

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR CEPAS DE
HELICOBACTER PYLORI CAGA-POSITIVO EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES SUBMETIDOS A
ESOFAGOGASTRODUODENOSCOPIA EM PORTO
ALEGRE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JULIANA GHISLENI DE OLIVEIRA

Porto Alegre, Brasil
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR CEPAS DE
HELICOBACTER PYLORI CAGA-POSITIVO EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES SUBMETIDOS A
ESOFAGOGASTRODUODENOSCOPIA EM PORTO
ALEGRE**

JULIANA GHISLENI DE OLIVEIRA
Orientadora: Prof^a. Dra. Themis Reverbel da Silveira
Co-orientadora: Dra. Cristina Helena Targa Ferreira

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil
2011

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Juliana Ghislêni de
Prevalência da infecção por cepas de *Helicobacter pylori* cagA-positivo em crianças e adolescentes submetidos a esofagogastroduodenoscopia em Porto Alegre / Juliana Ghislêni de Oliveira. -- 2011.
121 f.

Orientador: Themis Reverbêl da Silveira.
Coorientador: Cristina Helena Targa Ferreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. *Helicobacter pylori*. 2. cepas cagA-positivo. 3. prevalência. 4. crianças. I. Silveira, Themis Reverbêl da, orient. II. Ferreira, Cristina Helena Targa, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

05 / dezembro / 2011

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Júlio Carlos Pereira Lima

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Sandra Maria Gonçalves Vieira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Elza Daniel de Mello

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

(Mario Quintana)

Dedico este trabalho às **minhas maiores estrelas:**

meu marido, **Anderson**,
por compartilhar meus sonhos e projetos,
pelo apoio incondicional,
pela paciência de sempre,
pelo amor infinito;

meu filho, **Antônio**,
minha inspiração.
Com suas descobertas,
motiva-me a reinventar-me constantemente.
Por tornar tudo divertido e especial,
com suas risadas sonoras e sinceras;

meus pais, **Florinaldo e Ana Mariza**,
pelo exemplo de dedicação, devoção,
força, honestidade.
Por me ensinarem a lutar,
por tudo quanto desejo e acredito,
e perseverar sempre!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

(Charles Chaplin)

Minha história como pesquisadora começou muito cedo em minha vida acadêmica, precisamente no ano de 1998. Estava no segundo semestre da Faculdade de Medicina e, em virtude de uma greve da universidade, eu e um grupo de colegas acabamos estendendo um mero trabalho de conclusão de uma disciplina para uma pesquisa envolvendo quase 600 participantes. Inscrevemos nosso “robusto” trabalho na semana científica do Hospital de Clínicas, o qual foi selecionado, por sorte ou azar, para apresentação oral. Ficamos entre radiantes e assustados. Foi a partir daí que conheci e passei a frequentar assiduamente o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, coordenado na época, coincidência ou não, pela **Dra Themis Reverbel da Silveira**, minha orientadora. Ensaiei meus primeiros passos como pesquisadora com três pessoas muito especiais, com quem muito aprendi: o **Professor José Roberto Goldim**, meu primeiro orientador como bolsista de pesquisa da FAPERGS, e as **Professoras Mara Rúbia André-Alves de Lima e Elza Daniel de Mello**, de quem tive o prazer de auxiliar na conclusão de seus doutoramentos.

Remontando meu passado, entendo que minha trajetória profissional foi decisivamente influenciada por essas pessoas e acontecimentos...

Obrigada a **VOCÊS** pela inspiração, pelo aprendizado e, principalmente, pela oportunidade!

AGRADECIMENTOS

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** pelo apoio financeiro.

Às minhas irmãs e amigas, **Danielle e Renata**, pela inspiração, pela motivação, pela convivência, pelas trocas e, sobretudo, pela riqueza que a sua “simples” existência me proporciona.

À **Dra Cristina Targa Ferreira**, pela amizade sincera, pelas grandes ideias, pelo incentivo constante, pelo entusiasmo contagiante, pela confiança depositada.

À, quase médica, **Anna Camerin**, minha fiel escudeira, pelo apoio fundamental na logística deste trabalho, pela diligência, pela prontidão.

Às colegas gastroenterologistas pediátricas, **Carolina Albanese Neis, Marina Rossato Adami e Mirela Cristiane Santos**, pela paciência e pelo grande e incansável auxílio na inclusão dos pacientes e coleta dos dados.

À **Lenita Simões Krebs**, pela troca de experiências, pela disponibilidade.

À equipe de enfermagem das unidades de endoscopia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital Moinhos de Vento, em especial **Deonice Tramontin e Fabiana Veiga**, pelo cuidado e atenção no armazenamento dos questionários, testes de urease, biópsias coletadas.

À **Prof^a Luíse Meurer** e ao Laboratório Amplicon, em especial à **Dra Cláudia Rota**, pela realização dos exames histopatológicos e moleculares, pela gentil disponibilidade na discussão e revisão dos casos.

Aos colegas da Central de Regulação Hospitalar, em especial à **Miriam Dondonis**, pela amizade, compreensão e apoio imprescindíveis.

Ao **Carlos Kieling** e à **Prof^a Sandra Vieira** pelo auxílio com o banco de dados, pela discussão de resultados e, sobretudo, pelo incentivo.

Aos meus sogros, **Ivoni e José**, pelo carinho, pela torcida e pelo auxílio.

A todos vocês que contribuíram direta ou indiretamente, muito obrigada!

RESUMO

Introdução: A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) tem distribuição geográfica universal, porém apresenta grande variabilidade na prevalência, nos fatores de virulência e na apresentação clínica de acordo com a população estudada. No Brasil, um país continental composto por etnias e hábitos culturais diversos, o comportamento da infecção também parece variar conforme já demonstrado em diferentes estudos. O presente estudo foi realizado com o objetivo de descrever a prevalência da infecção por cepas de *H. pylori cagA*-positivo em um grupo de crianças e adolescentes submetidos a esofagogastroduodenoscopia (EGD) em Porto Alegre, cidade situada na região Sul do Brasil. **Materiais e Método:** Noventa e oito fragmentos de biópsia gástrica de crianças e adolescentes foram submetidos à pesquisa de cepas de *H. pylori cagA*-positivo pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Resultados:** A prevalência de cepas de *H. pylori cagA*-positivo foi de 29,6% (IC95% 18 a 43,6%). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto às características clínicas, demográficas, endoscópicas e histológicas dos pacientes infectados por cepas *cagA*-positivo em relação aos infectados por cepas *cagA*-negativo. **Conclusões:** O estudo demonstrou uma baixa prevalência da infecção por cepas de *H. pylori cagA*-positivo em crianças e adolescentes submetidos à EGD no sul do Brasil em comparação a estudos realizados com crianças de outras regiões do Brasil. Não houve associação entre a presença de cepas *cagA*-positivo e apresentação clínica adversa na amostra estudada.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; cepas *cagA*-positivo; prevalência; crianças brasileiras.

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has a worldwide distribution, but the prevalence of infection, virulence factors, and clinical presentation vary widely according to the studied population. In Brazil, a continental country composed of several ethnicities and cultural habits, the behavior of infection also appears to vary, as many other studies have shown.

Objective: The present study aimed to describe the prevalence of infection with *cagA*-positive *H. pylori* strains in a group of children and adolescents who underwent esophagogastroduodenoscopy (EGD) in Porto Alegre, a city in Southern Brazil. **Methods:**

Ninety-eight gastric biopsy specimens of children and adolescents were tested for presence of *H. pylori cagA*-positive strains by the polymerase chain reaction (PCR) method. **Results:**

The prevalence of *H. pylori cagA*-positive strains was 29.6% (IC95% from 18 to 43.6%). There were no statistically significant differences in clinical or demographic characteristics or in the endoscopic and histological features of patients infected with *cagA*-positive strains as compared with those infected by *cagA*-negative strains. **Conclusions:**

The study showed a low prevalence of infection with *cagA*-positive *H. pylori* strains among children and adolescents who underwent EGD in southern Brazil, in comparison to studies conducted with children from other regions of Brazil. There was no association between the presence of *cagA*-positive strains and more severe clinical presentations in the studied sample.

