

2/03  
52294

LEITURA  
INTERNA

Liliana Isabel Duarte Soares Ferreira

## **Diagnóstico Laboratorial da Infecção**

**por *Helicobacter pylori***

TI010/2007

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2006

Liliana Isabel Duarte Soares Ferreira

**Diagnóstico Laboratorial da Infecção**

**por *Helicobacter pylori***

Liliana Isabel Duarte Soares Ferreira

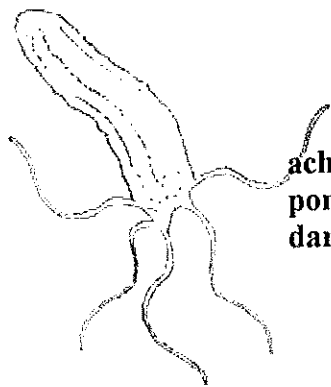
“Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública”.

## Sumário

Pretende-se investigar e descrever o Diagnóstico Laboratorial da infecção por *Helicobacter pylori*, métodos de diagnóstico invasivos e não invasivos, seu valor de diagnóstico e aplicações.

Este trabalho é o resultado de uma pesquisa bibliográfica intensa e está exposto num texto que pretende dar ao leitor a ideia de todos os pontos que se consideram fundamentais para a compreensão da problemática estudada.

O conhecimento dos métodos e técnicas de investigação irá com certeza permitir a realização futura de outros trabalhos neste âmbito.



**“A vida é normalmente comparada a uma maratona, mas acho que é mais como um sprint: longos períodos de trabalho árduo pontuados por breves momentos em que temos a oportunidade de dar o nosso melhor”.**

(Michael Johnson, atleta olímpico)

## **Dedicatórias**

Para os meus pais, pelo apoio que sempre me deram ao longo de toda a minha vida, especialmente nos últimos quatro anos e por terem contribuído para a pessoa que me orgulho de ser.

Ao Pedro Maia, o meu suporte e apoio nas alturas mais difíceis, que sempre me incentivou a nunca desistir, apesar de muitas vezes o querer fazer.

Ao Professor João C. Sousa, pela paciência e apoio.

## **Agradecimentos**

A todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, deixo expresso o meu sincero agradecimento, principalmente:

Ao Professor João C. Sousa que orientou o trabalho e sempre me incentivou a prosseguir com interesse pelo tema.



1. A descoberta de *Helicobacter pylori*
2. Taxonomia
3. Aspectos Microbiológicos
  - 3.1. Caracterização geral
  - 3.2. Morfologia e ultraestrutura
  - 3.3. Metabolismo
  - 3.4. Diversidade genómica – Genes associados à virulência
    - 3.4.1. Gene *vacA*
    - 3.4.2. Gene *cagA*
    - 3.4.3. Gene *baba*
    - 3.4.4. Gene *cagE*
    - 3.4.5. Gene *IceA*
    - 3.4.6. Gene *HP-NAP*
4. Factores de patogenicidade
  - 4.1. Factores de colonização
    - 4.1.1. Adaptação ao pH
    - 4.1.2. Adaptação ao stress
    - 4.1.3. Motilidade
    - 4.1.4. Aderência
  - 4.2. Factores de persistência
    - 4.2.1. Urease
    - 4.2.2. Catalase e superóxido dismutase
  - 4.3. Factores de acção tóxica
    - 4.3.1. Lipopolissacáridos
    - 4.3.2. Citotoxina vacuolizante (*vacA*)
    - 4.3.3. Ilha de patogenicidade *cag*
5. Resposta do hospedeiro à infecção por *H. pylori*
6. Métodos de diagnóstico da infecção por *H. pylori*
  - 6.1. Testes invasivos
    - 6.1.1. Determinação da actividade ureásica
      - 6.1.1.1. Valor do diagnóstico
    - 6.1.2. Exame anatomopatológico



## 1. A descoberta da *Helicobacter pylori*



Figura 1 - Robin Warren e Barry Marshall, em Estocolmo, na atribuição do Prémio Nobel.

Em 1979 Robin Warren, anatomopatologista do Hospital Royal Perth na Austrália, alerta para a presença de bactérias curvadas observadas em biopsias gástricas de doentes com úlcera gastroduodenal. Não foi possível estabelecer uma relação de causa-efeito, dado o facto de esta bactéria curvada não ser cultivável *in vitro* (1, 2).

Barry Marshall, em 1983, apresenta, na revista *Lancet* e no II Congresso Internacional sobre Infecção por *Campylobacter*, as condições culturais para o isolamento desta bactéria a partir das biopsias gástricas de doentes com gastrite crónica activa. Um ano mais tarde descreve-se a associação desta bactéria com úlcera gastroduodenal.

Esta bactéria Gram negativa cresce laboratorialmente em condições de microaerofilia, sendo por isso designada por *Campylobacter pyloridis*. Mais tarde foi designada por *Helicobacter pylori*.

A relação de causa-efeito entre a presença de *Helicobacter pylori* e gastrite ou úlcera gastroduodenal foi constatada, em 1985, de modo fascinante, quando Barry Marshall ingere um inóculo bacteriano de *Helicobacter pylori* e contrai infecção experimental.

Fica assim demonstrado que *Helicobacter pylori* é o agente etiológico da gastrite e da úlcera péptica em humanos.

Mais tarde, verifica-se que a erradicação de *Helicobacter pylori* com antibióticos conduzia à cura desta infecção. (3, 4, 5)

De forma mais complexa surge também, a possibilidade da implicação da bactéria não só na gastrite e na úlcera gastroduodenal, como também em determinados tipos de cancro gástrico, como os denominados MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue).

Em 1994, a IARC (International Agency of Research on Cancer), dependente da OMS, inclui *Helicobacter pylori* como agente carcinogénio do grupo 1. (6)

A 3 de Outubro de 2005, Barry J. Marshall e J. Robin Warren (*Figuras 1 e 2*) receberam o prémio Nobel da Fisiologia e Medicina, pela descoberta de *Helicobacter pylori* e a sua relação com a gastrite e úlcera péptica.



Figura 2 – Diplomas dos prêmios Nobel recebidos por Robin Warren e Barry Marshall

## 2. Taxonomia

No século XVII, Linné definiu regras para a organização taxonômica dos microrganismos, colocando no mesmo grupo microrganismos com semelhantes características fenotípicas. Contudo, este método apresentou algumas limitações: as características para ser considerado no grupo eram escolhidas arbitrariamente. Para combater as limitações às regras taxonômicas definidas por Linné, foi desenvolvida uma outra classificação, a classificação numérica. Esta mesma tem em conta um maior número de características fenotípicas, estando atribuída a cada característica um determinado valor, sendo depois feita uma análise estatística que permite a classificação do organismo. (8, 10)

Recentemente foi estabelecida uma nova classificação, a genômica. Esta mesma é baseada na composição dos graus de similaridade existentes entre sequências de nucleótidos em diferentes estirpes.

Actualmente uma espécie bacteriana é definida se o nível de DNA/DNA hibridizado entre estirpes é pelo menos de 70%.

A composição de sequências no gene que codifica o rRNA 16S, é também um critério para definir uma espécie bacteriana. Dois organismos com sequências idênticas no 16S rRNA assumem-se como pertencentes à mesma espécie. (7, 9)

As características gerais do genoma de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) estão descritas na figura 3.

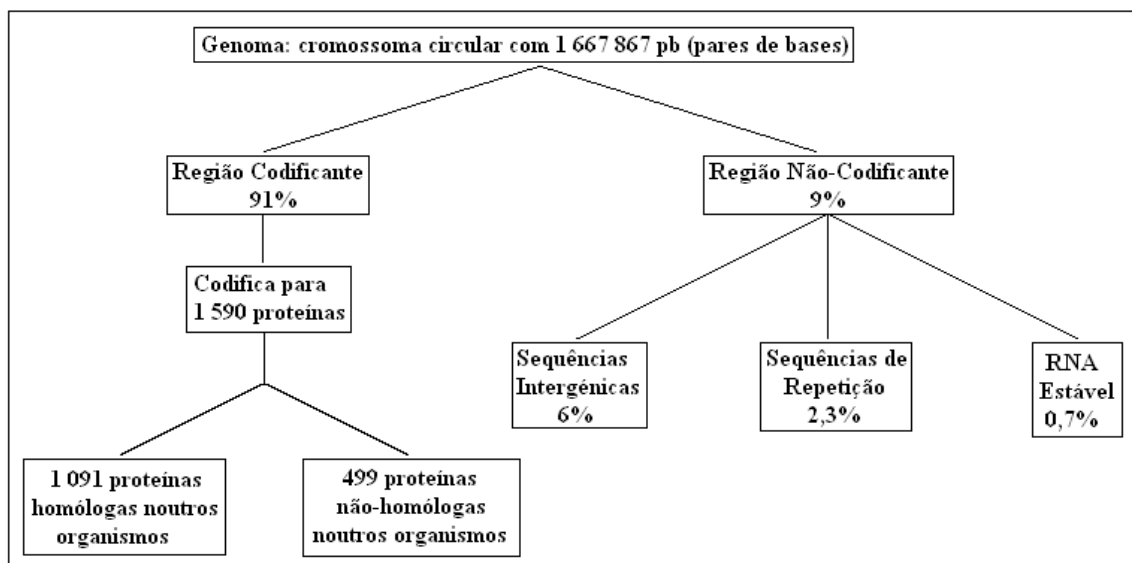


Figura 3 - Características gerais do genoma da *Helicobacter pylori*

### 3. Aspectos microbiológicos

#### 3.1. Caracterização geral

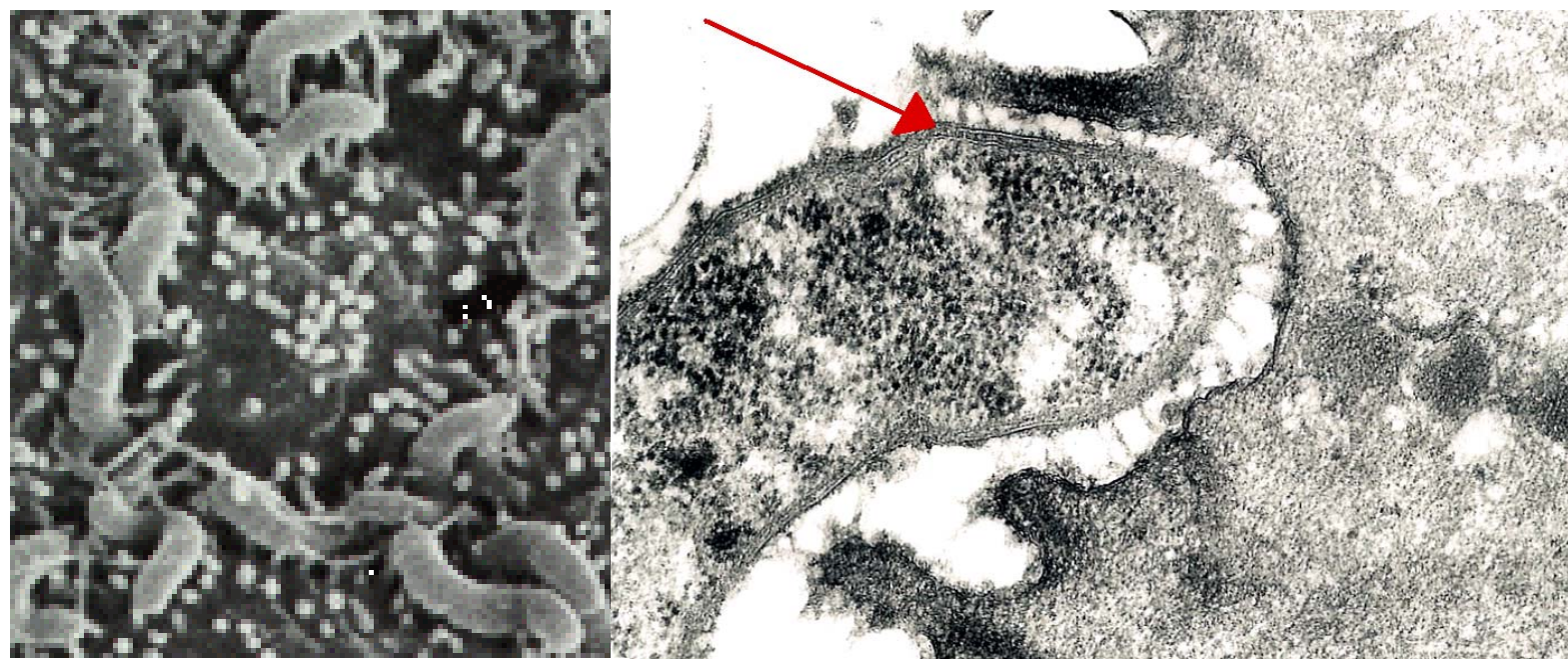


Figura 5 – Células de *H. pylori* na mucosa gástrica, observado por microscopia electrónica.

Figura 4 – Célula de *H. pylori* aderente à mucosa gástrica.

→ De notar a presença da OM (membrana externa) típica da parede celular das bactérias Gram negativo

*H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa (Figura 4), que coloniza exclusivamente o epitélio gástrico humano, localizando-se normalmente na mucosa antral ou fúndica do estômago, sob a camada mucosa, à superfície das células epiteliais (Figura 5). Em termos de requisitos de oxigénio, as bactérias pertencentes a este género caracterizam-se por serem microaerófilas. A *H. pylori* apresenta crescimento em condições de microaerofilia, formando colónias não pigmentadas, translúcidas e com 1-2 nm de diâmetro. A temperatura óptima de crescimento *in vitro* é de 37° C. As espécies pertencentes a este género são catalase, oxidase e urease positivas, sendo a degradação de ureia especialmente rápida. A redução de nitrato e a hidrólise do hipurato são variáveis dentro das espécies deste género, contudo a *H. pylori* não reduz o nitrato. As

bactérias do Género *Helicobacter* possuem actividade de fosfatase alcalina e  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase e são naturalmente resistentes à vancomicina, às sulfonamidas e ao trimetoprim. A *H. pylori* também é naturalmente resistente à cefalotina (11, 12). O genoma da *H. pylori* tem cerca de 1.600.000 pb (pares de bases). O conteúdo médio de C + G (Citosina + Guanina) é de 39%, havendo zonas específicas em que este conteúdo varia, como a ilha de patogenicidade *cag*, associado com a produção do antigénio *cagA* (13). O cromossoma de da *H. pylori* possui cerca de 91 % de ORF ( Open Reading Frames – fases abertas de leitura), das quais 84% são aparentemente comuns a todas as estirpes. Das ORF não obíquas, 50% são específicas da *H. pylori*, codificando para proteínas com função desconhecida, 8,6% codificam para enzimas de restrição ou modificação e 6,2% estão relacionados com elementos transponíveis.

