

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

MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES

Genótipos das cepas de *H. pylori* *vacA* e alelos, *cagA* e sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de Fortaleza utilizando método não endoscópico.

FORTALEZA

2010

MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES

Genótipos das cepas de *H. pylori* vacA e alelos, cagA e sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de Fortaleza utilizando método não endoscópico.

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

Orientadora:

Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo

FORTALEZA

2010

G627g Gonçalves, Maria Helane Rocha Batista
Genótipos das cepas de *H. pylori* vacA e alelos, cagA e
sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de
Fortaleza utilizando método não endoscópico./ Maria Helane
Rocha Batista Gonçalves. – Fortaleza, 2010.
65 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza-Ce,
2010.

1. *Helicobacter pylori* 2. Alelos. 3. Fosforilação. 4.
Técnicas de diagnóstico do sistema digestório. 5. Lúcia
Libanez Bessa Campelo (Orient.) I. Título.

CDD 579.323

MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES

Genótipos das cepas de *H. pylori* vacA e alelos, cagA e sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de Fortaleza utilizando método não endoscópico.

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

Aprovada em 13/08/2010

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

*Agradeço a Deus por todas as bênçãos em minha vida.
A maior delas chamada Maria Eduarda, minha filha, minha vida.
Ao meu marido Pedro Ivo por estar sempre ao meu lado e apoiar minhas escolhas.
Ao meu pai, meus irmãos e irmãs, por torcerem pelo meu sucesso.
E um agradecimento muito especial à minha mãe, que mesmo não estando mais neste
plano, me protege e ilumina o meu caminho.*

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos membros da banca, pela avaliação deste estudo.

À querida amiga MEYSSA QUEZADO DE FIGUEIREDO CAVALCANTE, mestranda em cirurgia, enfermeira, amiga de todas às horas, pelo incentivo, força e ajuda em todos os momentos.

Ao Sr. CÍCERO IGOR SIMÕES MOURO SILVA, doutorando em cirurgia, pela contribuição para conclusão desse estudo.

Ao Sr. FRANCISCO JOSEMAR ALVES DE OLIVEIRA, farmacêutico, mestrando em cirurgia, pelo apoio laboratório.

Aos acadêmicos de Medicina, RAFAEL ALMEIDA, RENATA JOCA E FERNANDO KENNEDY, pela parceria no laboratório.

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

A todos e todas que, de alguma forma, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância”.

Sócrates

RESUMO

Genótipos das cepas de *H. pylori* vacA e alelos, cagA e sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de Fortaleza utilizando método não endoscópico.

MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo.

O *H. pylori* infecta atualmente metade da população mundial e é relacionado com o desenvolvimento das afecções gástricas. O Enteroteste é um método minimamente invasivo que pode ser usado para detecção do *H. pylori* por meio não endoscópico. O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade e especificidade do Enteroteste frente ao Teste Respiratório e estudar o perfil genético das cepas de *H. pylori* em indivíduos residentes na comunidade Parque Universitário. O suco gástrico foi colhido a partir do Enteroteste, e realizada a cultura e a extração do DNA do *H. pylori*. A genotipagem das cepas foi realizada através da técnica de PCR e os sítios de fosforilação EPIYA de sequenciamento Participaram do estudo 50 indivíduos, 43 positivos e 7 negativos para a infecção pelo *H. pylori* através do Teste Respiratório. A cultura e o PCR a partir do Enteroteste apresentaram sensibilidade de 86% e 77%, respectivamente, com especificidade de 100% em ambos os métodos 33 cepas foram genotipadas como vacA positivas, sendo 39,4% vacA s1m1; 15,2% vacA s1m2; 18,2% vacA s2m2 27,2% com perfil vacA s com ausência do alelo m. Foram cagA positivas 66,6% das cepas sendo 54,5% com perfil EPIYA-ABC, 41,0% EPIYA-ABCC e 4,5% EPIYA-AB. O Enteroteste mostrou-se um método confiável com boa sensibilidade e especificidade para identificação do *H. pylori* através do cultivo e da técnica de PCR. A maioria das cepas expressou o alelo vacA s1, com predomínio do subtipo s1b e da combinação alélica s1m1. Mais da metade das cepas estudadas expressaram o gene cagA e a maioria dessas cepas tinham 3 ou 4 sítios de fosforilação, com perfil EPIYA-ABC ou EPIYA-ABCC. O perfil genético apresentado por essas cepas é o descrito para a América do Sul e diferente do padrão Asiático, a maioria das cepas circulantes na comunidade têm importante potencial patogênico. O Enteroteste é um método seguro, sensível e específico para detecção do *H. pylori*.

Palavras-chave: *H. pylori*. Enteroteste. Sítios EPIYA.

ABSTRACT

Genotypes of strains of *H. pylori* cow and alleles, cag and phosphorylation sites in an urban community EPIYA Fortaleza using endoscopic method not. MARIA HELANE ROCHA BATISTA GONÇALVES. Dissertation (Master Degree). Postgraduate *Stricto Sensu* in Surgery. Federal University of Ceará. Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo.

The *H. pylori* infect currently half of the world's population and is related to the development of gastric disorders. The Enterotest is a minimally invasive method that can be used for detection of *H. pylori* through endoscopic not. The objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of Enterotest opposite the Respiratory Testing and studying the genetic profile of strains of *H. pylori* individuals resident in the Community College Park. The gastric juice was collected from Enteroteste, and held the culture and the extraction of DNA from *H. pylori*. The genotyping of strains was carried out by the PCR technique and phosphorylation sites EPIYA sequencing participated in the study 50 individuals, positive and negative 7 43 for infection *H. pylori* through Respiratory Test. Culture and PCR from Enteroteste showed sensitivity of 86% and 77%, respectively, with 100% specificity in both methods. 33 strains were positive, genotipadas as Cow being 39.4% Cow *s1m1*; 15.2% Cow *s1m2*; 18.2% Cow *s2m2* 27.2% with Cow *s* profile with absence of allele *m*. Were positive 66.6% Bran of strains being profiled 54.5% EPIYA-ABC, 41.0% EPIYA-ABCC and 4.5% EPIYA-AB. The Enterotest proved to be a reliable method with great sensitivity and specificity for identification of *H. pylori* through cultivation and PCR technique. Most strains expressed alelo Cow *s1*, with a predominance of subtype *s1b* and allele combination *s1m1*. More than half of the studied strains expressed gene *Shit* and most of these strains were 3 or 4, phosphorylation sites profiled EPIYA-ABC or EPIYA-ABCC. The genetic profile presented by these strains is described for South America and nonstandard Asia, most strains circulating in the community have important potential pathogenic. The Enterotest is a safe method, sensitive and specific detection of *H. pylori*.

Keywords: *H. pylori*. Enterotest. EPIYA Sites.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

CagA – citotoxina A do *Helicobacter pylori*

C¹³ - Carbono 13

C¹⁴ - Carbono 14

CO₂- gás carbônico

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

CagA

H. pylori - *Helicobacter pylori*

IL-8 – Interleucina-8

rpm – rotações por minuto

vacA – gene da citotoxina vacuolizante

VacA – citotoxina vacuolizante

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Distribuição dos participantes quanto ao sexo.....	32
FIGURA 2: Distribuição dos indivíduos infectados por <i>H. pylori</i> , quanto à faixa etária.....	33
FIGURA 3: Distribuição do gene <i>cagA</i> na amostra estudada.....	36
TABELA 1: Primers usados na amplificação dos genes <i>cagA</i> e alelos de <i>vacA</i>	31
TABELA 2: Análise dos métodos diagnósticos empregados.....	34
TABELA 3: Caracterização do alelo <i>s</i> e das combinações alélicas do gene <i>vacA</i>	35
TABELA 4: Distribuição dos sítios de fosforilação EPIYA do gene <i>cagA</i>	36
TABELA 5: Caracterização da amostra quanto aos sítios de fosforilação EPIYA quanto à faixa etária.....	37
TABELA 6: Distribuição dos alelos do gene <i>vacA</i> com o gene <i>cagA</i> nas cepas estudadas.....	37
TABELA 7: Eficácia do Enteroteste Relatados em Estudos Anteriores.....	61
FIGURA 4: Gel de agarose para visualização das bandas do gene <i>cagA</i>	38
FIGURA 5: Gel de agarose para visualização das bandas do alelo <i>s1</i> do gene <i>vacA</i>	39
FIGURA 6: Gel de agarose para visualização das bandas do alelo <i>m1</i> do gene <i>vacA</i>	40
FIGURA 7: Gel de agarose para visualização das bandas do alelo <i>m2</i> do gene <i>vacA</i>	41

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico do <i>Helicobacter pylori</i>	13
1.2. Microbiologia do <i>Helicobacter pylori</i>	14
1.3. Patogenicidade do <i>Helicobacter. pylori</i>	15
1.4 Genética do <i>H. pylori</i>	16
1.4.1. Gene vacA	17
1.4.2. Gene cagA	17
1.4.3. Os sítios de fosforilação do gene cagA.....	18
1.5. Epidemiologia do <i>H.pylori</i>	19
1.6. Diagnósticos do <i>H. pylori</i>	21
1.6.1. Métodos não invasivos.....	22
1.6.2. Métodos invasivos.....	22

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26

3. MÉTODO

3.1. Casuística	27
3.2. Desenho do Estudo	27
3.3. Seleção dos Participantes.....	27
3.4. Procedimento	28
3.4.1. Realização do Teste Respiratório.....	28
3.4.2. Preparação das cápsulas utilizadas no Enteroteste.....	28

3.4.3. Realização do Enteroteste.....	28
3.4.4. Cultivo do H.pylori.....	29
3.4.5. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	29
3.5. Análise Estatística.....	31

4. RESULTADOS

4.1. Análise da Sensibilidade e Especificidade dos métodos empregados.....	34
4.2. Distribuição dos alelos do gene vacA nas cepas estudadas.....	34
4.3. Distribuição do gene cagA e dos sítios de fosforilação EPIYA nas cepas estudadas.....	35
4.4. Distribuição do gene cagA associado aos alelos do gene vacA.....	37

5. DISCUSSÃO	42
---------------------------	-----------

6. CONCLUSÃO	47
---------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	48
--------------------------	-----------

ANEXOS	62
---------------------	-----------

1. Introdução

1.1. Histórico do *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza o estômago, foi isolado pela primeira vez, em 1983, por Warren e Marshall, na Austrália, a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica e que por este motivo, receberam o prêmio Nobel de Medicina em 2005. Porém, desde o século passado, Krienitz (1906) foi o primeiro a observar “espiroquetas” no estômago humano (DOENGES, 1938).

No início de 1983, Warren e Marshall publicaram os seus primeiros trabalhos e, dentro de meses, vários outros cientistas do mundo, também, isolaram a bactéria. Os pesquisadores confirmaram os achados iniciais de Warren, isto é, a infecção pelo *H. pylori* está fortemente associada com inflamação persistente do estômago. Esta ligação levantou uma dúvida: o tecido inflamado atrai o *H. pylori* para lá colonizar ou ele causa inflamação? Porém, pesquisas posteriores provaram que a segunda hipótese é a correta. Observações realizadas em animais e em seres humanos, após ingestão voluntária da bactéria, resultaram em gastrite aguda (MARSHALL et al., 1983). O uso de antibióticos ou o desenvolvimento de condições gástricas desfavoráveis (atrofia da mucosa ou após gastrectomia parcial com refluxo de bile) levou ao desaparecimento da infecção (KUIPERS et al., 1998).

A espécie *Helicobacter pylori* foi inicialmente chamada de *Campylobacter like organisms*, passando posteriormente a ser denominada *Campilobacter pylordis*. Após vários estudos taxonômicos foi denominada *Helicobacter pylori* por conta de suas características bioquímicas e genéticas, serem diferentes do gênero *Campylobacter* (HEATLEY, 1995).

Atualmente, o *H. pylori* é considerado o principal agente etiológico da gastrite crônica e importante fator na gênese da úlcera péptica gástrica e duodenal (MÉGRAUD, 1997) e do linfoma gástrico do tipo MALT de baixo grau (PARSONNET et al., 1997). Estudos apontam que, além do risco de úlcera, a infecção crônica causada no estômago por esta bactéria pode tornar-se um precursor do câncer gástrico (KUIPERS, 1998).

O *H. pylori* é a bactéria responsável por uma das infecções mais prevalentes do planeta e embora ainda existam paradigmas, quanto à forma de transmissão, tratamento ideal, diagnóstico preciso, acredita-se que com o empenho de grandes pesquisadores essas questões muito em breve serão elucidadas.

1.2. Microbiologia do *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria Gram- negativa, de forma espiralada, medindo 2,5 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de diâmetro. Esta coloniza a mucosa gástrica produzindo as enzimas: urease, catalase, oxidase, protease e fosfolipase. O *H. pylori* produz urease que desdobra a uréia em amônia e CO₂, e assim, a amônia atua com receptor de íons hidrogênio gerando pH neutro no ambiente intracelular e pericelular bacteriano, proporcionando sua sobrevivência em um meio ácido (MOBLEY, 2001).

Ao microscópio eletrônico o *H. pylori* apresenta de cinco a seis flagelos monopolares embainhados. A bainha é uma membrana que envolve os flagelos, e possui uma constituição protéica e de lipopolissacárideos que provavelmente protegem os filamentos flagelares da acidez gástrica. Sua morfologia em espiral, associada aos flagelos, facilita sua locomoção através da camada de muco que é um dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica (EISIG et al., 2002).

São bactérias não esporuladas, e podem formar corpos cocóides ou esferóides em culturas velhas (KUSTERS et al., 1997). A conversão da forma espiral para a cocóide se dá diante das condições adversas: pH alcalino, alta temperatura, incubação prolongada, exposição a concentrações altas de oxigênio, tratamento com inibidor da bomba de prótons, antibióticos, óxido nítrico, etc. Acredita-se que a forma cocóide seja uma forma de resistência capaz de suportar condições ambientais adversas (COLE et al., 1997). Esta forma, embora viável, não é cultivável nem ativa, mas é mais resistente, sobrevivendo em ambientes hostis, fora do muco gástrico (BURNENS et al., 1993).

O *H. pylori* é microaerófilo, cresce melhor em uma atmosfera de 5 a 15% de O₂ com 5 a 10% de CO₂, em meio definido, contendo sangue e outros componentes que promovem o seu crescimento, como: vitamina B12 e aminoácidos (L-Glutamina, L-Cisteína). Vários meios de cultura como o Brain Heart Infusion (BHI) agar, Brucella agar, Columbia agar ou Skirrow's agar suplementados com sangue de cavalo, soro de cavalo, ou sangue de carneiro têm sido usados para o cultivo de *H. pylori*. A adição de agentes antimicrobianos torna os meios seletivos e facilita o isolamento da bactéria onde há presença de bactérias e fungos contaminantes (HOLTON, 1999). A temperatura ideal para o seu crescimento em meio de cultura é de 37°C após 3 a 5 dias. Todas as

cepas de *H. pylori* crescem em temperaturas que variam de 33°C a 40°C, embora algumas cresçam pobremente em temperaturas de 30°C a 40°C. Nenhuma cepa cresce a 25°C (BURY-MONÉ, et al., 2006). O pH apropriado para o crescimento do *H. pylori* varia de 5,5 a 8,5 com bom crescimento em pH entre 6,9 e 8. É difícil mantê-lo em subculturas repetidas e a viabilidade é usualmente perdida após cerca de 4 subculturas em meios convencionais (BURY-MONÉ, et al., 2006). As colônias formadas são circulares, convexas, translúcidas e não apresentam hemólise. A identificação após a cultura deve ser feita com base na morfologia da colônia, coloração de Gram e provas bioquímicas positivas para urease, catalase e oxidase (NDIP et al., 2003).

