

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Helicobacter pylori* À AMOXICILINA,
CLARITROMICINA E CIPROFLOXACINA NO RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL**

Tese de Doutorado

SIMONE ULRICH PICOLI

PORTO ALEGRE

2012

Simone Ulrich Picoli

**PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Helicobacter pylori* À AMOXICILINA,
CLARITROMICINA E CIPROFLOXACINA NO RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção de título de Doutor, pelo Programa de
Pós-Graduação: Ciências em
Gastroenterologia e Hepatologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. João Carlos Prolla

Co-orientador: Dr. Heriberto Fernández (UACH)

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

PICOLI, SIMONE ULRICH
PERFIL DE SENSIBILIDADE DE HELICOBACTER PYLORI À
AMOXICILINA, CLARITROMICINA E CIPROFLOXACINA NO RIO
GRANDE DO SUL / SIMONE ULRICH PICOLI. -- 2012.
73 f.

Orientador: JOÃO CARLOS PROLLA.
Coorientador: HERIBERTO FERNÁNDEZ.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. HELICOBACTER PYLORI. 2. SENSIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS. I. PROLLA, JOÃO CARLOS, orient. II.
FERNÁNDEZ, HERIBERTO, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Prolla pelo importante auxílio prestado na orientação deste doutorado e por sua disponibilidade em esclarecer dúvidas durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni pela oportunidade de aproximação com o Serviço de Gastroenterologia e com médicos colaboradores. Agradeço pelo incentivo e apoio na realização deste estudo e por todos os esclarecimentos oportunizados durante o seu desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Heriberto Fernández que desde o Chile foi capaz de transmitir e compartilhar seus conhecimentos específicos para o cultivo e teste de sensibilidade de *Helicobacter pylori*. Obrigada por atender prontamente todos os meus e-mails.

À minha mãe Elvira e minha irmã Carla pela paciência em minhas ausências, pelos almoços “relâmpago” e pelo incentivo proporcionado. O amor de vocês e de meu pai (*in memoriam*) sempre foi o propulsor de tudo em minha vida!

Ao meu marido e meu amor, Martín Sánchez, por ter “tocado” a janela do meu carro dando início a esta linda história de vida que construímos dia a dia! A Martina Zoé, fruto do nosso amor e que em breve virá a este mundo trazendo ainda mais alegrias para nossa família!

À Laura Renata de Bona pelo compartilhamento de atividades, amostras e materiais neste estudo.

Ao Huander Felipe Andreolla por ter me apresentado ao Prof Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni despertando, desta forma, meu interesse no estudo de *Helicobacter pylori*.

À minha amiga e colaboradora Erli Neuhauss pelo incentivo e auxílio nas últimas etapas de desenvolvimento deste doutorado. Seu apoio foi muito importante!

Aos profissionais da equipe médica contratados do Serviço de Gastroenterologia, Cristina Flores, Matheus e Cristina Arruda juntamente com os residentes Alexandre, Giuliano, Gustavo, Nadja e Cesar que colaboraram de

modo importante na coleta de amostras para o estudo. Obrigada p paciência.

À toda equipe do Centro Cirúrgico Ambulatorial (CCA), principalmente aos enfermeiros e técnicos de enfermagem os quais contribuíram de diversas formas ao trabalho.

Aos secretários do Centro Experimental de Pesquisa, Everaldo e Vanessa e aos funcionários da Unidade de Análise Molecular e de Proteínas (UAMP) Jeferson e Patrícia.

Ao Laboratório de Microbiologia do HCPA por oportunizar o uso das suas instalações para execução de parte deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia pelo aprendizado e apoio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia e do Serviço de Gastroenterologia do HCPA.

Aos pacientes e voluntários que participaram do estudo, pela sua disponibilidade no consentimento das coletas.

A todos os demais que, de alguma maneira, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Aspectos gerais de <i>Helicobacter pylori</i>	16
2.2 Epidemiologia.....	17
2.3 Patogenia.....	19
2.3.1 Fatores de virulência.....	19
2.3.1.1 Aderência.....	19
2.3.1.2. Urease.....	19
2.3.1.3 Gene <i>cagA</i>	20
2.3.1.4 Gene <i>vacA</i>	21
2.3.1.5 Gene <i>iceA</i>	21
2.3.1.6 Gene <i>nap</i>	22
2.3.1.7 Outros genes.....	22
2.3.2 Resposta inflamatória.....	22
2.3.3 Alterações da secreção ácida gástrica.....	23
2.4 Detecção de <i>H. pylori</i>	23
2.4.1 Reação em cadeia da polimerase.....	24
2.4.2 Teste da urease	24
2.4.3 Histologia.....	25
2.4.4 Sorologia.....	25
2.4.5 Teste respiratório com ureia marcada.....	26
2.4.6 Cultura.....	26
2.4.7 Pesquisa de antígeno nas fezes.....	27

2.5 Tratamento	28
2.6 Resistência aos antibióticos.....	29
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos.....	34
5 AMOSTRA E MÉTODOS	35
5.1 Amostra	35
5.2 Métodos.....	36
5.2.1 Delineamento do estudo.....	36
5.2.2 Metodologia.....	37
5.2.3 Análise estatística.....	42
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	43
7 SUPORTE FINANCEIRO.....	43
8 RESULTADOS.....	44
9 DISCUSSÃO.....	47
10 CONCLUSÕES.....	56
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	68
Anexo 1 TCLE Projeto 07-654.....	69
Anexo 2 TCLE Projeto 09-175.....	71
Anexo 3 Resumo esquemático dos procedimentos laboratoriais.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AMO	Amoxicilina
BHI	Brain Heart Infusion
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
<i>cagA</i>	Cytotoxin associated gene A
CCA	Centro Cirúrgico Ambulatorial
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLA	Claritromicina
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>dupA</i>	Duodenal ulcer promoting
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERI	Eritromicina
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós Graduação
H&E	Hematoxilina-eosina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IBP	Inibidor da bomba de prótons
<i>iceA</i>	induced contact with epithelium
IL	Interleucina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio

<i>oipA</i>	Outer inflammatory protein
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogênio Iônico
mL	Mililitro
<i>nap</i>	Neutrophils-activating protein
RBC	Citrato de bismuto ranitidina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	Células T helper
TTC	2,3,5- Cloreto de Trifeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
<i>vacA</i>	Vacuolating cytotoxin
γ	Gama
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μg	Micrograma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Breakpoints</i> da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo a Padronização Britânica.....	40
Tabela 2- <i>Breakpoints</i> da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo <i>CDS Method</i>	40
Tabela 3- <i>Breakpoints</i> da zona de inibição e sua concentração correspondente segundo a Padronização Francesa.....	41
Tabela 4-Variações de CIM para AMO e CLA e percentual de resistência em 54 isolados de <i>H. pylori</i>	44
Tabela 5- Resistência à CLA e CIP pela técnica qualitativa de disco difusão (CA-SFM) em 54 isolados de <i>H. pylori</i>	45
Tabela 6- Perfil de resistência dos 9 isolados de <i>H. pylori</i>	45
Tabela 7-Análise dos diagnósticos endoscópicos conforme perfil de sensibilidade/resistência aos antibióticos.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplo de determinação de CIM com de fita de E-test®.....39

RESUMO

Introdução: *Helicobacter pylori* é uma bactéria que infecta aproximadamente metade da população mundial e é considerada uma importante causa de câncer gástrico. A terapia de erradicação nem sempre é eficaz, pois pode ocorrer a resistência aos antimicrobianos. **Objetivo:** Determinar o perfil de sensibilidade de isolados de *H. pylori* frente aos antibióticos amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina na população do Rio Grande do Sul empregando distintas padronizações. **Material e Métodos:** Estudo transversal. Avaliaram-se 54 amostras de *H. pylori* obtidas através de cultivo de biópsias gástricas em Agar Belo Horizonte e incubação a 37°C em microaerofilia, durante cinco dias. A sensibilidade aos antibióticos foi determinada segundo as orientações das padronizações britânica (BSAC) e australiana (CDS Method) (quantitativas), além da francesa (CA-SFM) (qualitativa). **Resultados e discussão:** Sete (13%) isolados de *H. pylori* foram resistentes à claritromicina, um (1,9%) à amoxicilina e três (5,5%) à ciprofloxacina. Estes índices de resistência são considerados satisfatórios e demonstram que todos esses antibióticos podem ser utilizados na terapia empírica na população local, sobretudo a amoxicilina e a claritromicina como primeira linha de tratamento. As metodologias quantitativas BSAC e CDS Method revelaram concordância muito semelhante nos resultados de sensibilidade, sendo a interpretação mais facilitada na técnica CDS Method. A padronização CA-SFM parece ser mais atrativa sob o aspecto econômico, mas fornece resultados apenas qualitativos. **Conclusão:** Os antibióticos amoxicilina e claritromicina ainda são uma boa opção no tratamento anti-*H. pylori* na população do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, sensibilidade aos antimicrobianos.

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* is a bacteria which infects nearly half the world population and it is considered an important cause of gastric cancer. The eradication therapy is not always effective because resistance to antimicrobials may occur. **Objective:** To determine the susceptibility profile of *H. pylori* isolates to the antibiotics amoxicillin, clarithromycin and ciprofloxacin in the population of Rio Grande do Sul using different standardizations. **Material and Methods:** Transversal study. Were evaluated 54 samples of *H. pylori* obtained by gastric biopsies which were cultured on Belo Horizonte agar and incubated at 37°C in a microaerophilic environment for five days. The antibiotics susceptibility was determined according to the guidelines of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Australian (CDS Method) (quantitative) and the French (CA-SFM) (qualitative). **Results and discussion:** Seven (13%) *H. pylori* isolates were resistant to clarithromycin, one (1,9%) to amoxicillin and three (5,5%) to ciprofloxacin. These indices of resistance are considered satisfactory and show that all of these antibiotics can be used in the empirical therapy of the local population, especially amoxicillin and clarithromycin as a first line treatment. The quantitative methodologies BSAC and CDS Method revealed very similar agreement in the susceptibility results. Moreover, the CDS method had an easier interpretation technique. The CA-SFM standards seem to be more attractive on the economic aspect but they only provide qualitative results.

Conclusion: The antibiotics amoxicillin and clarithromycin are still a good option for anti-*H. pylori* treatment in the population of Rio Grande do Sul.

Keywords: *Helicobacter pylori*, antimicrobial susceptibility

1 INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria que está associada à etiopatogenia de diferentes doenças do trato digestivo como gastrites, úlceras pépticas gástricas e duodenais e câncer gástrico (HUNT, 1996). Constitui um dos microrganismos que mais infecta os humanos (CAVE, 1996; GRAHAM, 2000; HUNT, 1996) e estima-se que, aproximadamente, metade da população mundial seja portadora desse agente (HUNT, 1996). Sua distribuição não é homogênea e é influenciada por fatores como idade e condições socioeconômicas (McCALLION *et al.*, 1995).

Diferentes evidências clínicas demonstram benefícios na erradicação desta bactéria, entre eles a resolução da gastrite e a expressiva diminuição na taxa de recidiva de úlceras gástricas e duodenais (MARSHALL *et al.*, 1988).

A frequência de *H. pylori* nos países em desenvolvimento é de 80-90% e os regimes terapêuticos nem sempre são eficazes em tais populações (LACY & ROSEMORE, 2001). No Brasil, particularmente no Estado do Rio Grande do Sul, a prevalência da bactéria é distinta entre a população adulta e infantil. Um estudo envolvendo pacientes adultos dispépticos funcionais encontrou um elevado índice de infecção (76%) (MULLER *et al.*, 2007) frente a 24,86% detectados na população pediátrica (SOUSA *et al.*, 2001).

No tocante à erradicação de *H. pylori*, percebe-se que mesmo cumprindo um protocolo de tratamento estabelecido existem casos em que o paciente permanece infectado. Uma das possíveis explicações para este evento é a resistência da bactéria aos antimicrobianos empregados ou à concentração utilizada dos mesmos. Neste contexto, os antibióticos classicamente empregados na terapia de primeira linha são a amoxicilina e a claritromicina (COELHO & ZATERKA, 2005), embora outros antimicrobianos também sejam terapeuticamente úteis como tratamentos de segunda e/ou terceira linha.

Assim, torna-se relevante o conhecimento do perfil de sensibilidade de *H. pylori* frente aos antibióticos amoxicilina e claritromicina, bem como à ciprofloxacina, junto à população atendida no Rio Grande do Sul. Estas

informações serão muito úteis na eleição de terapia empírica mais direcionada para atendimento dos pacientes locais, visando a sua cura clínica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais de *Helicobacter pylori*

Em 1983, dois pesquisadores australianos, Barry J. Marshall e Robin Warren isolaram, pela primeira vez, *H. pylori* (Prêmio Nobel de Medicina – 2005) a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica. No entanto, a comunidade clínica interpretou tais achados com ceticismo e muitas críticas, fazendo com que a descoberta levasse algum tempo até tornar-se aceita. Dois anos depois, em 1985, Marshall se submeteu a endoscopia com coleta de biópsia gástrica para demonstrar que não estava infectado pela bactéria e que após intencional infecção com *H. pylori*, passou a desenvolver um quadro de gastrite histologicamente comprovada (AHMED, 2005). Contudo, data do século passado o achado de bactérias espiraladas no estômago de animais. Neste contexto, em 1906, Krienitz foi o primeiro a observar “espiroquetas” no estômago humano (TONELLI & FREIRE, 2000).

Os microrganismos do gênero *Helicobacter* são morfologicamente muito semelhantes à *Campylobacter*, mas possuem algumas diferenças bioquímicas e estruturais que permitiram sua classificação em um gênero à parte. Uma característica muito relevante que os diferencia é a presença de enzima urease, encontrada apenas em *Helicobacter* (GOODWIN *et al.*, 1989).

A bactéria caracteriza-se por ser Gram-negativa espiralada em forma de “S” ou bastonete curvo, microaerófila, mede cerca de 3 a 5 µm de comprimento por 0,5 µm de largura, tem parede celular externa lisa e possui de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e com bulbo terminal (TONELLI & FREIRE, 2000). Verdadeiramente, *H. pylori* pode se apresentar tanto na forma bacilar (replicável) como cocóide (não replicável) de acordo com as condições em que se encontre. Após o cultivo prolongado ou na vigência de terapia antimicrobiana o microrganismo pode se converter da forma bacilar para a cocóide (KUSTERS *et al.*, 1997). Entre suas características bioquímicas,

apresenta as enzimas catalase e oxidase, além da urease (GLUPCZYNSKI, 1996).