### 3.2. Morfologia e Ultraestrutura

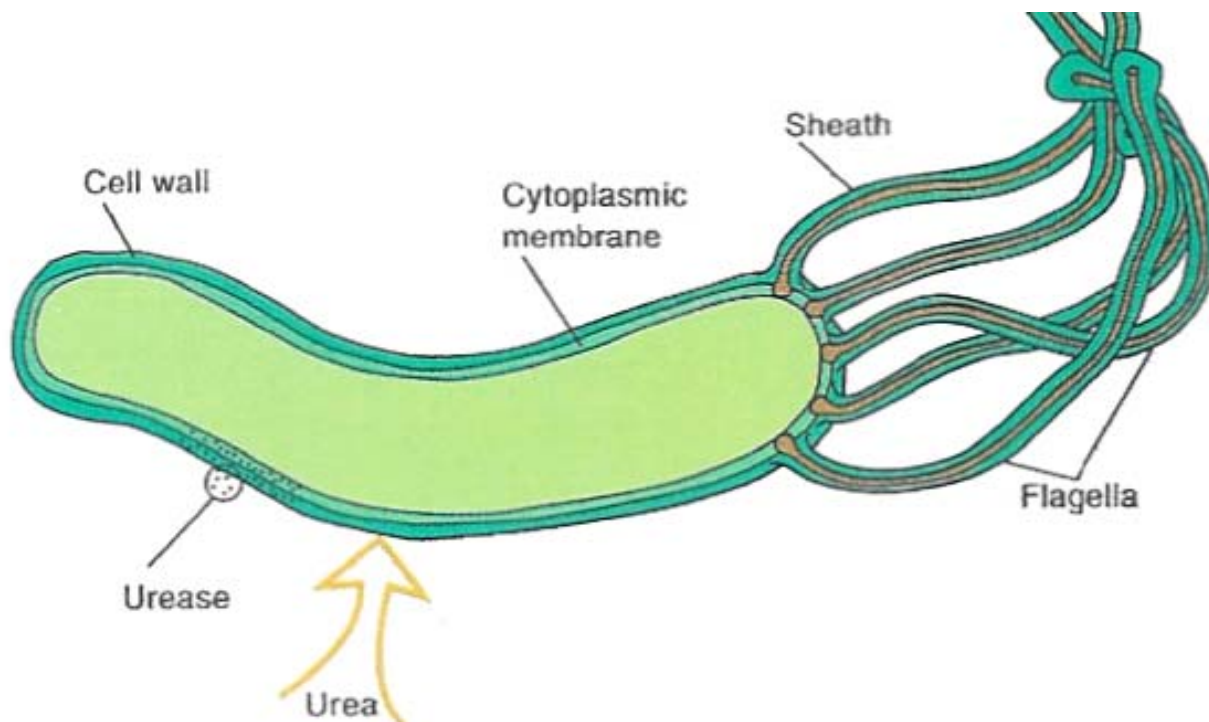


Figura 6 – Esquema da célula de *H. pylori*, mostrando a presença de flagelos.

A *H. pylori* apresenta uma forma helicoidal, curva ou recta com os extremos arredondados. O seu tamanho varia entre 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  de largura por 2,5-5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, possuindo 4-7 flagelos unipolares (Figura 6), que atravessam a parede celular, e estão ligados à membrana citoplasmática por um disco basal (11). Na extremidade, os flagelos apresentam uma forma de bulbo bastante característica, e são constituídos por uma unidade central envolvida por uma bicamada fosfolipídica que os protege da acidez gástrica (14). Em condições de stress físico ou químico a *H. pylori* pode apresentar uma forma cocóide com um tamanho variável entre 0,8-1,0  $\mu\text{m}$ , não cultivável *in vitro*. Estas formas também possuem flagelos unipolares, e apesar de não serem cultiváveis, mantêm aparentemente a capacidade de sintetizar DNA (15).

### 3.3. Metabolismo

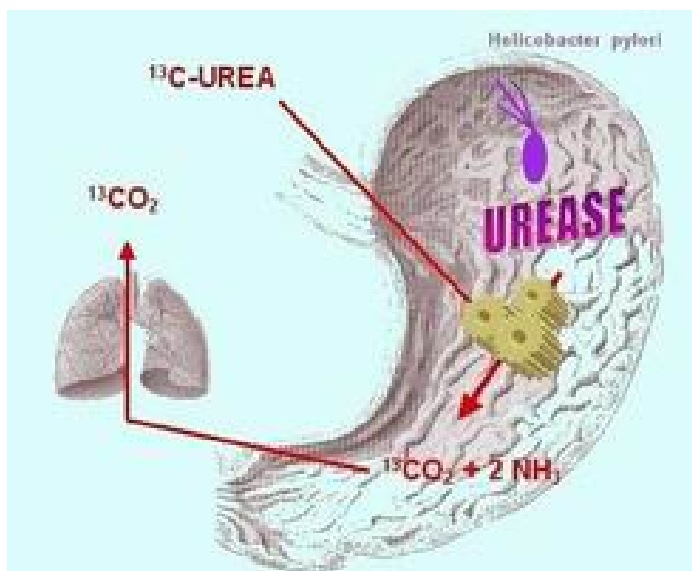


Figura 7 – Esquema mostrando que a urease de *H. pylori* hidrolisa a ureia do estômago em CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>, o que cria nichos de neutralidade de pH para o crescimento bacteriano.

A glicose é aparentemente o único hidrato de carbono utilizado pela *H. pylori* e o seu metabolismo pode seguir as vias oxidativa ou fermentativa, apesar do seu carácter microaerófilo obrigatório (16). A entrada deste composto na célula é mediada por uma permease, específica para glicose e galactose, não se conhecendo outras permeases de hidratos de carbono na *H. pylori* (17).

O azoto, tal como o carbono é um dos compostos essenciais para o crescimento de microrganismos. A *H. pylori* consegue utilizar vários compostos como fontes de azoto, como a ureia, amoníaco ou alguns aminoácidos. O amoníaco é produzido pela bactéria através da enzima urease, que permite a libertação do azoto presente na ureia na forma de iões amónio (Figura 7). A forma de assimilação destes iões é determinada pela disponibilidade no meio de energia e azoto, que controlam a acção de 2 enzimas, glutamina sintetase e glutamato deshidrogenase.

Em termos de composição em ácidos gordos, uma das características únicas desta bactéria é a síntese de novo de 3 colesteril glucosídeos, que representam cerca de 25% dos lípidos totais. Estas moléculas são sintetizadas por plantas e fungos, mas são raras em bactérias e animais superiores. Os colesteril glucosídeos sintetizados pela *H. pylori*

possuem uma ligação glicosídica que não foi ainda descrita noutros procariotas nem em eucariotas (18).

A produção de aminoácidos pela *H. pylori* é limitada, sendo necessário fornecer alguns aminoácidos ao meio para o seu crescimento. Através da utilização de vias anabólicas e catabólicas, os aminoácidos podem ser usados para a produção de enzimas e outras proteínas, ou como fontes de carbono e azoto. A *H. pylori* não produz as enzimas necessárias para constituir as vias metabólicas para a síntese de arginina e histidina. Os aminoácidos isoleucina, metionina, fenilalanina e valina também são necessários para o crescimento desta bactéria, já que as suas vias metabólicas se encontram incompletas (18). No entanto, a *H. pylori* apresenta crescimento em meio desprovido de glicose, desde que alguns aminoácidos estejam presentes no meio de cultura, o que indica que podem ser utilizados como fonte de carbono e conseqüentemente, de energia (19). Por outro lado, este microrganismo apresenta a capacidade de converter arginina em ureia, o que pode constituir uma fonte de azoto importante para o seu metabolismo (20).

O ferro é um dos elementos mais importantes nos processos biológicos, apesar de ser necessário em concentrações muito baixas. Na presença de oxigénio, o ferro encontra-se oxidado na forma Fe(III), que forma polímeros insolúveis a pH neutro. Na ausência de oxigénio, o ferro encontra-se na forma Fe(II), que é relativamente solúvel. O controlo da concentração de ferro no meio é muito importante, já que, por um lado, o ferro é um ião essencial para o funcionamento de diversas enzimas, o que implica que haja necessidade de armazenar este elemento, por outro lado, pode ser tóxico em elevadas concentrações (18). Conhecem-se 13 moléculas que fazem parte da regulação deste elemento noutras bactérias, ao nível da sua regulação, armazenamento e assimilação. Alguns análogos destas moléculas já foram descritos na *H. pylori*, mas o sistema completo de regulação não está ainda esclarecido (18). No entanto, sabe-se que a aquisição do ferro é mediada por uma lactoferrina humana, o que pode estar relacionado com a especificidade do hospedeiro verificada neste agente infeccioso.

### 3.4. Diversidade genómica – Genes associados à virulência

A diversidade genética da *H. pylori* tem sido alvo de muitos estudos, desde a variabilidade entre estirpes isoladas de diferentes indivíduos à variabilidade entre estirpes isoladas do mesmo indivíduo (21,22). Todos estes estudos têm mostrado que existem níveis de variação consideravelmente elevados entre isolados da *H. pylori*. A diversidade genómica da *H. pylori* deve-se principalmente a eventos de recombinação entre estirpes. A presença de mais de uma estirpe num hospedeiro e a competência natural desta bactéria poderão aumentar a probabilidade de recombinações homólogas (18). As variações genómicas podem ser também devidas a outros factores, como a ocorrência de mutações pontuais num gene (alteração num único nucleótido), é bastante frequente na *H. pylori*, e normalmente não origina diferenças ao nível dos aminoácidos. Outro mecanismo que esta espécie usa para gerar diversidade genómica é a organização de genes em mosaico, sendo o gene *vacA* um bom exemplo(23).

#### 3.4.1. Gene VacA

A colonização da mucosa gástrica pela *H. pylori* requer um complexo processo adaptativo. O factor-chave, que permite à bactéria sobreviver à acidez gástrica e atravessar o lúmen do estômago, é a enzima urease, que converte a ureia em amónia e bicarbonato (40). Para isso é necessária a produção da citotoxina *vacA*, que induz a formação de canais selectivos de aniões nas células epiteliais, levando à exsudação da ureia para a mucosa gástrica. A *vacA* é considerada um importante factor de virulência, visto que contribui para a produção de alcalóides, pela urease, que podem induzir danos no DNA (29, 36, 40).

O gene *vacA* está presente em todas as estirpes de *H. pylori* e compreende duas partes variáveis, *s* e *m* (Figura 8). A região *s* (codifica o sinal peptídico) está localizada no final da cadeia 5' e possui dois alelos, *s1* ou *s2*, sendo que para o alelo *s1* existem 3 subtipos: *s1a*, *s1b* e *s1c*; a região media (*m*) possui os alelos *m1* ou *m2*(25). A combinação em mosaico dos alelos da região *s* com os alelos da região *m* determina a produção de citotoxinas, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria. As estirpes

portadoras do genótipo vaca *s1/m1* produzem grande quantidade de toxina, enquanto as estirpes *s1/m2*, pouca ou nenhuma toxina. As estirpes *vacA* do tipo *s1a* parecem ser mais patogênicas que as *s1b* e *s1c* ou *s2*, sendo mais relacionadas com a úlcera péptica. As estirpes *m1* estão associadas a maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo *m2* (Quadro I) (42).

Alelos	Genótipos	Citotoxicidade
<i>s1a</i>		
<i>s1b</i>	<i>s1/m1</i>	Elevada
<i>s1c</i>	<i>s1/m2</i>	Baixa / Moderada
<i>s2</i>	<i>s2/m1</i>	-
<i>m1</i>	<i>s2/m2</i>	Ausente
<i>m2</i>		

Quadro I – Correlação entre genótipos de *H. pylori* e citotoxicidade.

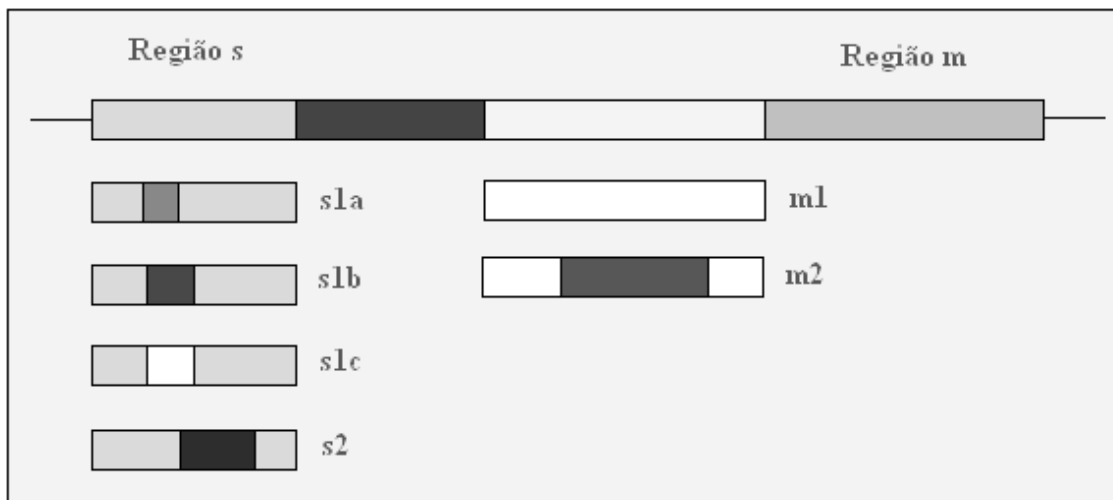


Figura 8 - Mosaico do gene *vacA* ( adaptado da bibliografia 25).

### 3.4.2. Gene CagA

O primeiro gene específico identificado na *H. pylori* foi o *Citotoxin Antigen Associated* (*cagA*), que está fortemente associado ao risco de desenvolvimento de cancro gástrico (33). As estirpes *cagA*<sup>+</sup> tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, como a IL-1b e IL-8 (28, 32). Estudos realizados, mostram que pacientes infectados por estirpes que expressam *cagA* têm probabilidade três vezes maior de desenvolver cancro gástrico do que aqueles infectados por estirpes *cagA*<sup>-</sup>. O gene *cagA* é considerado marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag-PAI*), que possui de 35 a 40 kb, comporta 31 genes (28) e é encontrada em cerca de 60% das estirpes ocidentais. A ilha *cag-PAI* (*cag* pathogenicity island) é um componente do genoma da *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção, que actua como agulha e serve para injectar moléculas efectoras da bactéria na célula hospedeira (Figura 9), permitindo que a bactéria module vias de metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (27, 38, 39).

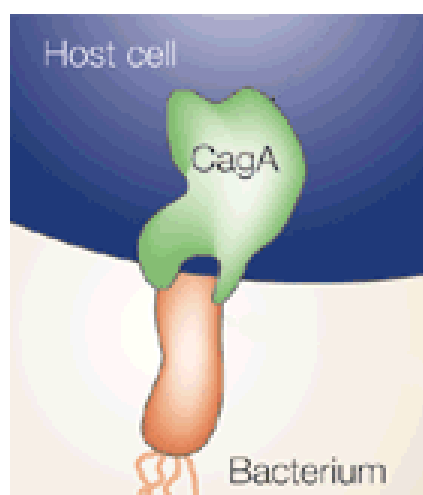


Figura 9 – Esquema mostrando o contacto íntimo da mucosa gástrica com *H. pylori* *cag A*<sup>+</sup>.

Recentemente, quatro grupos de pesquisadores demonstram que componentes da *H. pylori* induzem alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citosqueleto e alterações morfológicas que estimulam a célula a espalhar-se e se alongar de forma idêntica à produzida pelo factor de crescimento dos hepatócitos. Além disso, factores da bactéria podem induzir a desfosforilação de proteínas normalmente fosforiladas (26).