1.3. Patogenicidade do *Helicobacter pylori*

Segundo Kuipers (1998), o *H. pylori* é responsável por 95% das gastrites crônicas e em até nove vezes pelo aumento do risco de câncer. Foi reconhecido em 1994, pela Organização Mundial de Saúde como carcinogênico grupo I (BLASER et al., 1996).

O *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica humana com mínima competição por parte de outros microorganismos. Seus fatores de virulência permitem que o *H. pylori* sobreviva ao ambiente inóspito do estômago; estes fatores são: o formato espiralado, a motilidade, as enzimas e proteínas de adaptação, a capacidade de aderir às células da mucosa e ao muco gástrico (BRUCE, 1993), como também, os fatores genéticos e biomoleculares do microorganismo, como a presença dos genes *vacA*, *cagA* e dos sítios de fosforilação da proteína CagA (Epiya) (YAMAOKA et al., 2002; ARGENT et al., 2004).

Os principais mecanismos patogênicos do *H. pylori* estudados são: motilidade, aderência e produção de urease. Estes mecanismos rompem a integridade da mucosa gástrica através de toxinas e mediadores da inflamação contribuindo para a atividade clorido-péptica do estômago.

A motilidade é considerada essencial para que o microorganismo penetre na camada de muco que reveste o epitélio gástrico, protegendo-se assim da acidez e do peristaltismo estomacal (HAZEL et al., 1986).

A capacidade de adesão do *H. pylori* à superfície epitelial impede sua eliminação através dos movimentos peristálticos, além de promover elevadas concentrações de toxinas em determinadas áreas da mucosa gástrica. O microorganismo liga-se basicamente às células secretoras de muco, incluindo focos de metaplasia gástrica. Na microscopia eletrônica, esta aderência às células de muco do estômago pode envolver a

justaposição das membranas celulares bacterianas e mucosas assemelhando-se a “pedestais de inserção”. A bactéria adere à mucosa permitindo uma série de ações, que facilitam sua colonização e início do processo inflamatório (BRUCE, 1993).

O *H. pylori* produz elevada quantidade de urease, enzima que converte a uréia em amônia e que no ambiente gástrico, pode promover a desestabilização da camada de muco, provocando lesões sobre o epitélio de revestimento, principalmente em situações de gradientes elevados de pH (HAZEL et al., 1986).

O *Helicobacter pylori*, penetra na camada de muco, multiplicando-se em contato com as células epiteliais do estômago. As bactérias, após instaladas na mucosa gástrica, liberam diferentes agentes quimiotáticos, que penetram através do epitélio lesado e induzem a migração de polimorfonucleares para a lâmina do epitélio. As proteínas bacterianas também ativam os mastócitos, promovendo sua degranulação, liberando ativadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão de leucócitos às células endoteliais, bem como uma migração acentuada dessas células ao sítio da infecção. O *H. pylori* estimula o epitélio gástrico a produzir IL-8, que tem sua produção potencializada pelo TNF- α , pela interelucina-1 (IL-1) e pelo fator de necrose κ B (NF- κ B), liberados pelos macrófagos em resposta à parede lipopolissacarídica da bactéria (CRABTREE et al., 1991, 1994; MOBLEY, 2001; MAEDA et al., 2001).

1.4. Genética do *Helicobacter pylori*

O cromossomo do *H. pylori* tem um tamanho estimado de 1.68 - 1.73 Mb, e as sequências genômicas apresentam baixo teor de citosina e guanina, em média 32.5 mol% (TAYLOR et al., 1991).

Estudos recentes evidenciam que cepas do *H. pylori* apresentam diversidade genotípica, e que estas ativam o processo inflamatório por meio de mediadores e citocinas, que podem levar a diversos graus de resposta inflamatória do hospedeiro, resultando em diferentes desfechos patológicos (FOX et al., 2002).

Cepas *H. pylori* presentes na chamada ilha de patogenicidade *cag* (*cag* –PAI) induzem resposta inflamatória mais grave, através da ativação da transcrição de genes, aumentando o risco para desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico. O estresse oxidativo e nitrosativo induzido pela inflamação desempenha importante papel na carcinogênese gástrica como mediador da formação ou ativação de cancerígenos,

danos no DNA, bem como de alterações da proliferação celular e da apoptose (ISRAEL et al.,2001).

Em 1997, pesquisadores sequenciaram o genoma do *H. pylori* e descobriram genes que codificam fatores que interagem com o hospedeiro. Os mais importantes genes de *H. pylori* são *cagA* e *vacA*. O *vacA* codifica uma citotoxina vacuolizante, que degenera as células hospedeiras, a proteína VacA. O gene *cagA* codifica outra citotoxina, a proteína CagA, que estimula a produção de fatores quimiotáticos para os neutrófilos no epitélio gástrico do hospedeiro, levando a um processo inflamatório (TOMB et al., 1997).

1.4.1-Gene vacA

O gene da citotoxina vacuolizante (*vacA*), cuja proteína VacA, está presente em todos tipos de *H.pylori*, induz a formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais, levando à exsudação de uréia para a luz da mucosa gástrica. A proteína VacA é considerada importante fator de virulência, por produzir alcalóides através da urease, e induzir danos no DNA (SALAMA et al.,2001).

A estrutura entre os alelos *vacA* varia particularmente em duas regiões, na região N-terminal (s1a, s1b e s2) e perto da região do meio (m1 e m2), que descreve as diferenças na produção da citotoxina ou na atividade vacuolizante. Tem sido relatado que o final da estrutura do gene *vacA* é um mosaico que contém toda sua combinação de sinal sequência e tipos de região média, incluindo o raro alelo s2/m1. Diversas famílias de alelos de *vacA* estão presentes no *H.pylori* e seus produtos estão associados com ou sem atividade de vacualização *in vitro*. Os alelos do gene *vacA* têm sido associados com aumento de úlceras pépticas, e as regiões s e m, principalmente o alelo s1/m1 têm relevâncias clínicas estando associado com maior destruição do epitélio gástrico e úlcera duodenal (YAMAOKA et al., 1999). Em torno de 50 a 60% dos tipos de *H. pylori* produzem a citotoxina vacuolizante VacA (MÜLLER et al., 2002).

1.4.2-Gene cagA

O gene *cagA* de *H. pylori* codifica uma proteína considerada um fator de virulência. Estirpes bacterianas que têm o gene *cagA* estão associadas com uma maior capacidade de causar úlcera péptica. A proteína do *cagA* é transportada para as células humanas onde pode romper o funcionando normal do citoesqueleto. A ilha de patogenicidade *cag* tem aproximadamente 30 genes que codificam um complexo de transporte, o sistema de secreção tipo IV. Após fixação do *H. pylori* às células epiteliais

do estômago, a proteína CagA é injetada nas células pelo "sistema de secreção tipo IV". A proteína CagA é fosforilada em resíduos específicos de tirosina por uma tirosina cinase associada à membrana das células do hospedeiro (ARGENT et al., 2004).

Este gene está presente em torno de 50 a 70% das cepas de *H. pylori* e, todos produzem uma resposta local e sistêmica com anticorpos anti-CagA no hospedeiro humano. Diversos estudos sugerem que o gene *cagA* é altamente associado com a patogenicidade das cepas de *H. pylori*. Há relatos que a inflamação gástrica depende dos genes *cagA* presentes na ilha de patogenicidade – *cagPAI*, e foi sugerido que a patogenicidade do *cagA* pode promover proliferação celular e mudanças na morfologia, causados por sua fosforilação e produção de sinais intracelulares. (ASAHI et al., 2000).

No Brasil, muitos estudos têm associado à presença de *H. pylori cagA*-positivo com as doenças gástricas mais importantes, entre elas: gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico. Existe uma grande variedade de genótipos das cepas de *H. pylori* no país, levando a variações na prevalência dessas cepas e, como resultado o desenvolvimento de doenças gástricas (QUEIROZ et al., 1998; QUEIROZ et al., 2000; GATTI et al., 2006).

1.4.3. Os sítios de fosforilação do gene *cagA*.

O sistema secretório do tipo IV, codificado pelo gene *cagA*, favorece a fosforilação e o rearranjo do citoesqueleto das células gástricas e o produto terminal 3' da ilha *cag*, a proteína CagA, é introduzida nas células hospedeiras (ARGENT et al., 2004).

Quando introduzida na célula do epitélio gástrico, a proteína CagA induz a fosforilação de resíduos de tirosina, através de uma sequência modificada de cinco aminoácidos (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), denominada EPIYA. A proteína CagA fosforilada, ativa um sistema de enzimas fosfatase SHP-2, levando a alterações morfológicas nas células hospedeiras, que podem gerar displasia, metaplasia e o câncer gástrico (HIGASHI et al., 2002; SCHNEIDER et al., 2009).

Os modificadores EPIYA variam substancialmente em número e tipos de acordo com a região geográfica (CHOI et al., 2007). Os sítios variam de 1 a 6 modificadores de fosforilação de tirosina EPIYA (ARGENT et al., 2004) e apresentam diferenças estruturais, principalmente entre as populações dos países ocidentais e os orientais.

Nos países orientais, especialmente os do leste asiático, os segmentos EPIYA encontrados são A, B e D e não há evidências da presença do resíduo C. Já nos países ocidentais, ocorrem os segmentos de aminoácidos A, B e C dos modificadores EPIYA do *H. pylori*, onde EPIYA-A, contém 32 aminoácidos; EPIYA-B, 40 aminoácidos e EPIYA-C, 34 aminoácidos do segmento. *In vitro*, todos os tipos de modificadores de fosforilação da tirosina EPIYA do *cagA* podem ser fosforilados (HATAKEYAMA et al., 2005).

A associação do número de sítios de fosforilação com maior poder patogênico das cepas de *H. pylori* é evidenciada naquelas que apresentam acima de três sítios modificadores de fosforilação. Estudos observando a expressão da proteína CagA, mostram que o número de modificadores EPIYA presentes nestas cepas é associado com a intensidade da fosforilação da proteína CagA, com o alongamento celular e com a indução de processos inflamatórios (BARTCHEWSKY et al., 2009; SGHNEIDER et al., 2009).

Há evidências que a proteína CagA com 2 ou menos modificadores de fosforilação EPIYA não induzem o alongamento celular e têm poder reduzido de fosforilação intracelular, enquanto as que têm 3 ou mais sítios EPIYA têm um potencial de fosforilação e indução de rearranjo celular maior (ARAS et al., 2003).

1.5. Epidemiologia do *H. pylori*

Aproximadamente 50% da população mundial está infectada pelo *H. pylori*. E esta infecção é considerada um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, onde a prevalência da infecção é alta devido às baixas condições higiênicas e sanitárias (PARSONNET et al., 1997). Estudos em uma população de baixa renda no Peru apontam que 90% dos moradores são infectadas pelo *H. pylori* (RAMIREZ et al, 1994 ; 2005).

Existem fortes evidências de que a infecção pelo *H. pylori* é adquirida na infância e dentro do núcleo familiar (MENDALL et al.,1992). Muitos estudos destacam que, a aquisição do *H. pylori* ocorre por transmissão intrafamiliar e em virtude da má condição socioeconômica (MORAES et al.,2003 ; QUEIROZ et al., 2005).

Porém ainda não está bem entendido como esse microorganismo é transmitido dentro da comunidade. O único fato concreto é que o *H. pylori* entra para o estômago por via oral.

A infecção por *Helicobacter pylori* ocorre provavelmente na infância, por transmissão fecal-oral ou gástrica-oral, portanto havendo a influência de fatores de higiene e sanitários que justificam sua alta prevalência nos países em desenvolvimento de 30 a 90%, sendo próxima a 60% na América Latina (COELHO et al., 2000). Apesar da infecção provavelmente ocorrer durante a infância, não há associação clara entre a infecção por *H. pylori* e dispepsia em crianças. Por este motivo, a pesquisa de *H. pylori* não é indicada rotineiramente para crianças, exceto em casos graves de úlcera gástrica ou duodenal (DRUMM et al., 2000).

Existem vários fatores de risco que influenciam a transmissão do *Helicobacter pylori*, tais como: baixa condição socioeconômica, baixo nível educacional, baixas condições de saneamento básico e fatores nutricionais.

Estudos epidemiológicos em crianças são de grande importância para que se compreendam os aspectos relacionados com transmissão da infecção e determinação dos fatores envolvidos na aquisição da bactéria (KODAIRA et al., 2002).

A infecção pelo *H. pylori* apresenta distribuição universal. A variação na taxa de prevalência da bactéria quanto à distribuição geográfica é fato bem definido na epidemiologia do agente. A infecção é significativamente menos prevalente nos países industrializados, em todas as faixas etárias (KODAIRA et al., 2002).

Pode ser observado que na infância, ocorre um rápido aumento da taxa de prevalência da infecção, principalmente nos cinco primeiros anos de vida. E que a partir dos 15 anos essa prevalência passa a ser lenta. Em pessoas com 60 anos essa prevalência atinge um patamar ou entra em declínio (KODAIRA et al., 2002).

Conforme Mitchell et al., o perfil da curva de prevalência da infecção pelo *H. pylori* se mantém constante com relação à idade, independentemente do grau de desenvolvimento do país. Porém, nos países em desenvolvimento, a prevalência da infecção é alta em todas as faixas etárias.

Universalmente, diferentes cepas de *H. pylori* são associadas a diferenças na virulência, que interagindo com fatores ambientais e do hospedeiro levam a diferenças na expressão da doença. Fatores como: idade, etnia, gênero, geografia e condição socioeconômica, influenciam a incidência e prevalência da infecção pelo *H. pylori*. E dentro de um mesmo país, pode ocorrer variação entre populações urbanas e rurais (BLASER et al., 1996).

Nos países desenvolvidos, a infecção pelo *H. pylori* é rara em crianças menores de 10 anos, variando de 3,5 a 10% (PRIETO et al., 1992). Nos países em

desenvolvimento podem ser observadas altas taxas de soropositividade em faixas etárias mais jovens (KODAIRA et al., 2002).

Porém, independentemente da região, as diferenças parecem estar em função da condição socioeconômica da população (TAYLOR et al., 1991). Um estudo com crianças finlandesas revelou taxa de prevalência de 5,6% (REHNBERG-LAIHO et al., 1998). No México, a taxa de infecção varia de 20% em crianças de até um ano, chegando a 50% aos dez anos (TORRES et al., 1998). Entre adultos de meia idade nos países em desenvolvimento a prevalência é em média de 80 a 90% e em países desenvolvidos é menor que 40% (PEREZ-TRALLERO et al., 2004).