Embora metade da população mundial esteja infectada com este microrganismo, a infecção permanece latente na maioria dos indivíduos e em, aproximadamente, 20% deles ocorre desenvolvimento de doenças severas. A provável explicação para os diferentes desfechos seja atribuível à virulência das espécies de *H. pylori* juntamente com fatores do hospedeiro, ambientais e nutricionais (SHIOTA *et al.*, 2010). Portanto, diferentes variáveis, inclusive a aquisição na infância, o tipo de linhagem da bactéria, a predisposição genética do hospedeiro e o meio ambiente parecem estar relacionados à sua fisiopatogenia (WISNIEWSKI & PEURA, 1997).

Entre os acometimentos mais comuns envolvendo *H. pylori* estão descritos a gastrite crônica, a úlcera péptica e o câncer gástrico. Em 1994, a “International Agency for Research on Cancer” categorizou a infecção por esta bactéria como “carcinógeno do grupo I” (IARC, 1994). De fato, o câncer gástrico é uma das principais causas de morte por câncer no mundo, mas a sua incidência diminuiu significativamente em alguns países desenvolvidos ao longo das décadas (GARCIA *et al.*, 2007).

2.2 Epidemiologia

O *H. pylori* tem distribuição cosmopolita e estima-se que cerca de metade da população mundial esteja infectada, variando com a idade e o nível socioeconômico. A soroprevalência aumenta progressivamente com a idade (MITCHELL *et al.*, 2003) e é igualmente encontrada em homens e mulheres (MCCALLION *et al.*, 1995; ALAZMI *et al.*, 2010). Contudo, nos países em desenvolvimento podem ocorrer taxas de soropositividade elevadas em faixas etárias mais jovens (SHERMAN *et al.*, 2002). Em crianças aparentemente saudáveis, entre 0-12 anos, da zona urbana da Uganda (África) foi encontrada uma elevada prevalência de *H. pylori* (44,3%). O índice de colonização pela bactéria foi elevado em indivíduos no primeiro ano de vida e progrediu com o avanço de idade (HESTVIK *et al.*, 2010).

De modo semelhante, no Brasil, um estudo em crianças e jovens até 18 anos, de famílias de baixa renda, evidenciou um percentual de 34% de soropositivos, que aumentou significativamente com a idade (BEDOYA *et al.*, 2003).

O ser humano é o principal hospedeiro de *H. pylori*, não tendo ainda sido encontrados animais que cumpram o papel de reservatórios significantes. A bactéria pode ser encontrada, também, no ambiente, em águas contaminadas (GLYNN *et al.*, 2002). Um estudo epidemiológico realizado no Peru propôs a associação entre a prevalência deste microrganismo e a água potável, consolidando a hipótese de transmissão fecal-oral (KODAIRA *et al.*, 2002).

Contudo, pesquisas utilizando tipagem de DNA realizadas com famílias em condições de aglomeração demonstraram que a principal forma de transmissão é a interpessoal. Esta conclusão se fundamenta no achado da mesma cepa de *H. pylori* entre os diferentes membros de uma mesma família (ROMA-GIANNIKOU *et al.*, 2003), indicando que a via pela qual ocorre a transmissão pode ser fecal-oral ou oral-oral (MARSHALL, 2000). Embora a bactéria já tenha sido isolada de indivíduos dispépticos, acredita-se que sua sobrevivência após a transição até o intestino seja incomum devido ao efeito letal que a bile possui sobre a bactéria (KAPADIA, 1997).

Adicionalmente, há sugestão de que a bactéria possa ser encontrada na região bucal, em placa dentária ou na saliva. Além disso, o microrganismo já foi encontrado no suco gástrico de pacientes infectados, reforçando a possibilidade da transmissão oral-oral através de vômito ou refluxo esofágico (ATHERTON, 1997).

No segmento da medicina (Gastroenterologia) é importante destacar que existe possibilidade de transmissão de *H. pylori* através dos endoscópios se a desinfecção apropriada não for realizada (BROWN, 2000). Estudos demonstraram a possibilidade de transmissão através do ato sexual (oral-anal), enquanto a transmissão por vetores (insetos) é praticamente nula (ESLICK, 2001).

2.3 Patogenia

A evolução clínica da infecção por *H. pylori* é um evento complexo determinado pela interação entre os fatores relacionados ao hospedeiro, somados aos fatores ambientais e àqueles relativos à bactéria (WISNIEWSKI & PEURA, 1997).

Dentre os principais mecanismos patogênicos envolvidos estão os fatores de virulência do microrganismo, a resposta inflamatória e a alteração da secreção ácida gástrica.

2.3.1 Fatores de Virulência

2.3.1.1 Aderência

H. pylori possui capacidade excepcional de aderência, revelando grande afinidade pelas células mucíparas gástricas (QUEIROZ & MENDES, 1993). A adesão parece atuar na patogênese através da lesão direta da célula, facilitando a liberação dos produtos tóxicos produzidos pela bactéria nas proximidades da célula epitelial e estimulando a produção de citocinas pela célula do hospedeiro (MAHDAVI *et al.*, 2002). As adesinas envolvidas nos estágios iniciais da colonização podem ser proteínas bacterianas, glicoconjugados ou lipídeos que mediam a interação entre a bactéria e a superfície das células do hospedeiro (MILLER-POLDRAZA *et al.*, 2004).

2.3.1.2 Urease

A urease nativa de *H. pylori* possui massa molecular de aproximadamente 540 kDa e é uma molécula hexamérica contendo níquel que consiste em duas subunidades: UreA (26.5 kDa) e UreB (60.3 kDa), em uma razão molar 1:1. O principal papel desta enzima na patogênese da bactéria é a neutralização do microambiente ácido do estômago através da produção de amônia (HA *et al.*, 2001).

Todos os isolados de *H. pylori* encontrados no estômago de indivíduos infectados produzem grandes quantidades da enzima urease e esta pode representar 10 a 15% das proteínas bacterianas. Tal enzima juntamente com o influxo de uréia através de uma proteína de membrana específica (Urel) são essenciais na colonização e na resistência ácida *in vivo*. A produção de amônia através da urease bacteriana e a anidrase carbônica periplasmática ancorada na membrana, regulam o potencial de membrana e ajustam o pH periplasmático para cerca de 6,1 sob condições ácidas. Estes eventos promovem uma condição bioenergética adequada para a sobrevivência e crescimento de *H. pylori* (SACHS *et al.*, 2005).

2.3.1.3 Gene *cagA*

O *cagA* (*citotoxin antigen associated*) foi o primeiro gene específico de *H. pylori* descrito, sendo fortemente associado ao risco de desenvolvimento de câncer gástrico (PARSONNET *et al.*, 1997). Um estudo de caso-controle realizado em Porto Alegre demonstrou uma associação entre as linhagens de *H. pylori cagA*⁺ e o risco de câncer gástrico (MEINE *et al.*, 2011). De fato, este tipo de câncer é cerca de três vezes mais frequente em indivíduos infectados por linhagens *cagA*⁺ do que nos *cagA*⁻ (PARSONNET *et al.*, 1997). As cepas *cagA*⁺ são mais virulentas e induzem a expressão de níveis mais elevados de interleucinas, especialmente as IL-1b e IL-8 (BLASER & BERG, 2001). Por outro lado, cepas *cagA*⁻ também podem induzir o aumento da secreção de IL-8 através do gene *cagE*, presente na ilha de patogenicidade *cag* (LADEIRA *et al.*, 2003).

O gene *cagA* é o marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag-PAI*), sendo encontrado em 60% das cepas ocidentais. A ilha *cag-PAI* é um componente do genoma de *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes de um sistema de secreção que serve para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular do hospedeiro, como a expressão de proto-oncogenes (COVACCI *et al.*, 1999).

A estrutura de *cagA* mostra uma região 5' altamente conservada, enquanto a região 3' apresenta um número variável de sequências repetitivas, gerando uma variação no comprimento da referida proteína. Considerando a capacidade altamente antigênica de *cagA*, qualquer variação em seu comprimento poderá resultar em distintos graus de respostas inflamatórias (LADEIRA *et al.*, 2003).

2.3.1.4 Gene *vacA*

Conforme já descrito, a urease desempenha um papel chave na sobrevivência de *H. pylori* no pH inóspito do estômago através da conversão da uréia em amônia e bicarbonato. No entanto, esse processo requer a produção da citotoxina *vacA* que é responsável pela formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais, os quais conduzem a uréia para a luz da mucosa gástrica. Assim, a *vacA* é considerada um importante fator de virulência, já que contribui para a formação de alcalóides através da urease, induzindo a danos no DNA (SALAMA *et al.*, 2001).

O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori* e é composto por duas partes variáveis, “s” e “m”. 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 três subtipos (*s1a*, *s1b*, *s1c*). Já a região *m* (região média) possui apenas os alelos *m1* ou *m2* (ATHERTON *et al.*, 1995).

Contudo, a produção de citotoxinas depende da combinação em mosaico dos alelos da região s com os alelos da região m. Neste contexto, ocorre a produção de grande quantidade de toxina quando o genótipo de *vacA* for *s1/m1*; produção moderada se as cepas forem *s1/m2* e é baixa ou inexistente se *s2/m2* (ATHERTON *et al.*, 1999).

2.3.1.5 Gene *iceA*

Em 1998, foi descrito o gene *iceA* (*induced contact with epithelium*) que apresenta dois alelos: *iceA1* e *iceA2*. A expressão do primeiro alelo está

associada à úlcera péptica e ao câncer gástrico, sendo regulada pelo contato de *H. pylori* com as células epiteliais da mucosa gástrica. A função do alelo *iceA2* é desconhecida (PEEK *et al.*, 1999).

2.3.1.6 Gene *nap*

O gene *neutrophils-activating protein (nap)* de *H. pylori* está relacionado com a intensidade da inflamação, inclusive em cepas *cagA*⁻. O produto do gene, a proteína hp-nap, induz a aderência de neutrófilos às células endoteliais e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos neutrófilos e estas podem ter papel importante na carcinogênese gástrica (LADEIRA *et al.*, 2003).

2.3.1.7 Outros genes

H. pylori pode apresentar outros genes relacionados à sua virulência. Recentemente, um novo fator de virulência putativo foi identificado na ilha de patogenicidade *cag-PAI*: o gene *oipA* (*outer inflammatory protein*). Este codifica proteínas de membrana externa e induz a secreção de IL-8 pelas células epiteliais (BEN MANSOUR, FENDRI *et al.*, 2010).

O gene denominado *dupA* (*duodenal ulcer promoting*) está envolvido no aumento do risco de úlcera duodenal, embora pareça oferecer proteção contra a atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico em indivíduos japoneses, coreanos e colombianos (SHIOTA *et al.*, 2010).

2.3.2 Resposta inflamatória

No processo de infecção por *H. pylori* ocorre resposta imune inadequada devido ao predomínio de células Th₁ (*T helper*₁), enquanto as células Th₂ (*T helper*₂) estão praticamente ausentes. Estas células predominantes (Th₁) também induzem a produção de anticorpos e citocinas que potencializam o processo inflamatório, com danos às células do hospedeiro (LADEIRA *et al.*,

2003). Os pacientes infectados pela bactéria apresentam níveis de expressão e produção de interleucinas IL1- β , IL-6, IL-8 e de fator de necrose tumoral α (TNF- α) (ISRAEL & PEEK, 2001).

Com o objetivo de evitar a resposta imune e colonizar a mucosa gástrica, *H. pylori* apresenta moléculas semelhantes às do hospedeiro, como os antígenos de Lewis. Antígenos X e Y de Lewis, similares aos expressos no eritrócito humano, estão presentes em 80% das cepas. Como consequência ocorre uma baixa toxicidade do lipopolissacarídeo (LPS) do *H. pylori* em comparação ao LPS das Enterobactérias (MÉGRAUD, 2005).

2.3.3 Alterações da Secreção Ácida Gástrica

As alterações na secreção ácida exercem importante papel na patogênese da úlcera péptica prejudicando a inibição ácida na liberação de gastrina, aumentando a secreção de ácido basal e pós-estímulo, além de promover maior acidez no duodeno. A maior produção de ácido predispõe à metaplasia gástrica e está descrita a hipótese de que a bactéria, antes restrita ao estômago, colonizará também as áreas de metaplasia gástrica no duodeno. Como resultado, ocorrerá duodenite crônica que facilita a retrodifusão de íons hidrogênio e subsequente ulceração (TONELLI & FREIRE, 2000).

2.4 Detecção de *H. pylori*

Diferentes métodos, invasivos ou não-invasivos, encontram-se disponíveis para a detecção de *H. pylori*. Os invasivos são aqueles que dependem da realização de endoscopia para coleta de biópsias: reação em cadeia de polimerase (PCR) (LEHOURS *et al.*, 2003), teste da urease (ORNELLAS *et al.*, 2000), histologia (ROCHA, 1996) e cultura (MALFERTHEINER *et al.*, 2002). Já os não-invasivos incluem sorologia (PORTORREAL; KAWAKAMI, 2002; KIAS *et al.*, 2011), pesquisa de antígeno fecal e teste respiratório com uréia marcada com isótopos de carbono (^{14}C e ^{13}C) (CUTLER *et al.*, 1998; GODOY & RIBEIRO, 2004). A eleição do teste a

ser empregado dependerá da situação clínica do paciente (TONELLI & FREIRE, 2000).

2.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR é uma ferramenta utilizada para a detecção de *H. pylori*. Apresenta altíssima sensibilidade e especificidade, podendo ser feita diretamente de diferentes materiais clínicos como biópsias gástrica ou duodenal, suco gástrico, placa dentária, saliva e das fezes. Para identificação da bactéria tem sido usados os genes *rRNA* 16S *rRNA*, *ureA* e o *glmM*. Devido a sua alta sensibilidade, a PCR é muito utilizada em estudos epidemiológicos ligados à identificação de reservatórios ambientais, bem como em trabalhos de determinação do modo de transmissão deste microrganismo (LEHOURS *et al.*, 2003).