Key Words: *Helicobacter pylori*; *cagA*-positive strains; prevalence; Brazilian children.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Presença de *H. pylori* no epitélio gástrico

Figura 2: Sistema Sydney – divisão endoscópica

Figura 3: Aspecto da gastrite endoscópica nodular

Figura 4: Escala visual análoga, Sistema Sydney modificado

Figura 5: Representação esquemática dos locais de coleta dos fragmentos de biópsia gástrica conforme Sistema Sydney modificado

Figura 6: Resultado final da eletroforese em gel de agarose a 3% para pesquisa de *H. pylori* utilizando-se o *primer* 16S rRNA

Figura 7: Resultado final da eletroforese em gel de agarose a 2% para pesquisa de *H. pylori* utilizando-se o *primer ureA*

Figura 8: Resultado final da eletroforese em gel de agarose a 2% para pesquisa de cepas de *H. pylori cagA*-positivo

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Métodos para detecção da infecção por *H. pylori*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de cepas *cagA*-positivo em crianças no Brasil

Tabela 2: Prevalência da infecção por *H.pylori* em adultos no Brasil

Tabela 3: Prevalência da infecção por *H.pylori* em crianças no Brasil

LISTA DE SÍMBOLOS

HCl	ácido clorídrico
MgCl ₂	cloreto de magnésio
KCl	cloreto de potássio
CO ₂	dióxido de carbono
°C	grau Celsius
Tris	hidroximetilaminometano
=	igual
¹⁴ C	isótopo radioativo do elemento carbono com número de massa 14
¹³ C	isótopo não-radioativo do elemento carbono com número de massa 13
L	litro
>	maior que
≥	maior que ou igual
±	mais ou menos
®	marca registrada
<	menor que
≤	menor que ou igual
m	metro
μ	micro, 10 ⁻⁶
μL	microlitro
μm	micrometro
μmol	micromol
m	mili, 10 ⁻³
mmol	milimol

mol	mol
p	pico, 10^{-12}
pmol	picomol
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
UI	unidades internacionais

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE QUADROS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	12
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 BREVE HISTÓRICO	20
2.2 CARACTERÍSTICAS DO <i>H. PYLORI</i>	21
2.2.1 Características microbiológicas	21
2.2.2 Mecanismos de colonização	21
2.2.3 Características moleculares	23
2.2.4 Mecanismos patogênicos	24
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	24
2.3.1 A ilha de patogenicidade <i>cag</i>-PAI e o gene <i>cagA</i>	25
2.3.1.1 Importância clínica	26
2.3.1.2 Prevalência de cepas <i>cagA</i> -positivo	28
2.3.2 Outros fatores de virulência	29
2.4 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR <i>H. PYLORI</i>	30
2.4.1 Aspectos gerais	30
2.4.2 Transmissão e fatores de risco associados	31
2.4.3 Prevalência da infecção por <i>H. pylori</i>	33
2.4.4 Reinfecção	36
2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	37
2.5.1 Métodos invasivos	38
2.5.1.1 Histologia	38
2.5.1.2 Cultura	39
2.5.1.3 Teste da Urease	40
2.5.2 Métodos não(ou minimamente)-invasivos	40
2.5.2.1 Teste respiratório com ureia marcada	40
2.5.2.2 Pesquisa de antígeno nas fezes	42

2.5.2.3 Sorologia	42
2.5.3 Métodos moleculares	44
2.6 H. PYLORI E ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS	45
2.6.1 Gastrite	46
2.6.1.1 Classificação endoscópica	47
2.6.1.2 Classificação histológica	50
2.6.2 Úlceras gástrica e duodenal	53
2.6.3 Adenocarcinoma gástrico	54
2.6.4 Linfoma MALT gástrico	56
2.6.5 Outras doenças	56
3 JUSTIFICATIVA	58
4 OBJETIVOS	60
4.1 PRIMÁRIO	61
4.2 SECUNDÁRIOS	61
5 MÉTODO	62
5.1 DELINEAMENTO, LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	63
5.2 TAMANHO DA AMOSTRA	63
5.3 SELEÇÃO DOS PACIENTES	63
5.3.1 Critérios de inclusão	63
5.3.2 Critérios de exclusão	63
5.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	64
5.5 FLUXOGRAMA DO ESTUDO	64
5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	65
5.7 TESTE DA UREASE	65
5.8 ANÁLISE MOLECULAR	67
5.8.1 Extração de DNA	67
5.8.2 Detecção do <i>H. pylori</i> pelo método de PCR	68
5.8.3 Pesquisa do gene <i>cagA</i> pelo método de PCR	72
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
6 REFERÊNCIAS	76
7 ARTIGO	86
8 CONCLUSÕES	106
9 ANEXOS	108

*** 1. INTRODUÇÃO ***

A descoberta do *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e da sua associação com gastrite (WARREN, 1983), doença ulcerosa péptica (MARSHALL; WARREN, 1984) e adenocarcinoma gástrico (IARC, 1994), revolucionou o meio científico (KODAIRA et al., 2002; PAJARES; GISBERT, 2006). Muitos pesquisadores têm-se dedicado a entender o comportamento da infecção, o que pode ser evidenciado através dos milhares de artigos científicos publicados sobre esse assunto anualmente.

No entanto, ainda há muitas questões a serem respondidas sobre esse tema.

H.pylori é um patógeno com distribuição geográfica mundial (TALARICO et al., 2009), porém apresenta diferentes prevalências (FERREIRA et al., 1998; SOUTO et al., 1998; BENENSON et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005; CORTI, 2009; ESCOBAR-PARDO et al., 2011; KOLETZKO et al., 2011) e apresentações clínicas ao redor do mundo (BENENSON ET AL., 2002; HUSSEIN, 2010; YAMAOKA et al., 2010).

O espectro da infecção por *H. pylori* varia desde a ausência de sintomas até o desenvolvimento de doenças com elevada morbimortalidade (ATHERTON; BLASER, 2009), de modo que a presença do micro-organismo não necessariamente apresenta o mesmo impacto em todas as populações (ATHERTON; BLASER, 2009; PACIFICO et al., 2010; KOLETZKO et al., 2011).

As diferentes apresentações clínicas da infecção podem ser justificadas pela interação de fatores ambientais, fatores imunológicos e genéticos, próprios do hospedeiro, bem como pelos fatores de virulência da bactéria (ATHERTON, 1997).

O *H. pylori* apresenta grande diversidade genética (ATHERTON; BLASER, 2009). A presença de determinados genes no genoma bacteriano, como o gene *cagA*, implicam em maior virulência do micro-organismo, promovendo uma resposta inflamatória mais exuberante no hospedeiro, que resulta em maior dano tecidual e, por fim, em apresentação clínica mais grave (ATHERTON; BLASER, 2009).

O fato de a infecção ser adquirida predominantemente na infância e de o micro-organismo persistir na mucosa gástrica do hospedeiro por toda a vida (ATHERTON; BLASER, 2009; KOLETZKO et al., 2011), torna especialmente importante o entendimento do comportamento do *H. pylori* em populações pediátricas. Também, ressalta-se que crianças diferem dos adultos quanto à prevalência da infecção e quanto às complicações a ela relacionadas (TALARICO et al., 2009; KOLETZKO et al., 2011).

Atualmente, o grande desafio dos pesquisadores é o melhor entendimento da epidemiologia do *H. pylori*, o que permitirá o desenvolvimento de medidas que deverão alterar significativamente o perfil epidemiológico da infecção e o das doenças a ele relacionadas (KODAIRA et al., 2002).

*** 2. REVISÃO DA LITERATURA ***

2.1 BREVE HISTÓRICO

Datam do final do século XIX e do início do século XX os primeiros relatos da identificação de bactérias espiraladas em estômagos de animais e humanos (DUBOIS, 1995).

Espécies do gênero *Helicobacter* habitam o trato gastrointestinal de muitos mamíferos e pássaros, sendo que cada qual possui sua própria espécie de *Helicobacter* (DUBOIS, 1995; ATHERTON; BLASER, 2009).

H. pylori é a espécie de *Helicobacter* mais prevalente e estudada em seres humanos (CAMARGO et al., 2003). No entanto, outras bactérias do gênero *Helicobacter* também podem estar presentes no estômago de humanos (CAMARGO et al., 2003; VAN DEN BULCK et al., 2005).

Em termos históricos, Atherton e Blaser (2009) acreditam que o *H. pylori* seja parte da microbiota normal de humanos e que a evolução humana tenha ocorrido na sua presença.

Estudos envolvendo genética populacional sugerem que a infecção originou-se no continente africano oriental e que pode estar presente em humanos há 58.000 anos (LINZ et al., 2007).

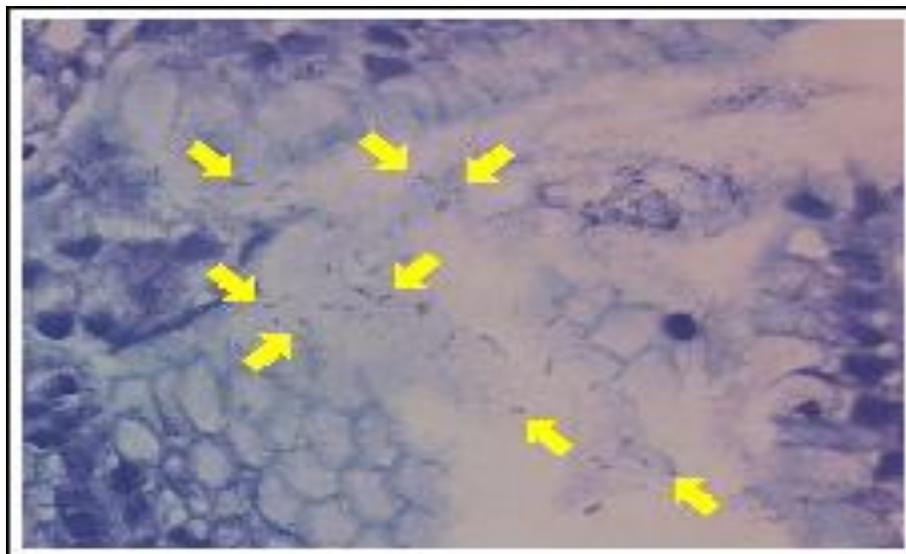
Em 1979, Warren observou pela primeira vez a presença de pequenos bacilos aderidos à superfície do epitélio gástrico em biópsias com gastrite crônica ativa (PAJARES; GISBERT, 2006). No entanto, somente em 1983, essa descoberta foi publicada e divulgada para o meio científico (WARREN, 1983).