A proteína *cagA* da *H. pylori* actua como antigénio altamente imunogénico. A estrutura do gene revela uma região 5' altamente conservada, mas com uma região 3' com número variável de sequências repetidas, o que leva à variação do comprimento da proteína. Como a proteína *cagA* é fortemente imunogénica, qualquer variação no seu comprimento pode levar a diferentes respostas no hospedeiro, incluindo diferentes graus de resposta inflamatória.

### **3.4.3. Gene BabA**

Os factores de aderência da bactéria ao epitélio gástrico favorecem a colonização e contribuem para a sua patogenicidade (35). O factor de aderência blood group antigen adhesin (*babA*) ligado ao grupo sanguíneo Lewis<sup>b</sup> foi descoberto recentemente. Ele pode ser um importante produto de patogenicidade ao permitir o contacto entre a bactéria e o epitélio e facilitar a libertação de factores de virulência como *cagA* e *vacA*. O gene *babA* possui dois alelos distintos: *babA1* e *babA2*. Em 1999, um estudo (30) demonstrou a associação entre o alelo *babA2* e a presença de ulcera péptica e adenocarcinoma gástrico.

### **3.4.4. Gene CagE**

O predomínio de neutrófilos na mucosa gástrica, observado em pacientes infectados por estirpes *cagA* positivas, é ligado ao aumento da secreção da interleucina 8 (IL-8) secretada pelas células epiteliais da mucosa gástrica. Entretanto, estirpes *cagA* negativas também induzem aumento da secreção da IL-8 (34). Isto deve-se ao facto de que a proteína *cagA* não actua directamente sobre a IL-8. O gene ligado ao aumento da produção da IL-8 é o *cagE*, que é um dos genes da ilha *cag* (31).

### **3.4.5. Gene IceA**

Recentemente, outro gene da *H. pylori* foi descrito e denominado Induced By Contact With Epithelium (*iceA*). A função de *iceA1* não está clara, mas este alelo apresenta forte homologia com a endonuclease de restrição do tipo II da *Neisseria lactamica*. A sua expressão é regulada pelo contacto da *H. pylori* com as células epiteliais da mucosa gástrica. A expressão deste alelo é associada à úlcera péptica e ao cancro gástrico (33). A função do alelo *iceA2* também é desconhecida.

### **3.4.6. Gene HP-NAP**

A gastrite induzida pela *H. pylori* é caracterizada por infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A intensidade da inflamação correlaciona-se com a severidade dos danos induzidos à mucosa e ao DNA. Em 1995, foi descrito o gene Neutrophils-Activating Protein (*HP-NAP*) da *H. pylori* e relacionaram a sua expressão ao potencial de indução de inflamação, mesmo em estirpes *cagA* negativas. O produto do gene *HP-NAP* induz aderência de neutrófilos às células endoteliais e estimula a produção de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio pelos neutrófilos (37).

## 4. Factores de patogenicidade

### 4.1. Factores de colonização

#### 4.1.1. Adaptação ao pH

As condições de pH do nicho ecológico da *H. pylori* são controladas pela secreção de ácido para o lúmen do estômago. O seu pH óptimo de crescimento *in vitro* é entre 6 e 7, não ocorrendo crescimento a pH inferior a 3, mesmo na presença de ureia (43). A *H. pylori* não é considerada acidófila, já que o seu metabolismo diminui em ambientes com pH baixo, mas sim um microrganismo neutrófilo que se adaptou ao ambiente ácido do estômago (18). A enzima urease é produzida em níveis muito elevados, cerca de 6% do total de proteína bacteriana, sendo a base da sobrevivência desta bactéria em pH ácido (50). Esta enzima catalisa a degradação da ureia em amoníaco e CO<sub>2</sub> (Figura 7), permitindo a *H. pylori* criar um microambiente neutro à sua volta no habitat ácido do estômago (52). A urease da *H. pylori* é diferente das outras bactérias. Encontra-se não só no citoplasma como à superfície da bactéria (44), possui dois pH óptimos, sendo um deles ácido, e é composta de apenas 2 subunidades (43, 49). A síntese e activação desta enzima requer 4 genes acessórios, *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH*, para além dos genes *ureA* e *ureB* que codificam para as duas subunidades da enzima (18). É uma metaloenzima, necessitando de níquel para a sua actividade e o seu bom funcionamento depende de varias enzimas, que controlam a incorporação, transporte e armazenamento do níquel (46, 48, 50, 18, 57).

Para além da urease, vários estudos parecem indicar que a *H. pylori* desenvolveu outros mecanismos de adaptação ao baixo pH. Pode utilizar as ATPases de membrana para ajustar as diferenças de potencial entre o interior e o exterior da célula, ou pode também criar um potencial de membrana positivo no interior da célula através de transportadores aniónicos de membrana (53, 17). Por outro lado as aminas, produto da descarboxilação de aminoácidos, podem ter um papel importante na regulação do pH (56).

### **4.1.2. Adaptação ao stress oxidativo**

Durante o processo inflamatório da mucosa gástrica, verifica-se o aumento de moléculas tóxicas à base de oxigénio. A *H.pylori* tem capacidade de resistir às agressões oxidativas destes compostos. As 3 enzimas responsáveis por estes mecanismos são a catalase, a superóxido dismutase e a alquilhidroperóxido redutase. O anião superóxido (altamente tóxico) é convertido em peróxido de hidrogénio pela superóxido dismutase, cuja transformação em oxigénio e água é catalisada pela enzima catalase (54). A enzima alquilhidroperóxido redutase catalisa a conversão do alquilhidroperóxido, outro composto tóxico.

### **4.1.3. Motilidade**

Uma das características da *H. pylori* mais importantes para a colonização do epitélio gástrico é a sua motilidade, que lhe permite mover-se através da mucosa gástrica (47). Esta característica é conferida pelos flagelos, que possuem uma bainha característica deste género (Figura 6), que envolve o centro do flagelo e o protege da acidez gástrica (45, 11). Outra característica interessante destas estruturas celulares é serem constituídas por polímeros de duas subunidades: a flagelina maior, FlaA, e a flagelina menor, FlaB (51, 59). A regulação da síntese dos flagelos é um processo complexo que envolve a acção concentrada de pelo menos 40 genes (18). Para além dos flagelos, a *H. pylori* utiliza outros meios para se movimentar através da mucosa gástrica. O movimento de quimiotaxia tem sido bastante descrito na *H. pylori*, sendo mediado pela concentração no meio de alguns aminoácidos e de ureia (55).

### **4.1.4. Aderência**

Outro factor considerado necessário à colonização da mucosa gástrica pela *H. pylori* é a aderência da bactéria às células epiteliais gástricas. A *H. pylori* exhibe um forte tropismo para a mucosa gástrica humana, o que estará provavelmente relacionado com a presença de receptores celulares situados exclusivamente a este nível. Diversos tipos de adesinas

foram já descritas para a *H. pylori*, que lhe permitem interagir com as células epiteliais gástricas, nomeadamente através da ligação ao ácido siálico existente nas cadeias açucaradas dos glicolípidos de membrana (1), a receptores sulfatados, a antigénios fucosilados dos grupos sanguíneos e à fosfatidiletanolamina (51). dados recentes sugerem que os factores de aderência podem contribuir para a patogenicidade da *H. pylori*. Estudos utilizando ratinhos transgénicos que exprimem o epítipo humano Lewis<sup>b</sup> na sua mucosa gástrica, mostraram que o antigénio Lewis<sup>b</sup> funciona como receptor para uma adesina da *H. pylori*, e que a aderência da bactéria às células gástricas resulta no desenvolvimento de gastrite crónica e atrofia gástrica (11). A ligação preferencial da *H. pylori* ao antigénio Lewis<sup>b</sup>, que constitui um determinante do grupo sanguíneo O, poderá explicar o risco aumentado de desenvolvimento da doença ulcerosa péptica em indivíduos deste grupo sanguíneo, a adesina que medeia a aderência da *H. pylori* aos antigénios Lewis<sup>b</sup>, produzidos pelas células epiteliais gástricas, é a proteína babA.

## **4.2. Factores de persistência**

A infecção pela *H. pylori*, uma vez estabelecida no estômago persiste normalmente durante toda a vida do hospedeiro. Parece assim que a resposta imunitária dirigida contra a bactéria é ineficaz na sua eliminação da mucosa gástrica, sendo a persistência da infecção, e conseqüente cronicidade da reacção imunitária e inflamatória, o que explica a virulência deste microrganismo. Os factores envolvidos na persistência da infecção constituem assim determinantes patogénicos.

### **4.2.1. Urease**

A enzima urease da *H. pylori* contribui para a persistência da bactéria na mucosa gástrica, na medida em que, ao alcalinizar o meio através da libertação de amoníaco, poderá ter um efeito inibidor sobre as células fagocitárias, impedindo a sua actuação eficaz (50). outro potencial mecanismo de invasão à resposta imunitária do hospedeiro é a camuflagem dos antigénios bacterianos pela fixação de imunoglobulinas à superfície da *H. pylori*. Ao contrario de outras bactérias urease positivas, que possuem actividade ureásica no interior do citoplasma, a enzima da *H. pylori* tem também uma localização

extracelular. Assim a camuflagem deste abundante antigénio poderá proteger a bactéria de uma resposta imunitária contra a própria urease (79). Independentemente destes mecanismos, foi sugerido que a abundância de antigénio libertados pela bactéria no meio extracelular, poderá saturar os anticorpos locais, tornando ineficaz a resposta imunitária (70).

#### **4.2.2. Catalase e superóxido dismutase**

A resposta inflamatória intensa induzida pela infecção por *H. pylori* é composta entre outros, por células fagocitárias, em particular os monócitos e os neutrófilos. Foi sugerido que a *H. pylori* é capaz de resistir à fagocitose, através da acção principal da enzimas catalase, superóxido dismutase e também a urease, tal como descrito anteriormente. Após a fagocitose, ocorre um processo oxidativo, com libertação de metabólitos de oxigénio reactivos, como o peróxido de hidrogénio, aniões superóxido e os radicais hidroxil. Estes metabólitos são tóxicos para os microrganismos que, no entanto, possuem enzimas capazes destoxificar estas substancias, nomeadamente a catalase e a superóxido dismutase, também produzidas pela *H. pylori* (75, 80). No entanto o seu papel como determinantes de virulência permanece ainda por esclarecer.

### **4.3. Factores de acção tóxica**

#### **4.3.1. Lipopolissacáridos (LPS)**

As moléculas de LPS, família de glicolípidos encontrados na membrana externa das bactérias Gram-negativas, estão também presentes na espécie *H. pylori*, e apesar do seu baixo poder antigénico, pareem ter um papel importante na patologia deste microrganismo. Diversos estudos mostraram que o LPS contribui para a modificação da estrutura da mucosa gástrica, quer pelo efeito inibitório do processo de glicosilação e de sulfatação da mucosa (74), quer por estimulação da secreção de pepsinogénio (82). mais recentemente foi descrita uma terceira actividade biológica da molécula de LPS, relacionada com a sua fracção glicoproteica, que tem homologia estrutural com as

cadeias oligossacáridas dos antígenos de Lewis<sup>x</sup> e Lewis<sup>y</sup>. Estes motivos antigénicos foram encontrados no LPS de 80% das estirpes de *H. pylori*(21). verificou-se que os indivíduos infectados com estas estirpes desenvolviam anticorpos dirigidos contra aqueles epítopes antigénicos. Como as epítopes do tipo Lewis<sup>x</sup> e Lewis<sup>y</sup> se encontram presentes em grande quantidade na superfície das células parietais humanas, poderá ocorrer uma reacção auto-imune dirigida contra este tipo de células, que leva à sua destruição e à evolução da infecção inicial para um quadro clínico de atrofia gástrica, condição precursora do cancro gástrico (21). Mais recentemente, foi sugerido que a contribuição do LPS e dos determinantes de Lewis na patogenicidade da *H. pylori* pode ser multifacetada com um importante papel na promoção da adesão da bactéria ao epitélio gástrico (68) e na influencia da resposta inflamatória do hospedeiro(72).

#### **4.3.2. Citotoxina vacuolizante (vacA)**

A acção patogénica da toxina vacA traduz-se principalmente na alteração do tráfego vesicular intracelular em células eucarióticas, levando à formação de grandes vacúolos, contendo marcadores de endossomas (76) e lisossomas (73). A actividade da toxina vacA não se limita, no entanto, à indução da vacuolização, tendo sido descrita a capacidade da própria toxina formar canais iónicos em duplas camadas lipídicas (81) e actuar, *in vitro*, na redução da resistência eléctrica transepitelial em monocamadas polarizadas. Esta última observação sugere que um dos papéis da proteína vacA no processo da ulcerogénese poderá consistir no aumento da permeabilidade paracelular do epitélio gástrico (78). Mais recentemente, foi descrito o mecanismo de actuação da toxina *in vitro*. O estudo mostrou que a toxina vacA actua na mitocôndria das células eucarióticas, desplotando o processo de apoptose. A ocorrência de apoptose no epitélio gástrico de indivíduos infectados pela *H. pylori* está bem documentada e parece estar implicada no desenvolvimento de gastrite atrófica. Este estudo sugere assim que a toxina pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de neoplasia gástrica.

O gene *vacA* apresenta uma variação interestirpe na sua sequência nucleotídica, nomeadamente nas regiões sinal (tipos *s1* e *s2*) e média (tipos *m1* e *m2*), que vai determinar a produção de uma citotoxina com actividade vacuolizante (60, 67).

### 4.3.3. Ilha de patogenicidade Cag

Algumas estirpes de *H. pylori* possuem no seu genoma, uma região de 40 kb denominada ilha de patogenicidade *cag*, contendo 31 genes que codificam uma série de proteínas implicadas na virulência de estirpes de *H. pylori* (63). A presença da ilha de patogenicidade funcional no genoma da bactéria determina um aumento do estado inflamatório da mucosa gástrica, através da infiltração de células polimorfonucleares e um aumento de produção de interleucina-8 (IL-8) (65). De facto, a presença da região *cag* tem sido associada às estirpes mais virulentas, denominadas tipo I ( $cag^+$ ,  $vacA^+$ ), enquanto que a ausência desta região determina uma menor virulência, sendo as estirpes classificadas como tipo II ( $cag^-$ ,  $vacA^-$ ) (63). Nesta região está localizado o gene *cagA* que codifica para a proteína *cag A*.