2.4.2 Teste da Urease

O teste da urease em fragmento de tecido é baseado na presença da enzima denominada urease. É muito sensível, sendo o mais usado para o diagnóstico endoscópico. Um fragmento de biópsia do antro e/ou do corpo gástrico são introduzidos imediatamente após a coleta em um substrato contendo uréia e um indicador de pH (vermelho de fenol). A urease hidrolisa a uréia em amônia e dióxido de carbono, com consequente alcalinização do pH e mudança da cor do meio, de amarelo para rosa. Quando a mudança de cor ocorre dentro das primeiras 24 horas, o teste é considerado positivo (ORNELLAS *et al.*, 2000).

Apesar das várias preparações disponíveis no mercado, o teste de urease não tamponado tem mostrado acurácia comparável e custo cumulativo menor (CHU *et al.*, 1997), sendo largamente utilizado na prática clínica, tendo como inconveniente o não conhecimento sobre a intensidade da inflamação. Devido à possibilidade de contaminação por bactérias produtoras de urease, como *Proteus* sp., podem ocorrer alterações na cor do teste durante a

estocagem. Por isso, preconiza-se que a preparação contendo uréia e o marcador sensível de pH seja feito rotineiramente (ORNELLAS *et al.*, 2000).

2.4.3 Histologia

O material para a análise histopatológica, a biópsia, é obtido durante o exame endoscópico e é processado com uma coloração histológica, como Giemsa, Hematoxilina e Eosina, Warthin-Starry, Steiner ou carbolfucsina. Este exame possibilita a verificação de infecção por *H. pylori*, além de demonstrar o grau de intensidade de inflamação da mucosa gástrica. Este método pode apresentar falhas e inconveniências, tanto pela falta de visualização e identificação da área mais afetada no momento da coleta, como pela retirada de biópsias de locais inadequados ocasionada pela distribuição desigual do microrganismo na mucosa gástrica (ROCHA, 1996).

2.4.4 Sorologia

As maiores titulações de anticorpos contra *H. pylori* são observadas nas classes das imunoglobulinas IgG e IgA, sendo a primeira a mais importante. Os títulos de IgM não diferenciam os indivíduos infectados dos não infectados (RATHBONE *et al.*, 1986).

Embora a amostra de soro seja processada através de uma excelente técnica imunológica (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), podem ocorrer resultados falsos negativos naqueles indivíduos que não desenvolvem reação imunológica satisfatória frente à infecção. Neste grupo encontram-se os imunodeprimidos, os idosos e crianças. Desta forma, o método ELISA parece ser mais sensível e específico em pacientes adultos de países desenvolvidos (PORTORREAL & KAWAKAMI, 2002).

O teste sorológico tem sido utilizado em estudos epidemiológicos por ser um exame não-invasivo (BLEECKER *et al.*, 1994). Contudo, deve-se considerar que a infecção é restrita a mucosa e que a estimulação antigênica

pode ser lenta, gerando resultados falso-negativos em poucas semanas ou meses após a infecção (MÉGRAUD, 1996).

2.4.5 Teste Respiratório com Uréia Marcada

Considerando que este teste respiratório envolve a utilização de uréia, pode-se dizer que seu fundamento é o mesmo do teste da urease: a detecção da enzima produzida por *H. pylori*.

Neste teste, o indivíduo ingere uma solução de uréia marcada (^{13}C ou ^{14}C) que é convertida pela urease em amônia e bicarbonato, o qual é absorvido e convertido em CO_2 nos pulmões. Posteriormente, é feita a expiração em um balão próprio que permite a detecção do carbono marcado, presente no CO_2 , por cintilação ou espectrografia (TONELLI & FREIRE, 2000).

Entre as suas limitações pode-se citar a impossibilidade de utilização em gestantes, bem como em menores de 18 anos pelo caráter radioativo do ^{14}C . Em contrapartida, o ^{13}C pode ser usado na pediatria por não apresentar características radioativas. O teste respiratório com uréia marcada é considerado um ótimo teste não invasivo, com grande utilidade em estudos epidemiológicos, apresentando sensibilidade superior a 90%, além de ser altamente específico (GODOY & RIBEIRO, 2004).

2.4.6 Cultura

O cultivo de *H. pylori* pode ser influenciado pelas características do meio de cultura, pelo número de biópsias e suas condições de obtenção (tempo e temperatura de transporte), bem como pelo uso prévio de medicamentos (inibidor da bomba de prótons, antibióticos, bismuto ou benzocaínas). Outro possível interferente é a presença de resíduos de glutaraldeído na pinça de coleta (MALFERTHEINER *et al.*, 2002). Embora a cultura seja uma das técnicas diagnósticas mais difíceis de executar, ela é muito útil, pois viabiliza a realização do teste de sensibilidade aos antibióticos.

Existem alguns aspectos comuns entre os diferentes meios de cultura empregados para isolamento de *H. pylori*. Todos eles oferecem um bom suporte nutricional através de uma base de agar à qual se adiciona sangue de carneiro ou de cavalo ou, ainda, de soro fetal bovino, além da suplementação com antibióticos que tornam o meio seletivo.

Neste contexto, temos o agar sangue de carneiro 7% com 1% de extrato de levedura e suplemento DENT® (vancomicina 10mg/L, trimetoprim 5 mg/L, cefsoludina 5 mg/L e anfotericina B 5 mg/L) (OTTH *et al.*, 2011); agar Brucella sangue de carneiro 5% com suplemento Skirrow® (vancomicina 10 mg/L, trimetoprim 5 mg/L e polimixina B 2500 UI/L) (DESTURA *et al.*, 2004); agar Columbia sangue de cavalo 10% e o suplemento Skirrow (BEN MANSOUR *et al.*, 2010); agar Brucella com 10% de soro fetal inativado juntamente com os antibióticos vancomicina (10 mg/L), trimetoprim (5 mg/L), anfotericina B (5000 UI/L) (LINS *et al.*, 2010) e o agar Belo Horizonte® cuja formula contém base de Agar Columbia com 10% de sangue de carneiro, vancomicina (6 mg/L), ácido nalidíxico (20 mg/L), anfotericina B (2 mg/L) e 40 mg/L de 2,3,5-Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) (OPLUSTIL *et al.*, 2004). Este último meio foi desenvolvido por pesquisadores brasileiros, de Minas Gerais.

Independente do meio de cultura eleito para o isolamento da bactéria, é imprescindível a incubação em atmosfera de microaerofilia (5-6 % de O₂, 8-10% CO₂, 80-85% N₂), 37°C, durante 5 a 10 dias (OTTH *et al.*, 2011; BEN MANSOUR *et al.*, 2010; LINS *et al.*, 2010).

São poucos os centros no Brasil que trabalham com essa técnica diagnóstica que é cara e requer um laboratório especializado. Ela, na verdade, ainda tem sido usada apenas no âmbito de pesquisa (TONELLI & FREIRE, 2000).

2.4.7 Pesquisa de antígeno nas fezes

Este teste não invasivo é indicado em abordagens iniciais de dispepsia não investigada, além de ser útil na avaliação pós-tratamento de erradicação. Contudo, para evitar o resultado falso negativo é recomendado um intervalo

mínimo de 6 a 12 semanas após o término do tratamento (SOCIEDADE PORTUGUESA DE GASTROENTEROLOGIA, 2008).

A detecção dos antígenos pode ser feita através da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com anticorpos policlonais anti-*H. pylori*. Este método qualitativo apresenta elevada sensibilidade (92 a 94%) e especificidade (92,8 a 95,4%) (BRADEN & CASPARY, 2001).

2.5 Tratamento

Infelizmente não existe um consenso sobre esquema terapêutico ideal na erradicação de *H. pylori* e combinações de vários antimicrobianos e diferentes tempos de tratamento já foram usados. Parece ser importante o emprego concomitante de um medicamento com secreção salivar e/ou gástrica (claritromicina ou metronidazol) e um fármaco com ação luminal (amoxicilina, bismuto, tetraciclina ou furazolidona). Contudo, a eficácia do tratamento dependerá do percentual de isolados resistentes ao metronidazol e/ou claritromicina (GONZAGA *et al.*, 2000).

Considerando que a sensibilidade de *H. pylori* aos antibióticos é muito variável e que é influenciada por raça e uso prévio desses medicamentos, o sucesso de um esquema de tratamento em uma comunidade não permite a generalização dos resultados (GRAHAM, 1998). O ideal seria basear o tratamento no conhecimento prévio do índice de resistência microbiana na comunidade local, o que é difícil na maioria dos centros brasileiros (HAN *et al.*, 1999).

A terapia antimicrobiana com apenas um medicamento corresponde a fracasso terapêutico. Contudo, a partir 1989, se utilizou uma associação de amoxicilina (50 mg/kg/dia), metronidazol (20 a 30 mg/kg/dia) e furazolidona (6 a 8 mg/kg/dia), em três doses diárias, por sete dias, com erradicação de 84% (LIND, 1999). Entretanto, o percentual de efeitos colaterais é significativo, mas na maioria dos indivíduos não impede a continuidade da terapia (HARRIS & MISIEWICZ, 2001). Ultimamente, vem sendo utilizada a associação de um inibidor da bomba protônica (omeprazol 20 mg, lansoprazol 30 mg, pantobrazol

40 mg ou rabeprazol 20 mg) mais amoxicilina (1000 mg) e claritromicina (500 mg) (SILVA *et al.*, 2004). Esta é uma das propostas terapêuticas de primeira escolha recomendada pelo II Consenso Brasileiro sobre *H. pylori* (COELHO & ZATERKA, 2005).

É importante destacar que o sucesso da erradicação de *H. pylori* não depende apenas da susceptibilidade da bactéria ao antimicrobiano utilizado na terapia, mas este é um dos principais fatores tendo, assim, maiores taxas de cura em pacientes infectados com linhagens sensíveis ao tratamento. Foi sugerido que a taxa de erradicação deste microrganismo é menor em pacientes com dispepsia funcional, comparando-se à pacientes com úlcera. Desse modo, os fatores de virulência de *H. pylori* poderiam influenciar na falência terapêutica (KIM *et al.*, 2003).

Um estudo brasileiro analisou a eficácia da tripla terapia com lansoprazol, amoxicilina e claritromicina usados por sete dias em pacientes com úlcera péptica numa área urbana. Foi concluído que esta tríplice associação é bem tolerada e apresenta altas taxas de erradicação, tornando-se uma boa alternativa para países em desenvolvimento (BELLELIS *et al.*, 2004).

Quando há falha na terapia de primeira linha, torna-se necessária uma terapêutica de segunda linha. Neste caso, o tratamento é baseado fundamentalmente no uso de bismuto e levofloxacina (GISBERT, 2008).

2.6 Resistência aos antibióticos

A resistência bacteriana em *H. pylori* pode ser categorizada em diferentes classes:

- a) Natural ou primária: é definida como a incapacidade intrínseca do antimicrobiano em erradicar a infecção.
- b) Secundária: desenvolvimento de resistência adquirida para antimicrobiano frente ao qual a bactéria era inicialmente sensível; isto se dá por mutações ou aquisição de plasmídeos.

c) Outro tipo de resistência pode estar especificamente ligado ao *H. pylori* onde as espécies mostram sensibilidade *in vitro*, mas são resistentes *in vivo*. A causa preliminar desta resistência é a dificuldade do antimicrobiano em alcançar o local da infecção em concentrações suficientes para resultar em um efeito antibacteriano (PAJARES-GARCÍA *et al.*, 2007).

O cultivo de *H. pylori* passa a ter mais importância nas populações onde a bactéria apresenta maior resistência aos antimicrobianos, pois é possível realizar o teste de suscetibilidade a partir da cultura (DÍAZ-REGAÑÓN *et al.*, 2006). Para o antimicrobiano claritromicina, a determinação do perfil de sensibilidade está recomendada quando o nível de resistência ultrapassar 15 a 20% (MALFERTHEINER *et al.*, 2005). Em crianças, percebe-se que os índices de resistência ao metronidazol e claritromicina vêm aumentando, mas se mantém grande a sensibilidade a amoxicilina e tetraciclina (LÓPEZ-BREA *et al.*, 2001). Infelizmente, a tetraciclina não é antimicrobiano recomendado na terapêutica pediátrica uma vez que tal medicamento produz deformidades ósseas e dentárias na população infantil (<http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004030919301756998982000107&mode=dir&letter=F>). No Brasil, a resistência à tetraciclina está descrita entre 0% (EISIG *et al.*, 2011) a 7% (MENDONÇA *et al.*, 2000).

Nos países em desenvolvimento a resistência de *H. pylori* aos antimicrobianos é considerada mais elevada que nos países desenvolvidos. Existem poucos estudos brasileiros envolvendo esta temática, fato que dificulta a eleição da terapia empírica mais recomendada para uma determinada população. No Brasil, já foram reportadas taxas de 16% de resistência para a claritromicina (GODOY *et al.*, 2003), mas outro estudo brasileiro mais recente indicou que apenas 8% das amostras apresentavam este fenótipo (EISIG *et al.*, 2011). Curiosamente, outro trabalho brasileiro, conduzido com pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, não detectou espécies resistentes à claritromicina (EISIG *et al.*, 2003).

A claritromicina é um antibiótico bacteriostático que afeta a síntese proteica através da sua união à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, impedindo a translocação do complexo terciário do sítio A ao sítio P do ribossomo, acarretando em interferência no alongamento da síntese proteica. A

união é dada pela formação de pontes de hidrogênio entre diferentes radicais hidroxila do macrolídeo (CLA) e determinadas bases do RNAr 23S (PETERS & CLISSOLD, 1992). A resistência à CLA em *H. pylori* é resultante de mutações pontuais no gene *rrn* 23S que codifica para o RNAr 23S da subunidade ribossomal 50S. As mutações mais frequentes são a substituição de uma adenina por uma citosina ou guanina na posição 2142 (A2142C, A2142G) ou por uma guanina na posição 2143 (A2143G) (VERSALOVIC *et al.*, 1996; OCCHIALINI *et al.*, 1997). Deste modo, é produzida uma modificação na estrutura do ribossomo que afeta a sua união permanente com o antibiótico e não interfere na síntese de proteínas (OCCHIALINI *et al.*, 1997). Tais mutações fazem com que as linhagens resistentes tolerem concentrações crescentes de antibiótico (OCCHIALINI *et al.*, 1997; OLEASTRO *et al.*, 2003). Os relatos de resistência para este macrolídeo são diversificados, oscilando entre 2 a 29% (DÍAZ-REGAÑÓN *et al.*, 2006).