No Brasil, um estudo com crianças e jovens até 18 anos, em famílias de baixa renda, demonstrou um percentual de 34% de infectados, e um aumento significativo com a idade (BEDOYA et al., 2003). Outro estudo transversal, realizado em Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, verificou uma prevalência de 34,1% em crianças (OLIVEIRA et al., 1994). No Mato Grosso do Sul, a prevalência foi de 77,5% em crianças e jovens, e de 84,7% em adultos, pertencentes a uma população da área rural (SOUTO et al., 1998).

Estudo realizado em Fortaleza, estado do Ceará pelo nosso grupo, em uma comunidade urbana de baixa renda, utilizando teste respiratório marcado com C¹³, em crianças e adolescentes, encontrou uma prevalência de 30% nas crianças aos 2 anos de idade, atingindo 74% de infectados aos 20 anos (RODRIGUES et al., 2004). Em estudo anterior, foi relatado que, nos indivíduos acima de 20 anos residentes em comunidade urbana, a prevalência foi em torno de 82% (BRAGA et al., 1995) e em pacientes com dispepsia em torno de 80 % (MOTA et al., 2008).

Esses dados encontrados em Fortaleza corroboram o que é descrito na literatura em relação aos países em desenvolvimento, onde as taxas de infecção são elevadas e o microorganismo é adquirido em geral já na infância (SIPPONEN, 1992).

1.6. Diagnóstico do *Helicobacter pylori*

Existem vários testes disponíveis para o diagnóstico da infecção por *H. pylori*. Estes testes podem ser através de métodos invasivos ou não-invasivos. Os não-invasivos incluem sorologia e teste respiratório com uréia marcada com isótopos de carbono C¹³ (CUTLER et al., 1998). Os invasivos são os que utilizam a endoscopia digestiva alta para coleta de biópsias e, mais recentemente, o método não-endoscópico com o Enteroteste.

1.6.1 Métodos não invasivos

A sorologia baseia-se na detecção de anticorpos específicos imunoglobulina G (IgG), encontradas em amostra de soro das pessoas infectadas. Geralmente são realizados através da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e pelo Western Blotting, onde os anticorpos da classe IgG e IgA estão dirigidos a vários antígenos bacterianos. Vale ressaltar que, podem ocorrer resultados falso-negativos em crianças, idosos e em pessoas imunodeprimidas, por não desenvolverem reação imunológica contra a infecção (PORTORREAL et al., 2002).

Outro método diagnóstico é a pesquisa de antígenos do *H. pylori* nas fezes (HpSA). Este teste é tão eficaz quanto o teste respiratório e ainda tem a vantagem de ser mais barato, ter o resultado em uma hora, não requer equipamentos sofisticados e o material pode ser estocado para futuras pesquisas (VAIRA et al., 2000).

O teste respiratório utiliza o isótopo estável, não radioativo (C^{13}), ou o isótopo pouco radioativo (radioatividade equivalente à do meio ambiente) (C^{14}), como marcadores da uréia (GRAHAM et al., 1991). O princípio do teste baseia-se na atividade de produção de urease pelo *H. pylori*. O paciente ingere uma solução de uréia marcada C^{14} e C^{13} , a uréia é convertida em amônia e bicarbonato, o qual é absorvido e convertido em CO_2 nos pulmões (TONELLI et al., 2000). Onde será detectado pelo espectômetro de massa (se usa o C^{13}) ou pelo contador de cintilação líquida (se se usa o C^{14}) (COELHO et al., 1998). O teste utilizando o C^{13} não-radioativo, por não ser invasivo, é o teste ideal para o diagnóstico da infecção em crianças.

O teste respiratório foi recentemente validado para uso em crianças brasileiras com uma sensibilidade de 95,5% e especificidade de 99,0% (CARDINALI et al., 2003).

1.6.2 Métodos invasivos

A endoscopia é um método caro, invasivo e desconfortável, tornando-se inadequada para ser realizada em larga escala em estudos na comunidade, e principalmente em crianças, grupo no qual geralmente a infecção é adquirida (VELAPATIÑO, et al., 2006)

O estudo da mucosa gástrica por meio de biópsia permite o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* nas preparações em lâminas, esfregaços e cortes histológicos fixados e corados. Em face da extensa distribuição do *H. pylori* no estômago, todos os testes baseados em biópsias podem, teoricamente, falhar no diagnóstico da infecção. A

fim de tentar eliminar este risco, várias amostras do corpo e antro devem ser obtidas (VAN ZWET et al., 1996).

O teste de urease é o método mais simples, menos dispendioso e fornece resultado dentro de poucas horas ou até mesmo minutos. O exame histológico permite a observação direta do *Helicobacter pylori* e, ao mesmo tempo, fornece informações sobre a morfologia tecidual. Os métodos de coloração usados para demonstração do *H.pylori* são hematoxilina-eosina, o corante de prata Whartin-Starry e o corante de Giemsa (MARSHALL et al., 1987).

O exame histopatológico, em muitos estudos, é considerado padrão para a detecção do *H. pylori*, pois, confirma a presença da bactéria e da gastrite. Há excelente correlação entre a cultura de bactérias e a identificação histopatológica (BARTHEL et al., 1990). A cultura constitui o modo mais específico para estabelecer o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, embora a sensibilidade varie em diferentes centros, possivelmente pelas diferenças nas técnicas empregadas para o cultivo da bactéria. A cultura, além de fornecer o diagnóstico definitivo, permite avaliar a sensibilidade do *H. pylori* a agentes usados no tratamento, fator importante para a prática clínica (VAN ZWET et al., 1996). É importante para os estudos de fatores de virulência e tipagem genética. Porém é uma técnica diagnóstica cara e requer um laboratório especializado (TONELLI et al., 2000).

São poucos os centros no Brasil que usam o isolamento da bactéria como método diagnóstico, pois este é caro, requer utilização de diversos materiais e equipamentos específicos, bem como uma estrutura laboratorial especializada. Portanto, a técnica tem sido utilizada apenas no âmbito da pesquisa (SIQUEIRA, 2007).

O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é outro método usado para a detecção do *H. pylori*. Este método detecta seqüências específicas de ácidos nucleicos da bactéria. Utiliza oligonucleotídeos sintéticos, que agem como “primers” para a replicação enzimática das seqüências de DNA definidas (CLAYTON et al.,1992). O PCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade, pode ser feito diretamente das biópsias gástrica ou duodenal, do suco gástrico, da placa dentária, da saliva, da cultura e até mesmo das fezes. Devido sua alta sensibilidade, o PCR é muito utilizado em estudos epidemiológicos (LEHOURS et al., 2003).

A técnica do PCR em biópsias gástricas é usada para tipar e identificar as cepas de *H. pylori* presentes no estômago (GARCIA et al.,2006). Como também permite diferenciar entre reincidências e novas infecções ao comparar as cepas do

microorganismo antes e depois do tratamento e assim contribuindo para a erradicação da bactéria.

É recomendado o emprego de pelo menos dois métodos para um diagnóstico mais acurado da infecção pelo *H. pylori*, porém, na prática, a escolha é influenciada pela disponibilidade, experiência e circunstâncias clínicas.

Como uma possível alternativa à endoscopia GI superior, Perez-Trallero et al., 1995, propuseram o Enteroteste para obtenção de suco gástrico. Este teste permite obter suco gástrico sem a necessidade de endoscopia digestiva alta sendo possível detectar *H. pylori* a partir do cultivo do suco e de PCR.

Nesse teste o indivíduo ingere um cordão com uma cápsula contendo um fio no seu interior. Após 1 hora, o fio é retirado e o suco gástrico aderido ao cordão será utilizado para testes moleculares e cultura. Os resultados obtidos com esse método são variáveis com sensibilidade de 75% a 100%, em países como Austrália (SAMUELS et al., 2000) e México (TORRE et al., 2001) respectivamente e quando comparado com o exame histológico ou cultura da biópsia. Também em Taiwan e no Peru foi relatada alta sensibilidade e especificidade do método (WANG et al., 2003; VELAPATIÑO, et al., 2006). No Brasil não existe nenhum estudo validando o Enteroteste.

O Enteroteste pode ser utilizado para avaliar sensibilidade antimicrobiana em pacientes que não curaram a infecção, sendo enfatizada a importância do método associado ao teste respiratório, na falência do tratamento com o objetivo de determinar a resistência pós-terapêutica do *H. pylori* aos antibióticos, com pouco inconveniente para o paciente (LEODOLDER et al., 2005).

Os estudos das cepas de *H. pylori* têm sido realizados, na maioria das vezes, através da obtenção de fragmentos de biópsia gástrica obtidos pela endoscopia ou pela cirurgia para cultivo ou extração de DNA do tecido. Entretanto a endoscopia é um método, desconfortável, oneroso, não se tornando adequado para estudos de comunidade e principalmente em crianças, grupo esse de fundamental importância para o estudo do *H. pylori*, pois a infecção é adquirida na infância.

Portanto, o Enteroteste mostra-se de grande valia, pois, pode ser facilmente executado sem representar nenhum risco para os indivíduos, sendo importante se validar o teste no Brasil. A utilização desse teste poderá ampliar o conhecimento não somente acerca dos genótipos das cepas de *H. pylori*, mas também aprofundar os estudos sobre a transmissão da bactéria e resistência primária aos diversos antimicrobianos.

O grande desafio é o melhor entendimento da epidemiologia do *H. pylori*, fato que permitirá o desenvolvimento de medidas que modificarão o perfil epidemiológico da infecção e o das doenças a ela relacionadas. Entretanto, não existe nenhum estudo em nível nacional utilizando o Enteroteste, que poderá ser de grande valia não somente para estudos de pesquisa, mas também para aplicabilidade nos protocolos de diagnóstico clínico.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Estudar o perfil genético das cepas de *H. pylori* em indivíduos residentes na comunidade Parque Universitário utilizando método não endoscópico (Enteroteste).

2.2 Objetivos Específicos

1- Avaliar a sensibilidade e especificidade do método não endoscópico (Enteroteste), em obter *H. pylori* para cultura e PCR, tendo como método de comparação o Teste Respiratório.

2- Avaliar os genótipos *vacA* e alelos, *cagA* e sítios de fosforilação EPIYA das cepas de *H. pylori*, na comunidade urbana Parque Universitário.

3. Método

3.1. Casuística

Foram convidados para participar do estudo, indivíduos residentes na comunidade Parque Universitário, na cidade de Fortaleza, no período de agosto de 2009 a fevereiro de 2010, que haviam participado de outro estudo epidemiológico e que tinham o diagnóstico positivo para a infecção por *H. pylori* através do teste respiratório.

Os que aceitaram participar do estudo foram entrevistados por agentes de saúde, e responderam um questionário, onde foram obtidas as seguintes informações: idade, sexo, grau de instrução, fonte de água, hábitos de higiene, condições hidrossanitárias, e agrupamento familiar (número de pessoas no domicílio, número de crianças por domicílio, número de compartimentos no domicílio), dor no estômago, diarreia, dor de cabeça e vômito. Todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo não haviam feito uso de medicamentos antimicrobianos nos últimos seis meses.

O estudo foi submetido à análise e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa – CONEPE da Universidade Federal do Ceará – UFC. Todos os participantes e/ou responsáveis por estes, receberam informações sobre o estudo em questão, fornecendo consentimento por escrito para a realização do mesmo.

3.2. Desenho do Estudo

Estudo descritivo e analítico transversal.

3.3. Seleção dos Participantes

Foram critérios de inclusão:

- Participantes ou, responsável legal, que assinaram o termo de consentimento informado.
- Indivíduos que tinham diagnóstico de *H. pylori* através do teste respiratório.

Foram critérios de exclusão:

- Indivíduos portadores de doenças prévias, tais como, Insuficiência Renal, Insuficiência Hepática e Insuficiência Cardíaca Congestiva.

3.4. Procedimento

3.4.1 Realização do Teste Respiratório

O teste respiratório foi determinado como teste padrão ouro para a detecção da presença de *H. pylori*. Para realização do teste respiratório, o participante ficou em jejum prévio de seis horas. Primeiramente, soprou em um balão, em seguida ingeriu 200 ml de suco de laranja contendo uréia marcada com C¹³, após 30 minutos da ingestão do suco, soprou em um outro balão. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa Bacteriológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte - Brasil. A concentração do C¹³ respiratório foi analisada pelo Espectômetro Infravermelho não Dispersível (IRIS Analysator, Wagner Analysen Technik, Worpswede, Germany®). O teste foi realizado segundo as instruções do fabricante e os valores foram considerados positivos de acordo com protocolos validados previamente. O teste foi considerado positivo quando o valor do C¹³ sobre a linha de base era maior que 5% (HILDEBRAND et al., 1997).

3.4.2. Preparação das cápsulas utilizadas no Enteroteste

As cápsulas utilizadas no Enteroteste foram produzidas no laboratório de gastroenterologia da Unidade de Pesquisas Clínicas da UFC, obedecendo todas as técnicas assépticas e estéreis. Foram utilizadas cápsulas de gelatina de tamanho 1. Foi feito um orifício na extremidade de maior diâmetro da cápsula utilizando uma agulha estéril de calibre 21x 1". Em seguida com ajuda da agulha foi introduzido o fio no interior da cápsula, onde este já havia sido esterilizado em autoclave a 121°C previamente. Na parte de menor diâmetro da cápsula foi colocado 150 mg de amido, como excipiente inerte. As cápsulas foram fechadas, embaladas em papel alumínio estéril e armazenadas em ambiente fresco de no máximo a 25 °C, até seu uso.

3.4.3. Realização do Enteroteste

A metodologia utilizada para realização do Enteroteste foi baseada em protocolos desenvolvidos por Samuels et al. Segundo o protocolo, o indivíduo, após um jejum prévio de oito horas, deglute uma cápsula de gelatina contendo em seu interior um fio (fibra absorvente) de 90cm de comprimento, juntamente com 200 ml de água. Após a

deglutição da cápsula, 20cm do fio ficou fora da boca, preso à bochecha. O fio foi retirado após uma hora de ingestão da cápsula, 30 cm do fio foi descartado e sua porção distal foi colocada em meio de transporte, contendo 5ml de caldo BHI (Difco®) e glicerol a 20% (Sigma®). As amostras foram identificadas, acondicionadas em caixa térmica, a uma temperatura de aproximadamente 4 °C e, imediatamente, enviadas ao laboratório em um tempo máximo de quatro horas, onde foram prontamente processadas.

3.4.4. Cultivo do *H. pylori*

As amostras do fio foram colocadas em um tubo contendo solução salina, com o objetivo de diminuir a contaminação orofaríngea, em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm's, por 10 minutos, para formação de precipitado. Após a centrifugação, foi colhida uma porção do sedimento do fundo do frasco para cultivo das placas contendo meio Ágar-sangue de carneiro com skirrow, que é um meio seletivo composto por antimicrobianos e antifúngicos. As culturas foram incubadas sob condições microaerofílicas (5% O₂, 10% de CO₂, 85% N₂) a 37 °C utilizando as atmosferas Probac® durante 4 a 7 dias. As colônias de *H. pylori* foram identificadas pelas características morfológicas e pelos testes bioquímicos de urease, catalase e oxidase.