## 5. Resposta do hospedeiro à infecção por *H. pylori*

A colonização da mucosa gástrica pela *H. pylori* é acompanhada por uma reacção imunológica local e sistémica, simultaneamente humoral e celular. A fase inicial, não específica, é caracterizada pelo recrutamento de fagócitos, macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos, introduzidos directamente por factores bacterianos libertados no meio, nomeadamente as proteínas NAP, urease e o LPS, e indirectamente através de produtos de activação do complemento, lípidos bioreactivos e citocinas, como a IL-8 (66, 69). A produção de IL-8 pelo epitélio pode também ser estimulada por estirpes de *H. pylori* mais virulentas, que contém a ilha de patogenicidade *cag*. Os fagócitos recrutados migram para a superfície da mucosa gástrica, fagocitando as células bacterianas, com libertação de enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigénio, que têm efeitos citotóxicos ao nível da mucosa gástrica (70). Além disso, ao atravessar o epitélio gástrico, os fagócitos podem fragilizar as junções entre as células epiteliais, diminuindo a integridade da barreira gástrica (70, 77). É provável que, a longo prazo, a acção benéfica dos fagócitos seja largamente ultrapassada pela sua acção

nociva. Após a resposta inicial não específica desenvolve-se a resposta imunitária específica. A resposta humoral compreende a produção de anticorpos anti-*H. pylori*, do tipo IgG, IgA e IgM, que podem ser detectadas ao nível do estômago (resposta local) ao nível do sangue, saliva e urina (resposta sistémica). Estes anticorpos parecem ter uma acção mais nefasta de que efectiva no combate à infecção. Os anticorpos IgG produzidos na submucosa, podem gerar complexos imunes com os antígenos bacterianos; estes por sua vez podem contribuir para a distribuição da mucosa gástrica, recrutando e activando células polimorfonucleares, produtoras de substâncias tóxicas. A resposta celular é representada pelos linfócitos Th (T helper), do tipo CD4 e pelas células citotóxicas CD8 (66, 71, 70). A produção de IL-12 activada pelos antígenos da *H. pylori*, estimula os linfócitos Th, do tipo Th1, a produzir  $\text{INF}\gamma$  (interferão  $\gamma$ ) implicado na indução de apoptose das células epiteliais,  $\text{TNF}\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) e IL-2 e a activar macrófagos, favorecendo a persistência e o aumento da inflamação. A resposta linfocitária Th1 vai também estimular o linfócitos B a produzir imunoglobulinas G, que têm um efeito nocivo devido à formação de complexos imunes. A estimulação de linfócitos do tipo Th2 desencadeia a produção de interleucinas do tipo (61, 62, 64, 67) e de anticorpos, nomeadamente IgA, e tende a favorecer a regressão da reacção inflamatória. É provável que o equilíbrio estabelecido entre a resposta do tipo Th1 e Th2 determine a intensidade e a evolução da inflamação gástrica (66, 71, 70).

## 6. Métodos de diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*

A infecção pelo *H. pylori* desempenha um papel primordial na fisiopatologia da doença gastrointestinal, sendo o diagnóstico correcto e o sucesso da erradicação, cruciais nas diferentes etapas desta infecção.

Desde a descrição inicial deste microrganismo, por Marshall e Warren, numerosos métodos de diagnóstico, invasivos e não invasivos, têm sido desenvolvidos, sem que nenhum seja perfeito. Cada método desenvolvido possui as suas vantagens e os seus inconvenientes, o que o torna, mais ou menos, adaptado às diferentes etapas da infecção pela *H. pylori*.

Quando o clínico é confrontado com um doente dispéptico, a modalidade mais usual de diagnóstico para efectuar o rastreio é a serologia, sendo a histologia e o exame cultural, utilizados para confirmação do diagnóstico serológico. No que diz respeito à confirmação da erradicação bacteriana, o teste de eleição é o teste respiratório.

Os diferentes métodos de diagnóstico e as recomendações sobre a sua utilização prática têm sido amplamente revistos nestes últimos anos (83, 84, 85, 86). Para o rastreio geral, têm sido desenvolvidos testes que utilizam o sangue total e que podem ser efectuados pelo médico de clínica geral. Os resultados são rápidos e o custo da análise reduzido. Estes testes são denominados testes rápidos (87). Os outros testes em desenvolvimento são a serologia dos anticorpos *CagA* e o Imunoblot. Um outro campo que está actualmente a receber uma atenção especial é a reacção de polimerização em cadeia (PCR-Polymerase Chain Reaction) associada à reacção imunoenzimática do DNA. Testes directos não invasivos incluirão, provavelmente, num futuro próximo, a utilização da PCR e a detecção imunoenzimática de antígenos de *Helicobacter pylori* nas fezes. No entanto, e apesar do desenvolvimento de todos estes testes não invasivos, os testes baseados no estudo da biopsia gástrica não foram abandonados (88).

Tendo em consideração a natureza aleatória da infecção pela *H. pylori*, todos os testes baseados na biopsia gástrica estão sujeitos, teoricamente, ao erro de amostragem devido à distribuição irregular do microrganismo na mucosa gástrica. Esta situação pode ser a causa de resultados falsamente negativos (90, 92, 91, 89).

## 6.1. Testes invasivos

### 6.1.1. Determinação da actividade ureásica

Todos os testes para a determinação da actividade ureásica (testes de urease) se baseiam na deposição de uma biopsia num meio sólido, semi-sólido ou líquido, contendo ureia. Se a *H. pylori* está presente na biopsia, a grande quantidade de urease presente (100, 160) dará origem à hidrólise da ureia em amónia e bicarbonato. A amónia libertada aumenta o pH do meio o que causa a mudança de cor do indicador de pH, localmente ou num segundo compartimento do teste. Podem ser utilizados testes comerciais assim como testes artesanais. Entre os testes artesanais, o teste ultra rápido consiste numa solução concentrada de ureia (10%) não tamponada, que permite obter o resultado em 15 minutos (163). Vários kits utilizando uma gelose estão actualmente no mercado: o CLO test®, o HUT test®, e o HP fast®. O gel de agar contem, para além da ureia, um agente bacteriostático e um indicador de pH. No que diz respeito ao Pyloritec®, as biopsias são colocadas numa membrana e a mudança de cor do indicador do pH ocorre num outro compartimento do teste. O CLO test® (Figura 10), é actualmente o teste mais utilizado na Europa. O indicador de pH utilizado é o vermelho de fenol, que muda de amarelo brilhante para vermelho quando a *H. pylori* está presente na biopsia (129).

Em oposição aos testes rápidos de urease que utilizam um meio líquido e que devem ser conservados a -20°C, a maior parte dos testes comerciais são conservados a +4°C e devem ser aquecidos à temperatura ambiente antes de serem utilizados.

A biopsia deve ser introduzida no meio, o mais rapidamente possível, pois a sensibilidade diminui ao longo do tempo.

Com o intuito de otimizar a sensibilidade, é preferível incubar os testes de urease em gelose a 37°C até se efectuar a leitura (160). Teoricamente, a temperatura ideal para a incubação deve ser de 42°C, temperatura óptima da enzima urease. Infelizmente, um equipamento especial é necessário. Para o Pyloritec® a incubação à temperatura ambiente é suficiente (144).

Na prática clínica, os testes de urease podem ser lidos aos 20 minutos, 1 hora, 3 horas e 24 horas após a introdução da biópsia no meio. Uma outra alternativa é efectuar uma única leitura do resultado após 1 hora, o que pode, no entanto, diminuir a sensibilidade. Se o teste é negativo à primeira hora, é aconselhável enviar as biópsias ao laboratório para um exame bacteriológico e/ou histológico. A PCR é especialmente adaptada a esta situação, pois trata-se de uma técnica que não necessita de condições específicas de transporte. O exame histológico parece também fornecer resultados satisfatórios (119).



Figura 10 – Clotest – teste da actividade ureásica de *H. pylori*.

### 6.1.1.1. Valor do Diagnóstico

A sensibilidade destes testes é diminuída aquando da sua utilização no estudo da erradicação da *H. pylori*, 1 mês após o tratamento (116). No caso de fracasso terapêutico, a densidade bacteriana é inferior ao limiar necessário (cerca de  $10^4$  a  $10^5$  UFC/ml), para provocar uma mudança de cor do indicador de pH (124, 152). Diversos estudos mostram que os resultados falsamente negativos estavam estreitamente associados a baixas contagens bacterianas (163). Os testes de urease não são, por esta razão, recomendados na verificação da erradicação da *H. pylori*. Para além dos tratamentos específicos de erradicação, a carga bacteriana pode ser reduzida pela toma recente de antibióticos, prescritos para uma outra infecção (161).

A utilização de certos corantes durante a endoscopia, como o azul de metileno para detectar a metaplasia gástrica, pode interferir com os testes de urease, pois estes

corantes podem actuar como bactericidas (108). As biopsias devem, por conseguinte, ser colhidas antes da utilização destes corantes. A hemorragia pode também afectar, negativamente, os resultados de detecção da *H. pylori*. Estudos demonstram que os testes de urease não podem detectar a bactéria na presença de sangue, bÍlis e suco gástrico. Por outro lado, outros investigadores (118) demonstraram que os resultados falsamente negativos, obtidos no caso de úlceras gástricas, não podem ser explicados unicamente pela presença de sangue. Um resultado falsamente positivo ocorre, geralmente, quando o teste é lido após o tempo de incubação recomendado pelo fabricante (162).

### **6.1.2. Exame anatomopatológico**

O exame anatomopatológico é importante, não só para o diagnóstico da infecção por *H. pylori*, como também para a avaliação do estado da mucosa. Pode ser utilizado para demonstrar a presença de uma gastrite activa, de atrofia, de metaplasia intestinal, de displasia e de malignidade (102).

Após uma reunião realizada em Sydney, em 1990, os patologistas iniciaram uma standardização da interpretação das preparações histológicas. A chamada classificação de Sydney foi revista em Houston em 1994 (99), sendo hoje em dia largamente aceite, o que facilita a análise patológica. A detecção da *H. pylori* é uma fase importante no sistema de classificação de Sydney. O consenso geral preconiza a obtenção de biopsias provenientes de diferentes zonas do estômago e a utilização de colorações especiais.

#### **6.1.2.1. Colorações histológicas**

Na maioria dos casos a *H. pylori* pode ser identificada em cortes histológicos corados pela hematoxilina/eosina, a qual revela a bactéria corada de rosa (Figura 11) (162). No entanto, este microrganismo é de difícil visualização, motivo pelo qual devem ser utilizadas diferentes colorações em simultâneo. A coloração de prata de Warthin-Starry, inicialmente desenvolvida para a detecção de espiroquetas em cortes histológicos permite a visualização da *H. pylori* em forma de bastonete corado de preto. Estudos comparando a sensibilidade desta coloração e a sensibilidade da coloração hematoxilina/eosina, mostraram que a primeira é mais sensível. Alguns autores demonstraram que a coloração de Giemsa, menos laboriosa e de custo inferior, possui

uma eficácia idêntica à Warthin-Starry (107). Outros, utilizaram colorações como a coloração de Gimenez ou a coloração de Brown-Hopps (156), mas o ganho destas em relação às colorações de rotina é posto em questão.

Alguns investigadores defendem o uso de colorações imunológicas, utilizando anticorpos monoclonais (121), mas estas requerem técnicas especiais e são demasiado dispendiosas.

#### **6.1.2.2. Método**

Para o exame anatomopatológico, as biopsias devem ser colocadas, imediatamente após a colheita, numa solução de fixação, como o líquido de Bouin ou o formaldeído. Este tratamento de fixação permite obter um maior intervalo de tempo entre a colheita e o exame. A localização e a morfologia particular da *H. pylori* facilitam, consideravelmente, o diagnóstico histológico. A coloração hematoxilina/eosina é, em seguida, utilizada. Numa situação de resultado duvidoso, nomeadamente quando um número reduzido de bactérias está presente, uma coloração suplementar deve ser efectuada a fim de permitir uma visualização clara da bactéria em questão. Colorações como a de Giemsa modificada, Cristal Violeta, Acridina Orange, ou Warthin-Starry podem ser utilizadas como complemento.

## **Diagnóstico Anatomopatológico da infecção por *Helicobacter pylori***

### **Na sala de endoscopia:**

- Preparação da amostra
  - 2 biopsias do antro (da parede anterior e posterior, ambas a pelo menos 2 cm da junção piloro-duodenal).
  - 2 biopsias do corpo (da parede anterior e posterior), nomeadamente numa situação de tratamento com inibidor da bomba de prótons.
  - eventualmente, uma biopsia da incisura
- Se possível, orientar de imediato a biopsia.
- Fixação imediata

### **No laboratório:**

- Método
  - incluir a biopsia em parafina
  - efectuar uma série de cortes de 3 a 5  $\mu$ m
  - coloração
    - Hematoxilina/eosina como coloração de rotina;
    - Uma coloração especial de acordo com a preferência do patologista (isto é, Giemsa, Violeta de Cresyl)
- Observação histológica
  - utilização da objectiva 40X (eventualmente a objectiva de 100X com óleo de emersão)
  - caracterizar e graduar o aspecto patológico
  - classificar a gastrite (pelo sistema de Sydney)
  - detecção da *H. pylori*
- Relatório
  - lesões histológicas
  - presença ou ausência da *H. pylori* (se possível efectuar uma apreciação semiquantitativa)

A *H. pylori* pode ser pesquisada (ao microscópio) com grande ampliação ao nível do muco gástrico, do epitélio e das criptas. Esta bactéria pode aderir às células epiteliais mas, praticamente, nunca foi encontrada intracelularmente. Também não é encontrada em áreas do estômago que apresentem metaplasia intestinal. Quando resultado é positivo, o número de bactérias presente pode ser expresso semiquantitativamente (141).

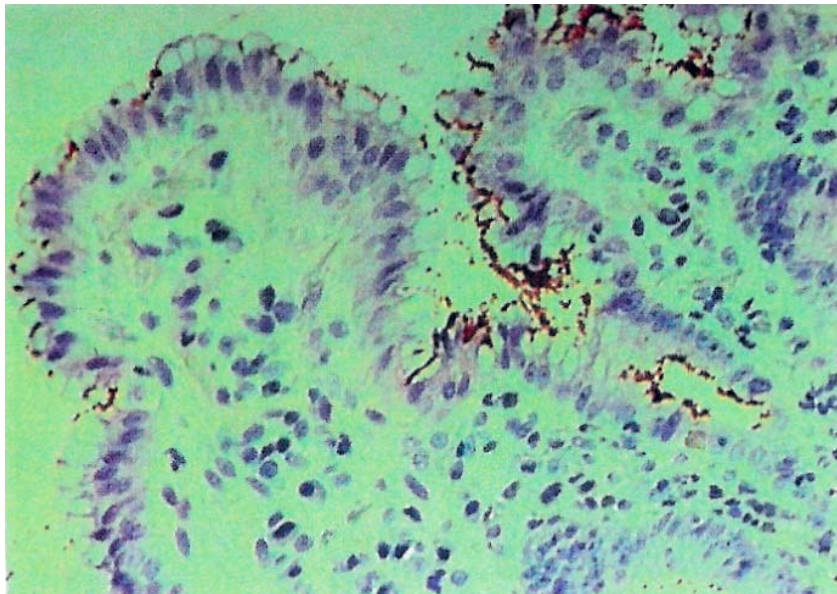


Figura 11 – Corte histológico de biopsia gástrica corado por hematoxilina/eosina, sendo visíveis células de *H. pylori* coradas de vermelho.

### 6.1.2.3. Valor do Diagnóstico

A sensibilidade desta bactéria é satisfatória se forem utilizadas duas biopsias, tal como para os outros testes de diagnóstico. Este método, baseado na morfologia da bactéria, possui uma sensibilidade limitada quando um número reduzido de organismos está presente, como no caso de um pós-tratamento antibiótico. Um outro problema potencial, é a presença de outras bactérias espiraladas (ex: *Campylobacter spp.*) provenientes da cavidade bucal. A *H. pylori* pode também, em alguns casos, ser encontrada sob a forma cocoide, forma esta de difícil identificação.