O metronidazol é o antimicrobiano para o qual *H. pylori* tem apresentado maior índice de resistência: a primária é de 30-40%, enquanto a secundária é de 70 a 100% (GLUPCZYNSKI, 1998); na Tunísia a resistência primária é elevada em adultos (56.8%) e é menor na população infantil (25%) (BEN MANSOUR *et al.*, 2010). De modo semelhante, dados brasileiros também apontam índices elevados de resistência primária na população adulta: 55% (GODOY *et al.*, 2003) e 51% (EISIG *et al.*, 2011). Possivelmente, estes índices possam ser atribuídos ao amplo uso de metronidazol no tratamento de infecções ginecológicas (giardíase) e de doenças parasitárias (amebíase) (QUEIROZ *et al.*, 1993).

A resistência secundária ao metronidazol é elevada quando usado como o único agente no tratamento da infecção por *H. pylori* e é mais baixa quando em combinação com um segundo ou terceiro antimicrobiano. Vários relatos mostram que a resistência ao metronidazol parece ter menos impacto que a resistência à claritromicina (PAJARES-GARCÍA *et al.*, 2007).

A amoxicilina é um antibiótico fundamental na terapia anti-*H.pylori*, apresentando ação bactericida devido à inibição da biosíntese da parede celular bacteriana. Trata-se de uma penicilina semi-sintética que possui uma

estrutura cíclica, o anel beta-lactâmico, responsável por sua potência e especificidade. Nas linhagens da bactéria sensíveis à AMO, a inadequada formação da parede celular produz um desequilíbrio osmótico que ocasiona a morte celular. Entre as vantagens destacáveis apresentadas por este antibiótico frente a outras aminopenicilinas no tratamento de *H. pylori* pode-se destacar a melhor absorção a partir do trato digestivo, melhor capacidade para alcançar concentrações eficazes nos sítios de ação e maior capacidade de penetração na parede celular bacteriana. A ação da AMO se dá por sua ligação à proteínas de ligação de penicilinas (PBPs ou *penicillin binding proteins*) presentes na superfície da membrana bacteriana. Após a entrada do antibiótico na bactéria através das PBPs, ocorre o bloqueio da síntese da parede por interferência do anel beta-lactâmico propiciando a lise celular por desequilíbrio osmótico (ORTIZ *et al.*, 2006).

Felizmente, as taxas de resistência à amoxicilina são reduzidas em todo o mundo, possibilitando sua utilização empírica. Contudo, dentre os raros estudos brasileiros, um deles corrobora a inexistência de linhagens resistentes (EISIG *et al.*, 2011), enquanto outro descreve um índice atípico de 29% de isolados com resistência à amoxicilina (MENDONÇA *et al.*, 2000). Tal situação demonstra a necessidade do monitoramento local dos padrões de resistência de *H. pylori* aos antibióticos.

A falha na erradicação não pode ser obrigatoriamente atribuída à resistência bacteriana, pois outros fatores devem ser considerados como a conformidade da terapia (a respeito da duração e dose), propriedades dos fármacos e características da lesão gástrica (úlceras pépticas ou gastrite crônica). Não há nenhum consenso sobre qual deve ser a duração mínima do tratamento de erradicação. Entretanto, alguns dados sugerem que um regime por tempo menor pode aumentar taxas da resistência, particularmente aos nitroimidazóis (metronidazol) (PAJARES-GARCÍA *et al.*, 2007).

3 JUSTIFICATIVA

As taxas de não erradicação de *H. pylori* após tratamento com combinações de antimicrobianos pode ser atribuída a mecanismos de resistência bacterianos. Tais taxas são diversificadas, variando em diferentes regiões de um mesmo país e entre países diferentes.

Existem poucos estudos brasileiros, e nenhum no Rio Grande do Sul, demonstrando a prevalência de resistência no nosso meio. O não conhecimento dessa informação dificulta o sucesso do tratamento, uma vez que o médico pode ter prescrito o antimicrobiano menos ativo sobre *H. pylori*.

Assim, o desconhecimento das taxas de resistência de *H. pylori* à amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina na população local justifica a necessidade da realização do presente estudo. Embora os dados de resistência para os demais antimicrobianos também sejam relevantes, os mesmos não puderam ser obtidos, unicamente, por limitações financeiras.

Questão da pesquisa: Qual é o índice de resistência de *H. pylori* aos antibióticos amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina na população do Rio Grande do Sul?

Hipótese: O índice de resistência aos antibióticos amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina é elevado a ponto de impossibilitar o emprego destes fármacos na terapia empírica anti-*H. pylori*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Determinar o perfil de sensibilidade de isolados de *H. pylori* frente aos antibióticos amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina na população do Rio Grande do Sul, Brasil.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar quantitativamente a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos amoxicilina e claritromicina empregados no tratamento de erradicação de *H. pylori*.

- Comparar o resultado do perfil de sensibilidade (CIM) de *H. pylori* à amoxicilina e claritromicina obtido através de duas padronizações distintas: *British Society Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC, 2009) e *CDS Method* (2009).

- Determinar qualitativamente a sensibilidade de *H. pylori* frente à ciprofloxacina e claritromicina através de disco difusão segundo *Comite de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM, 2007).

5 AMOSTRA E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA

As amostras (culturas) de *H. pylori* foram oriundas dos projetos GPPG-HCPA 09-175 “Desenvolvimento e validação de um novo meio de cultivo para *Helicobacter pylori*” (Mestrado) e GPPG-HCPA 07-654 “Perfil de sensibilidade de *Helicobacter pylori* à amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina no Rio Grande do Sul, Brasil” (Doutorado).

Em ambos os estudos (09-175 e 07-654) foram realizados cultivos de biópsias do antro de pacientes que necessitavam realizar endoscopia digestiva com coleta de biópsia por indicação médica no Centro Cirúrgico Ambulatorial (CCA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Critérios de inclusão de indivíduos:

Realização de endoscopia digestiva alta por indicação médica.
Assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexos I e II).

Critérios de exclusão de indivíduos:

Câncer Gástrico com tratamento quimioterápico prévio.
Pacientes em tratamento de qualquer tipo de câncer.
Gastrectomia total e parcial.
Paciente cirrótico em estado grave.
Plaquetopenia.
Pacientes que realizavam endoscopia para dilatação esofágica.
Pacientes que realizavam endoscopia para passagem de sonda.
Pacientes com nefropatia grave.
Varizes esofágicas.
Ligadura elástica de varizes esofágicas.
Impossibilidade de realizar biópsia gástrica.

Tamanho da amostra

Foram avaliados 54 isolados de *H. pylori*, sendo 28 originários do projeto 09-175 “Desenvolvimento e validação de um novo meio de cultivo para *Helicobacter pylori*” (Mestrado), enquanto 26 foram do projeto 07-654 “Perfil de sensibilidade de *Helicobacter pylori* à amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina no Rio Grande do Sul, Brasil” (Doutorado). Todos os 54 isolados foram obtidos de indivíduos diferentes (amostras não repetidas).

Do montante das amostras utilizadas, 50 delas foram testadas imediatamente após seu crescimento em cultivo primário e apenas 4 isolados de *H. pylori* encontravam-se estocados (duplicata) em criotubos com caldo Brain Heart Infusion (Himedia, Índia) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, Alemanha), à -80°C.

O descongelamento (reativação) dos 4 isolados bacterianos foi feito por inoculação de alíquota de cada amostra em Agar Columbia Chocolate (Oxoid, United Kingdom) e incubação a 37°C sob atmosfera de microaerofilia (Microaerobac®, Probac do Brasil) durante 72 horas. Após, foi adicionado 100 µL de caldo BHI (Himedia, Índia) na superfície de cada Agar Columbia Chocolate (Oxoid, United Kingdom) sendo espalhado com alça de Drigalski, e submetido à nova incubação pelo mesmo período e sob as mesmas condições atmosféricas e de temperatura. O objetivo desta conduta foi obter maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada amostra de *H. pylori*. De modo semelhante, as outras 50 amostras de *H. pylori* (cultivo primário) também foram subcultivadas em Agar Columbia Chocolate (Oxoid, United Kingdom) juntamente com 100 µL de caldo BHI (Himedia, Índia) e incubadas em condições de microaerofilia (Microaerobac®, Probac do Brasil) durante 3 dias.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal.

5.2.2. Metodologia

Cultivo de *H. pylori*

Todas as biópsias de antro obtidas obedeceram à seguinte logística:

- a) Cada fragmento (biópsia) de antro coletado foi preservado em microtubos com 1 gota de solução fisiológica estéril, em temperatura ambiente, por no máximo 3 horas.
- b) A biópsia foi semeada através de “*imprint*” (com alça bacteriológica estéril) na superfície de meios de cultura seletivos para *H. pylori*: agar Belo Horizonte® (Probac do Brasil), Agar Columbia (Oxoid, United Kingdom) com 7% sangue de cavalo lisado suplementado com DENT® (Oxoid, United Kingdom) e/ou “Meio 2”, desenvolvido no projeto 09-175 (cuja fórmula não pôde ser detalhada devido ao processo de patente do mesmo). As placas semeadas foram colocadas em jarra com gerador de microaerofilia (Microaerobac®, Probac do Brasil) e incubadas a 36,5-37°C em estufa bacteriológica durante o período médio de 5 dias.
- c) O crescimento sugestivo de *H. pylori* que aparece como colônias pequenas, circulares e translúcidas no meio sem a solução marcadora de colônia (PORTORREAL e KAWAKAMI, 2002) ou brilhantes no meio com TTC (QUEIROZ *et al.*, 1987) foi identificado através de provas fenotípicas universalmente aceitas: morfologia característica em esfregaço corado pelo Gram (bacilo Gram negativo curvo ou em “S”), urease positiva, catalase positiva e oxidase positiva (OTTH *et al.*, 2011).
- d) Para fins de confirmação do isolamento e de identificação adequados de *H. pylori*, sete culturas aleatórias oriundas do projeto de Mestrado 09-175 foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) para sequenciamento molecular. DNA bacteriano foi obtido utilizando a metodologia de fervura (‘boiling’) a partir das colônias que cresceram nas culturas. Foram utilizadas cerca de cinco colônias de cada placa de meio de

cultura de forma aleatória utilizando ponteiras estéreis. As ponteiras foram lavadas em 50 µL de água de alto grau de pureza obtida por osmose reversa (MilliQ, Millipore, USA). As amostras foram fervidas a 95°C durante 10 minutos em termociclador, resfriadas em gelo, centrifugadas a 12.000g por 10 segundos, e armazenadas a -20°C até sua utilização. Alíquotas de 1 µL foram usadas nas reações em cadeia de polimerase (PCR). As regiões sequenciadas foram dos genes 23S (fragmento de 98pb) e cagA (fragmento de 307 pb). Os fragmentos amplificados foram sequenciados utilizando o sequenciador automático ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada amplicon, utilizando-se os iniciadores senso e antisenso. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) e a análise dos eletroferogramas foi realizada pelo software Sequencing Analysis v.5.3.1 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos do mesmo amplicon (iniciadores senso e antisenso) foram editadas e montadas no programa SeqMan (DNASar, Madison, Wisconsin, USA). As sequências obtidas com cada montagem foram comparadas estabelecendo-se a sequência final de cada amostra. As sequências finais de cada amostra foram comparadas às sequências do GenBank utilizando a ferramenta BLAST. Tal procedimento confirmou que os isolados obtidos na cultura eram efetivamente *H. pylori*.

Todas as culturas correspondentes a *H. pylori* foram repicadas em Agar Columbia Chocolate (Oxoid, United Kingdom) juntamente com 100 µL de caldo BHI (Himedia, Índia) e incubadas em condições de microaerofilia (Microaerobac®, Probac do Brasil) durante 3 dias. O crescimento abundante do microrganismo foi utilizado para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos propostos.

A determinação da CIM aos antibióticos claritromicina e amoxicilina foi determinada através de duas padronizações diferentes: *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) e *CDS Method*. Adicionalmente, foram testados os antibióticos ciprofloxacina (equivalente à levofloxacina) e

eritromicina (equivalente à claritromicina) através de técnica qualitativa de disco difusão, descrita pelo *Comite de L'Antibiogramme De La Societé Française De Microbiologie* (CA-SFM).

De acordo com *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) (disponível em http://www.bsac.org.uk/susceptibility_testing.cfm), foram suspendidas colônias frescas (2 a 3 dias) de *H. pylori* em água destilada até equivalência ao padrão 3 da Escala McFarland (9×10^8 UFC/mL) (ajustado em Densimat®, Biomeriéux). Esta suspensão foi semeada na superfície de placas Agar Mueller Hinton com 10% de sangue de cavalo (placas com diâmetro de 90 mm). Após secagem da superfície do agar, foi aplicada uma fita de E-test® de amoxicilina e claritromicina (bioMérieux, França) (uma fita por placa) e as mesmas foram incubadas em estufa a 35°C sob atmosfera de microaerofilia (Microaerobac®, Probac do Brasil) durante 3 a 5 dias. A leitura da CIM foi definida pela região de completa inibição do crescimento, conforme exemplo ilustrativo na Figura 1 e foi realizada em 72 horas de incubação e novamente em 96 horas de incubação.



Figura 1: Exemplo de determinação de CIM com de fita de E-test® (bioMérieux, França). A zona onde a elipse se “fecha” é equivalente à CIM do antimicrobiano contido na fita.

Os pontos de corte para definição de sensibilidade ou resistência determinados pela BSAC são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. *Breakpoints* da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo a Padronização Britânica (BSAC, 2009).