3.4.5. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para extração do DNA da cultura da bactéria foram removidas 05 colônias da placa e adicionado 180µl de tampão ATL e agita no vortex por 15 segundos. Em seguida adiciona 20µl de proteinase K e leva ao vortex por 15 segundos, incuba a 56°C de 01 a 03 horas. Adiciona 200µl de tampão AL, agita no vortex por 15 segundos e incuba a 70°C por 10 minutos. Adiciona 200µl de etanol e leva ao vortex por 15 segundos. Em seguida, faz-se a eluição do material celular com os tampões AW1, AW2 e AE, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (QIAGEN®).

Para a extração do DNA da bactéria do suco gástrico, são necessários 200µl do suco gástrico, a este é adicionado 20µl da proteinase K e 200µl de tampão AL leva ao vortex por 15 segundos. Adiciona 200µl de etanol e agita em vortex por 15 segundos. Elui-se o material seguindo o protocolo com os tampões específicos de QIAGEN® para extração do DNA da bactéria.

O material genético de *H. pylori* extraído tanto das culturas, como do suco gástrico foi utilizado como modelo de DNA para a amplificação dos genes *cagA*, *vacA*

e seus alelos a partir de “primers” específicos previamente descritos na literatura. Foram colocados 5,0µL do DNA extraído em tubos específicos e adicionados os reagentes: 12,5µL da enzima Taq-DNA polimerase GoTaq green[®], que catalisa as reações; 2,5µL dos “primers” específicos para o gene *cagA* e para os alelos *s1*, *m1* e *m2* do gene *vacA* das cepas de *H. pylori*. As reações aconteceram separadas para cada gene. A tabela 1 mostra os primers utilizados para cada marcador.

A amplificação do DNA extraído foi realizada em termociclador (My Cycler – Bio-Rad, CA. - USA[®]), obedecendo ao protocolo de ciclos específicos para cada gene.

Conforme ATHERTON et al., 1995, os ciclos para a amplificação do gene *cagA*, foi de 42 ciclos sendo: 1 ciclo para desnaturação inicial de um minuto e meio a 94°C, 39 ciclos com desnaturação a 94°C por um minuto; anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos, seguidos de mais um ciclo de extensão final a 72°C por sete minutos.

A sequência sinal (alelo *s1*) do gene *vacA* foi amplificada da seguinte forma: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C, 34 ciclos com desnaturação a 95°C por um minuto; anelamento a 52°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguido de mais um ciclo de extensão final de sete minutos a 72°C. Para os alelos da região média do gene *vacA* (*m1* e *m2*), a amplificação deu-se da seguinte maneira: 1 ciclo inicial a 95°C de um minuto e trinta segundos, seguido de 34 ciclos com desnaturação de trinta segundos a 95°C; anelamento a 56°C por um minuto; extensão por um minuto e trinta segundos a 72°C e um último ciclo de cinco minutos a 72°C para extensão final.

Após extração e amplificação do DNA, foi feito um gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídio. O gel foi submerso em tampão TAE (Promega[®]), e as amostras de DNA foram adicionadas ao gel para observação das bandas de nucleotídeos do DNA de *H. pylori*. O gel foi submetido à corrida eletroforética a 100V por 40 minutos. Após a corrida, o gel foi revelado em máquina fotográfica reveladora eletrônica de ultravioleta (Bio-Rad, CA. - USA[®]) para visualização dos pares de bases, sendo o resultado considerado positivo ou negativo para os genes em questão de acordo com a presença ou ausência dos pares de bases pertencentes a eles (figuras 4- 7).

Para identificação dos sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA, as amostras de DNA extraído foram enviadas e analisadas por sequenciamento de DNA na Faculdade de Medicina de Belo Horizonte – MG, através de PCR em tempo real, para a observação da quantidade de sítios de fosforilação e confirmação dos demais marcadores.

Tabela 1: Primers usados na amplificação dos genes *cagA* e alelos de *vacA*

Primer	Sequência (5' - 3')	Pares de base
ureA - F	GCCAATGGTAAATTAGTT	491
ureA - R	CTCCTTAATTGTTTTTAC	
cagA - F	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	349
cagA - R	CTGCAAAAGATTGTTTGCGAGA	
vacA s1 - F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259
vacA s1 - R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
vacA s2 - F	ATGGAAATACAACAAACACAC	286
vacA s2 - R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
vacA m1 - F	GTAATGGTGGTTTCAACACC	290
vacA m1 - R	TAATGAGATCTTGAGCGCT	
vacA m2 - F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352
vacA m2 - R	CATAACTAGCGCCTTGCAC	

(Atherton, et al 1995; Peek, et al 1999).

3.5 Análise Estatística

Foi utilizado o programa operacional de análise estatística SPSS 16.0 *for Windows*, para estabelecimento das frequências das variáveis analisadas. Foram calculadas a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo para os métodos utilizados neste estudo.

4. RESULTADOS

Foram convidados para participar deste estudo 70 indivíduos. Destes, 20 se recusaram a participar. Dos 50 restantes, 43 foram positivos para a presença do *H. pylori* pelo teste respiratório e 7 negativos. Em torno de 10% dos que realizaram o Enteroteste apresentaram intolerância na primeira tentativa, realizando o teste com sucesso posteriormente.

Dos 43 indivíduos infectados com *H. pylori*, 21 eram do sexo feminino (48,8%), e 22 do sexo masculino (51,2%) e idade variou entre 08 e 18 anos, com média de idade de 14,3 anos. A figura 1 mostra a distribuição dos indivíduos estudados quanto ao sexo. O grupo foi dividido por faixas etárias, onde, 32 participantes tinham de 08 a 14 anos (74,4%) e 11 participantes de 15 a 18 anos (25,6%). A figura 2 mostra a distribuição dos participantes do estudo quanto à faixa etária. Dos 7 indivíduos não infectados, 04 eram do sexo feminino (57,2%), e 03 eram do sexo masculino (42,8%) e idade variou entre 15 e 27 anos, com média de idade de 20 anos.

Neste trabalho foi feita a genotipagem do *H. pylori* utilizando a técnica de PCR, para identificação genes *cagA*, *vacA* e de seus alelos *s1/s2* e *m1/m2* em amostras de suco gástrico colhidas no Enteroteste.

Figura 1: Distribuição dos participantes quanto ao sexo

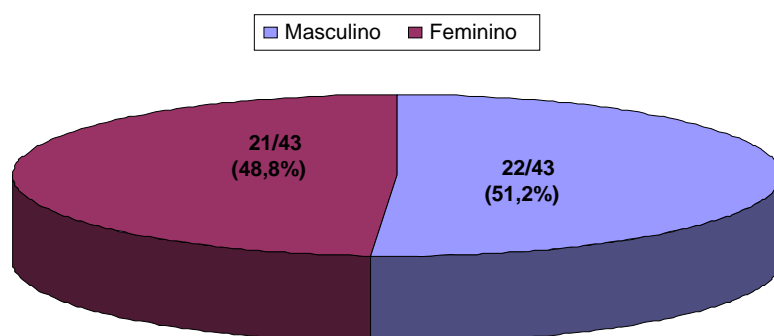
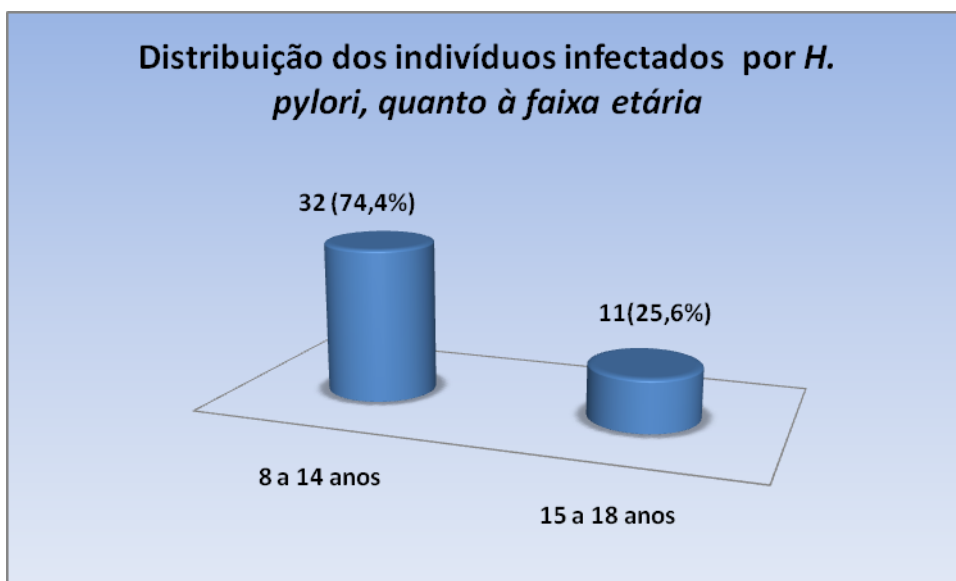


Figura 2: Distribuição dos indivíduos infectados por *H. pylori*, quanto à faixa etária



Conforme análise do questionário, todas as residências tinham estrutura em alvenaria, 58,1% dos domicílios têm mais de quatro compartimentos, 95,3% têm água fornecida pela Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE). Em 51,2% (22/43) dos domicílios, residem de 06 a 09 pessoas, em 46,5% (20/43), de 02 a 05 pessoas e em 2,3% (1/43) mais de 10 pessoas.

Avaliando o número de crianças por domicílio, observou-se que, 55,8% (24/43) têm até 03 crianças, em 27,9% (12/43), há de 04 a 06 crianças e em 16,3% (7/43), residem mais de 06 crianças por domicílio.

Com relação aos sintomas foram analisados: dor no estômago, diarreia, dor de cabeça e vômito. O grupo positivo apresentou os seguintes resultados: 13 participantes (30,2%) relataram sentir dor no estômago e 30 (69,8%) negaram tal sintoma. Episódios diarreicos foram relatados por 10 indivíduos estudados (23,3%), e 33 (76,7%) não apresentaram diarreia. Apenas 17 indivíduos (39,5%) informaram apresentar dor de cabeça, e 26 (60,5%) não relataram o sintoma. O vômito foi relatado por 06 (14%) dos pesquisados e 37 (86%) não apresentaram vômito.

Ao realizar o cultivo do suco gástrico colhido no enteroteste, foram obtidas 37/43 culturas (86%) positivas para *H. pylori*. Estas foram confirmadas com base na morfologia das colônias e pelos testes bioquímicos de: urease, catalase, oxidase e pela coloração de Gram. Como também foi empregada a técnica de PCR para identificação das cepas, onde foi amplificado o gene *ureA* e a sequência sinal do gene *vacA*.

4.1. Análise da Sensibilidade e Especificidade dos métodos utilizados.

Foi possível cultivar 37 amostras (86%), a partir do suco gástrico. Como já mencionado anteriormente, as culturas foram consideradas positivas para o *H. pylori*, tendo como base: a morfologia, os testes bioquímicos e coloração de Gram. As 7 amostras provenientes de pacientes com teste respiratório negativo foram culturas negativas.

Foi realizado PCR do material colhido através do enteroteste em todas as 50 amostras, das 43 positivas para *H. pylori* através do teste respiratório, 33 (76,7%) foram PCR positivas para gene ureA e a sequência sinal do gene vacA. As sete amostras *H. pylori* negativas pelo teste respiratório foram também negativas no PCR.

Foi encontrada uma sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o PCR de: 77%, 100%, 100% e 41,2% respectivamente. Na cultura, foram encontrados os valores de: 86%, 100%, 100% e 53,8% para os respectivos parâmetros acima mencionados. O Teste Respiratório obteve uma sensibilidade e especificidade de: 100%, sendo considerado como teste padrão para detecção do *H. pylori*. A tabela 2 mostra os valores citados para cada teste.

Tabela 2: Análise dos métodos diagnósticos empregados				
Técnica	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP%	VPN%
PCR	77	100	100	41,2
Cultura	86	100	100	53,8

4.2-Distribuição dos alelos do gene vacA nas cepas estudadas

Das cepas estudadas do suco gástrico colhido no enteroteste, 33 (76,7%) foram positivas e 10 (23,3%) foram negativas, de acordo com a presença da sequência sinal do gene vacA. Para o alelo s1 foram positivas 27/33 (81,8%), para o alelo s2 do gene vacA apenas 6/33 cepas (18,2%) foram positivas. Foi realizada a genotipagem de 17 cepas para o subtipo s1b do vacA e todas foram positivas.

A região média do gene vacA foi expressa em 24 cepas. O alelo m1 foi expresso em 13 cepas (54,2%) e o alelo m2 estava presente em 11 cepas (45,8%).

Com relação à combinação alélica do gene *vacA*, foi encontrada a seguinte expressão nas 33 cepas positivas: 13 (39,4%) *vacAs1m1*, 05 (15,2%) *vacAs1m2*, 06 (18,20%) *vacAs2m2*, 09 cepas (27,2%) apresentaram somente a sequência sinal *s1* do *vacA* sem expressão da região média do gene. Não foram observadas cepas com o alelo *vacA s2m1*. A tabela 3, mostra a frequência da sequência sinal e das combinações alélicas do gene *vacA*, respectivamente.

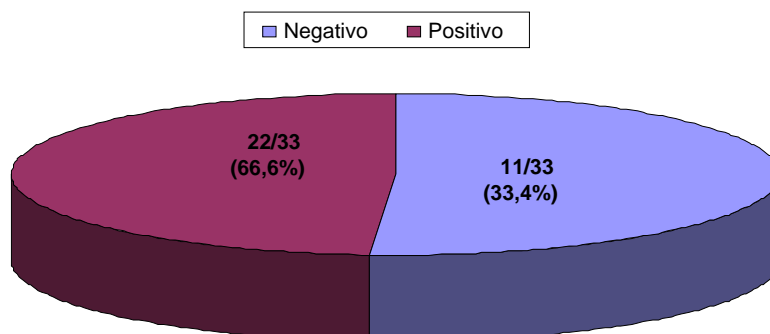
Tabela 3: Caracterização do alelo <i>s</i> e das combinações alélicas do gene <i>vacA</i>		
Genótipos	Frequência (n= 33)	%
<i>vacA s1</i>	27	81,8%
<i>vacAs2</i>	6	18,2%
<i>vacA s1m1</i>	13	39,4%
<i>vacA s1m2</i>	5	15,2%
<i>vacA s2m2</i>	6	18,2%
<i>vacA s1*</i>	9	27,2%

*s1= ausência do alelo *m*

4.3- Distribuição do gene *cagA* e dos sítios de fosforilação EPIYA nas cepas estudadas

Foi feita a genotipagem das 33 amostras estudadas para o gene *cagA*, onde 22 cepas (66,6%) foram positivas para a presença deste gene e 11 (33,4%) foram *cagA* negativas. A figura 3 mostra a distribuição do gene *cagA* na amostra estudada.

Figura 3: Distribuição do gene cagA na amostra estudada.