Numa situação de dúvida, métodos imunohistológicos baseados no uso de anticorpos poli e monoclonais anti *H. pylori*, podem ser utilizados. A hibridação *in situ* tem sido utilizada em alguns laboratórios e pode ser de grande ajuda para a identificação da bactéria presente na lâmina própria, local onde os métodos convencionais são de difícil aplicação.

A grande vantagem do exame anatomopatológico reside no facto de que este permite a detecção de uma gastrite crónica activa. A presença desta última, na maioria dos casos, é indicativa de uma infecção por *H. pylori* o que conduz a uma pesquisa minuciosa da bactéria. Os resultados do exame anatomopatológico devem ser relatados segundo o sistema de Sydney (99).

A precisão do exame está ligada à quantidade de material fornecido, podendo ser diminuída quando bactérias morfológicamente atípicas estão presentes. No entanto, esta situação é rara aquando de um primeiro diagnóstico.

Um estudo realizado na Universidade de Amesterdão, mostrou que a sensibilidade do exame anatomopatológico, comparada à sensibilidade da cultura, atinge os 95% no período de pré-tratamento e os 88% no período pós-tratamento. Mesmo o teste da urease pode ser mais sensível que o exame anatomopatológico 4 semanas após um tratamento com amoxicilina.

Em suma, este teste é um meio útil na detecção da infecção por *H. pylori*. Mais ainda, este exame permite um registo permanente acerca do estado da infecção e o acompanhamento das lesões inflamatórias, podendo ser menos preciso no período após o tratamento (158).

Num estudo realizado na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (serviço de Pediatria) foi demonstrada a concordância de 91,5% os dados Histológicos e os dados Microbiológicos.

Cinquenta e oito crianças foram sujeitas a endoscopia digestiva e a partir dos fragmentos da mucosa do antro gástrico, foi efectuado exame histológico (Giemsa modificado) e exame cultural microbiológico

Simultaneamente, foram colhidas amostras de sangue para a pesquisa de anticorpos IgG anti-H.pylori.

Os resultados obtidos estão expressos no quadro II.

Quadro II – Correlação entre o exame histológico, microbiológico e detecção do título de anticorpos anti-H.pylori, em 58 crianças.

Doente	Hist.	Microb.	IgG $\geq$ 4
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	-
4	-	-	-
5	-	-	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	+
11	+	-	-
12	-	-	+
13	+	+	-
14	+	+	-
15	-	-	+
16	-	-	-
17	-	-	+
18	+	+	-
19	-	-	+

20	+	+	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	+	+	+
24	-	-	+
25	+	+	-
26	-	-	-
27	+	+	+
28	-	-	-
29	-	-	+
30	+	+	-
31	-	-	+
32	+	+	-
33	-	-	-
34	-	-	+
35	+	+	+
36	-	-	-
37	+	-	-
38	-	-	+
39	+	+	-

40	-	-	-
41	+	+-	-
42	-	+	+
43	+	+	+
44	+	+	-
45	-	-	-
46	-	-	-
47	-	+	+
48	+	+	-
49	-	-	+

50	+	+	-
51	-	-	+
52	-	-	-
53	+	+	+
54	-	-	-
55	+	+	+
56	-	-	-
57	+	+	+
58	-	-	-

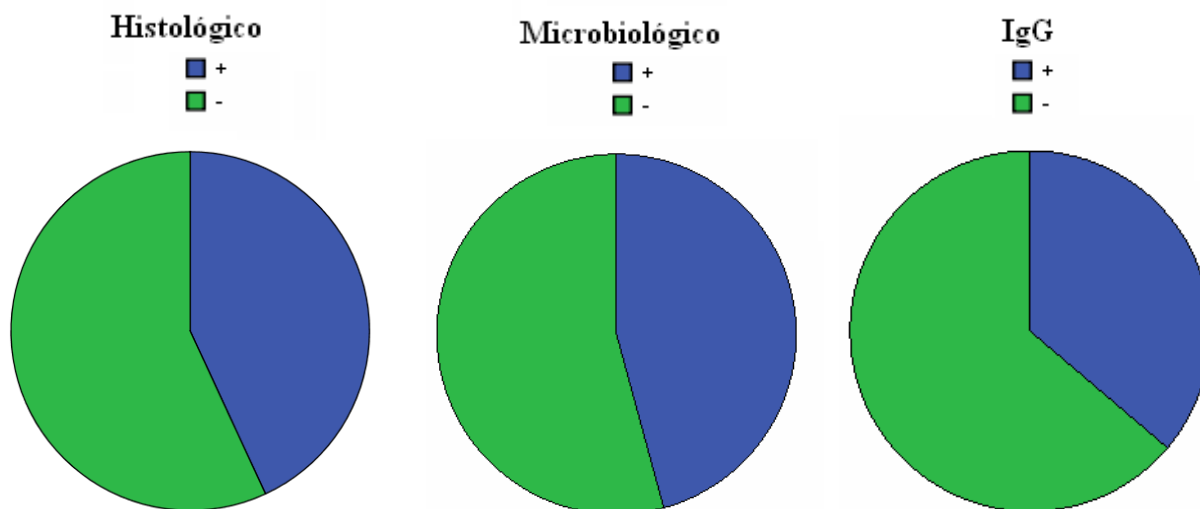


Figura 12 – Gráficos que representam a frequência de testes positivos e negativos, correlacionando-se entre si.

**Conclusão:** Relativamente aos resultados obtidos, estes são em maioria negativos, sendo 44,8% dos doentes *H. pylori* positivos. Existe uma excelente correlação entre o exame histológico e os resultados microbiológicos, sendo que os cinco resultados discordantes podem dever-se à perda de viabilidade de *H. pylori*, provavelmente devido às condições de transporte das amostras.

A concordância entre a histologia e microbiologia foi de 91,3%.

### 6.1.3. Métodos bacteriológicos

#### 6.1.3.1. Exame Microscópico

Após esmagamento da biopsia, o esfregaço é preparado, corado e observado ao microscópio. A observação pode ser feita por microscopia de fundo escuro ou por microscopia de contraste de fase, as quais permitem a observação morfológica da bactéria, assim com, em alguns casos, a sua mobilidade (139).

Diferentes colorações podem ser utilizadas, sendo a coloração de Gram a mais habitualmente utilizada em rotina (Figura 13). É também possível utilizar uma coloração imunocitoquímica com anticorpos anti-*H. pylori* do tipo monoclonal ou policlonal (143).

A sensibilidade das diferentes colorações está próxima de 90%. Trata-se de um método simples, rápido e pouco dispendioso que pode ser realizado na sala de endoscopia.

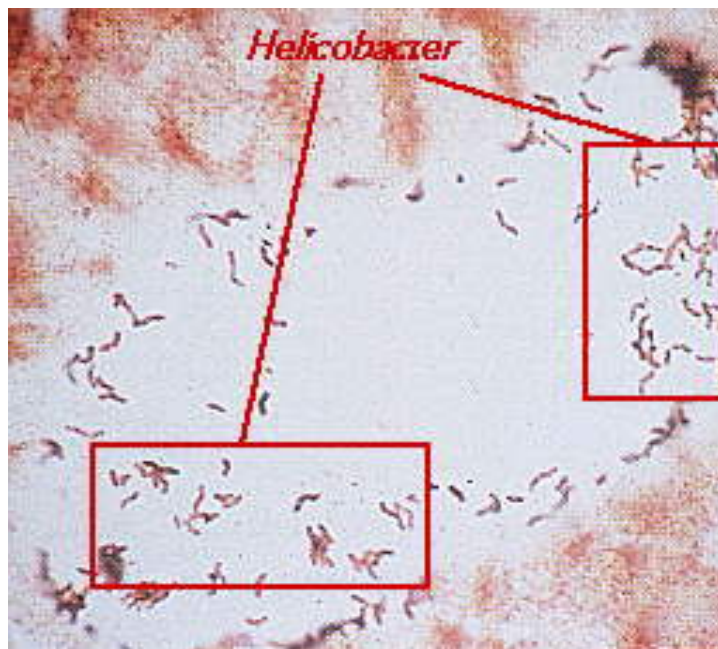


Figura 13 – Visualização de *H. pylori* a partir de biopsias, com coloração de Gram.

### 6.1.3.2.Cultura



Figura 14 – Crescimento de *H. pylori* a partir das biopsias, em gelose sangue, em microaerofilia.

O exame cultural (Figura 14) é o método de referência e é o único que permite aplicar todos os métodos de tipificação molecular. No entanto, tem como principal inconveniente o seu longo período de incubação (de 1 a 4 dias). Um outro inconveniente é a sua dependência da viabilidade da bactéria, o que requer condições especiais de colheita e de transporte da biopsia (130).

### 6.1.3.3. Colheita e transporte da biopsia gástrica

A biopsia é, geralmente, obtida a nível do antro, pois trata-se do principal local de colonização da *H. pylori*. Duas biopsias devem ser obtidas, devido à distribuição irregular da bactéria e à conseqüente possibilidade de erro de amostragem. Biopsias obtidas do corpo são necessárias numa situação de controlo pós-tratamento ou quando o doente foi submetido a um tratamento com anti-secretores. O transporte da biopsia deve ser rápido e esta deve estar protegida, pois a *H. pylori* é sensível ao oxigénio e à dissecação, sendo a sua sobrevivência limitada à temperatura ambiente. A temperatura ideal de transporte é inferior a 10°C (147). No caso de um curto período de transporte (< 4 horas) as biopsias podem ser transportadas numa solução salina ou numa solução de glicose a 20% sob a condição de serem mantidas a 4°C. Se o período for mais longo (24 horas), a biopsia deve ser colocada num meio de transporte apropriado, como o meio de Stuart (114), ou o meio Portagerm pylori (bioMérieux), igualmente mantido a 4°C. Quando o período de transporte é superior a 24 horas a biopsia deve ser mantida a -70°C ou em azoto líquido e, neste caso, um simples tubo seco é suficiente para o transporte.

### 6.1.3.4. Meios de cultura

Uma das etapas importantes da cultura é o esmagamento da biopsia, pois a distribuição da *H. pylori* não é uniforme. Esta encontra-se, essencialmente, no muco e à superfície das células. Este esmagamento deve ser efectuado com a ajuda de um esmagador mecânico ou manual, num pequeno volume de caldo (meio de Brucela líquido) de forma a libertar as bactérias.

Diferentes meios de cultura podem ser utilizados. Cada um é constituído por uma base de gelose, um suplemento de crescimento e um suplemento selectivo. Os principais meios de cultura utilizados estão indicados no quadro III. (130, 138, 93).

Quadro III – Meios de cultura para o isolamento de *H. pylori*.

	BHI* (1985)	Gelose de sangue (1988)	BHI* (1989)	Columbia (1991)	Gelose GC
Suplemento de crescimento:	7% sangue de cavalo	5% sangue de cavalo (desfibrinado)	10% de soro de cavalo	-	7% sangue de cavalo (desfibrinado)
Outros:	1% Isovitalex	-	- 1% extrato de levedura - 0,2% carvão - 40 mg cloreto de trifeniltetrazolio	- 10% de gema de ovo - 40 mg cloreto de trifeniltetrazolio	-
Antibióticos:	-Vancomicina -Anfotericina B	-Vancomicina -Trimetropim	-Vancomicina -Trimetropim -Anfotericina B -Cefasulodina	-Vancomicina -Trimetropim -Anfotericina B -Cefasulodina	-Vancomicina -Trimetropim -Anfotericina B -Cefasulodina

A melhor estratégia para a cultura é a utilização de um meio selectivo e de um meio não selectivo com diferentes bases de gelose, de forma a cobrir todas as situações. Estudos comparativos mostram que nenhum meio apresentado permite o crescimento da *H. pylori* em 100% dos casos.

### **6.1.3.5. Incubação**

Sendo uma bactéria microaerofílica, a *H. pylori* necessita de uma atmosfera especial. Esta atmosfera pode ser obtida utilizando um equipamento sofisticado, como estufas microaeróbicas ou, simplesmente, utilizando jarras dentro das quais uma mistura adequada de gás é introduzida através de um sistema automático (Anoxomat) ou através de Campy Packs.

Os meios são incubados a 37°C e o período de incubação depende da viabilidade da bactéria, sendo normalmente de 3 a 4 dias numa primeira cultura. No entanto, os meios devem ser mantidos a 37°C em atmosfera de microaerofilia durante 12 dias antes de considerar que a cultura é negativa.

### **6.1.3.6. Identificação**

A identificação é efectuada através da observação das características morfológicas das colónias assim como as características bioquímicas e citomorfológicas das estirpes bacterianas. As colónias são pequenas (1 a 2 mm de diâmetro), redondas, brilhantes e não hemolíticas. A bactéria pode ser observada directamente a partir das colónias suspeitas, por um exame a fresco ou ainda pela coloração de Gram. A *H. pylori* é uma bactéria Gram negativa que apresenta uma morfologia característica, encurvada e/ou arredondada.

As reacções positivas dos testes catalase, oxidase e, particularmente, urease, indicam com relativa segurança a presença da *H. pylori*.

### **6.1.3.7. Valor do Diagnóstico**

O interesse principal da cultura, para além da sua sensibilidade e da sua especificidade, reside no facto de esta permitir a determinação da resistência da bactéria aos antibióticos. A terapia actual de erradicação da *H. pylori* faz apelo a antibióticos para os quais a bactéria pode ser, à partida, resistente. A resistência pode, também, ser desenvolvida durante o tratamento. A determinação da resistência é da máxima importância pois trata-se da principal causa do insucesso terapêutico.

A cultura tem sido acusada como sendo uma técnica exigente em termos de transporte e de cuidados a ter com a biopsia, isto é, tratamento rápido, uso de meios de cultura frescos, assim como condições especiais de incubação.

A única razão para não efectuar a cultura numa situação de diagnóstico primário é a demora na obtenção do resultado (109, 155).

O National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 1999) (134) americano preconiza a utilização do meio Mueller Hinton, adicionado com 5% de sangue de cavalo, de 2 semanas de idade, de um inóculo equivalente a 2 na escala de MacFarlaud e a leitura dos resultados efectuada após 3 dias de incubação.

As recomendações Europeias são idênticas. É excepção a quantidade de sangue de cavalo – 10% em vez de 5%.

Finalmente, uma outra vantagem da cultura é a possibilidade de comparar as estirpes isoladas de doentes diferentes ou de um mesmo doente a intervalos de tempo diferentes (110).

#### **6.1.4. Amplificação Genética**

##### **PCR-Polymerase Chain Reaction**

A reacção de polimerização em cadeia (PCR), descrita pela primeira vez por Saiki em 1985 e desenvolvida por Mullis e Faloona em 1987, originou uma modificação fundamental no campo da biologia molecular, abrindo novos horizontes nas ciências medicas e biológicas. A PCR é um teste enzimático, realizado *in vitro*, que permite ampliar selectivamente um fragmento de DNA presente numa amostra até um milhão de vezes. A aplicação desta técnica à pesquisa da *H. pylori* permitiu a clonagem e a sequenciação de importantes genes envolvidos na colonização e patogénese desta bactéria, assim como o fornecimento de novas técnicas de diagnóstico.