	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Sensível ($\mu\text{g/mL}$)
Amoxicilina	> 1	≤ 1
Claritromicina	> 1	≤ 1

Segundo o *CDS Method* (2009) uma suspensão bacteriana equivalente a 2 de McFarland (ajustado em Densimat®, BiomeriêuX) foi preparada em caldo BHI (Himedia, Índia), a partir de colônias com 72 horas de crescimento. Um inóculo abundante foi semeado na superfície de placas com Agar Columbia Chocolate (Oxoid, United Kingdom) (placas com diâmetro de 90 mm) e, após secagem completa, aplicou-se uma fita do antimicrobiano por placa. A técnica preconiza o emprego de discos de antibióticos de amoxicilina e eritromicina, mas estes foram substituídos por fitas de E-Test® (bioMérieux, França) para determinação da CIM. Esta troca se fundamentou na indisponibilidade no mercado brasileiro de discos com concentração de 2 μg de amoxicilina e 5 μg de eritromicina preconizados pelo *CDS Method*. A incubação das placas foi realizada em microaerofilia (Microaerobac®, Probac do Brasil), a 35°C, por 3 dias. A leitura da CIM foi definida pela região de completa inibição do crescimento bacteriano, conforme exemplo ilustrativo da Figura 1 e sua interpretação obedeceu aos valores de CIM apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. *Breakpoints* da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo *CDS Method* (2009).

	Sensível ($\mu\text{g/mL}$)
Amoxicilina	≤ 1
Claritromicina	≤ 0.5

Nota: O CDS não indica *breakpoints* de resistência para Amoxicilina e Claritromicina.

As concentrações de ambos antibióticos (clartitromicina e amoxicilina) contidas nas fitas de E-test® vão desde 0,016 µg/mL até 256 µg/mL.

Para realização do teste de sensibilidade segundo a Padronização Francesa (CA-SFM, 2007), foram suspendidas colônias frescas (72 horas) de *H. pylori* em solução fisiológica até o equivalente a escala 3 McFarland (ajustado em Densimat®, Biomérieux). Este inóculo foi semeado na superfície de placas de agar Mueller Hinton com 10% de sangue de cavalo (diâmetro 90 mm). Posteriormente, foram aplicados os discos de eritromicina 15 µg e ciprofloxacina 5 µg (Biorad, França). De acordo com esta padronização, não se recomenda o teste com discos de amoxicilina, pois até o momento raras cepas mostraram sensibilidade reduzida a este antimicrobiano (CA-SFM, 2007).

A incubação foi feita em microaerofilia (Microaerobac®, Probac do Brasil), a 35°C, durante três dias (72 horas) e nova leitura em quatro dias (96 horas) para detecção de dupla população. Ao término de cada período de incubação (72 horas e 96 horas) o halo de inibição (diâmetro) foi mensurado com uso de régua milimetrada e interpretado conforme pontos de corte demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. *Breakpoints* da zona de inibição e sua concentração correspondente segundo a Padronização Francesa (CA-SFM, 2007).

	Resistente	Sensível
	Halo mm (CIM µg/mL)	Halo mm (CIM µg/mL)
Ciprofloxacina	< 20 (> 1)	≥ 20 (≤ 1)
Eritromicina	< 17 (≥ 4)	≥ 22 (≤ 1)

Cada uma das escalas de McFarland devidamente preparadas e ajustadas foram avaliadas através de coloração de Gram a fim de assegurar a presença de formas replicáveis (formas bacilares) para o teste de sensibilidade. Uma gota de cada escala foi colocada sobre lâmina de vidro limpa e

desengordurada e após secagem a temperatura ambiente, o esfregaço foi fixado no calor. Posteriormente, realizou-se a coloração de Gram e a lâmina foi observada em microscópio (Nikon) com aumento final de 1000 vezes. O achado de formas bacilares curvas ou espiraladas Gram negativas e ausência de formas cocóides caracterizou a amostra como adequada para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A padronização CA-SFM permite a presença de até 10% de formas cocóides na suspensão em teste.

5.2.3 Análise estatística

Os resultados foram organizados em tabelas Excel (2007) e analisados através do programa SPSS 17.0. Foi determinada a prevalência de resistência aos diferentes antibióticos através de cálculos percentuais. O grau de concordância entre as metodologias (padronizações) foi avaliado pelo índice kappa (k) e o nível de significância estabelecido em $\alpha=0,05$.

6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto utilizou amostras (culturas) de *H. pylori* oriundas do projeto 09-175 “Desenvolvimento e validação de um novo meio de cultivo para *Helicobacter pylori*” (Mestrado) cujo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) foi devidamente assinado pelos participantes do mesmo. Também foram utilizadas as culturas originadas pelo projeto 07-654 “Perfil de sensibilidade de *Helicobacter pylori* à amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina no Rio Grande do Sul, Brasil” (Doutorado) cujo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) também foi firmado pelos participantes.

7. SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho totalizou R\$ 10.950,00 (dez mil novecentos e cinquenta reais). O FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos) financiou parte deste investimento e a outra parte correspondeu a investimento de verba própria da autora do trabalho.

8. RESULTADOS

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *H. pylori* frente à CLA oscilaram de inferior a 0,016 µg/mL até superior a 256 µg/mL (Tabela 4). Quatro isolados da bactéria demonstraram alto nível de resistência à CLA, com CIMs iguais ou superiores a 256 µg/mL. A resistência a este antibiótico foi visivelmente detectada em 6 (11,1%) isolados de *H. pylori* através da BSAC, enquanto o CDS Method a detectou em 7 (13%) isolados. Contudo, a análise estatística demonstrou um grau de concordância (Kappa) muito bom entre os resultados obtidos através do CDS Method e BSAC ($k=0,913$; $p<0,001$) (ALTMAN, 1998).

A CIM para a AMO variou de inferior a 0,016 µg/mL até 2 µg/mL (Tabela 4). A resistência ao respectivo fármaco foi encontrada em apenas um mesmo isolado (1,9%) de *H. pylori* em ambas as padronizações e foi compatível com um baixo nível de expressão de resistência (CIM máxima igual a 2 µg/mL). Ocorreu discordância de uma diluição no valor da CIM entre as metodologias quantitativas: 1,5 µg/mL na BSAC e 2 µg/mL no CDS Method, fato que não modificou o resultado de “resistência”. A análise estatística revelou o máximo grau de concordância (Kappa) entre as metodologias CDS Method e BSAC ($k=1,000$; $p<0,001$). A amostra resistente à AMO apresentou resistência simultânea à CLA (CIM 24 µg/mL).

Tabela 4. Variações de CIM para AMO e CLA e percentual de resistência em 54 isolados de *H. pylori*.

Antibióticos	Valores de CIM	Isolados de
	(µg/mL)	<i>H. pylori</i> resistentes
	0,016-256	n (%)
Claritromicina (CLA)	<0,016 - >256	7 (13)
Amoxicilina (AMO)	<0,016 - 2	1 (1,9)

A padronização francesa (CA-SFM), uma metodologia qualitativa, caracterizou os 54 isolados de *H. pylori* como “sensíveis” ou “resistentes” à

CLA e à CIP (ciprofloxacina). Segundo esta padronização, o antibiótico eritromicina (ERI) é equivalente à CLA, enquanto a CIP corresponde à levofloxacina (LEVO). O teste de sensibilidade à AMO não é recomendado nem descrito uma vez que a respectiva padronização considera a resistência a este fármaco um evento raro.

Os resultados desta última padronização demonstraram que as 7 (13%) amostras resistentes à CLA corresponderam às mesmas detectadas pela técnica quantitativa CDS Method ($k=1,000$ e $p<0,001$). O índice de resistência para a CIP foi de 5,5% (Tabela 5) e um isolado de *H. pylori* apresentou resistência simultânea à CIP e CLA (CIM >256 µg/mL).

Tabela 5. Resistência à CLA e CIP pela técnica qualitativa de disco difusão (CA-SFM) em 54 isolados de *H. pylori*.

Antibióticos	Isolados de <i>H. pylori</i> resistentes	
	n (%)	
Eritromicina* (CLA)	7 (13)	
Ciprofloxacina (CIP)	3 (5,5)	

*Eritromicina é equivalente à claritromicina.

O perfil global de resistência aos antibióticos dos isolados de *H. pylori* está demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Perfil de resistência dos 9 isolados de *H. pylori*.

Perfil de resistência	n (%)
Apenas Amoxicilina	0 (0)
Apenas Claritromicina	5 (55,6)
Apenas Ciprofloxacina	2 (22,2)
Claritromicina+Amoxicilina	1 (11,1)
Claritromicina+Ciprofloxacina	1 (11,1)

Foram avaliados os dados de resistência aos antibióticos *versus* diagnóstico endoscópico nas 9 amostras que se revelaram resistentes a um ou mais fármacos. Percebeu-se que os indivíduos infectados por *H. pylori* com resistência aos antibióticos apresentaram uma proporção mais elevada de úlcera gástrica quando comparados aos indivíduos com *H. pylori* sensível aos antibióticos ($p=0,069$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise dos diagnósticos endoscópicos conforme perfil de sensibilidade/resistência aos antibióticos.

Diagnóstico endoscópico	Resistente	Sensível	p^*
	(n=9) n (%)	(n=45) n (%)	
Hérnia Hiatal pequeno porte	2 (22,2)	7 (15,6)	0,635
Úlcera gástrica	2 (22,2)	1 (2,2)	0,069
Angiectasia em corpo gástrico	1 (11,1)	0 (0,0)	0,167
Pangastrite endoscópica enantematosa leve	2 (22,2)	3 (11,4)	0,190
Placas de metaplasia no antro	1 (11,1)	0 (0,0)	0,167
Gastrite endoscópica erosiva moderada corpo	1 (11,1)	0 (0,0)	0,167
Normal	2 (22,2)	6 (13,3)	0,608
Duodenite enantematosa leve	1 (11,1)	0 (0,0)	0,167
Gastroduodenite endoscópica erosiva leve	1 (11,1)	0 (0,0)	0,167

*Nível de significância $p<0,05$.

9. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que as taxas de resistência de *H. pylori* aos antibióticos foram satisfatórias, com índice praticamente nulo para a amoxicilina e baixo para ciprofloxacina e para a claritromicina.

A falha terapêutica no tratamento para erradicação de infecções por *H. pylori* pode ser multifatorial, mas a principal causa é a resistência aos antimicrobianos. A sensibilidade de *H. pylori* aos antibióticos demonstra variações entre os diferentes países e é influenciada pelo uso prévio desses fármacos. Por isso, o sucesso de um esquema terapêutico não permite a generalização dos resultados (GRAHAM, 1998) e torna-se relevante fundamentar o tratamento no conhecimento prévio do índice de resistência microbiana na comunidade local (HAN *et al.*, 1999). Tal informação poderá promover o uso mais racional dos antibióticos.

Existem diferentes metodologias para determinar o perfil de sensibilidade aos antibióticos e algumas delas contemplam testes para *H. pylori*. Entre elas, encontram-se as padronizações australiana (CDS Method), britânica (BSAC), americana (CLSI), francesa (CA-SFM), entre outras. Ao eleger uma delas, é fundamental seguir as suas orientações detalhadamente a fim de obter resultados confiáveis e reprodutíveis.

No presente estudo, foram utilizadas três dessas metodologias em 54 isolados de *H. pylori* que permaneceram viáveis após seu cultivo e subcultivo. As técnicas quantitativas desenvolvidas foram as descritas em “BSAC” e “CDS Method”, além da técnica qualitativa contida em “CA-SFM”. Os fármacos testados foram a amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA) e a ciprofloxacina (CIP), sendo a AMO e a CLA considerados antibacterianos de primeira linha no tratamento de erradicação de *H. pylori* no Brasil.

Em 9 (16,7%) dos 54 isolados de *H. pylori* foi encontrada a resistência a pelo menos um antibiótico (Tabela 6). A menor frequência deste evento foi associada à AMO (uma amostra=1,9%). Efetivamente, os índices mundiais de resistência a este antibacteriano são baixos e, por esta razão, o mesmo é frequentemente utilizado na terapêutica combinada de primeira linha. Em

países da América Latina foram descritas taxas de resistência à AMO inferiores a 4%: 3,8% na Colômbia (TRESPALACIOS *et al.*, 2010), 2,2% no Paraguai (FARIÑA *et al.*, 2007), 2,3% no Chile (OTTH, *et al.*, 2011) e não foi encontrada resistência na Venezuela (URRESTARAZU *et al.*, 2003), em São Paulo/Brasil (EISIG *et al.*, 2011), nem em outro estudo colombiano (ÁLVAREZ *et al.*, 2009).

A sensibilidade à AMO é ainda maior nos demais países do mundo. Não foram descritos isolados de *H. pylori* resistentes à AMO na Alemanha (WOLLE *et al.*, 2002), na Espanha (LÓPEZ-BREA *et al.*, 1997; DÍAZ-RAGAÑÓN, *et al.*, 2006), nas Filipinas (DESTURA *et al.*, 2004), na Tunísia (BEN MANSOUR *et al.*, 2010), entre outros. Ainda que a sensibilidade de *H. pylori* à AMO seja muito satisfatória, é importante o seu monitoramento, pois eventuais resistências podem ocorrer. Um exemplo disso é caracterizado pelo achado de 23,9% dos isolamentos de *H. pylori* resistentes à AMO no Irã. Considerando que o índice de infecção pela bactéria neste país é extremamente elevado, é provável que o amplo uso deste antibiótico no tratamento de erradicação possa ter contribuído para o desenvolvimento dessas linhagens resistentes (ABADI *et al.*, 2011).

Ainda que seja um evento raro, o mecanismo de resistência de *H. pylori* à AMO é atribuído a mutações nas PBPs, particularmente na PBP1A que apresenta maior afinidade por esse antibiótico que as demais PBPs. As mudanças conformacionais produzidas pelas mutações diminuem a afinidade da AMO pelo sítio de ligação, gerando as linhagens resistentes (GERRITS *et al.*, 2006). A mutação mais frequente é dada pela substituição da serina na posição 414 por arginina (S414R) (ORTIZ *et al.*, 2006).

Felizmente, além do índice de resistência à AMO encontrado no presente estudo ter sido bem baixo (1,9%), o nível de expressão de tal resistência também foi ínfimo, não superando a CIM de 2 µg/mL. Em contrapartida, no Chile, apesar das taxas de resistência à AMO serem baixas (2,3%) foram encontrados isolados com expressivo nível de resistência, com CIM superior a 256 µg/mL (OTTH *et al.*, 2011).