Para caracterização do potencial de virulência do gene cagA, foram sequenciados os sítios de fosforilação EPIYA. Das 22 cepas sequenciadas, 1 (4,5%) apresentou sítio de fosforilação EPIYA AB, sem presença de sítio C, 12 cepas (54,5%), apresentaram um sítio de fosforilação C, tendo o perfil ABC, 9 (41,0%) apresentaram dois sítios de fosforilação C, com o perfil ABCC. Nenhuma cepa expressou três sítios C de fosforilação. A distribuição dos sítios de fosforilação presentes nas cepas cagA positivas analisadas, está descrita na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos sítios de fosforilação EPIYA do gene cagA

	Frequência	%
sítio AB	1	4,5%
sítio ABC	12	54,5%
sítio ABCC	9	41,0%
total	22	100,0%

A distribuição dos sítios EPIYA encontrados nas cepas estudadas foi o seguinte: O grupo com faixa etária de 8 a 14 anos apresentou 8 (36,4%) cepas com um sítio de fosforilação C EPIYA, e 7 (32,0%) cepas com dois sítios de fosforilação C e apenas um sítio AB. O grupo de 15 a 18 anos, apresentou 4 (18,0%) cepas com um sítio C e também 2 (9,0%) cepas com dois sítios de fosforilação C, com o perfil ABCC e

nenhuma cepa com o perfil AB. A tabela 5 mostra a caracterização dos sítios de fosforilação EPIYA, com relação à idade, onde foram divididos por grupos de faixa etária.

Tabela 5: Caracterização da amostra quanto aos sítios de fosforilação EPIYA quanto à faixa etária

	Sítios EPIYA			total
	AB	ABC	ABCC	
8 a 14 anos	1 (4,6%)	8 (36,4%)	7 (32,0%)	16
15 a 18 anos	0	4(18,0%)	2 (9,0%)	6
total	1	12	9	22

4.4. Distribuição do gene *cagA* associado aos alelos do gene *vacA*

Nas cepas estudadas, a associação do gene *cagA* com os alelos do gene *vacA* foi: 10 cepas (45,4%) expressaram o genótipo *cagA/vacA s1m1*, 3 cepas (13,6%) *cagA/vacA s1m2* e 9 cepas (41,0%) foram *cagA/vacA s1* com ausência de alelo m. nenhuma cepa apresentou a associação do gene *cagA* com os alelos *vacAs2m1* e *vacA s2m2*. A tabela 6 mostra a distribuição dos alelos do gene *vacA* com o gene *cagA*.

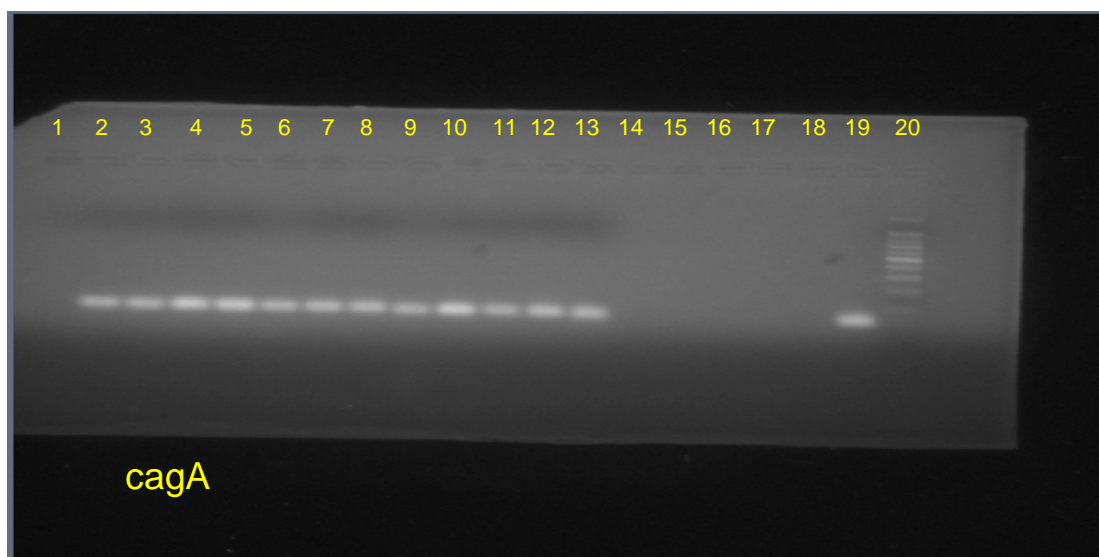
Tabela 6: Distribuição dos alelos do gene *vacA* com o gene *cagA* nas cepas estudadas

genótipos	<i>vacA s1m1</i>	<i>vacA s1m2</i>	<i>vacA s2m1</i>	<i>vacA s2m2</i>	<i>vacA s1*</i>
<i>cagA</i> + (n= 22)	10 (45,4%)	3 (13,6%)	0	0	9 (41,0%)
<i>cagA</i> - (n= 11)	3 (27,3%)	2 (18,2%)	0	6 (54,5%)	0

*ausência do alelo m

Os géis com as bandas dos genótipos estudados estão dispostos nas figuras 4 - 7 a seguir:

Figura 4: Gel de agarose para visualização das bandas do gene *cagA*.



Da esquerda para a direita tem-se:

Poço 1: Controle negativo

Poço 2: *cagA* positivo

Poço 3: *cagA* positivo

Poço 4: *cagA* positivo

Poço 5: *cagA* positivo

Poço 6: *cagA* positivo

Poço 7: *cagA* positivo

Poço 8: *cagA* positivo

Poço 9: *cagA* positivo

Poço 10: *cagA* positivo

Poço 11: *cagA* positivo

Poço 12: *cagA* positivo

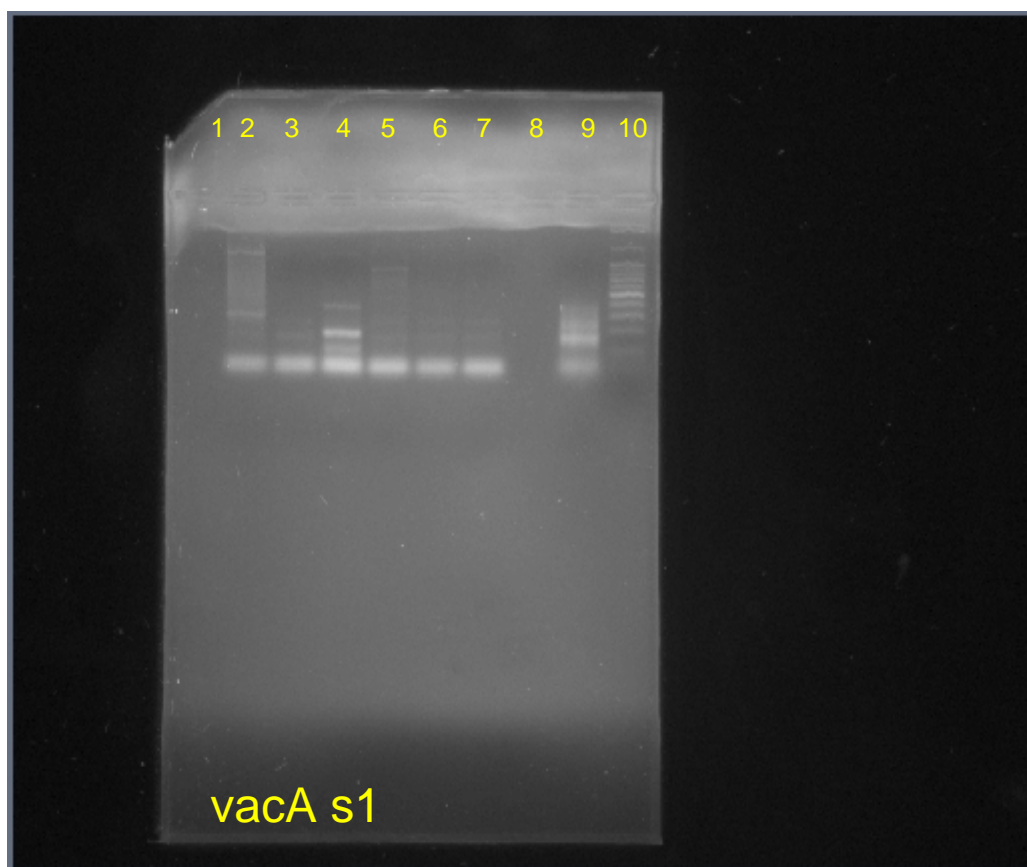
Poço 13: *cagA* positivo

Poços: 14, 15, 16, 17 e 18: vazios

Poço 19: Controle positivo

Poço 20: DNA Ladder

Figura 5: Gel de agarose para visualização das bandas do alelo s1 do gene vacA



Da esquerda para a direita tem-se:

Poço 1: Controle negativo

Poço 2: vacA s1 positivo

Poço 3: vacA s1 positivo

Poço 4: vacA s1 positivo

Poço 5: vacA s1 positivo

Poço 6: vacA s1 positivo

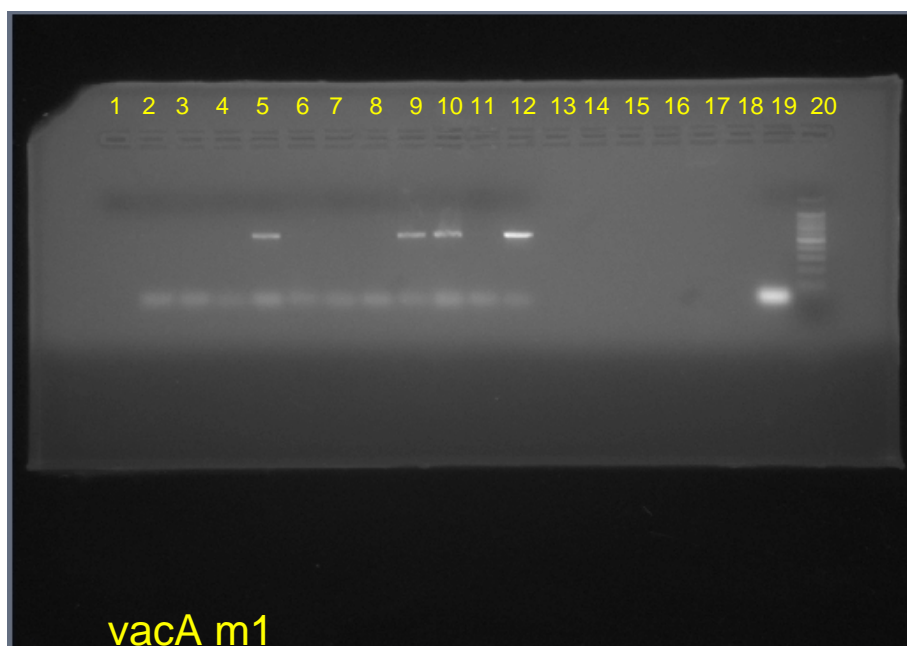
Poço 7: vacA s1 positivo

Poço 8: vazio

Poço 9: Controle positivo

Poço 10: DNA Ladder

Figura 6: Gel de agarose para visualização das bandas do alelo m1 do gene vacA



Da esquerda para a direita tem-se:

Poço 1: Controle negativo

Poço 2: vacA m1 negativo

Poço 3: vacA m1 negativo

Poço 4: vacA m1 negativo

Poço 5: vacA m1 positivo

Poço 6: vacA m1 negativo

Poço 7: vacA m1 negativo

Poço 8: vacA m1 negativo

Poço 9: vacA m1 positivo

Poço 10: vacA m1 positivo

Poço 11: vacA m1 negativo

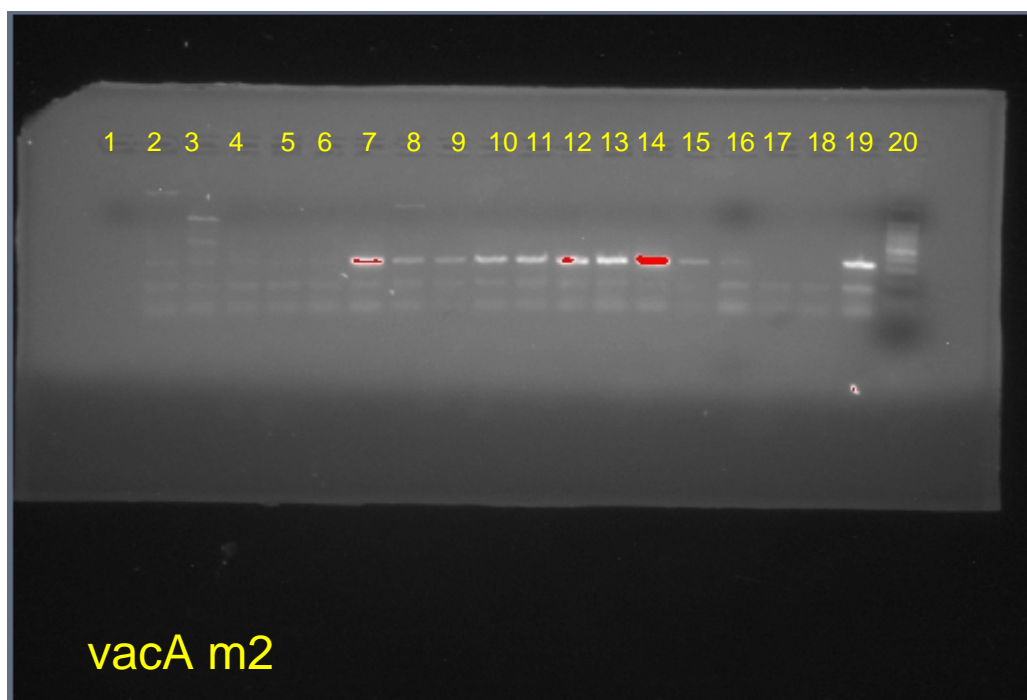
Poço 12: vacA m1 positivo

Poços: 14,15, 16, 17 e 18: vazios

Poço 19: Controle positivo

Poço 20: DNA Ladder

Figura 7: Gel de agarose para visualização das bandas do alelo m2 do gene vacA



Da esquerda para a direita tem-se

Poço 1: Controle negativo

Poço 2: vacA m2 negativo

Poço 3: vacA m2 negativo

Poço 4: vacA m2 negativo

Poço 5: vacA m2 negativo

Poço 6: vacA m2 negativo

Poço 7: vacA m2 positivo

Poço 8: vacA m2 positivo

Poço 9: vacA m2 positivo

Poço 10: vacA m2 positivo

Poço 11: vacA m2 positivo

Poço 12: vacA m2 positivo

Poço 13: vacA m2 positivo

Poço 14: vacA m2 positivo

Poço 15 : vacA m2 positivo

Poço 16: vacAm2 negativo

Poço 17: vacA m2 negativo

Poço 18: vacA m2 negativo

Poço 19: Controle positivo

Poço 20: Leader

5- Discussão

A infecção pelo *Helicobacter pylori* é muito prevalente na população mundial, bem como, na cidade de Fortaleza. É também, significativamente associada ao perfil sócio-econômico das populações, principalmente, nos países em desenvolvimento. (RODRIGUEZ et al., 2005).