A PCR é um método sensível e objectivo que permite a obtenção rápida de resultados sem recorrer a condições estritas de transporte. No entanto, nenhuma informação sobre a viabilidade da bactéria pode ser obtida. A sua sensibilidade é idêntica à sensibilidade da cultura no que diz respeito à detecção da *H. pylori* num diagnóstico primário. Devido à sua boa precisão, a PCR é válida, essencialmente, na avaliação do sucesso terapêutico, momento em que o número de bactérias presente na mucosa gástrica é, geralmente, reduzido. Esta redução pode impedir a detecção por outros métodos de diagnóstico.

#### **6.1.4.1. Método**

Uma determinada sequência de DNA da *H. pylori* pode ser amplificada utilizando primers específicos. Em seguida, essa sequência pode ser detectada pela análise do produto de amplificação. Em resumo, a biopsia é esmagada e em seguida lisada num tampão especial a fim de tornar o DNA acessível. A mistura reaccional contém a sequência alvo, os primers específicos, os oligonucleótidos e a Taq polimerase. Uma série de 30 a 40 ciclos de amplificação é em seguida realizada, cada um incluindo 3 etapas: a desnaturação do DNA, a hibridação dos primers e o alongamento da cadeia de DNA.

Diferentes pares de primers foram propostos baseados no gene da urease, no RNA ribossomal 16S, num gene que codifica uma proteína de 26 kd, num gene para o qual não é conhecida a função ou ainda sobre um gene que codifica para uma fosfoglucosamina mutase.

#### **6.1.4.2. PCR, Presente e Futuro**

Embora a PCR seja, actualmente, um importante método de diagnóstico da *H. pylori*, existem ainda meios de aumentar a sensibilidade e a praticabilidade deste método. Diferentes vias podem ser seguidas para ampliar a utilidade da PCR. Uma destas vias é o tratamento da amostra a fim de remover as substâncias susceptíveis de inibir a reacção de PCR, o que permite a utilização de outras amostras para além da biopsia gástrica no diagnóstico da *H. pylori*. Alguns estudos têm sido feitos, utilizando a saliva, a placa dentária, o suco gástrico e as fezes (153).

A obtenção da sequência alvo do DNA mais adequada podem aumentar a sensibilidade. Técnicas como a o Southern blot devem ser utilizadas na confirmação de resultados duvidosos, tais como a presença de mais de uma banda ou de um arrastamento. Infelizmente, este tipo de técnicas são demasiado delicadas de realizar. Recentemente, a fim de aumentar a sensibilidade, a especificidade e a rapidez do método, uma reacção de hibridação colorimétrica para detectar o produto de amplificação foi desenvolvida. Trata-se de uma técnica simples e que pode ser facilmente realizável para um grande número de amostras (126, 128). O teste de rastreio (screening) e o teste de confirmação, são efectuados em simultâneo (117). Um outro potencial da PCR é a possibilidade de

quantificação do DNA alvo, presente na amostra mediante a utilização de um controle interno numa reacção de competição. Um novo método de quantificação foi desenvolvido. Este é baseado numa monitorização contínua da fluorescência emitida em cada ciclo de amplificação (159). Foram descritos e comparados 3 testes de monitorização da fluorescência. O primeiro é baseado num fluorocromo (brometo de etídio) o qual aumenta a fluorescência por ligação ao produto de amplificação. Estes fluorocromos dependem da especificidade inerente aos primers. Actualmente, a amplificação inespecífica após números ciclos de amplificação limita a sensibilidade da técnica. Duas outras técnicas foram desenvolvidas, as quais possuem a vantagem de serem específicas do fragmento amplificado. Uma utiliza um par de sondas marcadas (uma marcada com fluoresceína e a outra marcada com rodamina) e depende da actividade 5'-exonucleásica da polimerase para a separação do dador e do receptor por hidrólise. A fluorescência do dador é aumentada quando o *quencher* do receptor é removido (145, 94, 146).

A terceira técnica utiliza duas sondas adjacentes, uma marcada com cianina na posição 5' e a outra marcada com fluoresceína na posição 3'. Este sistema depende da hibridação, independentemente das sondas adjacentes dadora e receptora.

A monitorização da fluorescência em cada ciclo durante a amplificação do DNA é uma técnica que possui um grande potencial na quantificação do DNA. Com uma instrumentação simples e utilização deste sistema de monitorização, a deteção e quantificação específica de sequências pode ser obtida 5 a 20 minutos após o início da ciclicação térmica.

Uma aplicação importante da PCR é a deteção de marcadores patogénicos da infecção pela *H. pylori*. A PCR pode ser utilizada na deteção do gene *cagA* e assim como de outros marcadores de virulência, directamente a partir da biopsia permitindo uma avaliação rápida do grau de risco do doente de desenvolver uma úlcera péptica (86, 117).

Uma outra aplicação potencialmente interessante, é a deteção da resistência microbiana aos macrólidos. A resistência da *H. pylori* aos macrólidos é devida a uma diminuição da ligação destes antibióticos aos ribossomas, a qual tem sido associada a mutações pontuais do gene 23S do RNA ribossomal. Associando a PCR e a sequência, é possível determinar qual a mutação responsável da resistência da *H. pylori* aos macrólidos. No entanto, e apesar de ser a técnica de referência, esta é de difícil aplicação à rotina. Um outro método consiste em efectuar uma restrição dos produtos de amplificação (PCR-RFLP) (. Foi desenvolvida uma técnica que permite a deteção rápida e fácil da

resistência da *H. pylori* aos macrólidos a partir das estirpes, ou directamente a partir das biopsias gástricas. Esta técnica é baseada numa hibridação em fase sólida com sondas específicas a cada mutação pontual (149, 136).

Finalmente, a flagrante diversidade genómica da *H. pylori* dá a possibilidade de estudar os diferentes aspectos epidemiológicos da infecção por esta bactéria. Diferentes métodos de tipagem, baseados na utilização da PCR, são utilizadas com a finalidade de diferenciar as diferentes estirpes da *H. pylori* (140, 127). Entre eles distinguem-se: a) PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), já citado, e baseado na amplificação de um fragmento de DNA conhecido, seguida de uma digestão por uma enzima de restrição. Trata-se de um método rápido que pode ser aplicado directamente às biopsias gástricas. b) A RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) baseado no estudo do polimorfismo da amplificação de motivos repartidos pelo genoma, utilizando como *primers* sequências nucleotídicas arbitrárias. c) A PCR-sequenciação, baseada na amplificação de um gene conhecido como polimórfico e comum a todas as estirpes da *H. pylori*. Em seguida, a sequência nucleotídica dos fragmentos amplificados dos diferentes isolados, é determinada e comparada por sequenciação directa.

## 6.2. Testes não invasivos

### 6.2.1. Teste respiratório

Se um doente infectado com *H. pylori* ingere ureia marcada com  $^{13}\text{C}$  ou  $^{14}\text{C}$ , a urease produzida por este organismo determina a libertação de  $\text{CO}_2$  e amoníaco. O  $\text{CO}_2$  marcado que será absorvido na circulação sanguínea e, em seguida, eliminado no ar expirado num intervalo de tempo não superior a 5 minutos (101). A detecção do  $\text{CO}_2$  marcado indica, assim, a presença da infecção pela *H. pylori*.

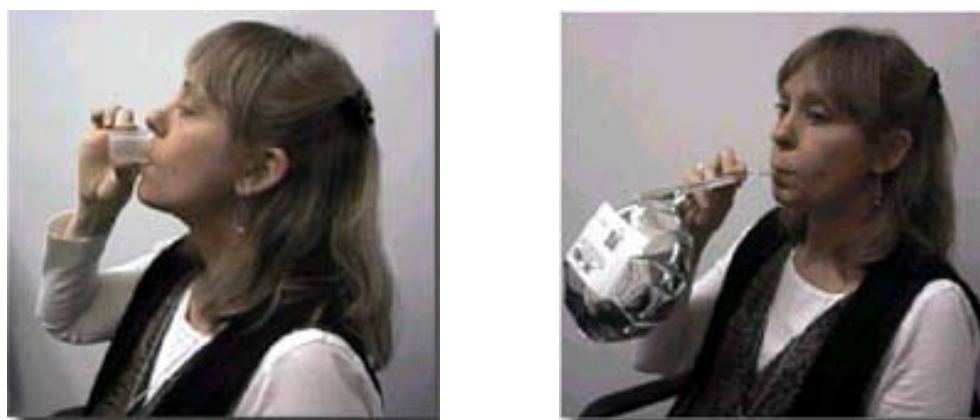


Figura 16 – Teste respiratório.

O tempo de contacto entre a ureia e a bactéria pode ser aumentado pela ingestão de uma refeição teste, de forma a retardar o esvaziamento do estômago.

A ureia marcada com  $^{13}\text{C}$ , isótopo não radioactivo, é completamente inofensivo. O teste comercial UBT utiliza o  $^{13}\text{C}$  com uma grau de pureza de 99%. Em oposição ao  $^{14}\text{C}$ , isótopo radioactivo, o não  $^{13}\text{C}$  não necessita de cuidados especiais, de autorização especial, nem de condições de transporte ou de armazenamento. Todas estas razões levam a que o teste  $^{13}\text{C}$  seja mais correntemente utilizado que o  $^{14}\text{C}$  UBT (94). A detecção do ar, isotopicamente enriquecido, requer um equipamento complexo e dispendioso a qual associa a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa. Outros

sistemas de detecção baseados em espectrometria laser (133, 145) ou de infravermelhos, têm sido recentemente propostos por serem menos dispendiosos. Todos estes sistemas se baseiam na mediação da relação entre o  $^{13}\text{C}$  /  $^{14}\text{C}$ . Esta relação é habitualmente expressa por comparação a um padrão internacional. Os resultados por sua vez são expressos como um aumento da variação (delta) dos valores ( $^{13}\text{C}$  por 1000) medidos antes e após a ingestão da ureia marcada (146). O limiar para considerar um teste positivo foi inicialmente fixado a 5 delta por mil, mas dados recentes mostraram que um limiar de 3,5 delta por 1000 é mais apropriado.

### 6.2.1.1. Método

Diferentes variáveis tem sido estudadas no que diz respeito ao teste respiratório, tais como a refeição teste, a quantidade de  $^{13}\text{C}$  ingerida, assim como a colheita da amostra. Um protocolo europeu standard foi proposto em 1991. Este protocolo consiste na recolha de uma amostra de ar, após um período de jejum por aspiração dentro de um tubo, através de uma palha, até se formarem gotas de condensação nas paredes do tubo. Este é, em seguida, rapidamente fechado. Uma refeição rica em lípidos, é então administrada e 5 minutos mais tarde, 100g de ureia marcada com  $^{13}\text{C}$  são ingeridas (95, 101, 123). A amostra de ar subsequente pode ser colhida como uma única amostra, aos 30 minutos, ou como uma mistura de amostras num recipiente, todos os 5 minutos durante 30 minutos, iniciando as colheitas aos 10 minutos após a ingestão da ureia marcada. A standardização europeia parece ser válida, pois num estudo recente o teste respiratório foi considerado mais sensível no estudo europeu do que no estudo americano (137). Estudos recentes mostram uma tendência para uma simplificação deste procedimento. Actualmente a recomendação vai no sentido de utilizar o ácido cítrico (100) em vez da refeição teste, de utilizar 75mg de ureia em vez de 100mg e de colher somente duas amostras, uma antes e outra 30 minutos após a ingestão da ureia). O transporte das amostras ao laboratório não requer qualquer condição especial, isto é, temperatura ou tempo limitado. O correio regular pode ser utilizado sem contra-indicação.

Numerosos estudos têm sido efectuados em crianças, mas até hoje, não existe um protocolo standard ou um limiar específico pediátrico. Em alguns estudos a refeição teste utilizada em pediatria é a mesma que a utilizada para os adultos, no entanto, outros

estudos utilizaram com sucesso o chocolate e o gelado. A dose de ureia varia de 50mg a 250mg incluindo 75mg e 125 mg. Investigadores utilizarem 2mg/kg com um máximo de 100mg. O uso de um dispositivo especial, possuindo uma válvula unidireccional, facilita a colheita da amostra nas crianças (111).

### **6.2.1.2. Valor do diagnóstico**

A boa sensibilidade e a boa especificidade do teste respiratório permite que este possa ser utilizado para o diagnóstico da infecção pela *H. pylori* assim como para a avaliação da eficácia terapêutica 4 a 6 semanas após o tratamento de erradicação (148) enquanto que o teste serológico não pode ser utilizado na avaliação pós-terapêutica. Em crianças, utilizando 75mg de ureia e duas colheitas (T0 e T40), obteve uma sensibilidade de 98,3% e uma especificidade de 100% numa situação de pré-terapêutica. Teoricamente, os resultados falsamente positivos podem ser devidos à actividade ureásica de bactérias do tracto orofaríngeo, intestinal e mesmo do estômago.

Resultados falsamente negativos têm sido detectados quando o doente foi anteriormente tratado com antibióticos, sais de bismuto ou omeprazol (122). Após um tratamento de 15 dias com 30mg de Lanzoprazol ou Ranitidina é necessário esperar 5 dias antes de utilizar o teste respiratório (98). Para os doentes que sofreram uma gastrectomia, o resultado falsamente negativo pode ser devido a uma retenção insuficiente de ureia marcada no compartimento gástrico, descreve resultados falsamente negativos em doentes que apresentam no exame histológico da biopsia uma pequena carga bacteriana. Apesar de estudos correlacionando positivamente a quantidade CO<sub>2</sub> marcada no ar expirado com o resultado quantitativo da cultura a bacteriana observada no exame histológico e mesmo com o grau de actividade da gastrite , outros estudos não chegaram à mesma conclusão . Actualmente, ainda não é possível considerar o teste respiratório como um teste semiquantitativo.

A comparação dos diversos testes citados está indicada no quadro IV.

Quadro IV - Comparação da sensibilidade dos diferentes testes de diagnóstico antes do tratamento.

	n=104 (1999)	n=351 (1998)	n=105 (1996)	n=104 (1995)
<sup>14</sup> C UBT	93,3%	95%	100%	94%
Serologia	9,5%	99%	98,4%	-
Histologia	95,5%	-	96,8%	100%
Teste de urease	88,6%	85%	90,2%	-
Cultura	100%	93%	98,4%	86%
PCR	93,2%	-	96,7%	91%

## 6.2.2. Detecção de anticorpos específicos

Mesmo não se tratando de uma bactéria invasiva, a *H. pylori* estimula activamente o sistema imunitário do hospedeiro pela libertação de polissacáridos e proteínas imunogénicas.

### 6.2.2.1. Teste ELISA

O teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbed Assay) é o método mais correntemente utilizado para detectar os anticorpos anti *H. pylori*, no soro. Os antígenos brutos utilizados inicialmente, têm sido, na sua maioria, substituídos por antígenos purificados, sobretudo nos testes comerciais. Extractos bacterianos efectuados com tampão de glicina em meio ácido, são ainda utilizados nos testes ELISA artesanais, enquanto que antígenos mais purificados, como a urease e proteínas de elevado peso molecular, são os mais utilizados nos testes comerciais. Existem mais de 20 testes diferentes disponíveis.