A CLA tem melhores propriedades farmacocinéticas que outros macrolídeos, é mais estável que a eritromicina (ERI) em meio ácido e penetra

em altas concentrações no tecido gástrico e muco, além de apresentar maior tempo de meia vida (PICCOLOMINI *et al.*, 1997). No presente estudo, sete amostras (13%) de *H. pylori* foram resistentes à CLA e dados mundiais demonstram que este índice é variável geograficamente. Os macrolídeos são considerados antimicrobianos com boa atividade *in vitro* frente ao *H. pylori* e na Europa a resistência primária a esta classe oscila de 2 a 10%; contudo, na resistência secundária este percentual chega a 70-100% (GLUPCZYNSKI, 1998). De modo semelhante, na África a resistência primária à claritromicina é de 14,6% em adultos e 18,8% em crianças (BEN MANSOUR *et al.*, 2010). Dados revisados por Wang *et al* (2000) indicam níveis de resistência de 9,1% no Japão, de 6,1 a 12,6% nos Estados Unidos e menor que 15% na Europa (WANG *et al.*, 2000).

Na América Latina, a resistência à CLA também é variável com relatos colombianos de 2,2% (ÁLVAREZ *et al.*, 2009), 15% (RIVEROS *et al.*, 2009) e 17,7% (TRESPALACIOS *et al.*, 2010), no Chile é descrita entre 9,1% (OTTH *et al.*, 2011) e 20% (VALLEJOS *et al.*, 2007) e 2,2% no Paraguai (FARIÑA *et al.*, 2007). No Brasil, também foram encontrados índices variáveis: em São Paulo de 8% (EISIG *et al.*, 2011) a 16% (RIBEIRO *et al.*, 2003), em Belo Horizonte 17,3% (MAGALHÃES *et al.*, 2002) e 16,5% em Recife (LINS *et al.*, 2010).

Tamanha diversidade nas taxas de resistência à CLA pode ser atribuída à frequência de utilização deste antibiótico em cada uma dessas regiões do mundo. Está comprovado que o uso prévio de macrolídeos, como a eritromicina e a azitromicina, induz a resistência cruzada à CLA (PAJARES-GARCÍA *et al.*, 2007). Na Colômbia, Álvarez e colaboradores acreditam que o índice de 2,2% seja atribuído ao baixo consumo deste macrolídeo na população avaliada, uma vez que tal antimicrobiano não se encontra entre os medicamentos disponibilizados pelo plano obrigatório de saúde local (ÁLVAREZ *et al.*, 2009), fator que restringe o seu uso. Por outro lado, taxas mais expressivas, como de 20% no Chile (VALLEJOS *et al.*, 2007) representam um dado de grande importância já que a CLA é um dos antibióticos frequentemente utilizados nas terapias de erradicação. A resistência à CLA diminui a eficácia da terapia antibiótica e é o principal fator de risco para falha terapêutica. Em linhagens de *H. pylori* sensíveis a este antibacteriano as taxas

de erradicação se aproximam de 88% (PAJARES-GARCÍA *et al.*, 2007). Assim, de modo geral, está sugerido que todo o antibiótico cuja resistência alcance 20% não seja empregado na terapêutica anti-*H.pylori* (FUCCIO *et al.*, 2008).

Embora o presente estudo não tenha contemplado avaliações de *H. pylori* em nível molecular, os polimorfismos genéticos do citocromo P450 2C19 (CYP2C19) e/ou da bactéria, como mutações pontuais na região codificante da subunidade ribossomal 23S do rRNA (MÉGRAUD, 2004; MÉGRAUD & LEHOURS, 2007; DUCK *et al.*, 2004) estão diretamente envolvidos na expressão fenotípica da resistência à CLA.

Entre os 7 isolados de *H. pylori* resistentes à CLA descritos neste estudo, mais da metade deles (4) apresentou alto nível de resistência ao antibiótico com CIMs iguais ou superiores a 256 µg/mL. Tal achado sugere a utilização prévia de macrolídeos na população avaliada, gerando a resistência cruzada à CLA em níveis muito expressivos. Em contrapartida, o trabalho chileno de Otth e cols. revelou que todas as oito amostras de *H. pylori* resistentes à CLA tiveram CIMs máximas de 64 µg/mL (OTTH *et al.*, 2011).

Outro antibiótico avaliado neste estudo, a ciprofloxacina (CIP), faz parte da classe das quinolonas e é um fármaco bactericida alternativo que demonstra boa eficácia no tratamento anti-*H.pylori*. As quinolonas podem ser prescritas a indivíduos alérgicos à AMO ou àqueles que apresentaram falha na terapia tripla. O mecanismo de ação destes fármacos consiste em impedir a replicação do DNA bacteriano através da união com a enzima DNA girase (RUBINSTEIN, 2001). Sua principal ação ocorre na subunidade A da DNA girase (*gyrA*), especificamente na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR - *quinolone resistance determining region*) (BOGAERTS *et al.*, 2006). O evento da resistência à CIP é atribuído a mutações em QRDR, sendo as substituições de aspartato por glicina (D91G) e asparagina por lisina (N87K) as mais predominantes (GLOCKER *et al.*, 2007).

Os níveis mundiais de resistência à CIP são relativamente baixos, alcançando 2,4% no Teerã/Irã (SHOKRZADEH *et al.*, 2011), 5,7% no Chile (OTTH *et al.*, 2011), 7,9% na Espanha (TORO *et al.*, 2001) e 9,5% na Alemanha (GLOCKER *et al.*, 2007). Glocker *et al.* supõem que a maior

expressão de resistência à CIP descrita na Alemanha seja um evento que ocorra rapidamente e que está associado ao aumento no uso de fluoroquinolonas pela população. De modo semelhante às publicações mundiais, os dados do presente estudo também revelaram uma taxa reduzida de *H. pylori* resistente à CIP (5,5%). Este achado revela a possibilidade de seu emprego na terapêutica de erradicação da bactéria, caso seja necessária a utilização de antibióticos não pertencentes à primeira linha de tratamento no Rio Grande do Sul.

Por outro lado, estão descritos casos menos comuns onde a resistência à CIP é mais expressiva. Como exemplos, pode-se citar índices de aproximadamente 21% em Portugal (CABRITA *et al.*, 2000; PAJARES-GARCÍA *et al.*, 2007) e de 35% no Norte do Irã (ABADI *et al.*, 2011). Wang *et al.* (2010) revelaram índices de resistência às quinolonas (ciprofloxacina-CIP, levofloxacina-LVX e moxifloxacina-MOX) ainda mais alarmantes. O estudo deste grupo indicou que as linhagens resistentes chegam a 55,7% na China e que todos os isolados de *H. pylori* que apresentaram resistência à CIP foram igualmente resistentes a LVX e MOX (WANG *et al.*, 2010). Assim, fica evidenciada a relevância do monitoramento local do perfil de sensibilidade aos antibióticos em isolados de *H. pylori*, visando uma terapêutica mais direcionada.

Embora as técnicas quantitativas, BSAC e CDS Method, empregadas no presente estudo, tenham resultado em um grau de concordância muito alto ($k=1,000$ para AMO e $k=0,913$ para CLA) na identificação das linhagens resistentes aos antibióticos, percebeu-se que no CDS Method a leitura da elipse do E-test foi mais facilmente visualizada. Possivelmente isto esteja relacionado com o uso do caldo BHI para o preparo do inóculo de *H. pylori* no CDS Method, enquanto na BSAC o inóculo foi preparado em água destilada estéril. O suporte nutricional oferecido pelo caldo BHI, um meio tamponado que contém infusão de cérebro de bezerro, infusão de coração de boi, proteose peptona, glicose, cloreto de sódio e fosfato dissódico (MANUAL OXOID, 2000) deve ter promovido um crescimento mais confluyente, permitindo a adequada interpretação da CIM quando comparado ao crescimento do inóculo feito em água destilada. Outro aspecto que também pode ter favorecido o crescimento

mais abundante de *H. pylori* no CDS Method foi o uso de um meio de cultura um pouco mais nutritivo (Agar Columbia Chocolate) que àquele empregado na BSAC (Agar Muller Hinton Sangue). A base do Agar Columbia Chocolate contém peptona, amido, cloreto de sódio e ágar (MANUAL OXOID, 2000) e a adição de sangue de cavalo à base com temperatura elevada (80°C) faz com que as hemácias litem, liberando hemina e hematina, que são compostos fundamentais para o crescimento de microrganismos exigentes (ANVISA, 2004).

Assim, a combinação destes dois aspectos nutricionais, o uso de caldo BHI no preparo do inóculo e o emprego de Agar Columbia Chocolate no teste de sensibilidade, seguramente proporcionou um melhor desenvolvimento da bactéria no teste de sensibilidade segundo o CDS Method quando comparado à outra padronização quantitativa (BSAC).

Outro aspecto favorável na metodologia quantitativa descrita no CDS Method diz respeito ao tempo de incubação: são necessários 3 dias em microaerofilia, enquanto que na BSAC deve-se incubar entre 3 a 5 dias, sob a mesma atmosfera de microaerofilia. Este maior período é recomendado para visualização de subpopulações da bactéria que poderão mudar a interpretação do resultado de sensibilidade. Em nosso estudo, foi constatada a importância dessa leitura tardia: em 3 dias de incubação na BSAC não se observou a subpopulação de *H. pylori* resistente à CLA em uma amostra, mas este evento foi visualizado após 4 dias de incubação. Assim, a padronização quantitativa CDS Method parece ser mais vantajosa também pela possibilidade de leitura em apenas 3 dias de incubação.

A técnica de disco difusão proposta pela CA-SFM (qualitativa) demonstrou resultados de resistência equivalentes aos obtidos pelo CDS Method (quantitativa) para o antibiótico CLA ($k=1,000$ e $p<0,001$), com a vantagem de ser realizada com custo muito inferior. Cada fita de E-test CLA utilizada tem um valor de aproximadamente R\$ 10,00 enquanto cada disco do mesmo antibiótico custa cerca de R\$ 0,50. Desta forma, se encoraja o emprego da padronização francesa (CA-SFM) para estudos de sensibilidade frente a este antibiótico. Paralelamente, à luz da concordância dos resultados

encontrados para a CLA na comparação quantitativa *versus* qualitativa (CDS Method *versus* CA-SFM), acredita-se que os achados de resistência para CIP observados por esta mesma técnica de disco difusão estejam corretos e que devem refletir o verdadeiro panorama de resistência dos isolados de *H. pylori* avaliados. Desta forma, parece interessante o emprego da referida técnica qualitativa para rastreamento do perfil global de resistência aos antibióticos, com ótima relação custo-benefício. Contudo, um importante inconveniente da CA-SFM é a não recomendação de teste de sensibilidade à AMO, fato que excluiria este fármaco do monitoramento por esta técnica de menor custo.

Indubitavelmente, ao avaliar o fenótipo de resistência aos antibióticos de qualquer microrganismo é fundamental empregar uma metodologia padronizada, que descreva o conjunto de procedimentos a serem seguidos visando a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. Tais informações descreverão, por exemplo, desde o preparo do inóculo bacteriano (a quantidade uniformizada da bactéria a ser testada), os meios de cultura que serão empregados, as condições de incubação (tempo, temperatura, atmosfera gasosa) até os critérios de interpretação do teste (pontos de corte ou *breakpoints*). Neste contexto, diferentes padronizações estabelecem os requerimentos para verificar a sensibilidade de *H. pylori* frente aos antibióticos mais comumente utilizados na terapêutica de sua erradicação. Como exemplos, pode-se citar a padronização britânica (BSAC), a australiana (CDS Method), a francesa (CA-SFM), a americana (CLSI), entre outras. Contudo, nem todas elas contemplam testes com os mesmos antibióticos: o estudo de sensibilidade para a AMO não está descrito na CA-SFM, mas está claramente caracterizado nas padronizações CDS Method e BSAC.

Os testes de sensibilidade desenvolvidos no presente estudo contemplaram todos os aspectos descritivos indicados em cada uma das padronizações (CDS Method, BSAC e CA-SFM). Foram empregados os meios de cultura recomendados, respeitaram-se as recomendações do preparo do inóculo de *H. pylori* e condições de incubação, foram testados os antibióticos compatíveis com cada metodologia e a leitura interpretativa (*breakpoints*) também seguiu os parâmetros individuais de cada padronização. Desta forma,

se considera que os resultados encontrados foram adequados, confiáveis e são reproduzíveis.

Por outro lado, muitas publicações acerca do perfil de sensibilidade de *H. pylori* aos antibióticos podem ter seus resultados questionados devido a erros metodológicos. Tais trabalhos não seguem uma padronização internacional, fazendo com que a interpretação dos índices de resistência aos antibacterianos requeira cautela. Como exemplo destas incongruências, um trabalho indiano testou diferentes antibióticos (ciprofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, amoxicilina, claritromicina e metronidazol) por disco difusão e os resultados foram interpretados segundo a padronização americana (CLSI) (KUMALA & RANI, 2006). Porém, o CLSI recomenda o teste somente por ágar diluição e não por difusão de disco, além de descrever apenas a claritromicina como antibiótico a ser avaliado em *H. pylori*.

De modo semelhante, outro estudo avaliou a sensibilidade de isolados de *H. pylori* frente à amoxicilina (AMO), claritromicina (CLA), metronidazol (MET) e tetraciclina (TET) com fitas de E-test e inóculo equivalente a 3 de McFarland. Um ponto bem controverso foi a eleição dos critérios interpretativos: a CLA seguiu os pontos de corte para ágar diluição do CLSI, o MET teve seus *breakpoints* definidos segundo estudos multicêntricos, enquanto TET e AMO foram interpretados segundo parâmetros de outros microrganismos descritos no CLSI (TORO *et al.*, 2003). Outro exemplo de teste de sensibilidade equívoco pode ser observado no trabalho espanhol de Díaz-Regañón (2006). *H. pylori* foi testado frente à CLA e MET por E-test, AMO e TET por disco difusão, além do teste de todos estes fármacos também por agar diluição. O inóculo de *H. pylori* empregado foi descrito somente na técnica de ágar diluição (2 McFarland) e se desconhece o inóculo bacteriano utilizado no E-test e disco difusão. Para interpretação do resultado de sensibilidade foram utilizadas duas padronizações diferentes: CLSI para CLA e BSAC para os demais antibióticos (DÍAZ-REGAÑÓN *et al.*, 2006).

