb 2009. Research Support, N.I.H., Extramural
Review.

SUZUKI, R. B.; LOPES, R. A.; DA CAMARA LOPES, G. A.; HUNG HO, T. *et al.* Low *Helicobacter pylori* primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of Sao Paulo, Brazil. **BMC Gastroenterol**, 13, p. 164, Dec 4 2013.

TELFORD, J. L.; GHIARA, P.; DELL'ORCO, M.; COMANDUCCI, M. *et al.* Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. **J Exp Med**, 179, n. 5, p. 1653-1658, May 1 1994.

THUNG, I.; ARAMIN, H.; VAVINSKAYA, V.; GUPTA, S. *et al.* Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. **Aliment Pharmacol Ther**, 43, n. 4, p. 514-533, Feb 2016. Review.

TORRES-DEBAT, M. E.; PEREZ-PEREZ, G.; OLIVARES, A.; FERNANDEZ, L. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* and mechanisms of clarithromycin resistance in strains isolated from patients in Uruguay. **Rev Esp Enferm Dig**, 101, n. 11, p. 757-762, Nov 2009.

TRESPALACIOS-RANGEL, A. A.; OTERO, W.; AREVALO-GALVIS, A.; POUTOUPINALES, R. A. *et al.* Surveillance of Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Bogota-Colombia (2009-2014). **PLoS One**, 11, n. 7, p. e0160007, 2016.

TRICOTTET, V.; BRUNEVAL, P.; VIRE, O.; CAMILLERI, J. P. *et al.* Campylobacter-like organisms and surface epithelium abnormalities in active, chronic gastritis in humans: an ultrastructural study. **Ultrastruct Pathol**, 10, n. 2, p. 113-122, 1986.

VALLEJOS, C.; GARRIDO, L.; CACERES, D.; MADRID, A. M. *et al.* [Prevalence of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* isolated from Chilean patients]. **Rev Med Chil**, 135, n. 3, p. 287-293, Mar 2007.

VEGA, A.; CORTIÑAS, T.; PUIG, O.; SILVA, H. Molecular characterization and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* strains isolated in Western Argentina. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, 14 Suppl 3, p. e85-92, 2010.

VIANNA, J. S.; RAMIS, I. B.; RAMOS, D. F.; GASTAL, O. L. *et al.* The interplay between mutations in *cagA*, 23S rRNA, *gyrA* and drug resistance in *Helicobacter pylori*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 60, p. e25, 2018.

WADA, T.; MAEDA, S.; TAMARU, A.; IMAI, S. *et al.* Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. **J Clin Microbiol**, 42, n. 11, p. 5277-5285, Nov 2004.

WU, J. Y.; WANG, S. S.; LEE, Y. C.; YAMAOKA, Y. *et al.* Detection of genotypic clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by string tests. **World J Gastroenterol**, 20, n. 12, p. 3343-3349, Mar 28 2014.

YAMAOKA, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 7, n. 11, p. 629-641, Nov 2010. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GUTIERREZ, O.; KIM, J. G. *et al.* Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. **J Clin Microbiol**, 37, n. 7, p. 2274-2279, Jul 1999. Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

YEH, Y. C.; CHANG, W. L.; YANG, H. B.; CHENG, H. C. *et al.* H. pylori cagL amino acid sequence polymorphism Y58E59 induces a corpus shift of gastric integrin alpha5beta1 related with gastric carcinogenesis. **Mol Carcinog**, 50, n. 10, p. 751-759, Oct 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't.

YEO, Y. H.; SHIU, S. I.; HO, H. J.; ZOU, B. *et al.* First-line Helicobacter pylori eradication therapies in countries with high and low clarithromycin resistance: a systematic review and network meta-analysis. **Gut**, 67, n. 1, p. 20-27, Jan 2018. Meta-Analysis
Review
Systematic Review.

ZHANG, Q. B.; NAKASHABENDI, I. M.; MOKHASHI, M. S.; DAWODU, J. B. *et al.* Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of Helicobacter pylori isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. **Gut**, 38, n. 6, p. 841-845, Jun 1996.