Estudos prévios realizados por este grupo, em Fortaleza, têm demonstrado alta prevalência de *H. pylori* tanto em indivíduos residentes na comunidade urbana Parque Universitário quanto em pacientes dispépticos que procuram o Serviço de Gastroenterologia do HUWC, para realização de endoscopia. Também esses estudos mostram que a infecção é adquirida precocemente na infância (RODRIGUEZ et al., 2004).

Diversos estudos demonstram que as cepas de *H. pylori* que expressam o perfil genético de patogenicidade estão relacionadas com desfechos mais graves como câncer gástrico (Atherton et al., 2005). Assim se faz necessário a detecção precoce da bactéria, uma vez que a infecção é adquirida na infância.

Existem poucos estudos na literatura e nenhum a nível nacional avaliando o perfil genético de virulência de cepas de *H. pylori* em indivíduos residentes em comunidades, principalmente em crianças e adolescentes. Essas amostras populacionais são muito importantes, pois são mais representativas do perfil das cepas circulantes em determinada região do que aquelas provenientes de pacientes sintomáticos que realizam endoscopia e acompanhamento ambulatorial.

O isolamento das cepas de *H. pylori* do estômago de pessoas colonizadas por esse microorganismo permite avaliar o perfil genético de virulência das cepas e a suscetibilidade aos diversos antimicrobianos. Os estudos das cepas de *H. pylori* têm sido realizados, na maioria das vezes, através da obtenção de fragmentos de biópsia gástrica obtidos pela endoscopia ou pela cirurgia para cultivo ou extração de DNA do tecido. Entretanto, a endoscopia é um método invasivo, desconfortável e oneroso, não se tornando adequado para estudos em comunidades e principalmente em crianças, grupo esse de fundamental importância, pois a infecção se inicia na infância.

No presente estudo, o suco gástrico de 43 indivíduos, sabidamente infectados pelo *H. pylori*, conforme resultado do Teste Respiratório, foi avaliado através da cultura da bactéria e pela técnica de PCR para determinar a acurácia na genotipagem das cepas infectantes, utilizando o Enteroteste, um método minimamente invasivo. A detecção

molecular do *H. pylori* tem a vantagem de fornecer dados sobre a presença ou ausência do potencial de virulência da bactéria.

A utilização do Enteroteste como procedimento para detecção da infecção pelo *H. pylori*, foi iniciada em 1995, por Perez-Trallero et al, que conseguiram uma sensibilidade de 58% quando analisaram a cultura de pacientes submetidos a este teste e que eram sabidamente positivos para a infecção.

O Enteroteste ainda não foi validado em amostras populacionais no Brasil, assim o objetivo inicial foi avaliar a sensibilidade e especificidade do teste em diagnosticar *H. pylori* tendo como padrão o teste respiratório marcado com C¹³, previamente validado.

O Enteroteste utiliza um fio com uma cápsula já industrializada e pronta para ser utilizada de nome comercial Entero-Test Hp® (HDC Corporation, USA). Nesse estudo o teste foi produzido artesanalmente seguindo o protocolo descrito por Samuels et al., com algumas modificações com relação ao tamanho da cápsula. Foram utilizadas cápsulas menores, o que facilitou em muito a adesão dos participantes, principalmente as crianças. Vale ressaltar que a maior parte dos participantes estão entre 8 e 14 anos de idade. A aceitação do teste foi considerada boa, tendo em vista que apenas dez por cento dos indivíduos convidados reclamaram de desconforto ao realizar o teste.

Os resultados da sensibilidade do Enteroteste em detectar *H. pylori* através da cultura do suco gástrico têm variado bastante desde 81% na Alemanha, por Leodolder et al., 75% no México por Torres et al., resultados similares ao encontrado no presente estudo, cuja a sensibilidade da cultura foi de 86%, com especificidade também de 100%. Já, na China, Leong et al acharam 38% de sensibilidade da cultura.

Samuels et al., utilizando o Enteroteste em uma amostra de 33 pacientes, onde 32 foram positivos através da cultura, apresentou uma sensibilidade de 97%. Resultado superior ao encontrado neste estudo. O aumento significativo da sensibilidade deste método pode ser atribuído à melhoria da técnica e aprimoramento do cultivo do *H. pylori*.

Quando a detecção é feita através do PCR, a sensibilidade também apresenta grande variação de 63% a 94 %. A tabela 7 mostra os estudos realizados com os respectivos índices de detecção de *H. pylori* através de PCR e de cultura.

Nesse estudo a sensibilidade encontrada da técnica de PCR do suco gástrico foi de 77% e sua especificidade foi de 100%. Esses resultados ficam próximos aos relatados por Yoshida et al. e Domínguez et al., para o PCR.

Velapatiño et al., em estudo comparando os tipos de cepas de *H. pylori* obtidas do suco gástrico e do tecido, identificando-as através da cultura e do PCR, demonstraram que as cepas estudadas eram idênticas entre si. Além do mais, Simanti et al., relatam que outra vantagem do método de PCR através do suco gástrico é o êxito da detecção de casos de infecção mista. Devido à distribuição desigual do organismo em toda a mucosa do estômago, existe considerável variação no número de bactérias na amostra de biópsia de um único sítio gástrico. Ao mesmo tempo, cepas geneticamente diferentes do *H. pylori* podem ser predominantes em diferentes locais da biópsia gástrica.

Neste estudo foram genotipadas 33 cepas de *H. pylori* quanto à presença do gene *vacA* e seus alelos. Com relação à expressão da sequência sinal do gene *vacA*, foram encontradas 81,8% de cepas expressando *vacA* s1, e 18,2% *vacA* s2. Essa maior expressão do alelo s1 está de acordo com o relatado na literatura.

Marciokowska et al, em estudo conduzido em uma comunidade rural da Polônia, acharam prevalência de 83,4% de cepas com o alelo s1 do gene *vacA*. No Nordeste do Brasil, Brito et al., estudando pacientes portadores de gastrite e úlcera, acharam uma prevalência geral de 76,8% de cepas *vacA* s1 nessa população. Esses dados indicam que a maioria das cepas encontradas nesse estudo e nos demais têm um maior potencial de codificação e expressão da citotoxina vacuolizante através da presença do alelo s1, que é o principal responsável pelo comando da codificação dessa proteína.

A subtipagem do alelo *s*, mostra que todas avaliadas expressaram o subtipo *vacA* s1b, semelhante ao que é descrito para os países da Península Ibérica, da América Latina (VAN DOORN et al., 1999) e no sudeste do Brasil (PARRA et al., 2003). Em estudo conduzido na região Amazônica, houve um predomínio de cepas s1b, porém, foram encontrados 18% de cepas expressando o subtipo *vacA* s1c, com perfil parecido ao das cepas asiáticas (PARRA et al., 2003).

Os alelos de *vacA* m1e m2 foram igualmente distribuídos nas cepas estudadas. Semelhante ao encontrado em recente metanálise feita por Sugimoto e Yamaoka, avaliando estudos feitos em países em desenvolvimento da África e da América Latina. O estudo dos tipos de cepas tem ajudado a entender a migração dos povos e sua relação com a aquisição do *H. pylori*.

As combinações alélicas presentes nas cepas estudadas foram: *vacA* s1m1 (39,4%), seguida de *vacA* s2m2 (18,2%), *vacA* s1m2 (15,2%). Também foi encontrado

um alto percentual de cepas que não expressaram a região média do gene, expressando somente a sequência sinal (27,2%). Não houve expressão da combinação alélica s2m1.

O maior percentual de cepas vacA s1m1 encontrado, pode ser um indicador de um maior potencial patogênico, uma vez que as cepas mais virulentas são as que expressam esta combinação alélica (UMIT et al., 2008).

O percentual de cepas cagA encontrado nesse estudo foi de 66,6%. A presença do gene cagA foi baseada em resultado obtido por PCR e sequenciamento dos sítios EPIYA, método mais acurado para detecção deste gene (ARGENT et al., 2004). A prevalência encontrada no presente estudo é similar à relatada no estado de Minas Gerais, por Oliveira et al., onde a presença de cepas de *H. pylori* cagA positivas foi de 59,2%, em portadores de gastrite.

Um estudo realizado com crianças de 1 a 16 anos, no estado de São Paulo, por Gatti et al., demonstrou que 80% dos infantes acometidos por gastrite tinham cepas cagA positivas, sugerindo uma forte relação do gene cagA com o desenvolvimento dessa doença, relacionado-a com a infecção precoce e demonstrando haver uma alta prevalência desse tipo de cepas em crianças.

O gene cagA é altamente polimórfico na diversidade de sua região terminal 3', e isso é expresso através da variação dos sítios de fosforilação EPIYA.

A presença dos sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA, nas cepas estudadas foi: 41,0% apresentaram o perfil EPIYA-ABCC, 54,5% tinham EPIYA-ABC e 4,5% expressaram somente o perfil AB. A maioria das cepas expressou um sítio C de EPIYA, o que é indicativo de menor poder de fosforilação intracelular induzido pela bactéria através da proteína CagA.

Todas as cepas avaliadas nesse estudo apresentaram padrão de EPYA-AB ou EPYA-ABC e ABCC, como é descrito em outros estudos em países ocidentais (HIGASHI et al., 2002). Nenhuma cepa apresentou padrão de EPYA-ABD. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Schmidt et al., ao estudar populações de diferentes origens étnicas, bem como os achados de Parra et al., em estudo envolvendo populações indígenas da região amazônica e indivíduos da região sudeste do Brasil, onde todas as cepas apresentaram sítios EPIYA-C.

Esse padrão dos sítios EPIYA, foi similar também ao encontrado em estudo desenvolvido por este grupo em pacientes dispépticos portadores de gastrite, onde todas as cepas estudadas tinham perfil EPIYA-C, onde 42,2% dos indivíduos estudados

tinham cepas com perfil EPIYA-ABCC e 55,6% expressavam EPIYA-ABC (SILVA, 2009).

Já, Bartchewsky Jr. et al., em estudo no estado de São Paulo, encontraram percentuais de 77% de EPIYA-ABC e 8% de EPIYA-ABCC, em portadores de gastrite. Valores diferentes dos encontrados nesse estudo, onde o percentual de EPIYA-ABC foi menor e o de EPIYA-ABCC foi significativamente maior do encontrado em São Paulo, sugerindo que as cepas circulantes em nosso meio sejam potencialmente mais patogênicas, uma vez que expressam mais sítios de fosforilação da proteína CagA.

Muitos estudos têm mostrado diferenças geográficas na prevalência do *H. pylori* e seus genótipos. Existem poucos relatos na literatura no Brasil envolvendo a genotipagem das cepas de *H. pylori* em comunidades. Vale ressaltar que as populações avaliadas nos estudos anteriores, diferem deste por se tratarem de portadores de afecções gástricas, uma vez que os convidados a participar nesta pesquisa eram residentes de uma comunidade urbana e não portadores dessas doenças, sendo a maioria abaixo dos 14 anos de idade. Também não existe um estudo envolvendo o sequenciamento dos sítios de fosforilação EPIYA em tais comunidades, não havendo, portanto, parâmetros de comparação totalmente equivalentes para o presente estudo.

O conhecimento da epidemiologia e transmissão do *H. pylori* permitirá traçar estratégias para diminuir ou até evitar as doenças a ele associadas, determinar os fatores de risco e principalmente as populações mais susceptíveis.

O Enteroteste utilizado mostrou ser um método confiável, por ser um teste simples, seguro, pouco invasivo e eficaz para detectar o *H. pylori* quando a endoscopia não é indicada, podendo ser de grande interesse clínico e epidemiológico, pois este permite que a cultura possa estabelecer terapias de erradicação, mostrando a resistência aos antibióticos e principalmente detectar os genes de maior virulência, sendo bastante útil em estudos populacionais.

6. Conclusão

O Enteroteste mostrou-se um método confiável, de fácil execução, tendo boa sensibilidade e especificidade para identificação do *H. pylori* através do cultivo e da técnica de PCR.

A maioria das cepas genotipadas nesse estudo apresentaram o alelo s1 do gene *vacA* e todas as cepas subtipadas para esse alelo expressaram o subtipo s1b. A combinação alélica mais comum deste gene foi *vacA* s1m1.

Mais da metade das cepas estudadas expressaram o gene *cagA* e a maioria dessas cepas tinham 3 sítios de fosforilação, com perfil EPIYA-ABC, seguido do perfil EPIYA-ABCC, que são marcadores de uma maior atividade de fosforilação da proteína CagA. O gene *cagA* foi predominantemente associado ao alelo *vacA* s1m1.

A combinação desses genótipos e a quantidade de sítios EPIYA expressos sugerem que o padrão de cepas circulantes na comunidade são as que apresentam um maior potencial patogênico.

REFERÊNCIAS

AMY, L. S.; HELEN M. W.; GRACE, Y. H.; LUKE, D. G.; BARRY, J. M. Culture of *Helicobacter pylori* from a Gastric String May Be an Alternative to Endoscopic Biopsy. **Journal Of Clinical Microbiology**, p. 2438–2439, June 2000.

ARAS, R. A.; LEE, Y.; KIM, S. K.; ISRAEL, D.; PEEK, R. M. Jr.; BLASER, M. J. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. **J. Infect. Dis.**, v.188: p. 486–496, 2003.

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

ATHERTON, J. C.; CAO, P.; PEEK, R. M.; TUMMURU, M. K. R.; BLASER, M. J.; COVER, T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 1771-1777, 1995.

ASAHI, M.; ITO, S.; ITO, Y.; SUTO, H.; NAGAI, Y.; TSUBOKAWA, M.; TOHYAMA, Y.; MAEDA, S.; OMATA, M.; SUZUKI, T. SASAKAWA C. *Helicobacter pylori* cagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. **J. Exp. Med.**, 191(4): 593-602, 2000.

BARTCHEWSKY, JR. W.; MARTINI, M. R.; MASIERO, M.; SQUASSONI, A. C.; ALVAREZ, M. C.; LADEIRA, M. S.; SALVATORE, D.; TREVISAN, M.; PEDRAZZOLI JR., J.; RIBEIRO, M. L. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1 β and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 44, n. 2: p. 153-161, 2009.

BARTHEL, J. S.; EVERETT, E. D. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: The “gold standard” and the alternatives. **Rev. Infect. Dis.**, v.12: p. S107, 1990.

- BEDOYA, A.; GARAY, J.; SANZON, F. Histopathology of gastritis in *Helicobacter pylori* infected children from populations at high and low gastric cancer risk. **Hum Pathol** . 34: 206-13,2003.
- BLASER, M. J.; CRABTREE, J. E. CagA and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 106: p. 565-567, 1996.
- BLASER, M.J. & BERG, D.E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J. Clin. Invest.**, 107(7): 767-73, 2001.
- BRAGA, L. L. B. C.; MARSHAL, B. J.; GUERRANT, R. L. *H. pylori*: Gastritis, Peptic Ulcer and Gastric Cancer in Developing Countries. **Edge Develop.**, p.127-144, 1995.
- BRITO, C. A. A.; SILVA, L. M. B.; JUCÁ, N.; NILMA, C.; LEAL, C. N.; SOUZA, W., QUEIROZ, D.; CORDEIRO, F.; SILVA, N. L. Prevalence of cagA and vacA genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98: p. 817-821, 2003.
- BRUCE, E. D. Mecanismos patogênicos do *Helicobacter pylori*. **Clínicas de Gastroenterologia da América do Norte**, v. 1: p.43-57, 1993.
- BURY-MONÉ, S.; KAAKOUSH, N. O.; ASECIO, C.; MÉGRAUD, F.; THIBONNIER, M.; DE REUSE, H.; MENDZ, G.L. Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? **Helicobacter**, v. 10, suppl. 1: p. 40-46, 2006.
- CARDINALI, L.C.C; ROCHA, G.A; ROCHA, A.M . Evaluation of C-urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41: p. 334-335, 2003.
- CHOI, K. D.; KIM, N.; LEE, D. H.; KIM, J. M.; JUNG, H. C.; SONG, I. S. Analysis of the 3' Variable Region of the cagA Gene of *Helicobacter pylori* Isolated in Koreans. **Dig. Dis. Sci.**, v. 52: p. 960-966, 2007.