Diante do exposto percebe-se que tamanhas incoerências metodológicas não podem refletir em resultados confiáveis e se recomenda cautela ao considerar os achados demonstrados por publicações semelhantes.

Por fim, o presente trabalho avaliou os dados de resistência *versus* diagnóstico endoscópico nas 9 amostras de *H. pylori* resistentes a um ou mais antibióticos. Os indivíduos infectados por linhagens resistentes apresentaram uma proporção maior de úlcera gástrica que os infectados com *H. pylori* sensível aos antibióticos. Diferentes estudos, entre eles o do grupo de Ben Mansour e cols. mencionou que não há diferenças na prevalência de resistência segundo o *status* da doença (BEN MANSOUR *et al.*, 2010), mas outro estudo descreveu o contrário e concluiu que pacientes com úlcera duodenal e dispepsia não ulcerativa devem ser geridos de forma diferente na prática médica e devem ser considerados de forma independente em ensaios de erradicação (BROUTET *et al.*, 2009). Como a diferença estatística encontrada no presente estudo foi limítrofe ($p=0,069$), acredita-se ser necessária uma maior amostragem a fim de verificar se, efetivamente, os indivíduos com úlcera gástrica são mais infectados com linhagens da bactéria com menor sensibilidade aos antibacterianos na região de Porto Alegre.

Entre as limitações do presente estudo, cabe destacar o número amostral. Apesar de 342 indivíduos submetidos à endoscopia terem participado do estudo, o cultivo e subcultivo da bactéria de interesse só foi possível em 54 isolados de *H. pylori*. É necessária uma maior amostragem da bactéria para confirmação da tendência do padrão de resistência aos antibióticos observado até o momento. Além disso, outro aspecto que poderia ser explorado diz respeito ao teste de sensibilidade aos antibióticos com a inclusão de outros fármacos anti-*H. pylori*, como o metronidazol e a tetraciclina. Isso permitiria o conhecimento do padrão local de resistência a todos os antibióticos atualmente disponíveis na terapêutica de erradicação.

10. CONCLUSÕES

a) Considerando a baixa taxa de resistência à AMO descrita nos isolados de *H. pylori* avaliados (1,9%) sustenta-se o seu emprego na terapêutica empírica de primeira linha na população local de Porto Alegre.

b) Apesar da resistência à CLA ter sido mais expressiva (13%) que àquela observada na AMO, não se desencoraja o seu emprego na terapia combinada com AMO uma vez que o índice dessa resistência não se aproximou do índice limite de 20%.

c) As elevadas taxas de sensibilidade de *H. pylori* à CIP (94,5%) sugerem que este pode ser um fármaco útil na terapêutica de erradicação entre os indivíduos de Porto Alegre (RS).

d) Os resultados das padronizações quantitativas CDS Method e BSAC foram equivalentes e a primeira delas permitiu a interpretação dos resultados de forma mais evidente.

e) A padronização CA-SFM forneceu resultados de claritromicina equivalentes às padronizações quantitativas.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADI ATB, TAGHVAEI T, MOBAREZ AM, CARPENTER BM, MERRELL DS. Frequency of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from the Northern population of Iran. J Microbiol. 2011; 49(6): 987-993.
- AGREUS L. Natural history of dyspepsia. Gut. 2002; 50 Suppl 4:iv2-iv9.
- AHMED, N. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: is the debate over? Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2005; 4:17.
- ALAZMI WM, SIDDIQUE I, ALATEEQI N, AL-NAKIB B. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among new outpatients with dyspepsia in Kuwait. BMC Gastroenterol 2010; 10:14.
- ALTMAN DG. Practical statistics for medical research. Ed. Chapman & Hall, Londres, Inglaterra. 1998.
- ÁLVAREZ A, MONCAYO JI, SANTACRUZ JJ, CORREDOR LF, REINOSA E, MARTÍNEZ JW, BELTRÁN L. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Colombia. Rev Méd Chile. 2009; 147: 1309-1314.
- ANVISA. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Módulo IV, 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf.
- ATHERTON JC *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem. 1995; 270(30): 17771-7.
- ATHERTON JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut. 1997; 40: 701-3.
- ATHERTON JC *et al.* Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 1999; 37(9): 2979-82.
- BEDOYA A, GARAY J, SANZON F, *et al.* Histopathology of gastritis in *Helicobacter pylori* infected children from populations at high and low gastric cancer risk. Hum Pathol. 2003; 34:206-13.
- BELLELIS P, SAMANO EST, NUNES RC, *et al.* Efficacy of a triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in a well-developed urban area in Brazil. São Paulo Med J. 2004; 122(2):73-5.
- BEN MANSOUR K., BURUCOA C., ZRIBI M. *et al.* Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9:22.

BEN MANSOUR K, FENDRI C, ZRIBI M, MASMOUDI A, LABBENE M, FILLALI A, BEN MAMI N, NAJJAR T, MEHERZI A, SFAR T, BURUCOA C. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9:10.

BLASER, M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest. 2001; 107(7): 767-73. 2001.

BOGAERTS P, BERHIN C, NIZET H, GLUPCZYNSKI Y. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. Helicobacter. 2006; 11:441-5.

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

BROUTET N, TCHAMGOUÉ S, PEREIRA E, LAMOULIATTE H, SALAMON R, MÉGRAUD F. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy-results of individual data analysis of 2751 patients. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17:99-109.

BROWN LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev. 2000; 22: 283-97.

BSAC - British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Version 8 January 2009. Disponível em http://www.bsac.org.uk/susceptibility_testing.cfm. Acesso em 23.03.2009.

CABRITA J, OLEASTRO M, MATOS R, MANHENTE A, CABRAL J, BARROS R, LOPES AI, RAMALHO P, NEVES BC, GUERREIRO AS. Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisboa area, Portugal (1990-1999). J Antimicrob Chemother. 2000; 46:1029-1031.

CA-SFM – Comité de L'Antibiogramme De La Société Française De Microbiologie, Recommendations 2007. Disponível em <http://www.sfm.asso.fr/doc/download.php?doc=DiU8C&fic=casfm>. Acesso em 23.09.2009.

CAVE DR. Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*. Am J Med. 1996; 100(5A):12S-17S.

CDS Method - Antibiotic Susceptibility Testing By the CDS Method. A Manual for Medical and Veterinary Laboratories Online Edition, S.M. Bell, B.J. Gatus, J.N. Pham, G.T. Fisher. March, 2009.

COELHO LGV, ZATERKA S. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. Arq Gastroenterol. 2005; 42:128-132.

COVACCI, A. et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science. 1999; 284: 1328-33.

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

DESTURA RV, LABIO ED, BARRET LJ, *et al.* Laboratory diagnosis and susceptibility profile of *Helicobacter pylori* infection in the Philippines. *Annals of Clin Microbiol Antimicrob.* 2004; 3:25.

DÍAZ-REGAÑÓN J, ALARCÓN T, DOMINGO D, *et al.* Sensibilidad de 36 aislamientos de *Helicobacter pylori* a cuatro antibióticos de primera línea y características de virulencia *Rev Esp Quimioterap.* 2006; 19(1):34-38.

DUCK WM, SOBEL J, BRUCKNER JM. Antimicrobial resistance, incidence and risk factors among *Helicobacter pylori* infected persons, in the United States. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10:1088-1094.

EISIG, JN *et al.* *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. *Arq. Gastroenterol.* 2011; 48(4):261-264.

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

FARIÑA N, KASAMATSU E, SAMUDIO M, MORÁN M, SANABRIA R, LASPINA F. Susceptibilidad a antibióticos de cepas paraguayas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastro-duodenal. *Rev Méd Chile.* 2007; 135:1009-1014.

FUCCIO L, LATERZA L, ZAGARI RM, CENNAMO V, GRILLI D, BAZZOLI F. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *BJM.* 2008; 337:746-750.

GARCIA MJA, WARD EM, CENTER MM, HAO Y, SIEGEL RL, THUN MJ. Global cancer facts & figures. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.

GERRITS MM, GODOY AP, KUIPERS EJ, RIBEIRO ML, STOOFF J, MENDONCA S *et al.* Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2006; 11:181-7.

GISBERT JP, CALVET X, GOMOLLÓN F, *et al.* Tratamiento erradicador de *Helicobacter pylori*. Recomendaciones de la II Conferencia Española de Consenso. *Med Clin.* 2005; 125:301-16.

GISBERT JP. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World J Gastroenterol.* 2008;14:5385-402.

GLOCKER E, STUEGER H, KIST M. Quinolone resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(1):346-9.

GLUPCZYNSKI, Y. BURETTE A. Drug therapy for *Helicobacter pylori* infection: problems and pitfalls. Am J Gastroenterol. 1990; 85:1545-1551.

GLUPCZYNSKI Y. Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing. In: Lee A., Mégraud F. eds. *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis & basic research*. London: W. B. Saunders Company Ltd, 1996.

GLUPCZYNSKI, Y. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: A global overview. Acta Gastroenterol Belg. 1998; 61:357-366.

GLYNN MK, FRIEDMAN CR, GOLD BD, *et al.* Soroincidence of *Helicobacter pylori* infection ina cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. Clin Infect Dis. 2002; 35:1059-65.

GODOY APO, RIBEIRO ML. Disponível em [Document2http://www.helicobacter.org](http://www.helicobacter.org). Acesso em 10.10.2007.

GODOY AP, RIBEIRO ML, BENVENGO YH, VITIELLO L, MIRANDA MDE C, MENDONÇA S, PEDRAZZOLI J Jr. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterol. 2003;3:20.

GONZAGA VAZ COELHO L, LEÓN-BARÚA R, QUIGLEY EMM and representatives of the Latin-American National Gastroenterological Societies affiliated with the Inter-American Association of Gastroenterology (AI-GE). Latin-American Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol. 2000; 95:2688-2691.

GOODWIN CS, ARMSTRONG JA, CHILVERS T, *et al.* Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Campylobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int J Syst Bacteriol. 1989; 39:397-405.

GRAHAM DY. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implication for therapy. Gastroenterology. 1998; 115:1272-7.

GRAHAM DY. Therapy of *Helicobacter pylori*: current status and issues. Gastroenterology. 2000; 118(2 Suppl 1):S2-S8.

HA NC, OH ST, SUNG JY, CHA KA, LEE MH, OH BH. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. Nat Struct Biol. 2001; 8:505-509.

HAN SR, BHAKDI S, MAEURER MJ, *et al.* Stable and unstable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? J Clin Microbiol. 1999; 37:2740-2741.

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

HARRIS A, MISIEWICZ JJ. Management of *Helicobacter pylori* infection. *Brit Med J*. 2001; 323:1047-1049.

HESTVIK E, TYLLESKAR T, KADDU-MULINDWA DH, NDEEZI G, GRAHNQUIST L, OLAFSDOTTIR E, TUMWINW JK. *Helicobacter pylori* in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based cross sectional survey. *BMC Gastroenterology*. 2010; 10:62.

HUNT RH. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med*. 1996; 100(5A):42S-50S.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, 7-14 June, 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994; 61:1-241.

ISRAEL DA & PEEK RM. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001; 15:1271-90.

KAPADIA, CR. Host factors in *Helicobacter* infection. *Gastroenterology*. 1997; 113(1):361-2.

KIAS *et al.* *Helicobacter pylori* stool antigens: post and pre-treatment evaluation of two methods performances in adult's strains in Algeria. *BMC Proceedings*. 2011; 5(Suppl 1):P96.

KIM JJ, KIM JG, KWON DH. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolated in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter*. 2003; 8:202-6.

KOBAYASHI I, SAIKA T, MURAOKA H, *et al.* *Helicobacter pylori* isolated from patients who later failed *H. pylori* eradication triple therapy readily develop resistance to clarithromycin. *J Med Microbiol*. 2006; 55:737-740.

KODAIRA MS, ESCOBAR SMU, GRISI S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Rev Saúde Públ*. 2002; 36(3):356-69.

KUMALA W, RANI A. Patterns of *Helicobacter pylori* isolate resistance to fluoroquinolones, amoxicillin, clarithromycin and metronidazoles. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(5).

KUSTERS, J. G. *et al.* Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*. 1997; 65(9):3672-9.

LACY BE, ROSEMORE J. *Helicobacter pylori* : ulcers and more: the beginning of an era. *J Nutr*. 2001; 131:2789S-2793S.

LADEIRA MSP, SALVADORI DMF, RODRIGUES MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. J Bras Patol Med Lab. 2003; 39(4):335-342.

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

LIND T, MÉGRAUD F, UNGE P, *et al*. The MACH 2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. Gastroenterology. 1999; 116: 248-253.

LINS AK, LIMA RA, MAGALHÃES M. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Recife, Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. Arq Gastroenterol. 2010; 47(4).

LÓPEZ-BREA M, DOMINGO D, SANCHEZ I, ALARCON T. Evolution of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates from Spain. J Antimicrob Chemother. 1997; 40: 279-281.

LÓPEZ-BREA M, MARTÍNEZ MJ, DOMINGO D, *et al*. A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. J Antimicrob Chemother. 2001; 48: 295-297.

MAGALHÃES PP, QUEIROZ DMM, BARBOSA DVC . *et al*. *Helicobacter pylori* Primary Resistance to Metronidazole and Clarithromycin in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(6): 2021–2023.

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

MALFERTHEINER P, MÉGRAUD F, O'MORAIN C. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. Summary of the Maastricht-3 2005 Consensus Report. Business Briefing. Eur Gastroenterol Rew. 2005; 1-4.

MANUAL OXOID. 1 ed. Inglaterra, 2000.

MARSHALL BJ, GOODWIN CS, WARREN JR, *et al*. Prospective double blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. Lancet. 1988; 2:1437-1442.

MARSHALL BJ. *Helicobacter pylori* in the year 2000. *Helicobacter pylori* Foundation. 2000; 50:1-9.

MCCALLION WA, ARDILL JES, BAMFORD KB, *et al.* Age dependent hypergastrinaemia in children with *Helicobacter pylori* gastritis – evidence of early acquisition of infection. *Gut*. 1995; 37:35-38.

MCMAHON BJ, HENNESSY TW, BENSLER JM, *et al.* The Relationship among Previous Antimicrobial Use, Antimicrobial Resistance, and Treatment Outcomes for *Helicobacter pylori* Infections. *Ann Intern Med*. 2003; 139:463-469.