Utilizando o teste ELISA, é possível detectar anticorpos anti *H. pylori* das diferentes classes de imunoglobulinas, assim como obter resultados quantitativos. Actualmente, os melhores testes disponíveis para detectar os anticorpos da classe IgG possuem uma sensibilidade e uma especificidade superior a 90% e mesmo 95%. A determinação dos

anticorpos IgA, cujo nível é elevado em, aproximadamente, dois terços dos doentes infectados, tem interesse num reduzido número de doentes (2%) para os quais o nível de anticorpos IgG não é significativo. Por outro lado, os anticorpos IgM têm sido descritos em 5-20% dos doentes, mas somente quando uma resposta em anticorpos da classe IgG está igualmente presente. Através da determinação conjunta dos níveis de anticorpos tipo IgG e IgA, praticamente a totalidade dos doentes infectados podem ser identificados.

No entanto, a serologia possui as suas limitações. A infecção pela *H. pylori* é uma infecção da mucosa e, por conseguinte, a resposta imunitária sistémica pode ser fraca. Esta situação pode conduzir a um certo número de resultados próximos do valor limiar e, conseqüentemente, a uma variação da sensibilidade e especificidade do método. Uma reavaliação de todos os testes serológicos disponíveis comercialmente, baseada em estudos publicados, foi recentemente efectuada. Segundo este estudo, a diferença de eficácia dos testes serológicos é, sobretudo, devida ao facto de que os testes serológicos disponíveis visam a detecção de diferentes tipos de anticorpos (IgA, IgG, IgM) e são utilizados em diferentes populações de estudo. No entanto, a eficácia global dos testes comerciais que detectam unicamente os anticorpos do tipo IgG mostram que a serologia é um bom método de diagnóstico da infecção por *H. pylori*.

A descoberta da importância da ilha de patogenicidade CagA estimulou consideravelmente o interesse da detecção específica da proteína CagA, a qual é um marcador de patogenia da referida ilha. Um fragmento combinante de CagA tem sido utilizado no teste ELISA (103, 97,132).

### **6.2.2.2. Detecção de anticorpos na saliva**

A possibilidade de detectar os anticorpos anti-*H. pylori* na saliva, permite obter um teste que evita a colheita de sangue. Este teste consiste na obtenção de saliva com a ajuda de um instrumento de colheita apropriado. A saliva é em seguida utilizada no teste ELISA. Estudos mostraram que, utilizando um teste ELISA artesanal, o teste salivar para determinar as IgG é um método preciso para a detecção da infecção por *H. pylori* em crianças. Em 112 crianças testadas, este teste revelou uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 82% quando comparado ao exame histológico e aos testes de urease sobre as respectivas biopsias gástricas (142, 125).

### **6.2.2.3. Teste de Imunoblot**

O imunoblot é um excelente método para o estudo da resposta imunitária contra os diferentes antígenos de *H. pylori*. Em geral, os antígenos desnaturados da bactéria são separados por electroforese, transferidos sobre uma membrana de nitrocelulose e em seguida colocados em contacto com o soro a testar. Este método pode ser o método de escolha para confirmar os resultados serológicos duvidosos (113, 135).

### **6.2.2.4. Testes rápidos**

Diversas companhias desenvolveram testes utilizando sangue total de forma a permitirem a sua utilização no consultório médico. A primeira geração de testes inclui os testes de aglutinação em látex, os quais permitiam a visualização os agregados antígeno-partículas de látex em 2 a 3 minutos após a mistura dos mesmos. Nos novos testes, o soro ou o sangue capilar é adicionado a tiras de cromatografia nas quais foram adsorvidos os antígenos específicos. Uma reacção colorida é observada ao fim de alguns minutos.

Numerosos estudos comparativos foram realizados, estando a grande maioria destes de acordo no que diz respeito ao baixo custo do teste, à rapidez de obtenção do resultado e à sua fácil realização.

### **6.2.2.5. Valor do diagnóstico**

A serologia continua a ser, actualmente, o método mais atractivo para o rastreio da infecção por *H. pylori*. Trata-se de um método de diagnóstico bem aceite pelo doente. O resultado é obtido rapidamente e qualquer laboratório está habilitado a realizar um teste ELISA. Para além do mais, trata-se de um método global, isto é, ao contrario dos métodos baseados na biopsia gástrica, permite uma avaliação do estado infeccioso da totalidade da mucosa gástrica sem estar sujeito ao potencial erro de amostragem (115, 151).

### 6.2.3. Teste nas fezes



Figura 17 – Detecção da *H. pylori* nas fezes.

Até hoje, não existia um teste vocacionado para a detecção da *H. pylori* directamente, sem realizar uma endoscopia para obtenção da biopsia gástrica. Os laboratórios Meridian desenvolveram, recentemente, um teste (Premier Platinum HpSA) baseado no princípio ELISA para detectar os antigénios *H. pylori* nas fezes. Este teste utiliza anticorpos policlonais anti *H. pylori* presentes numa amostra de fezes diluídas. Em seguida, um anticorpo policlonal marcado com peroxidase e um substrato, são utilizados para desenvolver a cor. A leitura do resultado é feita com a ajuda de um leitor de placas (Figura 17).

#### 6.2.3.1. Valor do diagnóstico

Os primeiros resultados revelaram uma sensibilidade de 83%, comparando este teste com a serologia e de 97% comparando-o com o teste respiratório. Os resultados preliminares de um estudo de avaliação da eficácia terapêutica demonstraram uma diminuição rápida dos valores obtidos pelo teste Premier HpSA ao longo do tempo. Um estudo Europeu, utilizando 501 doentes, para os quais foram efectuados o teste histológico, o teste da urease e a cultura, revelou uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 91,8% para o teste HpSA..

Este teste é, pois, um método de diagnóstico sensível e específico para a detecção da *H. pylori*. Trata-se de um teste directo não invasivo, que pode ser facilmente realizado num laboratório de rotina e num reduzido espaço de tempo (2 horas). A sua precisão parece ser boa mesmo numa situação de pós-tratamento.

O HpSA pode igualmente ser utilizado em estudos epidemiológicos, nomeadamente em crianças de idade pré-escolar, para as quais, por razões éticas, os testes directos invasivos não devem ser efectuados. Trata-se pois de um excelente complemento à serologia, método utilizado até hoje com a restrição de que, no primeiro ano de vida a presença de anticorpos maternos torna impossível a interpretação dos resultados da serologia (154, 126).

## Bibliografia

1. Marshall, B. J., Warren, J. R. Spiral bacteria in the human stomach: A common finding in patients with gastritis and duodenal ulcer. 1983; *Campylobacter* II, London P.H.L.S.
2. Marshall, B. J., Warren, J. R. 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Campylobacter* Infections, 1983; Brussels.
3. Marshall, B. J., Warren, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. 1984; *Lancet*.
4. Warren J. R. Spiral bacteria of the gastric antrum. 1984; *Med J. Aust.*
5. Morris A., Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. 1987; *Am J. Gastroenterol.*
6. Marshall, B. J., Warren J. R., Goodwin CS, Duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pyloridis*. 1989; *Lancet*.
7. Courcoux P., Freland C., Piemond Y., Fauchère J.L., Labigne A., PCR and direct DNA sequencing as a method for distinguishing between different strains of *Helicobacter pylori*. 1990; *Rev. Esp.Enferm Dig* 78:29.
8. Goodwin CS, Amstrong JA, Chilvers T., Peters M, Collins MD, Sly L, Mc Connell W. Harper WES *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen nov as *Helicobacter pylori* comb nov and *Helicobacter mustelae* com nov respectively. 1989; *Am J. Gastroenterol.*
9. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kaudler o, Moore LH, Stacklebrant E, Starr MR, Trujer HG Report of AdHoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. 1987.

10. Woese CR, There must be a prokaryotic somewhere: microbiology's search for itself. 1994; *Microbial rev.* 58:1-9.
11. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994; 9<sup>a</sup> ed. Baltimore, Maryland 21202, USA: William and Wilkins.
12. Vincent P. Transmission and acquisition of *Helicobacter pylori* infection: evidences and hypothesis. 1995; *Biomed & Pharmacother.*
13. Censini S, Lange C, Xiang Z, Cag a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease associated virulence factors. 1996; *Proc Natl Acad Sci USA.*
14. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. 1985; *J. Med Microbiol.*
15. Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. 1993; *Criteria for their viability.*
16. Medz GL, Hazell SL, Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. 1999; *J Gen Microbiol.*
17. Tomb JF, White O, Kerlavage AR. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. 1997; *Nature.*
18. Morais A, Mendez GL, Hazell S, Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. 1999; *Microbiol Molecular Biol Reviews.*
19. Medz GL, Hazell SL, Aminoacid utilization by *Helicobacter pylori*. 1995; *Biochem Cell Biol.*

20. Medz GL, Hazell SL, The urea cycle of *Helicobacter pylori*. Microbiology 1996; 142: 2959 – 67
21. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR . 1999; J Gen Microbiol.
22. Kuipers EG, Israel DA, Kusters JG. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. J Infect Dis 2000; 181: 273-82
23. Atherton JC, Cao P, Peek R Jr. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. 1995; J. Biol. Chem.; 270
24. Asahi M. *Helicobacter pylori* cagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. 2000; J. Exp. Med., 191 (4): 593-602,.
25. Atherton J.C. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. 1995; J. Biol. Chem..
26. Atherton J.C. CagA: a role at last. 2000; Gut. 47 (3):3301,.
27. Covacci A. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. 1999; Science, 284: 1328-33,.
28. Blaser M.J. & Berg D.E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risks of human disease. 2001; J. Clin. Invest., 107 (7): 767:73,.
29. Debellis L. *Helicobacter pylori* cytotoxin vacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. 2001; Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol, 281(6): G1 440-8,.
30. Gerhard M. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen adhesion. 1999; Proc. Natl. Sci. USA, 96: 12778-83,.

31. Naito Y. & Yoshikawa T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. 2002; Free Radic. Biol. Med 33(3): 323-36.
32. Personnet J. Risks for gastric cancer I people whit cagA positive or cagA negative *Helicobacter pylori* infection. 2000; Science 287:1497-500,.
33. Peek R.M. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. 1999; Cancer Res., 59: 6124-31,.
34. Queiroz D. M. M. CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. 1998; J. Cancer. 78:135-9,.
35. Prinz C. Importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen during gastric inflammation. 2001; Cancer Res. 61:1174-80,
36. Salama N. R. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. Infect. Immun. 2000; 69(2):730-6.
37. Satin B. The neutrophil-activaing protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and major virulence factor. J. Exp. Med. 2000; 191(9):1467-76.
38. Segal E. D. Altered states: involvement of phosphorylated cagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. 1999;Proc. Natl. Sci. USA. 96: 14559-64.
39. Stein M., Rappuoli R. & Covacci A. Tyrosine phosphorilation of the *Helicobacter pylori* cagA antigen after cag-driven host cell translocation. 2000; Proc. Natl. Sci. USA. 97: 1263-8.

40. Tombola F. The *Helicobacter pylori* toxin is a urea permease that promote urea diffusion across epithelia. 1991; J. Clin. Invest.
41. Van-Doom L. Clinical relevance of the cagA, vacA, iceA status of *Helicobacter pylori*. 1998; Gastroenterology.
42. Yamaoka Y. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *Helicobacter pylori* associated diseases. 1998; J. Clin. Microbiol.,
43. Clyne M., Labigne A., Drumm B. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. 1995; Infect. Immun.
44. Dunn B. E., Vakil N. B., Schneider B. G. Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. 1997; Infect. Immun.,
45. Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. 1993; J. Med. Microbiol.,
46. Gilbert J. V., Ramakrishna J., Sunderman F. W. Jr. Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori*. 1995; Infect. Immun.,
47. Hazell S. L., Lee A., Brady L. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. 1986; J. Infect. Dis.,
48. Hendricks J. K., Mobley H. L., *Helicobacter pylori* ABC transporter: effect of allelic exchange mutagenesis on urease activity. 1997; J. Bacteriol.,
49. Hu L. T., Foxall P. A., Russell R. Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB. 1992; Infect. Immun.,

50. Labigne A., De Reuse H., Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. 1996; Infect. Agents Dis.
51. Leying H., Suerbaum S., Geis G. Cloning genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. 1992, Mol. Microbiol..
52. Marshall B. J. Barrett L. J., Prakash C. Urea protects *Helicobacter pylori* from the bactericidal effect of acid. 1990; Gastroenterology.
53. McGowan C. T., Cover T. L., Blaser M. J. Analysis of F1F0-ATPase from *Helicobacter pylori*. 1997; Infect. Immun..
54. Moran A. P. Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 1996; 215: 22-31.
55. Nakamura H., Yoshiyama H., Takeuchi H. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. Infect. Immun. 1998; 66: 4832-4837.
56. Olson E. R. Influence of pH on bacterial gene expression. Mol. Microbiol. 1993; 8: 5-14.
57. Skouloubris S., Thiberge J. M., Labigne A. *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival *in vivo*. Infect. Immun. 1998; 66: 4517-4521.
58. Suerbaum S., Josenhans C. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flag flagelin genes and consted allelic exchange. J. Bacteriol. 1993; 175: 3278-3288.
59. Worku M., Sidebothan R. L., Wren B. W. Chemotaxis oh *Helicobacter pylori* in presence of human plasma. Gut., 1997 41 (supl. I):A25.

60. Atherton J. C., Cao P., Peek R. M. Mosaicism in the vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 171-177.
61. Beil W., Birkholz C., Wagner S. Interaction of *Helicobacter pylori* and its fatty acids with parietal cells and gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Gut* 1994; 35: 1176-1180.
62. Borén T., Fal P., Roth K. A. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262: 1892-1899.
63. Censini S., Lange C., Xiang Z. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Sci. USA* 1996; 93: 14648-14653.
64. Covacci A., Telford J. L., Giudice G. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999, 284: 1328-1333.
65. Crabtree J. E., Covacci A., Farmery S. M. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with cagA-positive phenotype. *J. Clin. Pathol.* 1995; 48: 41-45.
66. Crabtree J. E. Reactions inflammatoires de l'hôte dans l'infection à *Helicobacter pylori*. Em: *Helicobacter pylori*-Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic. Mégraud Lamouliatte (eds). Amsterdam: Elsevier 1996: 219-234.
67. Van Doorn L. J., Figueiredo C., Sanna R. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 2597-2603,a.

68. Edwards N. J., Faller G. Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. *Mol. Microbiol.* 200; 35: 1530-1590.
69. Evans D. J. Jr., Evans D. G., Takemura T. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* 1995; 63: 2213-2220.
70. Fauchère J. L. Réponse immunitaire contre *Helicobacter pylori*. Em: *Helicobacter pylori*-Epidemiologie. Pathogène, Diagnostic. Megraud F., Lamouliatte (eds). Amsterdam: Elsevier 1996: 219-234.
71. Ernest P. B., Immunobiologie de *Helicobacter pylori*. La lettre de l'Infectiologue 1997; 12 (supl.3): 21-26
72. Heneghan M. A., McCarthy C. F., Moran A. P. Relationship of food group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. *Infect. Immun.* 2000; 68: 937-941.
73. Molinari M., Galli C., Norais N. Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 25339-25344.
74. Moran A. P. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 (supl.1):39-50.
75. Odenbreit S., Wieland B., Haas R. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 6960-7000.
76. Papini E., De Bernard M., Milia E. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal components. *Proc. Natl Sci USA* 1994; 91: 9720-9740.