ZHANG, Z.; LIU, Z. Q.; ZHENG, P. Y.; TANG, F. A. *et al.* Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of Helicobacter pylori. **World J Gastroenterol**, 16, n. 10, p. 1279-1284, Mar 14 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

ZHOU, J.; XIE, Y.; ZHAO, Y.; WANG, S. *et al.* Human gastrin mRNA expression up-regulated by Helicobacter pylori CagA through MEK/ERK and JAK2-signaling pathways in gastric cancer cells. **Gastric Cancer**, 14, n. 4, p. 322-331, Oct 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't.

ZULLO, A.; HASSAN, C.; CRISTOFARI, F.; ANDRIANI, A. *et al.* Effects of Helicobacter pylori eradication on early stage gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 8, n. 2, p. 105-110, Feb 2010. Review
Systematic Review.

APÊNDICE A: DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém você não deverá participar contra a sua vontade. Depois de ler as informações abaixo, ouça com atenção as explicações que lhe serão dadas e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam devidamente esclarecidos.

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG _____ SSP-CE, prontuário _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto citado acima e está ciente que:

1- O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que se instala no estômago e pode causar gastrite, úlcera ou câncer gástrico. O objetivo da pesquisa será avaliar a resistência do *Helicobacter pylori* à claritromicina de uso terapêutico no esquema primário de tratamento bem como os fatores de virulência através de técnica de biologia molecular.

2- O *Helicobacter pylori* apresenta características distintas entre suas populações (cepas) que podem torná-lo mais ou menos perigoso à saúde humana. Algumas variedades de cepas (tipos) podem produzir proteínas que danificam a mucosa gástrica, denominadas Cag A (citotoxina associada ao gene *cag*), Cag E, Vac A (citotoxina vacuolizante), Ice A que são codificadas pelo gene do mesmo nome, tornando imprescindível o estudo dos genótipos. Os genes *cagA* e *vacA*, além de outros fatores de virulência (gene *cagE* e *iceA*), são alvos deste estudo e estão implicados no aumento da patogenicidade do *Helicobacter pylori*, por isso procuramos identificar e estudar os perfis de virulência da bactéria.

3-A resistência do *H.pylori* aos agentes microbianos é um dos mais importantes fatores para se determinar a eficácia do tratamento. O estudo tem como objetivo avaliar a resistência do *H.pylori* a Claritromicina. Essa avaliação será feita por antibiograma e por método de biologia molecular.

4- Ao realizar o procedimento de Endoscopia serão coletadas biópsias da mucosa gástrica (retirada de pequenos fragmentos do estômago) As biópsias serão colhidas durante o exame endoscópico, de forma totalmente indolor, permitindo identificar a presença de alterações na mucosa gástrica (estudo microscópico do tecido do estômago) e realização de métodos de

biologia molecular. Também será coletado suco gástrico através de um teste denominado enteroteste, nesse exame você irá deglutir uma cápsula acoplada a um fio de algodão, que será ingerido com 200 ml de água e retirado após meia hora de forma indolor e sem desconforto para você.

4- Será coletado 5 ml de sangue para pesquisa de anticorpos no soro contra a bactéria *H.pylori*. Com relação a punção venosa para a coleta de sangue, poderá haver dor local e ocasionar formação de discreto hematoma no local da punção, que é minimizado com a realização de pressão local por poucos minutos e compressas com água morna posteriormente ao exame. O risco de gravidade é mínimo para o paciente. A coleta de sangue será realizada por profissionais devidamente treinados, o que, certamente, tende a minimizar o desconforto causado e evitar a formação de hematomas no local da punção.

5- Não há benefício direto para o mesmo, tratando-se de estudo experimental, testando a hipótese de que *H. pylori* se relaciona com algumas patologias gástricas, dentre elas o câncer. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício;

6- Não há despesas pessoais para o mesmo em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

7- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o mesmo tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas;

8- Tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isso venha a interferir no seu atendimento nesta Instituição;

9 - Tem permissão para procurar os médicos responsáveis a qualquer dia e hora pelos telefones que lhe serão fornecidos (fone: (85) 32236982 - Dra. Lúcia Libanez - Ambulatório de Pacientes Dispépticos - segunda-feira pela manhã, sala 14, 1º andar, no Setor de Ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio - UFC);

10- O resultado do exame será fornecido individualmente a cada paciente. Nenhum paciente será identificado quando da exposição ou divulgação do resultado final deste estudo;

11- Os médicos responsáveis o manterão informado e prestarão qualquer tipo de esclarecimento quanto ao progresso da pesquisa, conforme solicitação do paciente.