Inicialmente, a bactéria foi classificada como *Campylobacter pylori*, membro da família *Campylobacter*, e, em 1989, passou então a pertencer ao gênero *Helicobacter*, por suas características morfológicas, bioquímicas e estruturais distintas (PAJARES; GISBERT, 2006).

2.2 CARACTERÍSTICAS DO *H. PYLORI*

2.2.1 Características microbiológicas

H. pylori é uma bactéria do gênero *Helicobacter*, espiralada, gram-negativa, em forma de bastonete curvo ou em “S”, com 3 a 5µm de comprimento e 0,5µm de largura, de crescimento lento (TOMB et al., 1997), que possui de 4 a 6 flagelos unipolares e que vive em condições microaeróbias (CARVALHO et al., 2003), vide Figura 1.



Fonte: Medicina Digital

Figura 1: Presença de *H. pylori* no epitélio gástrico (Giemsa, 400X).

2.2.2 Mecanismos de colonização

A bactéria coloniza essencialmente o epitélio gástrico (COVER; BLASER, 2009; YAMAOKA, 2010). Quando é observada em outros sítios que não o estômago, como no esôfago e no duodeno, localiza-se nas áreas de metaplasia gástrica ou nas áreas de mucosa gástrica ectópica (CARVALHO et al., 2003; COVER; BLASER, 2009). No estômago, tanto em crianças quanto em adultos, o antro é a região com maior concentração da bactéria (CARVALHO et al., 1991).

Costuma localizar-se dentro ou sob a camada de muco que recobre o epitélio gástrico, em íntimo contato com a superfície luminal da célula epitelial ou mesmo nos espaços intercelulares (COVACCI, 1999; CARVALHO et al., 2003).

Com a ajuda dos flagelos, que permitem uma locomoção helicoidal, o *H. pylori* penetra a barreira mucosa, atinge as proximidades do epitélio gástrico e adere ao epitélio por meio de adesinas (TOMB et al., 1997; COVACCI, 1999; ATHERTON; BLASER 2009). Essa localização, sob o muco, favorece a sua reprodução e atividade (CARVALHO et al., 2003) .

A adesão é um pré-requisito para a colonização pelo *H. pylori*, assim como para a indução de doença no hospedeiro (ATHERTON; BLASER, 2009). Bactérias que se mantêm firmemente aderidas ao epitélio ficam menos expostas à acidez gástrica e não são eliminadas pelos movimentos peristálticos (BITTENCOURT et al., 2006; COVER; BLASER, 2009).

Algumas cepas de *H. pylori* aderem melhor à mucosa gástrica que outras (ATHERTON; BLASER, 2009). A adesina mais intimamente e consistentemente associada com doença é *blood group antigen-binding adhesin A (babA)* (ATHERTON; BLASER, 2009). Ela reconhece epítomos do grupo sanguíneo Lewis nas células epiteliais gástricas, induzindo uma atividade inflamatória mais intensa no hospedeiro (ATHERTON; BLASER, 2009). Sua presença está associada ao câncer gástrico e à úlcera duodenal (BITTENCOURT et al., 2006; ATHERTON; BLASER, 2009). A aderência da bactéria à mucosa gástrica é também mediada pela proteína *sialic acid-binding adhesin A (SabA)*, que se liga a resíduos glicoconjugados de ácido siálico, que são induzidos pela infecção pelo *H. pylori*, contribuindo para sua persistência (BITTENCOURT et al., 2006).

Urease pré-formada corresponde a 15% do conteúdo proteico citoplasmático do *H. pylori* (ATHERTON; BLASER, 2009). Quando o pH externo é menor que 6.5, um canal específico da membrana citoplasmática bacteriana se abre permitindo o ingresso de ureia (ATHERTON; BLASER, 2009). A urease bacteriana hidrolisa a ureia em amônia e dióxido

de carbono (CO₂), neutralizando o periplasma, permitindo a manutenção do potencial de membrana periplasmático e, conseqüentemente, sua sobrevivência em meio ácido (TOMB et al., 1997; COVACCI, 1999; CARVALHO et al., 2003; ATHERTON; BLASER, 2009).

2.2.3 Características moleculares

O genoma completo da bactéria foi sequenciado em 1997 (TOMB et al., 1997). A bactéria consiste em um cromossomo circular composto por 1.667.867 pares de base (pb), que representa cerca 1600 genes os quais codificam diferentes proteínas (TOMB et al., 1997).

H. pylori apresenta grande diversidade genética, porém uma alta similaridade entre as diferentes cepas é mantida (COVACCI, 1999; ATHERTON; BLASER, 2009; TALARICO et al., 2009).

A diversidade genética pode ser gerada através de mutações pontuais e de recombinação inter ou intragenômica (ATHERTON, 2000; ATHERTON; BLASER, 2009). Essa característica confere à bactéria habilidade de interagir com o hospedeiro de modo a permitir condições favoráveis à sua persistência no epitélio gástrico (ATHERTON; BLASER, 2009).

A diversidade genética do *H. pylori* se expressa por variações na prevalência de determinadas cepas nas diferentes regiões do mundo (HUSSEIN, 2010). A variação genética entre as diferentes cepas pode repercutir diretamente na virulência do organismo, na intensidade de resposta inflamatória observada no hospedeiro e, conseqüentemente, no tipo de desfecho clínico apresentado (CARVALHO et al., 2003).

H. pylori isolado de um mesmo paciente, com um intervalo de vários anos, demonstra impressões de ácido desoxirribonucleico (DNA) semelhantes (COVACCI, 1999). No entanto, apesar dessas impressões se manterem semelhantes, uma contínua evolução ocorre no estômago da pessoa infectada em função de vários fatores, entre os quais destacam-se:

mutações de nucleotídeos, exclusão de partes do material genético, combinação com DNA de cepas adquiridas posteriormente mas que não estabeleceram infecção crônica e transferência horizontal de novos genes (COVACCI, 1999). Como consequência, bactérias isoladas de adultos, embora apresentem impressão genética similar àquela adquirida na infância, têm uma variabilidade genética acumulada (COVACCI, 1999).

Cepas isoladas de crianças tendem a apresentar um menor percentual de perda de material genético quando comparadas a isolados de adultos (TALARICO et al., 2009). É possível que, quanto mais intacto o material genético, mais facilidade a bactéria encontre para colonizar o hospedeiro (TALARICO et al., 2009).

2.2.4 Mecanismos patogênicos

Conforme acima mencionado, a presença de flagelos, de adesinas e de urease pré-formada são alguns dos mecanismos utilizados pelo *H. pylori* para se estabelecer na mucosa gástrica (CARVALHO et al., 2003; ATHERTON; BLASER, 2009). Tais mecanismos estimulam uma resposta inflamatória do hospedeiro de intensidade variável, dependente da interação entre o tipo de cepa de *H.pylori* predominante no indivíduo (virulência da bactéria), com fatores imunológicos próprios do hospedeiro e com fatores ambientais (CARVALHO et al., 2003).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Diversos fatores de virulência do *H. pylori* são reconhecidos como associados a um maior potencial de patogenicidade da bactéria e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de doenças graves ligadas à infecção.

2.3.1 A ilha de patogenicidade *cag*-PAI e o gene *cagA*

A ilha de patogenicidade *cytotoxin-associated gene* (*cag*-PAI) é composta por um conjunto de genes responsável por codificar cerca de 40 proteínas com funções diversas (CARVALHO et al., 2003; BITTENCOURT et al., 2006).

A presença ou ausência da ilha de patogenicidade *cag*-PAI é o maior determinante na diferença genética entre os isolados de *H. pylori* associados com doenças (COVACCI, 1999; HSU et al., 2002).

Cytotoxin-associated gene A (*cagA*), por sua vez, é um dos genes da ilha *cag*-PAI, sendo um dos marcadores da sua presença (ATHERTON, 1997; TOMB et al., 1997; COVACCI, 1999; HSU et al., 2002).

O gene *cagA* codifica a proteína *CagA*, um dos fatores de virulência mais estudados do *H. pylori*, por sua conhecida imunogenicidade (ATHERTON, 2000; RICK et al., 2010; YAMAOKA, 2010).

A proteína *CagA* induz a secreção de citocinas inflamatórias do hospedeiro, especialmente a interleucina-8 (IL-8) (ATHERTON, 2000; CARVALHO et al., 2003). A IL-8 é um potente fator quimiotático e ativador de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, o que pode contribuir para uma resposta inflamatória mais acentuada nos pacientes colonizados por cepas *cagA*-positivas (ATHERTON, 2000; BITTENCOURT et al., 2006). Ela também induz a expressão de proto-oncogenes (COVACCI, 1999).