CLAYTON, C.L.; KLEANTOUS, H.; COATES, P.J MORGAN, D.D; TABAQCHALLI S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol**, v.30, p.192-200, 1992.

COELHO, L. G. V. *Helicobacter pylori* e doenças gastroduodenais. In: MINCIS, M. **Gastroenterologia & Hepatologia - Diagnóstico e Tratamento**, São Paulo: Lemos Editorial, p. 313-332, 1998.

COELHO, L.G.; LEON-BARUA, R.; QUIGLEY, E.M. Latin-American Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. Latin-American National Gastroenterological Societies affiliated with the Inter-American Association of Gastroenterology (AIGE). **Am J Gastroenterol**; 95(10):2688-2691, 2000.

COLE, S.P.; CIRILLO, D.; KAGNOFF, M.F.; GUINEY, D.G.; ECKMANN, L. Coccoid and spiral *helicobacter pylori* differ in their abilities to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. *Infect Immun.*; v. 65, n. 2, p. 843-846, 1997.

COVACCI, A., FALKOW, S.; BERG, D.E.; RAPPUOLI, R. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? **Trends Microbiol** 5:205–8,1997 .

CRABTREE, J. E.; SHALLCROSS, T. M.; HEATLEY, R. V.; WYATT, J. I. Mucosal tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Gut**, v.32: p.1473-1477, 1991.

CRABTREE, J. E.; WYATT, J. I.; TREJDOSIEWICZ, L. K. Inteleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v.47: p.61-66, 1994.

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

DOENGES, J. L. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. **Proc. Soc. Exp. Med. Biol.**, v.38: p. 536-538, 1938.

DRUMM, B.; KOLETZKO, S.; ODERDA, G. *Helicobacter pylori* infection in children: a consensus statement. European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori*. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**; v. 30, n.2: p. 207-213, 2000.

EISIG, J.N.; SILVA, FM - *Helicobacter pylori*. **Rev Bras Med**, v. 59, n. 6: p. 439-442, 2002 .

ERZIN, Y.; KOKSAL, V.; ALTUN, S.; DOBRUCALI, A.; ASLAN, M.; ERDAMAR, S.; DIRICAN, A.; KOCAZEYBEK, B. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotypes and correlation with Clinical Outcome in Turkish Patients with Dyspepsia. **Helicobacter.**, v 11, p 574-580, 2006.

FOX, J.G.; WANG, T.C. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. **Curr. Opin. Gastroenterol**, 18: 15-25, 2002.

GARCIA, A. J. D. P.; GISBERT, J. P. Es el enterotest una alternativa válida a la gastroscopia com biopsias para la detección de *H. pylori*? **Rev Esp Enferm Dig.**, v 98: 542-549,2006.

GATTI, L. L.; LÁBIO, R.; SILVA, L. C.; SMITH, M. A. C.; PAYÃO, S. L. M. *cagA* positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. **The Brazilian Journal of Infections Diseases.**, v. 10, n.4: p. 254-258, 2006.

GRAHAM, D. Y.; ADAM, E.; REDDY, G. T.; ARGAWAL, J. P.; ARGAWAL, R.; EVANS, D. J.; MALATY, H. M.; EVANS, D. G. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Índia: Comparison of developing and developed countries. **Dig. Dis. Sci.**, v.36, n.8, p. 1084-1088, 1991.

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

- HAZEL, S. L.; LEE, A.; BRADY, L.; HENNESSEY, W. *Campylobacter pyloridis*: association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factor in colonization of the gastric epithelium. **J. Inf, Dis.**, v. 153: p. 658-663, 1986.
- HEATLEY, R. V. The *Helicobacter pylori* handbook. 1. Ed . Osney Mead. Balckwell Science, 1995.
- HIGASHI, H.; TSUTSUMI, R.; MUTO, S. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. **Science**, v.295: p. 683-686, 2002.
- HILDEBRAND, P., BEGLINGER, C. Nondispersive Infrared Spectrometry: A New Method for the Detection of *Helicobacter pylori* Infection with the C 13 – Urea- Breath Test. **Clinical Infectious Diseases**, v 25, p 1003-1005, 1997.
- HOLTON, J. Clinical revelance of culture:why, how, and when. **Helicobacter**, v. 2, suppl. 1, p. 25-33, 1999.
- ISRAEL, D.A.; PEEK, R.M. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 15: 1271-90 , 2001.
- KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A.M. U.; GRISI, S. Epidemiological aspects of *helicobacter pylori* infection in childhood and adolescence. **Rev Saúde Pública**, v.36, p. 356-359, 2002.
- KREINITZ, W. Ueber das auftreten von spirochaeten verschiedener form im mageninhalt bei carcinoma ventriculi. **Dtsch. Med. Wochenshr**, v. 32, p. 872, 1906.
- KUIPERS, E.J. Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther**, v.12(Suppl 1), p.25-36, 1998.
- KUSTERS, J. G.; GERRITS, M.M.; VAN STRIJP, J.A.G.; VANDENBROUCKE-GRAULS, M.J.E. Coccoid forms of *helicobacter pylori* are the morphologic manisfestation of cell death. **Infect Immun.**, v 65, n. 9, p. 3672-3679, 1997.

LEHOURS, P.; RUSKONE, F.A., VERGNE, A.; CANTET, A.; MÉGRAUD, F. Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? **Am J Gastroenterol.** 98: 291-5, 2003.

LEODOLDER, A.; WOLLE, K.; VON, AMIM, U.; KAHL, S.; TREIBER, G.; EBERT, M.P.; PEITZ, U.; MALFERTHEINER, P. Breath and string test: a diagnostic package for the identification of treatment failure and antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* without the necessity of upper gastrointestinal endoscopy. **World J Gastroenterol.** v. 28, p. 584-6, Jan,2005.

MAEDA, S.; AKANUMA, M.; MITSUNO, Y.; HIRATA, Y.; OGURA, K.; YOSHIDA, H.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells.

MARCIOKOWSKA, E; IZABELA, R.; OSZKO, O. K.; KOWALCZUK, M. K.; LECH, C.,; ANDRZEJ, K. The evaluation of *vacA* gene alleles frequency in *Helicobacter pylori* strains in children and adults in Podlaskie region. **Folia Histochemica et Cytobiologica** Vol. 45, No. 3, pp. 215-219, 2007.

MARIA ,G. D.B.; CALIXTO, C. B.; ROBERTO, R. A.; PAUL, G.A. C.; IVETTE, G. C.; VLADIMIR, M. C.; NELSON, R. A. P.; GUENEAU,N. PCR detection of *Helicobacter pylori* in string-absorbed gastric juice. **Microbiology Letters** 198 15-16, 2001.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R.: Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet** v. 1, p. 1273-1275,1983.

MARSHALL, B.J.; WARREN, JR.; FRANCIS, G.J.,; LANGTON, S.R.; GOODWIN, C.S.; BLINCOW. E.D. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pylori* associated gastritis. **Am J Gastroenterol** 82:200-10, 1987 .

- MÉGRAUD, F. How should *Helicobacter pylori* infection be diagnosed? **Gastroenterology**. v. 113, p. 93-98, 1997.
- MENDALL, M.A.; GOGGIN, P.M.; MOLINEAUX, N.; LEVY, J.; TOOSY, T.; STRACHAN, D.; NORTHFIELD, T.C. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. **Lancet**. v. 339, p. 896–897, 1992.
- MITCHELL, H.M.; LI Y.Y.; HU, P.J.; LIV, Q.; CHEN, M.; DU, G.G. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J Infect Dis**;166:149-53, 1992.
- MOBLEY, H. L. T. *Helicobacter pylori* urease. In: ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. (Ed.) *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham, United Kingdom: **Horizon Scientific Press**: p.155-170, 2001.
- MORAES, M.M.; SILVA, G.A. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children. **J Pediatr**; 79: 21-8,2003.
- MOTTA, C. R. A.; CUNHA, M. P. S. S.; QUEIROZ, D. M. M.; CRUZ, F. W. S.; GUERRA, E. J. C.; MOTA, R. M. S.; BRAGA, L. L. B. C. Gastric precancerous lesions and *Helicobacter pylori* infection in relatives of gastric cancer patients from northeastern Brazil. **Digestion**., v. 78: p. 3-8, 2008.
- MÜLLER, I.; MEDINA, S. A.; PALACIOS, J.L. Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H. pylori* strain with other *H. pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence factors. **Biol. Res.**;35(1):67-84,2002.
- NDIP, R.N.; MACKAY, W.G.; FARTHING, M.J.G.; WEAVER, L.T. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 36, n. 5, p. 616-622, 2003.

NICOLINE, F.; TANIH, M.; MCMILLAN.; NATHAN, N., LUCY, M. N.D.I.P., LAWRENCE, T. W.; ROLAND, N. N. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA and iceA* genotypes in South African patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Trop**, 2010.

OLIVEIRA, A.M.R.; QUEIROZ, D.M;M.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **Am J Gastroenterol**;89:2201-04, 1994.

PAREJO, R.; GARCÍA, A.; DE RAFAEL, L.; CANTÓN, R.; OLIVARES, F.; BOIXEDA, D., Usefulness of the enterotest method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. **Gut**, 1998.

PARRA, F.C., AMADO, R.C., LAMBERTUCCI, J.R., ROCHA, J., ANTUNES, C.M., PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.s.a.** 100, 177–182,2003 .

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

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

PEREZ-TRALLERO, E.; ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 9, n. 1 2004.

PORTORREAL, A.; KAWAKAMI, E. Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes. **Arq Gastroenterol**. 39: 198-203, 2002.

PRIETO, G.; POLANCO, I.; LARRAURI, J.; ROTA, L.; LAMA, R.; CARRASCO, S. – *Helicobacter pylori* infection in children: clinical, endoscopic, and histologic correlations. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 14:420-5, 1992.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, C.A.; MAGALHÃES, P.P.; MOURA, S.B.; CABRAL, M.M.D.A.; NOGUEIRA, A.M.M.F. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int J Câncer**. v.78, p. 135-139, 1998.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.M.; CARVALHO, A.S.T.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; SOARES, T.F.; SANTOS, A.; CABRAL, M.M.D.A.; NOGUEIRA A.M.M.F. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. **J Infect Dis**, v.181, p. 626-630, 2000.

QUEIROZ, D. M. M.; BITTENCOURT, P.; GUERRA, J. B.; ROCHA, A. M.; ROCHA G. A.; CARVALHO, A. S. IL1RN polymorphism and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains increase the risk of duodenal ulcer in children. **Pediatr. Res.**, v. 58: p. 892-896, 2005.

RAMIREZ-RAMOS, A.R. H.; GILMAN, J. ; WATANABE, A. S.; RECAVARREN, W. ; SPIRA, J.; MIYAGUI, U. C.; RODRIGUEZ, C.; RAMIREZ,I. *Helicobacter pylori* infection in long-term Japanese visitors to Peru. **Lancet** 244:1017–1018, 1994.

RAMIREZ-RAMOS, A., R. H.; GILMAN, J.; WATANABE,Y. J. ; TAKANO, M. J.; ARIAS, S. E.; YOSHIWARA,W. C.; RODRIGUEZ,U. J.; MIYAGUI, M.B.; VELAPATIÑO,C.D.; MENDOZA, R. E.; CHING, A.J.; LEEY, C. J.; GUERRA,V.; COTOYA,C.; SEGOVIA, M. Comparacio´n de la prevalencia de la infeccio´n del esto´mago por el *Helicobacter pylori* en el Peru´ en poblacio´n Japonesa y Peruana. **Acta Gastroenterol. Latinoam.** 35:219–224, 2005.

REHNBERG,L. L.; RAUTELIN, H.; VALLE, M.; KOSUNEN, T. U. Persisting *Helicobacter* antibodies in finish children and adolescents between two and twenty years of age. **Pediatr Infect Dis J.** v.17: p. 796-799, 1998.

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

RODRIGUEZ, M.N.; QUEIROZ, D.M.; RODRIGUES, R.T.; ROCHA, A.M; BRAGA, N. M.B.; BRAGA, L.L. *Helicobacter pylori* infection in adult from poor urban community in Northeastern of Brazil: demographic, lifestyle and environmental factors. **Brazilian Journal of Infectious Disease.** v. 9, n. 5, p. 405-410, 2005.

RODRIGUEZ, M.N.;QUEIROZ, D.M.; RODRIGUES, R.T.; ROCHA, A.M.; LUZ, C.R.; BRAGA, L.L. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a poor urban Community in Fortaleza Northeastern of Brazil . **Revista de Saúde Pública.** v.39, n. 5, p. 847-849, 2005.

ROTH, D.E.; VELAPATIÑO, B.; GILMAN, R.H.; SU, W.W.; BERG, D.E.; CABRERA, L.; GARCIA, E. A comparison of a string test-PCR assay and a stool antigen immunoassay (HpSA) for *Helicobacter pylori* screening in Peru. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.95, p.398-9 ,Jul-Aug,2001.

SALAMA, N.R.; GLEN, O.; LUCY, T.,; STANLEY, F. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. **Infect. Immun.,** 69(2): 730-6, 2001.

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

SCHNEIDER, N.; KRISHNA, U.; ROMERO-GALLO, J.; ISRAEL, D. A.; PIAZUELO, M. B.; CAMARGO, M. C.; SINCINSCHI, L. A.; SCHNEIDER, B. G.; CORREA, P.; PEEK, R. M. Role of *Helicobacter pylori* CagA molecular variations in induction of host phenotypes with carcinogenogenic potential. **J. Infect. Dis.,** v. 119: p. 1-4, Ap. 2009.

SCHMIDT, H.M.; GOH, K.L.; FOCK, K.M.; HILMI, I.; DHAMODARAN, S.; FORMAN, D.; MITCHELL, H. Distinct caga epiya motifs are associated with ethnic diversity in malaysia and singapore. **Helicobacter**. v. 14: p. 256–263, 2009.

SILVA, C.; I.; S.; M. Genótipos cagA, vacA e alelos e sítios de fosforilação de tirosina da proteína cagA do *H. pylori* em pacientes com e sem história familiar de câncer gástrico. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia**, Fortaleza-Ce, 2009.