77. Parkos C. A., Colgan S. D., Delp C. Neutrophil migration across a cultured epithelial monolayer elicits a biphasic resistennt response representing sequential effects on trascellular and paracellular pathways. *J. Cell. Biol.* 1992; 117: 754-767.
78. Pelicic V., Reyrat J. M., Sartiri L. *Helicobacter pylori* vacA cytotoxin associated to the bacteria increases epithelial permeability independently its vacuolating activity. *Microbiology* 1999; 145: 2043-2050.
79. Phadnis S. H. Parlow M. H., Levy M. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.* 1996; 64: 904-912.
80. Spiegelhalder C., Gertenecker B., Kersten A. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect. Immun.* 1993; 61: 5315-5325.
81. Tombola F., Carlesso C., Szabo I. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolating. *Biophys J.* 1999; 76: 1401-1409.
82. Young G. O., Stemment N., Lastovica A. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates gastric mucosal pepsinogen secretion. *Aliment Pharmacol Ther.* 1992; 6:169-177.
83. De Boer W. A. Diagnostic of *Helicobacter pylori*. Review of diagnostic thechniques and recommendations for their use in different clinical settings. *Am. J. Gastroentrol.* 1997; 223: 35-42.
84. Dunn B. E., Cohen H., Blaser M. J. *Helicobacter*. *Cli. Microbiol. Rev.* 1997; 10: 720-741.
85. Megraud F. How should *Helicobacter pylori* infection be diagnosed? *Gastroenterology* 113. 1997; 113: 93-98.

86. Van Zwet A. A., Megraud F. Diagnosis. Current opinion in Gastroenterology 14: s27-33.
87. Megraud F. Advantages and disadvantages of current diagnosis tests for the detection of *Helicobacter pylori*. 1996; Scand. J. Gastroenterol 31: 57-62.
88. Megraud F. A growing demand for *Helicobacter pylori* culture in the near future? 1998; Ital. J. Gastroenterol. Hepatol. 1998; 29: 574-600.
89. Nedenkov-Sfrensen P., Aase S., Bjorneklett A. Sampling efficiencing in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and chronic active gastritis. 1991; J. Clin. Microbiol. 35:427-675.
90. Bayerdorffer E., Oertel H., Lehn N. Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pyloridis* colonisation. 1989; J. Clin. Pathol. 42:834-839.
91. Goodwin C. S., Blicow E. D., Warren J. R. Evaluation of culture techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. J. Clin. Pathol. 1985; 38:1127-1131.
92. Karnes W. e., Samloff I. M., Siurala M. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects whit atrophic body gastritis. Gastroenterology 101: 167-174.
93. Ansorg R., Von Recklinghausen G., Pomarius R. Evaluating of technics for isolation, subcultivation, and preservation of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 51.
94. Atherton J. C., Spiller R. C. The urea breath test for *Helicobacter pylori*. Gut. 1994; 35: 723-725.

95. Atherton J. C., Washington N., Blackshaw P. E. Effect of a test meal on the intragastric distribution of urea in  $^{13}\text{C}$ -urea breath test for *Helicobacter pylori*. Gut 36:337-340.
96. Barthel J. S., Everett E. D. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: the 'gold standard' and the alternatives. 1990; Rev. Infect. Dis. 12 (suppl 1): S107-S114.
97. Blecker U., Vandenplas Y. Usefulness of specific IgM in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. 1994; Pediatrics 93: 342-343.
98. Chey W. D., Woods M., Scheiman J. M. Lansoprazole and ranitidine affect the accuracy of the  $^{14}\text{C}$ -urea breath test by a pH-dependent mechanism. 1997; Am. J. Gastroenterol. 92: 446-450.
99. Dixon M., Genta R., Yardley J. Classification and grading of gastritis. The update Sydney System. Am. J. Surg. Pathol. 1996; 20:1161-1181.
100. Dominguez-Muñoz J. E., Leodolter A., Sauerbruch T. A citric acid solution in a optimal test drink in the  $^{13}\text{C}$ -urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. 1997; Gut. 35: 1499.
101. Eggers R. H., Kulp A., Tegeler R. A methodological analysis of  $^{13}\text{C}$ -urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infections: high sensitivity and specificity within 20 min. using 75 mg of  $^{13}\text{C}$ -urea. 1990; 2: 237-444.
102. Faigel D., Furth E. E., Childs M. Histological predictors of active *Helicobacter pylori* infection. 1996; 41: 937-943.
103. Feldman R. A., Deeks J. J., Evans S. J. Multi-laboratory comparison of eight commercially available *Helicobacter pylori* serology kits. *Helicobacter pylori* serology study group. 1995; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14: 428-433.

104. Fléjou J. F., Goldfain D. Diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*: étude histologic de biopsies gastriques après test à l'urease. Lettre de l'infectiologue XI (supp 5):43.
105. Genta R. M., Graham D. Y. A comparison of biopsy sites for the histophologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *Helicobacter pylori* density and distribution. 1994; Gastrointst. Endosc. 40: 342-345.
106. Graham D. Y., Go M. F., Evans D. J. Urease, gastric ammonium/ammonia, and *Helicobacter pylori* – the past, the present and recommendations for future research. 1992; Aliment. Pharmacol. Ther 6: 659-669.
107. Gray S. F., Wyatt J. I., Rathon B. J. Simplified technics for identifying *Campilobacter pyloridis*. 1986; J. Clin. Pathol. 39: 12-79.
108. Hack H. M., Parsonnet J. Testing negative for *Helicobacter pylori* after methylene blue spaying of gastric mucosa. 1994; Gastroentest. Endosc. 40: 397-398.
109. Hulten K., Geebrel A., Skold O. Macrolid resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. 1997; Agents Chemother 41: 2550-2553.
110. Jenks P. J., Megaud F., Labigne A. Clinical outcome after infection whit *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the cag pathogenicity island. 1998; Gut.43 (6): 752-8.
111. Kalach N., Briet F., Raymond J. Analyse cinétique et simplification du test respiratoire à l'urée <sup>13</sup>C pour le diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori* chez l'enfant. 1996; La letter de l'infectiologue (Suppl 5): 43.

112. Kalach N., Briet F., Raymond J. The 13 carbon urea breath test for the non-invasive detection of *Helicobacter pylori* in children. Comparison with culture and determination of minimum analysis requirements. 1998; J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 26: 291-296.
113. Katsuragi K., Noda A., Tachikawa T. Highly sensitive urine-based enzyme linked immunosorbed assay for detection of antibody to *Helicobacter pylori*. 1998; Helicobacter 3: 289-295.
114. Kjoller M., Fisher A., Justesen T. Transport conditions and number of biopsies necessary for culture of *Helicobacter pylori*. 1991; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10: 166-167.
115. Kosunen T. U., Sepalla K., Sarna S. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. 1992; 1: 893-895.
116. Kuipers E. J., Schenk B. E., Meuwissen S. G. M. *Helicobacter pylori*: who is positive and who is not? 1995; Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 7: 533-536.
117. Lage A. P., Fauconnier A., Burette A. Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified *Helicobacter pylori* DNA in gastric biopsy specimens. 1996; J. Clin. Microbiol. 34: 530-533.
118. Laine L., Chun D., Stein C. The influence of size or number of biopsies on rapid urease test results: a prospective evaluation. 1996; Gastrentest. Endosc. 43: 49-53.
119. Laine L., Lewin D., Nartoku W. Prospective comparison of commercially available rapid urease tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. 1996; Gastrentest. Endosc. 44: 523-526.

120. Lambert R., Creutzfeldt W., struber H. G. Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer disease: gastrin, endocrine cell growth, and gastritis. 1993; *Gastroenterology* 104: 1456-1370.
121. Loffeld R. J. L. F., Stobberingh E., Flendring J. *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. Compariison of culture, modified Giemsa stain and himmunohistochemistry. A retrospective study. 1991; *Clin. Microbiol.* 165: 69-73.
122. Logan R. P. H.; Walker M. M. Misiewicz J. J: Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment whit omepezole. 1995; *Gut* 36: 12-16.
123. Logan R. P: H., Walker M. M. The European <sup>13</sup>C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori*. 1992; *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* . 3: 915-921.
124. Louw J. A., Zak J. Omeprazole may clear but does not eradicate *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 4: 481-485.
125. Luzzza F., Oderda G., Maletta M. Salivary immunoglobolin G assay to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children. 1997; 35: 3356-3360.
126. Makristathis A., Pasching E. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. 1998; *J. Clin. Microbiol.* 36 (9): 2772-2774.
127. Morais A., Monteiro L., Occhialini, Pina M. Direct detection of *Helicobacter pylori* resiatance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. 1999; *Gut.* 44: 463-467.
128. Mapstone N. P., Lync D. A. F., Lewis F. A. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomach of patients whit gastritis using PCR. 1993; *J. Clin. Pathol.* 46: 540-543.

129. Marshall B. J., Warren J. R., Francis G. J. Rapid urease test in the management of *Campilobacter pylori*-associated gastritis. 1987; Lancet 1: 1273-1275.
130. Megraud F., Burette A. Comparison of tests for assessment of *Helicobacter pylori* eradication: results of a multicenter study using centralised facility testing. 1999; Gut (soumis).
131. Mion F., Rosner G., Rousseu M. <sup>13</sup>C-urea breath test for *Helicobacter pylori*: cut-off point determination by cluster analysis. 1997; Clin. Sci. 93: 3-6.
132. Mitchell H. M., Hazell S. L. Li Y. Y. serological response to specific *Helicobacter pylori* antigens: antibody against cagA antigen is not predictive of gastric cancer in a developing country. 1996; Am. J. Gastroenterol. 91: 1785-1788.
133. Murnick D. E., Schuman R., Rigas B. <sup>13</sup>C-urea breath test whit LARA system. 1995 Gastroenterology 108 (suppl): A 172.
134. C.L.S.I. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Vlth Informational supplement. M100-S16. 10, N°3. 2006.
135. Nilson I., Ljungh A., Aleljung P. Immunoblot assay for serodiagnosis *Helicobacter pylori* infections. 1997; J. Clin. Microbiol. 35: 427-432.
136. Occialini A., Urdaci M., Doucet Populaire F. Macrolides resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection in point mutations and assaya of macrolide binding to ribosomes. 1997; 41: 2724-2728.
137. Olson C., Siepman N., Cox S. A comparison of culture histology and <sup>13</sup>C-urea breath tests for detection of *Helicobacter pylori*. 1995; Gastroenterology 108: A221.

138. Piccolomini R., Bonaventura G., Festi D. Optimal combination of media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from biopsy gastric specimens. 1997; J. Clin. Microbiol. 35: 1541-1544.
139. Pinkard K. J., Harrison B., Capstick J. A. Detection of *Campilobacter pyloridis* in gastric mucosa by contrast microscopy. 1986; J. Clin. Pathol. 39: 112-113.
140. Pina M., Monteiro L. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by hybridization in liquid phase. 1998; 36 (11): 3285-3290.
141. Price A. B. "The histological recognition of *Helicobacter pylori*", in Lee A., Megraud F. *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis and basic research. 1995; Saunders, London, pp33-49.
142. Reilly T. G., Paxon V., Sanders D. S. A. Comparison of serum, salivary, and rapid whole blood diagnostics tests for *Helicobacter pylori* and their validation against endoscopy based tests. 1997; Gut 40: 454-458.
143. Rivera E., Lopez Vidal Y., Luqueno V. Indirect immunofluorescence assay for detection of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosal biopsies. 1991; Clin. Microbiol. 29: 1748-1751.
144. Rogge . D., Wagner D. R., Carrico R. J. Evaluation of a new urease reagent strip for detection of *Helicobacter pylori* in Gastric specimens. 1995; Am. J. Gastroenterol. 90: 1965-1960.
145. Schuman R., Rigas B., Prada A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by the LARA system. Towards a simplified breath test. 1995; Gastroenterology 108 (suppl.): A 215.
146. Sohara H., Kimura K., Taniguchi Y. <sup>13</sup>C-UBT by infra-red spectrophotometer for the diagnostic and eradication of *Helicobacter pylori*.

The second Meeting of the Japanese Research Society for *Helicobacter pylori* and related gastrduodenal diseases. 1996; Kobe 45.

147. Soltesz V., Zeeberg B., Wadstrom T. Optimal survival of *Helicobacter pylori* under various transport conditions. 1992; J. Clin. Microbiol. 30: 1453-1456.
148. Soulé J. C., Flejou J. F., Rousseau M. Comparison of 4 diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: a multicenter study using centralized facilities. 1995; Gastroenterology 108 (suppl.): A224.
149. Stone G., Shortridge D., Versalovic J. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. 1997; Antimicrob. Agents Chemother 41: 712-714.
150. Taylor D. E., Ge Z., Purych D. Cloning and sequence analysis of 2 copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori*. 1997; Antimicrob. Agents 41: 2621-2628.
151. Thijs J. C., Van Zwet A. A., Meyer B. C. Serology to monitor the efficacy of anti-*Helicobacter pylori* treatment. 1994; Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 6: 579-583.
152. Thijs J. C., Van Zwet A. A., Thijs W. J. Diagnostic test for *Helicobacter pylori*: prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. 1996; Am. J. Gastroenterol. 10: 2125-2129.
153. Uribe R., Fujioka T., Ito A. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* in gastric aspirates by PCR. 1998; 72: 114-122.
154. Vaira D., Malfetheiner P., Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using a novel, non-invasive antigen based assay in a European multicenter study. 1999; Lancet.

155. Van zwet A. A., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E., Thijs J. C. Stable amoxicilin resitance in *Helicobacter pylori*. 1998; The Lancet 352: 1595.
156. Westblom T. U., Madan E., Kemp J. Improved visualisation of mucus penetration by *Campilobacter pylori* using a Brown-Hopps stain. 1988; J. Clin. Pathol. 41: 2323.
157. Weston A. P., Campbell D. R., Hassanein R. S. Prospective multivariate evaluation of CLOtest performance. 1997; Am. J. Syphilis 4: 97-99.
158. Wittemen E. J., Jansen A., Simons A. M. J. "Comparison of culture, histology, CLOtesting and serology for the detection of *Helicobacter pylori* during a one-year follow-up". in the Wittemen E. M., ed., Clinical and Pathophysiological aspects of eradication of *Helicobacter pylori*. 1994; Academic Thesis, University of Amsterdam.
159. Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. 1997; Biotechniques 22: 130-138.
160. Xia H. X., Keane C. T. O'Morain C. A. Pre-formed urease activity of *Helicobacter pylori* as determined by a viable cell count technique – clinical implications. 1994; J. Med. Microbiol. 40: 435-439.
161. Young E. L., Sharma T. K., Cutler A. F., Prospective evaluation a new urea-membrane test for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric antral tissue. 1996; Gastroentest. Endosc. 44: 527-531.
162. Yousfi M. M., El-Zimaity H. M. T., Genta M. G. Evaluation of a new reagent strip rapid urease test for detecting of *Helicobacter pylori*infection. 1996; Gastrointest. Endosc. 44: 519-522.

163. Zaitoun A. M. Histology compared with chemical testing for urease rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimen. 1993; J. Clin. Pathol. 45: 448-449.
  
164. Versalovic J., Shortridge D., Kibler K. Mutations in the 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. 1996; Antimicrobial Agents Chemother 40: 477-480.