Os isolados de *H. pylori* podem ser classificados como produtores da proteína *CagA* (*cagA*-positivos) ou não produtores da proteína (*cagA*-negativos) (YAMAOKA, 2010).

A estrutura do gene *cagA* revela uma região 5' que é altamente conservada e uma região 3' que apresenta uma porção variável de repetições de sequências de aminoácidos (YAMAOKA et al., 1998; ROTA et al., 2001). Variações no número dessas repetições podem

ser uma forma de a bactéria se proteger da resposta imune do hospedeiro (YAMAOKA et al., 1998).

Estudos com isolados de *H.pylori* procedentes de diferentes regiões geográficas demonstram que a proteína *CagA* apresenta pesos moleculares distintos, como consequência de diferenças na sequência de repetições de aminoácidos na região 3' do gene *cagA* (JONES et al., 2009; HUSSEIN, 2010). As cepas *cagA*-positivas de países ocidentais e de países do leste da Ásia apresentam diferenças moleculares, de modo que *primers* desenvolvidos para pesquisa desse gene em isolados de países ocidentais podem falhar em encontrá-lo em isolados de *H. pylori* oriundos de países do leste da Ásia e vice-versa (ROTA et al., 2001). Acredita-se que a diferença no número dessas repetições possa influenciar na apresentação clínica da infecção (JONES et al., 2009; YAMAOKA et al., 2010).

Estudos têm demonstrado uma menor prevalência de *cagA* positividade em crianças em relação a adultos e um aumento dessa com a idade (QUEIROZ et al., 2000; TALARICO et al., 2009).

2.3.1.1 Importância Clínica do *CagA*

A presença de cepas *cagA*-positivo não é, necessariamente, um preditor da apresentação clínica da infecção por *H. pylori* (HSU et al., 2002; HUSSEIN, 2010; RICK et al., 2010).

Nem todas as cepas *cagA*-positivo expressam a proteína *CagA*, a qual seria o indutor final da resposta inflamatória (JONES et al., 2009; RICK et al., 2010; YAMAOKA, 2010).

Estudos realizados no Japão, Coreia do Sul e China demonstraram que mais de 90% das cepas de *H. pylori* são *cagA*-positivas, independente da apresentação clínica (YAMAOKA et al., 1998).

Em modelos animais, cepas *cagA*-positivo induzem dano gástrico visível enquanto cepas *cagA*-negativo lembram mais o comportamento de bactérias comensais do que de patógenos (ATHERTON, 1997; COVACCI, 1999).

Já em humanos, a associação entre a presença de cepas *cagA*-positivo com desenvolvimento de úlcera duodenal e câncer gástrico é ainda controversa, com vários estudos não conseguindo demonstrar essa relação (KATO et al., 2000; BENENSON et al., 2002; WILSCHANSKI et al., 2007; MOHAMED et al., 2009; SGOURAS et al., 2009; HUSSEIN, 2010).

Vários estudos demonstram que a presença desse gene parece induzir uma gastrite histológica mais pronunciada no hospedeiro (BARBOSA et al., 1989; QUEIROZ et al., 2000; DZIERZANOWSKA-FANGRAT et al., 2002; LUZZA et al., 2002; ALVARES et al., 2006; GATTI et al., 2006). A presença dessas cepas também parece estar associada a uma colonização com maior densidade bacteriana (DZIERZANOWSKA-FANGRAT et al., 2002).

No Brasil, estudos demonstraram uma prevalência de *cagA* positividade, significativamente maior, com valores acima de 90%, entre crianças com úlcera duodenal, sugerindo uma associação entre a presença dessa cepa e o desenvolvimento dessa condição (QUEIROZ et al., 2000; ASHOUR et al., 2002).

No Rio Grande do Sul, a prevalência de cepas *cagA*-positivo em adultos variou de 65 a 71% (ROTA et al., 2001; RAMIS et al., 2010). Também se demonstrou uma prevalência significativamente superior (de 87%) de *cagA* positividade entre adultos com úlcera duodenal (ROTA et al., 2001).

Câncer gástrico também tem sido associado à colonização por essas cepas no Brasil e no Rio Grande do Sul (QUEIROZ et al., 1998; MEINE et al., 2011).

Recentemente tem-se discutido, em vários estudos, a possibilidade de associação inversa entre a colonização por cepas *cagA*-positivo e o desenvolvimento de certas doenças,

como a doença do refluxo gastresofágico (PEREIRA-LIMA et al., 2004) e certas doenças alérgicas, levantando-se a hipótese de que a colonização por essas cepas, especificamente, seria um fator protetor, reduzindo o risco para esses desfechos (PEREIRA-LIMA et al., 2004; COVER; BLASER, 2009; MALFERTHEINER; SELGRAD, 2010).

2.3.1.2 Prevalência de cepas *cagA*-positivo

A prevalência de cepas *cagA*-positivo descrita varia de 25,5 a 95% em diferentes populações mundiais (KARHUKORPI et al., 2000; KATO et al., 2000; CATALANO et al., 2001; BENENSON et al., 2002; BRAVO et al., 2002; LUZZA et al., 2002; CON et al., 2007; MATTANA et al., 2007; MOHAMED et al., 2009; HUSSEIN, 2010; YAMAOKA et al., 2010).

A prevalência descrita dessas cepas em adultos no Brasil varia de 40,5 a 95% (QUEIROZ et al., 1998; ROTA et al., 2001; LEITE et al., 2005; ALAVARES et al., 2006; THOMAZINI et al., 2006; CARTÁGENES et al., 2009; RAMIS et al., 2010).

Em crianças brasileiras a prevalência de cepas *cagA*-positivo varia de 67-78% (QUEIROZ et al., 2000; ASHOUR et al., 2002; GATTI et al., 2006; CARTÁGENES et al., 2009) – vide Tabela 1.

Tabela 1: Prevalência de cepas *cagA*-positivo em crianças no Brasil

Autor, ano	Local do Estudo	Prevalência n /total (%)	Apresentação Clínica e <i>cagA</i> positividade
QUEIROZ et al., 2000	Belo Horizonte, MG	60 /80 (75)	Úlcera duodenal 100% <i>cagA</i> -positivos
ASHOUR et al., 2002	Belo Horizonte, MG	38 / 55 (69)	Úlcera duodenal 94,7% <i>cagA</i> -positivos
GATTI et al., 2006	Marília, SP	38 /57 (67)	Gastrite crônica 69% <i>cagA</i> -positivos
CARTÁGENES et al., 2009	Belém, PA	39 /50 (78)	Não descrito

% = percentual; n/total = frequência observada/total de observações.

2.3.2 Outros fatores de virulência

- *Vacuolating cytotoxin A (vacA)*: está presente em todas as amostras de *H. pylori*, codifica a proteína *VacA*, uma exotoxina capaz de induzir diretamente a formação de vacúolos intracitoplasmáticos e apoptose das células epiteliais. A toxina aumenta também a permeabilidade epitelial, o que pode facilitar tanto a passagem de substâncias tóxicas para dentro do epitélio como a difusão de nutrientes para a camada mucosa, favorecendo a sobrevivência do *H. pylori* (BITTENCOURT et al., 2006). Apresenta duas famílias de sequências sinalizadoras, denominadas *s1* e *s2*, com as variações *s1a*, *s1b* e *s1c*, bem como dois alelos localizados na região média do gene, *m1* e *m2* (BITTENCOURT et al., 2006). As amostras de *H.pylori vacA* tipo *s1* são consideradas as mais virulentas, sendo mais frequentemente observadas nos pacientes com úlcera péptica e câncer gástrico (ATHERTON, 1997; DE GUSMÃO et al., 2000).
- *Induced by contact with epithelium gene A (iceA)*: associa-se com maior risco de úlcera péptica (ATHERTON, 1997). No entanto, esses achados não foram confirmados em crianças e adultos brasileiros (ASHOUR et al., 2001).

- *Duodenal ulcer promoting gene A (dupA)*: é localizado na região do genoma bacteriano que codifica proteínas de superfície e alguns autores mostraram associação com úlcera duodenal em adultos (BITTENCOURT et al., 2006).

2.4 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *H. PYLORI*

2.4.1 Aspectos Gerais

A infecção pelo *H. pylori* apresenta distribuição geográfica universal (CARVALHO et al., 2003). Na grande maioria das vezes, a aquisição ocorre na infância (KOLETZKO et al., 2011), com igual frequência em ambos gêneros (MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006). Em geral tende a persistir por toda a vida do hospedeiro (COVACCI, 1999; ATHERTON; BLASER, 2009).

Observa-se que, na infância, ocorre rápido aumento da taxa de prevalência da infecção (HUSSEIN, 2010), particularmente nos cinco primeiros anos de vida (ROCHA et al., 2003). Já em indivíduos com idade superior a 60 anos, a curva de prevalência tende a atingir um patamar ou entrar em leve declínio (KODAIRA et al., 2002; ROCHA et al., 2003). A queda na imunidade geral e a diminuição da densidade bacteriana, como consequência da atrofia da mucosa gástrica, são possíveis explicações para essa diminuição de prevalência observada em idosos (KODAIRA et al., 2002; ROCHA et al., 2003).