SIMANTI, D.; SANTANU C.; ABHIJIT C.; AMAL S.; DHIRA, R. S.; RAMAMURTHY, T.; SUJIT KUMAR, B.; DOUGLAS, E. B.; BALAKRISH NAIR, G.; ASISH, K. M. Diagnosis and genotyping of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction of bacterial DNA from gastric juice. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 20: p. 1253–1259, 2005.

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

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P.S.S.; BARRETO, A.S.; QUINTANS – JR, L. J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*. **RBAC**, v. 39, n. 1: p. 9-13, 2007.

SOUTO, F.J.D.; FONTES, C.J.F.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M.M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the State of Mato Grosso do Sul. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro; v.93: p. 171-74, 1998.

SUGIMOTO, M., YAMAOKA, Y. The association of vacA genotype and helicobacter pylori-related disease in latinamerican and african populations. **Clin. Microbiol. Infect.** **Pmid**: 19392900, 2009.

TAYLOR, D. F.; SIMONS, M.; CHANG, N. Differentiation of *Helicobacter pylori* isolates by pulsed-field gel electrophoresis of genome DNA. **Microbiol. Ecol. Health Dis.**, v. 4, special issue: p. S172, 1991.

TOMB, J.F.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A.R. . The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**. v 388 (6642): p. 539-547, 1997.

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

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

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

UMIT, V.; TEZEL, A.; BUKAVAZ, S.; UNSAL, G.; OTKUN, M.; SOYLU, A. R.; TUCER, D.; BILGI, S. The relationship between virulence factors of *Helicobacter pylori* and severity of gastritis in infected patients. **Dig. Dis. Sci.**, v. 54, n. 1: p. 103-110, 2008.

VAIRA, D.; MALFERTHEINER, P.; MERGRAUD, F. Noninvasive antigen-based assay for assessing *Helicobacter pylori* eradication; a European multicenter study. The European *Helicobacter pylori* HpSA study group. **Am J Gastroenterol** 95:925-9, 2000.

VAN DOORN, L.J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PLAISIER, A.; CHNEEBERGER, P.; DE BOER, W. ET AL. Clinical relevance of the caga, vaca, and icea status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**; 115: 58-66 ,1998.

VAN ZWET, A.A.; THIJS, J.C.; ROOSENDAAL, R.; KUIPERS, E.J.; PENA, S.G.J. Practical diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v 8,p.501-07, 1996.

VELAPATIÑO, B.; BALQUI, J.; GILMAN, R.H.; BUSSALLEU, A.; QUINO, W.; FINGER, S.A.; SANTIVANÉZ, L.; HERRERA, P.; PISCOYA, A.; VALDIVIA, J.; COK, J.; BERG, D.E. Validation of string test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infections. **J Clin Microbiol** v4 (3):976-80, 2006.

GRAHAM DY. Relationship between helicobacter pylori ica, Caga, and vaca status and clinical outcome: studies in four Different countries. **J clin microbial** v 37: 2274-9 1999.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GUTIERREZ, O.; KIM, J.G.; KASHIMA, K.; GRAHAM DY. Relationship between helicobacter pylori ica, Caga, and vaca status and clinical outcome: studies in four Different countries. **J clin microbial** v 37: 2274-9 1999.

YAMAOKA, Y.; KIKUCHI, S.; EL-ZIMAITY, H.M.; GUTIERREZ, O.; OSATO, M.S.; GRAHAM, D.Y. Importance of *Helicobacter pylori* a in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. **Gastroenterology**;123(2):414-24, 2002.

WANG, S.W.; YU ,F.J.; LO ,Y.C.; YANG, Y.C.; WU, M.T.; WU, I.C.; LEE, Y.C.; JAN, C.M.; WANG, W.M.; WU, D.C. The clinical utility of string-PCR test in diagnosing *Helicobacter pylori* infection. **Hepatogastroenterologi.** v. 50, p. 1208-13 Sep-Oct, 2003.

WINDSOR, H.M.; ABIOYE,K.E.A.; MARSHALL, B.J. Methodology and transport medium for collection of *Helicobacter pylori* on a string test in remote locations. **Helicobacter.** v. 10, n. 6: p. 630-634, 2005.

Tabela 7: Eficácia do Enteroteste Relatados em Estudos Anteriores

Autor	Ano	N	Técnica	Sensibilidade%	Especificidade%	VPP%	VPN%
Domínguez et al.	2000	29	PCR	79	100	100	75
Ferguson et al	1999	22	Cultura	59	92	83	77
			PCR	63	100	100	80
Kopanski et al.	1996	128	Cultura	66	100	100	40
Leodolder et al.	2005	42	Cultura	81	100	100	88
Leong et al	2003	30	Cultura	38	100	100	41
Parejo et al	1998	27	Cultura	37	100	100	57
		27	PCR	93	100	100	92
Péraz-Trallero et al.	1995	43	Cultura	58	100	100	70
Roth et al	2001	40	PCR	70	100	100	37
Samuels et al	2000	33	Cultura	97	100	100	86
Torres et al	2001	16	Cultura	75	100	100	75
Wang et al	2003	34	PCR	94	96	92	86
Windsor et al	2005	45	Cultura	75	100	100	0
Yoshida et al	1995	114	PCR	76	97	97	71
Total (*)		386	Cultura	65	99	98	59
Total (*)		266	PCR	79	99	98	73
Total (*)		652	Cultura e PCR	70	99	98	65

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo ; PCR: reação em cadeia de polimerase ; (*): média de valor

Questionário – Genótipos das cepas de *H. pylori* vacA e alelos, cag A e sítios de fosforilação EPIYA em uma comunidade urbana de Fortaleza utilizando método não endoscópico.

IDENTIFICAÇÃO

1. Código _____
2. Nome _____
-
3. Data de Nascimento __ / __ / __
4. Sexo: __ (1=masculino; 2= feminino)
5. Endereço: _____
-

HISTÓRIA PSICO-SOCIAL

6. Tipo de Moradia __ (1=alvenaria; 2=taipa; 3=mista)
7. N° de pessoas no domicílio ____
8. N° de compartimentos ____
9. N° de crianças na casa ____
10. N° de adultos na casa ____
11. Origem da água consumida __ (1=CAGECE; 2= bomba; 3=cacimba; 4=chafariz; 5=poço; 6=lagoa; 7=açude; 8=outro)

INFORMAÇÃO CLÍNICA

(1=sim; 2=não)

12. Dor Abdominal ____
13. Vômitos ____
14. Diarréia ____
15. Usa algum medicamento ou usou durante os últimos 6 meses (1=sim; 2=não)

Antibiótico __ Antiinflamatório __ Antiácido __ Outros _____

Termo de Consentimento livre esclarecido

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

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

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

Objetivo: Esse trabalho tem como objetivo avaliar a infecção e os tipos de cepas de *Helicobacter pylori*, através do Teste respiratório e do Enteroteste (deglutição de uma cápsula contendo um fio de algodão).

Procedimento: Você irá responder a um questionário. Será realizado o teste respiratório, onde você irá soprar em um balão, em seguida tomará 200 ml de suco de laranja contendo uma substância, uréia marcada com C 13, que não é radioativo podendo ser utilizado por qualquer pessoa, inclusive crianças e gestantes. Após 30 minutos você soprará outro balão. Outro teste que será realizado é o Enteroteste, onde você irá deglutir uma cápsula, que contém um fio de algodão estéril medindo 90 cm de comprimento e 05 mm de largura (semelhante a uma linha que se usa para fazer trabalhos manuais de crochê). Uma pequena porção ficará para fora da boca e fixado à bochecha com uma fita adesiva. A cápsula será deglutida com um copo de água (200ml) e após 01 hora, o fio será removido. Ambos os testes necessitam de pelo menos 06 horas de jejum prévio. Serão incluídos nesse estudo aqueles que aceitarem participar voluntariamente do estudo e concordarem em realizar os testes. E será excluído do estudo aquele que não aceitar ,ou não conseguir realizar o teste.

Riscos : Esse método é confiável, e não apresenta riscos, apenas causa um leve desconforto pela sensação de um fio na garganta.

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

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

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

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

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

Nome do participante

Nome do responsável

Nome do pesquisador

Nome de quem obteve o TCCE

Assinatura

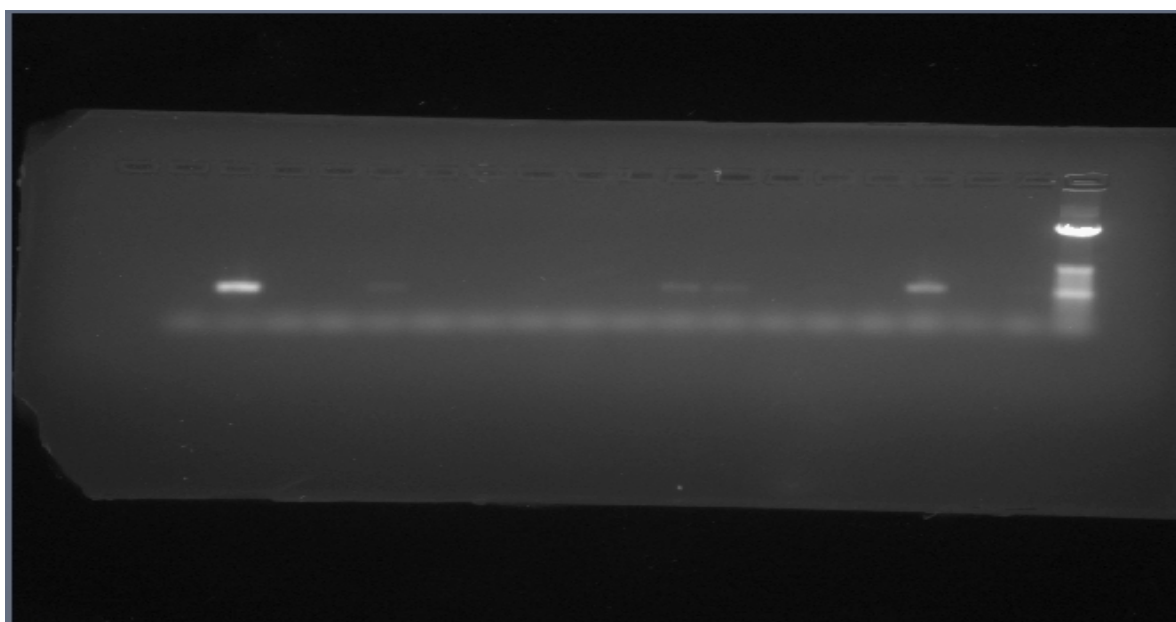
Assinatura

Assinatura

Assinatura

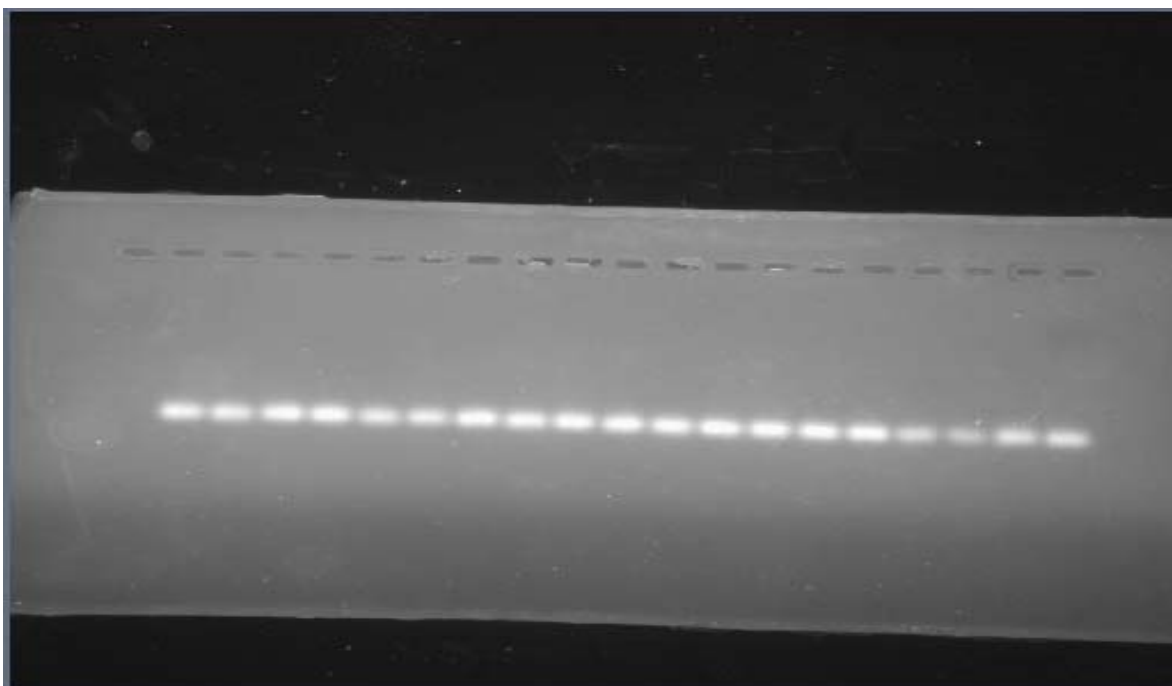
DADOS BRUTOS**PLANILHA DOS NEGATIVOS**

Darliene de Freitas Roque	PSC 045	2.0	14.12.94	15.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0
Joelma Bernardes Matos	PSC 047	2.0	09.05.93	16.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Jamile da Silva Aragão	PSC 048	2.0	16.08.89	20.0	3.0	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	3.0	1.0	1.0	1.0	2.0
Dilliana Maria Ferreira Oliveira	PSC 049	2.0	09.05.92	17.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Diego Barros Cunha	PSC 050	1.0	17.01.89	20.0	3.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Francisco Alan da silva Aragão	PSC 051	1.0	12.09.84	25.0	3.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	3.0	0.0	2.0	1.0	5.0
Marcos Roberto Santos da Silva	PSC 052	1.0	28.02.82	27.0	3.0	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Gel de agarose para ureA

1- C. negativo 6- PSC005 11- PSC010 16- PSC015
 2- PSC001 7- PSC006 12- PSC011 17- PSC016
 3- PSC002 8- PSC007 13- PSC012 18- PSC017
 4- PSC003 9- PSC008 14- PSC013 19- C. positivo
 5- PSC004 10- PSC009 15- PSC014 20- Ladder

Gel de agarose para cagA



1- C. negativo 6- PSC017 11- PSC022 16- PSC027
 2- PSC013 7- PSC018 12- PSC023 17- PSC028
 3- PSC014 8- PSC019 13- PSC024 18- PSC029
 4- PSC015 9- PSC020 14- PSC025 19- PSC030
 5- PSC016 10- PSC021 15- PSC026 20- C. Positivo

DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS

VACs1sg					
		Frequency	Percent	Valid Percent	
Valid	sim	36	83,72093	83,72093	
	não	7	16,27907	16,27907	
	Total	43	100	100	
UREsg					
		Frequency	Percent	Valid Percent	
Valid	sim	42	97,67442	97,67442	
	não	1	2,325581	2,325581	
	Total	43	100	100	
CAGsg					
		Frequency	Percent	Valid Percent	
Valid	sim	42	97,67442	100	
Missing	System	1	2,325581		
Total		43	100		