12- Os pesquisadores se comprometem em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

13- Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290 Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br”

14- Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que serão lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

APÊNDICE B: Entrevista para Coleta de dados dos pacientes.

CÓDIGO: _____ DATA: ____/____/____

Preenchido por: _____

1.IDENTIFICAÇÃO

1.1 Paciente: _____ 1.2

Prontuário: _____

1.2 Sexo: 1. |__| Masculino 2. |__| Feminino 1.3 Idade: _____

1.4 Data de Nascimento ____/____/____

1.5 Naturalidade _____ 1.6 Procedência

1.7 Endereço: _____

1.8 Fones: _____ 1.9 Referências:

1.10 Cidades: _____ 1.11 Estado:

1.12 N° Lâmina da peça cirúrgica _____

1. HISTÓRIACLÍNICA

2.1) Queixa Principal: _____

2.2) Data do início dos sintomas: _____ 2.3) 1ª Consulta: _____

2.4) Hemoglobina: _____ Hemácias: _____ Hematócrito: _____ Anemia: 1. () Sim 2. ()

2.5) Dor: 1. Queimação 2. Pontada 3. "Roendo" 4. Tipo "fome"

5. Outra: _____

2.6) Localização: 1. Epigástrica 2. Hipocôndrio direito 3. Costas

4. Outra: _____

2.

2.7) Dor noturna: : 1. Frequente () Rara 3. Nunca

2.8) Relação com o estresse: 1. Sim 2. Não

2.9) Alívio da Dor: 1. Alimentação 2. Antiácidos 3. Antagonista H2

4. Inibidor de bomba de próton 5. Outros: _____

2.10) Hematêmese : 1. Sim 2. Não. 2.11) Melena: 1. Sim 2. Não

2. Quantos quilos? _____ Há quanto tempo?

2.12) Perda de peso: 1. Sim Não _____

2.

2.13) Saciedade precoce: 1. Sim Não 2.14) Azia: 1. Sim 2. Não

2.15) Disfagia: 1. Sim 2. Não 2.16) Vômito: 1. Sim 2. Não

2.18) Icterícia: 1. Sim 2. Não 2.19) Outro:

2.17) Ascite: 1. Sim 2. Não _____

2.20)

Comorbidades: _____

Tipo sanguíneo: _____ 2.22) Transfusões sanguíneas: 1. Sim

2.21) _____ 2. Não

Qual? _____ Há quanto

2.23) Cirurgia gástrica anterior: 1. Sim tempo? _____ 2. Não

2.24) Endoscopia; Sim 2. Não

Resultados: _____

2. 25) Infecção por H. pylori: 1. Sim 2. Não 3. Não informa

2.25.1) Tratou: () Sim () Não Duração do tratamento:

2.25.2) Primeiro esquema terapêutico: () Sim () Não

Esquema terapêutico: 1) Medicamento 2) Medicamento 3) Medicamento

2.25.2) Segundo esquema terapêutico: () Sim () Não

Esquema terapêutico: 1) Medicamento 2) Medicamento 3) Medicamento

2.25.3) Mais de duas tentativas de erradicação:

Esquema terapêutico: 1) Medicamento 2) Medicamento 3) Medicamento

2.25.4) Não erradicação: () Não seguiu o () Resistência
tratamento/desistiu ao esquema

2.26) Doença de Ménétrier: 1. Sim 2. Não 3. Não informa

2.27) Uso frequente de AINES (Anti-inflamatórios Não-Esteroidais)?

1. Sim. Qual? _____

2.27.1) Em uso atual (Últimos 30 dias)? 1. Sim

2.28) Fumante (atual) 1. Sim 2. Não Idade de início: _____ O que fuma? _____

Há quanto tempo? _____ Se parou, há quanto tempo? _____ Frequência: _____

2.29) Etilista? 1. Sim 2. Não Idade de início: _____ O que bebe? _____ Frequência: _____

Há quanto tempo? _____ Se parou, há quanto tempo? _____

2.31) Usou algum antibiótico no último 1. Sim 2. Não

mês?