O perfil da curva de prevalência da infecção pelo *H. pylori* em relação à idade se mantém constante, independentemente do grau de desenvolvimento do país (KODAIRA et al., 2002). Entretanto, nos países em desenvolvimento, a prevalência da infecção é mais alta em todas as faixas etárias (KODAIRA et al., 2002).

Estudos epidemiológicos com indivíduos assintomáticos demonstram que, com frequência, a prevalência da infecção difere entre subgrupos populacionais que convivem em uma mesma área após ajustes de idade e de condições socioeconômicas (MOHAMED et al.,

2009; HUSSEIN, 2010; YAMAOKA et al., 2010). Acredita-se que essa diferença possa ser justificada pela combinação de fatores genéticos, ambientais, socioeconômicos e culturais (KODAIRA et al., 2002).

2.4.2 Transmissão e fatores de risco associados

A rota de transmissão da infecção por *H. pylori* ainda não está totalmente elucidada (AKCAN et al., 2000; SCHWARZ et al., 2008; DRUMM; ROWLAND, 2011).

Por tratar-se de um micro-organismo não-invasivo, a bactéria só consegue alcançar a mucosa gástrica através da boca (KODAIRA et al., 2002). É frágil em condições laboratoriais, sugerindo uma viabilidade limitada fora do hospedeiro (KODAIRA et al., 2002).

A dose mínima infectante para aquisição do micro-organismo é desconhecida (KODAIRA et al., 2002). Em adultos, foi descrita infecção com a ingestão voluntária de 3×10^5 organismos (KODAIRA et al., 2002). No entanto, a ocorrência de infecção pelo *H. pylori*, após a realização de procedimentos endoscópicos com equipamentos indevidamente esterilizados, sugere que uma dose do agente muito menor do que a descrita possa ser capaz de estabelecer a infecção (KODAIRA et al., 2002; CARVALHO et al., 2003).

Acredita-se que o *H. pylori* possa contaminar humanos através das fezes, saliva ou vômito (ESCOBAR; KAWAKAMI, 2004) e que a sua transmissão possa ocorrer de pessoa-a-pessoa pela via fecal-oral e/ou oral-oral (AKCAN et al., 2000).

A presença de cepas de *H. pylori* com impressão genética semelhante em grupamentos familiares sugere que a família seja a unidade central da infecção e que essa ocorra de uma pessoa para outra ou através de uma fonte comum de exposição (COVACCI, 1999; AKCAN et al., 2000; ESCOBAR; KAWAKAMI, 2004; MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006; SCHWARZ et al., 2008; DRUMM; ROWLAND, 2011).

A presença de mães e de irmãos infectados parecem ser fatores de risco independentes para a aquisição da infecção (ROCHA et al., 2003; ESCOBAR; KAWAKAMI, 2004; MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006). Acredita-se que o contato íntimo através de beijos, de oferta de alimentos, de compartilhamento de utensílios etc., possa favorecer a transmissão intrafamiliar da bactéria (KODAIRA et al., 2002).

Água contaminada tem sido descrita como um possível vetor de transmissão do *H. pylori* (MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006).

A presença de *H. pylori* nas fezes confirma que essa seja uma possível via de transmissão desse agente (KODAIRA et al., 2002). A associação entre a infecção por *H. pylori* e a infecção por outros micro-organismos com já reconhecida via de transmissão fecal-oral também sustenta essa hipótese (MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006; ESCOBAR-PARDO et al., 2011).

Transmissão através de fezes pode ocorrer devido a hábitos de higiene inadequados e à falta de saneamento básico (KODAIRA et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2006).

H. pylori foi identificado na placa dental e saliva, sugerindo que a infecção possa estar correlacionada com a sua presença na boca e reforçando a hipótese de transmissão oral-oral (ASSUMPCÃO et al., 2010; SILVA et al., 2010). Acredita-se que a regurgitação do conteúdo gástrico até a cavidade oral seja a rota utilizada pela bactéria para contaminar a boca (KODAIRA et al., 2002; ASSUMPCÃO et al., 2010).

Os dados são controversos em demonstrar um maior risco ocupacional de adquirir a infecção pelo *H. pylori* entre trabalhadores de unidades de endoscopia (MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006).

Estudos apontam que o maior fator preditivo para infecção por *H. pylori* é a condição socioeconômica do indivíduo, particularmente durante a infância (KODAIRA et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2006). Baixa renda familiar, baixo nível de escolaridade

(especialmente da mãe), aglomeração humana e institucionalização são alguns dos fatores de risco associados à essa condição descritos na literatura (STAAT et al., 1996; KODAIRA et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2006; MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006).

Por outro lado, a prevalência da infecção parece ser menor em crianças amamentadas por mães infectadas pelo *H. pylori*, sugerindo que a amamentação possa ser um fator de proteção para a aquisição da bactéria, embora os resultados acerca dessa associação ainda sejam controversos (CARVALHO et al., 2003; MAGALHAES QUEIROZ; LUZZA, 2006).

2.4.3 Prevalência da infecção por *H. pylori*

Estima-se que a prevalência média global de infecção por *H. pylori* seja de 50%. A infecção é, significativamente, menos prevalente na Europa e América do Norte, em comparação com América Latina, Ásia e África (BRAVO et al., 2002; CARVALHO et al., 2003; CORTI, 2009).

De um modo geral, tem-se observado uma diminuição dessa prevalência em diversas partes do mundo (OONA et al., 2004; ROTHENBACHER et al., 2004; ATHERTON; BLASER, 2009; KINDERMANN; LOPES, 2009; JANJETIC et al., 2011; KOLETZKO et al., 2011). Em certas populações pediátricas, a prevalência da infecção chega a ser abaixo de 10% (KOLETZKO et al., 2011). Tais achados também se confirmam em crianças brasileiras, nas quais se verificou uma redução na prevalência da infecção por *H. pylori* de 48,2% no período de 1993-96 para 27,7% no período de 2000-02 (KAWAKAMI et al., 2008).

No Brasil, estudos demonstram uma prevalência em adultos que varia de 31,4 a 83,3% (SOUTO et al., 1998; MELO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005; SANTOS et al., 2005; ITO et al., 2006; ZATERKA et al., 2007) – vide Tabela 2.

Tabela 2: Prevalência da infecção por *H.pylori* em adultos no Brasil

Autor, ano	Local do Estudo	Prevalência n/total (%)
MELO et al., 2003	Recife, PE	127/405 (31,4)
ITO et al., 2006	São Paulo, SP	406/1037 (39,2)
SANTOS et al., 2005	Pelotas, RS	230/363 (63,4)
ZATERKA et al., 2007	São Paulo, SP	652/993 (65,6)
RODRIGUES et al., 2005	Belo Horizonte, MG	165/204 (80)
SOUTO et al., 1998	Zona Rural, MT	170/204 (83,3)

%=percentual

A real prevalência da infecção por *H. pylori* em crianças brasileiras não está estabelecida. Estudos demonstram uma prevalência em crianças que varia de 22% a 77,5% (OLIVEIRA et al., 1994; FERREIRA et al., 1998; SOUTO et al., 1998; SOUSA et al., 2001; BAHU et al., 2003; MORAES; SILVA, 2003; RODRIGUES et al., 2005; GATTI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; SOUZA et al., 2008; CARTÁGENES et al., 2009; DATTOLI et al., 2010; MIRANDA et al., 2010; ESCOBAR-PARDO et al., 2011) – vide Tabela 3.

Tabela 3: Prevalência da infecção por *H.pylori* em crianças no Brasil

Autor, ano	Local do Estudo	Prevalência n/total (%)	Idade (média)	Método Diagnóstico
FERREIRA et al., 1998	Porto Alegre, RS	29/130 (22)	0-18 anos	Histologia
SOUSA et al., 2001	Porto Alegre, RS	45/181 (24,8)	(7,4 anos)	Histologia
BAHU et al., 2003	Porto Alegre, RS	50/185 (27)	1-12 anos	Histologia
DATTOLI et al., 2010	Salvador, BA	316/1104 (28,7)	4-11 anos	Pesquisa de anticorpos IgG pelo método ELISA
MORAES; SILVA, 2003	Recife, PE	73/228 (32)	2-10 anos	Pesquisa de anticorpos IgG pelo método ELISA
OLIVEIRA et al., 1994	Belo Horizonte, MG	85/249 (34,1)	0-18 anos	Pesquisa de anticorpos IgG pelo método de imunofluorescência indireta
MIRANDA et al., 2010	São Paulo, SP	116 /326 (35,6)	2-10 anos	Pesquisa de anticorpos IgG pelo método ELISA
RODRIGUES et al., 2007	Porto Velho, RO	75/200 (37,5)	2-13 anos	Pesquisa de anticorpos IgG pelo método ELISA
GATTI et al., 2006	Marília, SP	57/121 (47)	1-16 anos	Histologia, PCR
CARTÁGENES et al., 2009	Belém, PA	43/79 (54,4)	1-12 anos	Pesquisa de antígenos fecais
SOUZA et al., 2008	Aracaju, SE	9/15 (60)	1-15 anos	Histologia
RODRIGUES et al., 2005b	Fortaleza, CE	88/120 (73,3)	11-20 anos	Teste respiratório com ureia marcada com ¹³ C + Pesquisa de anticorpos IgG pelo método ELISA*
ESCOBAR-PARDO et al., 2011	Xingu, MT	180/245 (73,5)	2-9 anos	Teste respiratório com ureia marcada com ¹³ C
SOUTO et al., 1998	Zona Rural, MT	31/40 (77,5)	10-19 anos	Pesquisa de anticorpos IgG pelo método ELISA

% = percentual; n/total = frequência observada/total de observações; IgG = imunoglobulina G; ELISA = ensaio imunoenzimático; PCR = reação em cadeia da polimerase; ¹³C = carbono (isótopo não-radioativo).