MÉGRAUD, F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1998; 115:1278–1282.

MÉGRAUD F. *H. pylori* resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. 2004; 53:1374-84.

_____. *Helicobacters: from Bacterial Adaptation to Pathogenicity*. *Adv Clin Exp Med*. 2005; 14(1):5-10.

MÉGRAUD F, LEHOURS P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Reviews*. 2007; 20(2): 280-322.

MEINE GC, ROTA C, DIETZ J, SEKINE S, PROLLA JC. Relationship between *cagA*-positive *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer: a case control study in Porto Alegre, Rs, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2011; 48(1).

MENDONÇA S, ECCLISSATO C, SARTORI MS, GODOY APO, GUERZONI RA, DEGGER M, PEDRAZZOLI JRJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* Resistance to Metronidazole, Clarithromycin, Amoxicillin, Tetracycline, and Furazolidone in Brazil. *Helicobacter*. 2000; 5(2):79-83.

MILLER-POLDRAZA H, JOHASSON P, ANGSTROMJ, LARSSON T, LONGARD M, KARLSSON KA. Studies on gangliosides with affinity for *Helicobacter pylori*: binding to natural and chemically modified structures. *Glycobiology*. 2004; 14: 205-217.

MISIEWICZ G, HARRIS A. *Clinician's Manual on Helicobacter pylori*. 2nd ed. London: Life Science Communications, 1997.

MITCHELL A, SILVA TM, BARRETT LJ, *et al.* Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. *Clin Microbiol*. 2003; 4:1326-8.

MÓDENA JLP, ACRANI GO, MICAS AFD, *et al.* Correlation Between *Helicobacter pylori* Infection, Gastric Diseases and Life Habits Among Patients Treated at a University Hospital in Southeast Brazil. *Braz J Infec Dis*. 2007; 11(1):89-95.

NERI M, MILANO A, LATERZA F, *et al.* Role of antibiotic sensitivity testing before first-line *Helicobacter pylori* eradication treatments. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; 18: 821-7.

OCCHIALINI A, URDACI M, DOUCET-POPULAIRE F, BEBEAR CM, LAMOULIATTE H, MEGRAUD F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:2724-8.

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

OPLUSTIL CP, ZOCCOLI CM, TOBOUTI NR, SINTO SI. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica.* 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

ORNELLAS LC, CURY MS, LIMA VM, *et al.* Avaliação do teste rápido da urease conservado em geladeira. *Arq Gastroenterol.* 2000; 37:1555-157.

ORTIZ AP, REIS FC, FERRAZ LFC, GERRITS MM, MENDONCA S, KUSTERS JG *et al.* Differentially expressed genes in responses to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS. Immunol Med Microbiol.* 2006; 50:226-30.

OTTH L, WILSON M, FERNÁNDEZ H, OTTH C, TOLEDO C, CÁRCAMO V, RIVERA P, RUIZ L. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and susceptibility to Five antimicrobail drugs in Southern Chile. *Braz J Microbiol.* 2011; 42:442-447.

PAJARES-GARCÍA JM, PAJARES-VILLARROYA R, GISBERT JP. *Helicobacter pylori* infection: antibiotic resistance. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007; 99(2):63-70.

PARSONNET J. *et al.* Risk for gastric cancer in people with *cagA* positive or *cagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1997; 40: 297-301.

PEEK RM *et al.* *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res.* 1999; 59: 6124-31.

PETERS DH, CLISSOLD SP. Clarithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drug.* 1992; 44:117-64.

PICCOLOMINI R, DI BONAVENTURA G, CATAMO G, CARBONE F, MERI M. Comparative evaluation of the Etest, Agar dilution and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobials agents. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(7):1842-1846.

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

QUEIROZ, D. M. *et al.* Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol. 1987; 25(12):2378-9.

QUEIROZ DM, COIMBRA RS, MENDES EN, ROCHA GA, ALVES VM, OLIVEIRA CA, LIMA JR GF. Metronidazol resistant *Helicobacter pylori* in a developing country. Am J Gastroenterol 1993,88:322-3.

QUEIROZ, DMM & MENDES, ENH. *Helicobacter pylori* e outros microorganismos espiralados gástricos: aspectos microbiológicos. In: Castro, L.P.; Rocha, P.R.S. & Coelho, L.G.V. (eds.) Tópicos em gastroenterologia. São Paulo: Medsi. 1993; 4:235-48.

RATHBONE BJ, WYATT JI, WORSLEY BW, SHIRES SE, TREJDOSIEWICZ LK, HEATLEY RV, LOSOWSKY MS. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. Gut. 1986; 27:642-7.

RIBEIRO ML, VITIELLO L, MIRANDA MC, BENVENGO YH, GODOY AP, MENDONÇA S, PEDRAZZOLI J Jr. Mutations in the 23SrRNA gene are associated with claritromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2003; 2:11.

RIVEROS SCH, QUIROGA A, MARÍN JDM, REGINO WO. Resistencia primaria a la claritromicina em aislamientos de *Helicobacter pylori*. Rev Col Gastroenterol. 2009; 24(2).

ROCHA AFG. *Helicobacter pylori* – Diagnóstico pelo teste Respiratório. A C. Gastroenterol. 1996; 12:4-13.

ROMA-GIANNIKOU E, KARAMERIS A, BALATSOS B, *et al.* Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori*: a genetic analysis. Helicobacter. 2003; 8:15-20.

RUBINSTEIN E. History of quinolones and Their Side Effects. Chemotherapy. 2001; 47:3-8.

SACHS G, WEEKS DL, WEN Y, MARCUS EA, SCOTT DR, MELCHERS K. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. Physiology. 2005; 20:429-438.

SALAMA NR *et al.* Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. Infect Immun. 2001; 69(2): 730-6.

SHERMAN P, CZINN S, DRUMM B, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: Working Group Report of the First World Congress of

Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002; 35:128-33.

SHIOTA S, MATSUNARI O, WATADA M, HANADA K, YAMAOKA Y. Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori* dupA gene and clinical outcomes. *Gut Pathogens.* 2010; 2:13.

SHOKRZADEH L, JAFARI F, DABIRI H, BAGHAEI K, ZOJAJI H, ALIZADEH AH, ASLANI MM, ZALI MR. Antibiotic susceptibility profile of *Helicobacter pylori* isolated from the dyspepsia patients in Tehran, Iran. *Saudi J Gastroenterol.* 2011; 17(4):261-264.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GASTROENTEROLOGIA. *Helicobacter pylori.* *J Port Gastroenterol.* 15(5):192-194. ISSN 0872-8178. 2008.

TALLEY NJ. How should *Helicobacter pylori* positive dyspeptic patients be managed? *Gut.* 1999; 45(Suppl 1):I28-I31.

TONELLI E, FREIRE LMS, Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência. São Paulo: Medsi. 2000; 656-657.

TORO C, GARCIA-SAMANIEGO J, CARBÓ J, IÑIGUEZ A, ALARCÓN T, LOPEZ-BREA M, BAQUERO M. Prevalencia de la resistencia primaria de *Helicobacter pylori* a ocho antimicrobianos em um hospital de Madrid. *Rev Esp Quimioter.* 2001; 14:172-176.

TORO C, GARCÍA-SAMANIEGO J, ALARCÓN T, BAQUERO M. Relación entre detección de anticuerpos anti-CagA, sensibilidad antibiótica y úlcera péptica en pacientes con infección por *Helicobacter pylori.* *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21(3):137-41.

TRESPALACIOS AA, REGINO WO, REYES MM. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina em pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol.* 2010; 25(1).

URRESTARAZU MI, SERRANO N, PIÑERO R, CAVAZZA ME. Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2003; 23(1):14-15.

VALLEJOS CM, GARRIDO LO, CÁCERES DL, MADRID AM, DEFILIPPI C, DEFILIPPI C, TOLEDO HA. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina em *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la región metropolitana. *Rev Méd Chile.* 2007; 135:287-293.

VERSALOVIC J, SHORTRIDGE D, KIBLER K, GRIFFY MV, BEYER J, FLAMM RK et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori.* *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40:477-80.

WANG WH , WONG BCY , MUKHOPADHYAY AK, *et al.* High prevalence of *Helicobacter pylori* infection with dual resistance to metronidazole and clarithromycin in Hong Kong. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000; 14:901-910.

WANG L, CHENG H, HU F, LI J. Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(18):2272-2277.

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

WISNIEWSKI RM, PEURA DA. *Helicobacter pylori*: beyond peptic ulcer disease. *Gastroenterologist.* 1997; 5:295-305.

WOLLE K, LEODOLTER A, MALFERTHEINER P, KÖNIG W. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. *J Med Microbiol.* 2002; 51:705-709.

ZUNIGA-NORIEGA JR, BOSQUES-PADILLA FJ, PEREZ-PEREZ GI, *et al.* Diagnostic utility of invasive tests and serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in different clinical presentations. *Arch Med Res.* 2006; 37:123-8.

<http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004030919301756998982000107&mode=dir&letter=F>. Acesso em 14.10.2007.

ANEXOS

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PROJETO 07-654**

“Perfil de sensibilidade de *Helicobacter pylori* à amoxicilina, claritromicina e ciprofloxacina no Rio Grande do Sul, Brasil”.

G.P.P.G: 07-654

FICHA # _____

PACIENTE

JUSTIFICATIVA:

Os pesquisadores deste estudo pesquisam a bactéria *Helicobacter pylori* que é muito comum entre a população, chegando a 60-80% no estado do Rio Grande do Sul. Este microrganismo causa diversos sintomas relacionados ao estômago como: dor, estufamento, digestão difícil e, também, está associado a úlceras (pequenas feridas no estômago), entre outras doenças do estômago. Para que os pesquisadores possam estudar esta bactéria no laboratório são necessários pequenos fragmentos do estômago (biópsias).

Os participantes deste estudo serão pacientes que necessitem, por indicação médica, realizar endoscopia digestiva com coleta de pequenos fragmentos do estômago (biópsias) no HCPA. O exame de endoscopia digestiva permite que o médico examine o seu esôfago (canal da comida) e estômago, sem causar dor. O exame consiste na sedação venosa (um remédio que dá sono é introduzido através de punção de uma veia), colocação de um anestésico local (xilocaína) em spray na garganta e introdução de um tubo flexível e longo, através da sua boca. Caso você concorde em participar deste estudo, durante o exame de endoscopia o médico coletará 3 pedacinhos do seu estômago (biópsias) adicionais. As complicações do exame de endoscopia com biópsias são muito raras (menos de 1 em 1000 exames), mas podem necessitar de tratamento urgente. Como você será examinado por médicos com muita experiência neste tipo de exame, os riscos ficam bastante reduzidos.

Com um dos pedacinhos de estômago (biópsia) será realizado o Teste da Urease, o qual identifica a presença da bactéria no estômago em até 24h; as outras 2 biópsias serão utilizadas para os testes de laboratório de *Helicobacter pylori* que, futuramente, poderá nos trazer maior conhecimento sobre esta bactéria.

As realizações destes testes não terão custo adicional. Você será informado sobre o resultado do Teste da Urease. Caso você queira deixar de participar deste estudo, não haverá nenhum prejuízo em seu acompanhamento no HCPA.

A assinatura desse consentimento informado dará autorização aos pesquisadores do estudo de utilizarem os dados obtidos somente para fins científicos, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a identidade dos pacientes.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento ao Dr Luiz Edmundo Mazzoleni (telefones 51- 96780843 ou 51- 33598307) e a Simone Ulrich Picoli (telefones 51- 81795000 ou 51- 33598307). Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma, sem qualquer prejuízo ao meu acompanhamento no HCPA.

Eu também poderei esclarecer quaisquer dúvidas com relação a esta pesquisa através de contato com o Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Professora Nadine Clausel) (telefone do Comitê de Ética 51- 33597640).

O profissional _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado/(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Porto Alegre, _____ de _____ de 20_____

Assinatura dos participantes:

PACIENTE

TESTEMUNHA (nos casos especiais)

INVESTIGADOR

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PROJETO 09-175**

Desenvolvimento e Validação de um Novo Meio De Cultivo Para *Helicobacter pylori*.

G.P.P.G: 09-175

FICHA # _____

PACIENTE

JUSTIFICATIVA

A bactéria *Helicobacter pylori* possui uma freqüência muito elevada na população mundial, chegando a 60-80% no estado do Rio Grande do Sul. Este microrganismo está associado a diversas doenças do estômago como: úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma do tipo MALT. Também possui uma provável associação na dispepsia, na doença do refluxo gastro esofágico e em manifestações extra digestivas. Para que possamos estudar esta bactéria necessitamos de pequenos fragmentos do estômago (biópsias), para que estes sejam cultivados no laboratório.

Os participantes deste estudo serão pacientes que necessitem por indicação médica realizar endoscopia digestiva com coleta de biópsia no HCPA. Serão coletados 4 biópsias adicionais do seu exame para este estudo, esta coleta trará riscos considerados desprazíveis ao seu exame. Com uma das biópsias será realizado um teste chamado de Teste da Urease, o qual identifica a presença da bactéria no estômago em até 24h, a outra biópsia será utilizada para tentar desenvolver e validar um meio de cultivo para o *Helicobacter pylori* e futuramente poder nos trazer maior conhecimento sobre esta bactéria. As realizações destes testes não terão custo adicional para o paciente. Os pacientes serão informados do resultado do Teste da Urease.

A assinatura desse consentimento informado dará autorização aos pesquisadores do estudo de utilizarem os dados obtidos somente para fins científicos, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a identidade dos pacientes.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento ao Dr Luiz Edmundo Mazzoleni (telefone 51- 96780843) ou a Laura De Bona (telefones 54-99443330 ou 51-33598974). Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

Você poderá também esclarecer quaisquer dúvidas com relação a esta pesquisa através de contato com o Comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Professora Nadine Clause).
(Professora Nadine Clause).

O profissional _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado/(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Porto Alegre, _____ de _____ de 20__

Assinatura dos participantes:

PACIENTE

TESTEMUNHA (nos casos especiais)

INVESTIGADOR

ORIENTADOR / COORDENADOR DO PROJETO

ANEXO 3

RESUMO ESQUEMÁTICO DOS PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