- 2.32) Uso frequente de anti-secretores/IBP's? 1. Sim 2. Não Qual: _____
- 2.33) Em uso atual (Últimos 30 dias)? 1. Sim 2. Não Qual: _____

3. HISTÓRIA FAMILIAR

- 3.1) História de úlcera na família? 1. Sim; Qual o parentesco? _____
2. Não
- 3.2) Câncer gástrico na família? 1. Sim; Qual o parentesco?
1.1 Irmão (ã); 1.2 Tio/Tia; 1.3 Pai; 1.4 Mãe; 1.5 Avô/Avó;
1.6 Filho (a); 1.7 Pai e Mãe Qual a idade de aparecimento do Câncer? _____
2. Não
- 3.3) Câncer na família em outros sítios? 1. Sim Qual parente ? _____ Local _____
2. Não

4. CONDIÇÕES PSICO-SOCIAIS

- 4.1 Tipo de moradia: 1. Alvenaria; 2. Taipa; 3. Madeira; 4. Papelão; 5. Outro
- 4.2 Quantos cômodos? _____ 4.3 Quantas pessoas residem? _____
- 4.4 Possui rede de esgoto? 1. Sim 2. Não
- 4.5 Possui água encanada? 1. Sim 2. Não
- 4.6 Possui banheiro na casa? 1. Sim 2. Não
- 4.7 Tipo de ingestão da água? 1. Sem tratamento 2. Filtrada 3. Fervida
4. Ozonizada 5. Mineral 6. Outros _____
- 4.8 Formação escolar: 1. Analfabeto 2. Semi-analfabeto 3. 1º grau incompleto
4. 1º completo 5. 2º incompleto 6. 2º completo 7. 3º incompleto 8. Nível Superior
- 4.9 Estado civil: 1. Solteiro 2. Casado 3. Divorciado 4. Outros _____
- 4.10 Profissão: _____
- 4.11 Renda mensal 1. < 1SM 2. 1SM a 2 SM 3. 2SM a 3SM
4. 3SM a 5SM 5. > 5 SM

Números de irmãos _____ Número de irmãos mais novos _____

Posição na família: _____

5.HÁBITOS ALIMENTARES

5.1 Ingesta frequente de defumados? 1. Sim Frequência: _____ 2. Não

5.2 Ingesta frequente de carnes secas/salgadas? 1. Sim Frequência: _____ 2. Não

5.3 Ingesta frequente de farináceos? 1. Sim Frequência: _____ 2. Não

5.4 Ingesta frequente de verduras/frutas cítricas? 1. Sim Frequência: _____ 2. Não

5.5 Forma de armazenamento/estocagem dos alimentos?

5.5.1 Geladeira/Freezer: 1. Sim 2. Não

5.5.2 “Salga” e “Seca” as carnes 1. Sim Frequência: _____ 2. Não

5.5.3 Outros: 1. Sim Qual? _____ 2. Não

Anexo A: Custo financeiro por amostra para investigação de resistência genotípica primária à claritromicina

Tabela 11: Custo financeiro para investigação da resistência primária por amostra

MATERIAL	QUANTIDADE	CUSTO	CUSTO UNITÁRIO	QUANT. P/AMOSTRA	CUSTO POR AMOSTRA
Tubos para PCR	1000 unid	300,00	0,30	2 unid	0,60
Tubos para centrífuga	1000 unid	200,00	0,20	5 unid	1,00
Ponteiras com filtro	1000 unid	400,00	0,40	5 unid	2,00
Criotubos Eppendorf	1000 unid	200,00	0,20	2 unid	0,40
Kit de extração de DNA	1 kit (2000 amostras)	1.970,00	0,90	1 unid	1,97
Master mix para PCR	1 kit (1000 amostras)	2.700,00	2,70	1 unid	2,70
Primers	1 kit por gene (F e R)	100,00	0,80	1 unid	0,10
Placas para tempo real	10 placas (96 poços)	400,00	0,80	2 unid	1,60
Probes para PCR Tempo Real	1 kit (2 probes)	4.000,00	1,70	2 unid	3,40
	Total geral	10.970,00		Total por amostra	13,77