*Teste respiratório utilizado para indivíduos abaixo de 14 anos e pesquisa de anticorpos para indivíduos acima de 14 anos.

Observa-se uma grande heterogeneidade dos estudos brasileiros no que se refere à diversidade de métodos diagnósticos empregados bem como às diferentes faixas etárias e níveis socioeconômicos das amostras estudadas.

A maioria desses estudos incluiu pacientes sem sintomas gastrointestinais referidos (OLIVEIRA et al., 1994; SOUTO et al., 1998; MORAES; SILVA, 2003; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2007; CARTÁGENES et al., 2009; DATTOLI et al., 2010; MIRANDA et al., 2010; ESCOBAR-PARDO et al., 2011).

2.4.4 Reinfecção

A reinfecção por *H. pylori* pode ocorrer mesmo após erradicação bem sucedida, pois a resposta imunológica gerada durante a infecção, apesar de intensa, não protege o hospedeiro contra infecções subsequentes (XIAH et al., 1997; KODAIRA et al., 2002). Estudos clínicos e moleculares indicam que a recrudescência da infecção primária e a transmissão iatrogênica podem ser as responsáveis por grande parte dos casos de soroconversão pós-tratamento observados (KODAIRA et al., 2002).

Na maioria das vezes, a reinfecção é observada dentro de 12 meses após o término do tratamento (XIAH et al., 1997) e é mais frequente em crianças, especialmente abaixo dos 5 anos de idade (MAGISTA et al., 2005).

As taxas de reinfecção apresentam ampla variação ao redor do mundo (KODAIRA et al., 2002). Quanto mais alta a prevalência da infecção, maior o risco de reinfecção (MAGISTA et al., 2005).

Infecções por outras cepas de *H. pylori* após a primeira infecção são raras (COVACCI, 1999).

2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Há diversos métodos disponíveis para o diagnóstico da infecção por *H. pylori* (MONTEIRO et al., 2009; KOLETZKO et al., 2011).

Tradicionalmente, eles são classificados de acordo com a necessidade de realização de esofagogastroduodenoscopia (EGD) e de biópsia gástrica em invasivos e em não(ou minimamente)-invasivos (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). Os métodos moleculares utilizam materiais que podem ser obtidos de origens diversas (biópsia gástrica, fezes, saliva), podendo ser classificados tanto como invasivos quanto como não(ou minimamente)-invasivos, conforme a forma de obtenção do material utilizado para a análise (MONTEIRO et al., 2009) – Quadro 1.

<ul style="list-style-type: none">• Métodos Invasivos Histologia Cultura Teste da Urease• Métodos Não(ou minimamente)-Invasivos Teste Respiratório com Ureia Marcada Pesquisa de Antígenos Fecais Sorologia• Métodos Moleculares

Quadro 1: Métodos para detecção da infecção por *H. pylori*

Todos os testes diagnósticos podem ser realizados em crianças (KOLETZKO et al., 2011). Entretanto, testes que necessitam de cooperação dos pacientes, como o teste respiratório com ureia marcada, são mais difíceis de serem realizados, especialmente, em crianças pequenas (KOLETZKO et al., 2011).

Na população pediátrica, é fundamental considerar-se a idade da criança a ser testada na escolha do método diagnóstico a ser empregado, pois essa pode influenciar na acurácia de certos métodos (KOLETZKO et al., 2011). Há falta de estudos em crianças abaixo de 5-6 anos de idade tornando a acurácia dos testes diagnósticos nessa faixa etária incerta (VERES; PEHLIVANOGLU, 2007)

A distribuição irregular da bactéria no estômago e a baixa colonização bacteriana podem contribuir para erros de amostragem observados nos testes invasivos (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007).

Já os testes não(ou minimamente)-invasivos apresentam a necessidade de validação na população a ser estudada antes de serem utilizados (BITTENCOURT et al., 2006).

O uso de antibióticos e/ou de inibidores de bomba de prótons (IBP) pode causar resultados falso-negativos nos testes por reduzirem a densidade bacteriana (KOLETZKO et al., 2011). Portanto, é recomendado que os testes sejam realizados por, no mínimo, quatro semanas após o término do tratamento antimicrobiano e duas semanas após a interrupção do uso de IBP (KOLETZKO et al., 2011).

Nenhum método é isoladamente confiável para o diagnóstico da infecção por *H. pylori* (KOLETZKO et al., 2011). A cultura é o único método 100% específico, porém apresenta uma baixa sensibilidade (KOLETZKO et al., 2011). Por essa razão, as sociedades europeia e norte-americana de gastroenterologia, hepatologia e nutrição pediátrica recomendam, no último consenso, que haja concordância do resultado de, pelo menos, dois testes para definir um adequado status da infecção (KOLETZKO et al., 2011).

2.5.1 Métodos invasivos

2.5.1.1 Histologia

A histologia foi o primeiro método descrito na literatura a identificar a presença da infecção por *H. pylori* em humanos (WARREN, 1983).

É o único exame que permite a identificação da infecção bem como a presença das lesões histológicas associadas a essa condição (GUARNER et al., 2010).

Apresenta elevada sensibilidade (93,1% - IC95% 82,2 a 97,5) (OGATA et al., 2001), mas essa é dependente da localização dos fragmentos de biópsia coletados e da quantidade de fragmentos e do número de secções de biópsia analisados (MORRIS et al., 1989; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). A acurácia desse método também é dependente da experiência do patologista (BITTENCOURT et al., 2006).

São consideradas limitações específicas desse método a subjetividade da avaliação e a variabilidade na descrição dos achados interobservador (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007).

Recomenda-se que, no mínimo, dois fragmentos de biópsia do corpo e dois do antro sejam realizados para análise histológica, corados por hematoxilina-eosina e analisados de acordo com o Sistema de Sidney modificado (DIXON et al., 1996; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007; KOLETZKO et al., 2011). As colorações especiais (Warthin-Starry, Giemsa, Prata e imunohistoquímica) podem melhorar a detecção da bactéria (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007; KOLETZKO et al., 2011).

2.5.1.2 Cultura

É o único método considerado 100% específico (KOLETZKO et al., 2011). Uma cultura positiva para *H. pylori*, a despeito do resultado de outros métodos empregados, pode ser considerada suficiente para definir o status da infecção, porém a sensibilidade deste método é baixa (KOLETZKO et al., 2011).

A baixa sensibilidade do teste pode ser atribuída à dificuldade de execução do método em função do crescimento lento da bactéria e de peculiaridades acerca das condições ideais para o meio de cultura (MONTEIRO et al., 2009).

Além do diagnóstico da infecção, a cultura permite, também, o estudo de fatores de virulência da bactéria e da suscetibilidade aos antimicrobianos (BITTENCOURT et al., 2006).

2.5.1.3 Teste da Urease

O teste da urease é um método que se utiliza da capacidade do *H. pylori* de hidrolisar a ureia em amônia e CO₂ (ROTA, 2006). Diversas soluções comerciais são disponíveis (ROTA, 2006). Elas contêm, em geral, ureia e um marcador de pH, que muda de cor, de amarelo para rosa, por elevação do pH, quando a urease bacteriana está presente (ROTA, 2006). O resultado do teste pode ser obtido de 1 até 24 horas, dependendo do *kit* comercial utilizado (ROTA, 2006).

Apresenta sensibilidade entre 86-97% e especificidade entre 86-98% (ROTA, 2006). Como a densidade bacteriana é menor em crianças, recomenda-se que, no mínimo, dois fragmentos de mucosa gástrica sejam avaliados, um do corpo e um do antro (BITTENCOURT et al., 2006).

É um teste de baixo custo e de fácil execução (ROTA, 2006).

2.5.2 Métodos não(ou minimamente)-invasivos

2.5.2.1 Teste respiratório com ureia marcada

O teste respiratório com ureia marcada com carbono detecta a produção de ureia gerada pela ação da urease bacteriana (ROTA, 2006). Pode ser realizado utilizando-se o isótopo radioativo do carbono (¹⁴C) ou o isótopo não-radioativo (¹³C), sendo esse último o mais usado na atualidade (ROTA, 2006; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). Quando um

paciente infectado pelo *H. pylori* ingere a ureia marcada com ^{14}C ou ^{13}C , o CO_2 resultante da hidrólise bacteriana é absorvido na corrente sanguínea, capturado na exalação e, posteriormente, medido (ROTA, 2006; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). Três métodos podem ser utilizados para a medida do CO_2 marcado no ar expirado: espectrometria de massa, espectroscopia por infravermelho e análise assistida a laser (KAWAKAMI et al., 2002).

Estudos em crianças com idade superior a 6 anos demonstram que o teste respiratório com ureia marcada, independente do método de medição empregado, apresenta sensibilidade superior a 95% para o diagnóstico da infecção (KAWAKAMI et al., 2002; MACHADO et al., 2004; KINDERMANN; LOPES, 2009). A especificidade desse método é igualmente elevada nessa população (KAWAKAMI et al., 2002; MACHADO et al., 2004; KINDERMANN; LOPES, 2009).

Os resultados do teste podem ser influenciados pela quantidade e apresentação do substrato (se em cápsula ou em pó), pelo recipiente utilizado para o armazenamento do ar exalado, pelo método utilizado para medição do CO_2 marcado, pelo tempo de permanência do substrato no estômago, pela área de contato entre a urease bacteriana e o substrato, pela presença de algum inibidor de urease e pela densidade de *H. pylori* presente (KAWAKAMI et al., 2002).

É considerado o método de escolha para a avaliação da resposta ao tratamento da infecção, tanto em adultos quanto em crianças (BITTENCOURT et al., 2006). Também tem sido bastante utilizado em estudos epidemiológicos (MACHADO et al., 2004).

A aplicabilidade desse teste para crianças com idade inferior a 6 anos ainda é controversa visto que, comparando-se os resultados obtidos com crianças maiores, nessa faixa etária, a sensibilidade e a especificidade do teste apresenta valores mais baixos (KAWAKAMI et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2006).

2.5.2.2 Pesquisa de antígeno nas fezes

A detecção de antígenos de *H. pylori* em amostras de fezes pode ser realizada pelos métodos imunoenzimático ou imunocromatográfico (BITTENCOURT et al., 2006). O método imunoenzimático é quantitativo e emprega anticorpos mono ou policlonais (BITTENCOURT et al., 2006; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). Os testes imunocromatográficos foram lançados no comércio recentemente e parecem apresentar sensibilidade e especificidade semelhantes aos testes imunoenzimáticos (BITTENCOURT et al., 2006).

O teste empregando anticorpos monoclonais é o mais utilizado para o diagnóstico da infecção (KINDERMANN; LOPES, 2009). Apresenta valores de sensibilidade e especificidade elevados (em torno de 95%) (BITTENCOURT et al., 2006). No entanto, a sensibilidade do teste pode ser menor em crianças com idade abaixo de 6 anos (BITTENCOURT et al., 2006).

A principal utilidade desse teste é avaliar se houve erradicação da bactéria após o término do tratamento (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). Também pode ser empregado em estudos epidemiológicos (BITTENCOURT et al., 2006).

2.5.2.3 Sorologia

A infecção pelo *H. pylori* induz uma resposta imunológica celular e humoral no hospedeiro que resulta na produção de anticorpos anti-*H. pylori* das classes imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) (BITTENCOURT et al., 2006). Os anticorpos específicos das classes IgA e IgG atingem níveis sanguíneos detectáveis, aproximadamente, de 3 semanas a 3 meses depois da aquisição da infecção e podem permanecer elevados por até cerca de 2 anos após a erradicação da bactéria (BITTENCOURT et al., 2006). Já os anticorpos da classe IgM podem ser detectados mais precocemente (BITTENCOURT et al., 2006).

Existem várias preparações de antígenos disponíveis, incluindo antígenos de superfície ou secretores, subunidades da urease, catalase etc. (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). *CagA* é uma proteína altamente imunogênica, portanto, um excelente antígeno, de modo que altos títulos de anticorpos direcionados a ela podem ser encontrados em pacientes colonizados por cepas *cagA*-positivo (RICK et al., 2010). Em geral, testes que contêm misturas com antígenos variados demonstram uma sensibilidade mais alta (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007).

Dentre os vários métodos disponíveis, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é a técnica mais utilizada, pela rapidez, simplicidade, reprodutibilidade e baixo custo (BITTENCOURT et al., 2006; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). A maioria dos testes comerciais envolvendo essa técnica baseiam-se na detecção de anticorpos da classe IgG (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007).

A sensibilidade e especificidade desse método variam de 44,4 a 100% e depende, entre outros fatores, da idade da população estudada e da prevalência da infecção (DE OLIVEIRA et al., 1999; PORTORREAL; KAWAKAMI, 2002; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). Esse método não deve ser realizado para o diagnóstico da infecção em crianças menores de 12 anos devido à baixa sensibilidade apresentada nessa faixa etária (DE OLIVEIRA et al., 1999; BITTENCOURT et al., 2006).

Os testes sorológicos são de grande utilidade para fins de estudos epidemiológicos e de vacinação (HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007; KOLETZKO et al., 2011). Também podem ser úteis na identificação da infecção em indivíduos com atrofia gástrica, condição histológica que dificulta a identificação da bactéria diretamente em amostras de tecido (MALFERTHEINER; SELGRAD, 2010).

2.5.3 Métodos Moleculares

A detecção da infecção por *H. pylori* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser realizada tanto por amostras coletadas a partir de métodos invasivos (biópsia e suco gástricos) quanto por amostras coletadas a partir de métodos não(ou minimamente)-invasivos (saliva, placa dental e fezes) (ROTA, 2006; HIRSCHL; MAKRISTATHIS, 2007). Fragmentos de biópsia gástrica são o tipo de material mais comumente utilizados para a pesquisa da bactéria por PCR (ROTA, 2006). As amostras coletadas a partir de métodos não(ou minimamente)-invasivos costumam ser pouco empregadas, sendo mais utilizadas em estudos sobre o modo de transmissão da infecção (ROTA, 2006; ASSUMPCÃO et al., 2010).

Uma das limitações da técnica, quando utiliza amostras obtidas através de métodos invasivos, é a possibilidade de erro de amostragem decorrente de certas particularidades da infecção pelo *H. pylori*, já descritas no início dessa seção (TIVELJUNG et al., 1998).

A pesquisa do DNA bacteriano pode ser realizada em fragmentos de biópsia gástrica obtidos a fresco, em fragmentos fixados em formol e embebidos em blocos de parafina ou em fragmentos cultivados em meio de cultura, com resultados semelhantes (PARK et al., 2003; MONTEIRO et al., 2009).

Diversas técnicas da PCR têm sido descritas e, de um modo geral, elas têm demonstrado elevadas sensibilidade e especificidade, quando comparadas a outros métodos diagnósticos assim como quando comparadas entre si (ROTA, 2006).

Além do diagnóstico da infecção, a técnica de PCR permite a genotipagem dos fatores de virulência do *H. pylori* e a determinação da suscetibilidade da bactéria a antimicrobianos (BITTENCOURT et al., 2006). No entanto, a sua utilização não tem sido recomendada na prática clínica devido ao seu alto custo e a sua pouca relevância no manejo da infecção (MALFERTHEINER et al., 2007).

Por estarem presentes em, praticamente, todas as linhagens de *H. pylori*, os principais genes que servem de modelo para o desenvolvimento dos *primers* utilizados para a detecção da infecção são: os genes da urease (*ureA* e *ureC*), a sequência 16S rRNA *H. pylori*-específica e regiões aleatórias do DNA cromossomal da bactéria (ROTA, 2006). Já os genes *cagA*, *vacA*, entre outros, costumam ser utilizados para caracterizar a virulência da bactéria (ROTA, 2006).

A sensibilidade e a especificidade do método são diretamente associadas ao tipo de *primer* utilizado na reação, especialmente no que se refere à pesquisa dos fatores de virulência (LU et al., 1999; ROTA et al., 2001).

No nosso meio, Rota et.al (2001) demonstraram que *primers* desenvolvidos a partir de cepas de *H. pylori*, extraídas de indivíduos oriundos de países do leste da Ásia, apresentaram uma menor sensibilidade para identificar a presença do gene *cagA* em comparação com *primers* desenvolvidos a partir de cepas de indivíduos de países ocidentais (ROTA et al., 2001). Nesse estudo, a prevalência do gene *cagA* foi de 57% e de 71%, respectivamente, conforme o *primer* utilizado (ROTA et al., 2001).

2.6 *H. PYLORI* E ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS

H. pylori causa inflamação, aguda ou crônica, no estômago de, virtualmente, todos os indivíduos infectados, em geral, sem grandes repercussões clínicas (COVACCI, 1999; DOHIL et al., 1999; CARVALHO et al., 2003). A magnitude dessa inflamação varia de acordo com a virulência da cepa presente e com os fatores genéticos do hospedeiro (COVACCI, 1999).

A infecção por *H. pylori* não apresenta um quadro clínico típico (SPEE et al., 2010). A presença de sintomas gastrointestinais, na ausência de doença ulcerativa péptica, ainda não

foi, comprovadamente, associada à gastrite ocasionada pela bactéria (KOLETZKO et al., 2011).

Atualmente, as doenças mais amplamente associadas à infecção por *H. pylori* são: a doença ulcerosa péptica (gástrica e duodenal), o adenocarcinoma gástrico e o linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) gástrica (COVACCI, 1999).

Na infância, a infecção por *H. pylori* é considerada a maior causa de gastrite crônica e de úlcera duodenal (VERES; PEHLIVANOGLU, 2007; PACIFICO et al., 2010), embora as crianças apresentem uma prevalência significativamente menor dessa última doença em relação aos adultos (PACIFICO et al., 2010; KOLETZKO et al., 2011). Neoplasias gástricas associadas à infecção por *H. pylori* são raras na população pediátrica, com somente poucos casos de linfoma relatados na literatura (PACIFICO et al., 2010; KOLETZKO et al., 2011).

2.6.1 Gastrite

O termo gastrite refere-se à presença de células inflamatórias na mucosa gástrica, portanto trata-se de um diagnóstico fundamentalmente histológico (DOHIL et al., 1999).

A gastrite é classificada como aguda, quando o infiltrado inflamatório predominante é composto por neutrófilos, ou como crônica, quando o infiltrado inflamatório predominante é composto por linfócitos e plasmócitos.

A gastrite aguda é raramente diagnosticada em pacientes infectados por *H. pylori* (DIXON et al., 1996). Já a gastrite crônica é diagnosticada com mais frequência que a aguda e a sua associação com a infecção por *H. pylori* está bem estabelecida (CARVALHO et al., 2003). Em geral, a gastrite predomina na região do antro gástrico em crianças (DOHIL et al., 1999; CARVALHO et al., 2003; PACIFICO et al., 2010).

No intuito de uniformizar a descrição das gastrites, em 1990, um grupo de especialistas estabeleceu um conjunto de normas e nomenclaturas para melhor classificá-las e

graduá-las, que é conhecido como Sistema Sydney, em virtude do evento ter ocorrido nessa cidade (CASTRO et al., 1991; DIXON et al., 1996). Em 1994, essa classificação sofreu algumas alterações, fundamentalmente sob o ponto de vista histológico, tendo sido acrescentado a palavra “modificado” ao nome original desde então (DIXON et al., 1996). O Sistema Sydney modificado vem sendo a classificação mais utilizada para descrição de gastrite até o momento. A terminologia proposta por essa classificação é baseada em aspectos nosológicos da gastrite (DIXON et al., 1996).

2.6.1.1 Classificação Endoscópica

Mesmo reconhecendo que gastrite é um termo utilizado para designar um diagnóstico histológico, essa terminologia tem sido amplamente utilizada para descrever as alterações endoscópicas (DOHIL et al., 1999).

A classificação de Sydney incluiu uma divisão endoscópica que propõe que os endoscopistas descrevam seus achados com termos descritivos e mencionem tanto o tipo de alteração encontrada quanto a localização e a graduação das lesões (CASTRO et al., 1991; DOHIL et al., 1999). A Figura 2 apresenta a divisão endoscópica do Sistema Sydney.

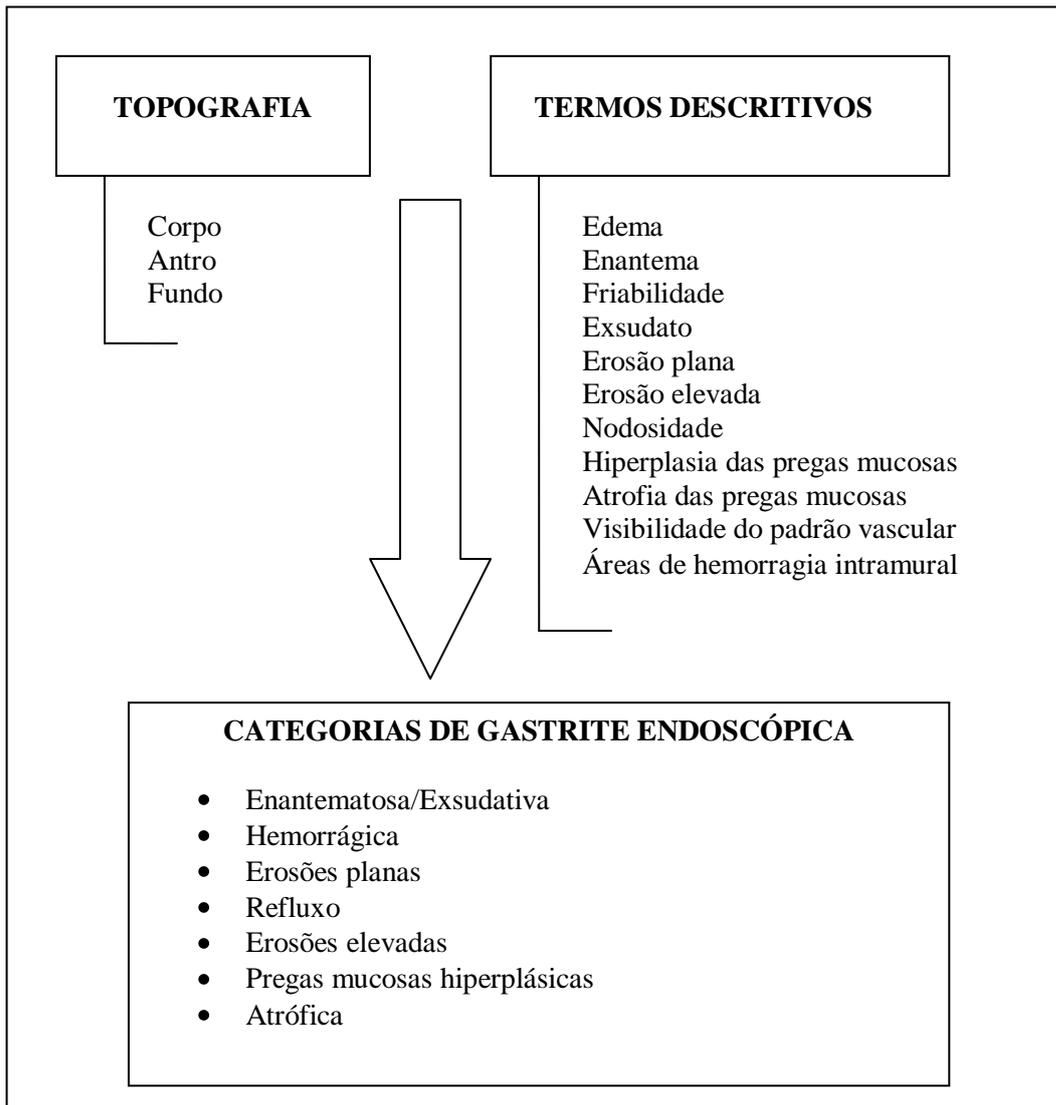


Figura 2: Sistema Sydney – divisão endoscópica.

Cerca de 50% das crianças infectadas por *H. pylori* apresentam um exame endoscópico normal (DOHIL et al., 1999). No entanto, a avaliação endoscópica da mucosa desses pacientes pode revelar enantema, erosões, úlceras e nodularidade antral (DOHIL et al., 1999).

Gastrite endoscópica nodular é o termo empregado para descrever a presença de irregularidades do relevo mucoso gástrico, designadas micronódulos, com superfície lisa e sem alteração de coloração (BUJANOVER et al., 1990; DOHIL et al., 1999; BAHU et al., 2003). A Figura 3 demonstra aspecto endoscópico da gastrite nodular.



Fonte: Arquivo pessoal CHTF.

Figura 3: Aspecto da gastrite endoscópica nodular

Os micronódulos podem ser melhor visualizados após a coleta de biópsias, pois o sangue procedente do local biopsiado funcionaria, nesse caso, como uma espécie de corante tornando-os mais evidentes aos olhos do endoscopista (DOHIL et al., 1999; BAHU et al., 2003).

A gastrite nodular é um achado endoscópico mais comumente observado em crianças (BUJANOVER et al., 1990; DOHIL et al., 1999). Quando é identificada, serve como um marcador da presença de *H. pylori*, assim como de atividade inflamatória mais intensa na mucosa gástrica do hospedeiro (LUZZA et al., 2002; BAHU et al., 2003), e costuma localizar-se, preferencialmente, no antro gástrico (BUJANOVER et al., 1990; DOHIL et al., 1999; BAHU et al., 2003).

Apesar da forte associação com a infecção por *H. pylori*, a gastrite endoscópica nodular pode ser encontrada em pacientes com linfoma gástrico, citomegalovirose e gastrite eosinofílica (DOHIL et al., 1999).

2.6.1.2 Classificação Histológica

O Sistema Sydney modificado propõe o uso de uma escala visual análoga (Figura 4) para que a classificação dos achados histológicos seja reproduzível (DIXON et al., 1996).

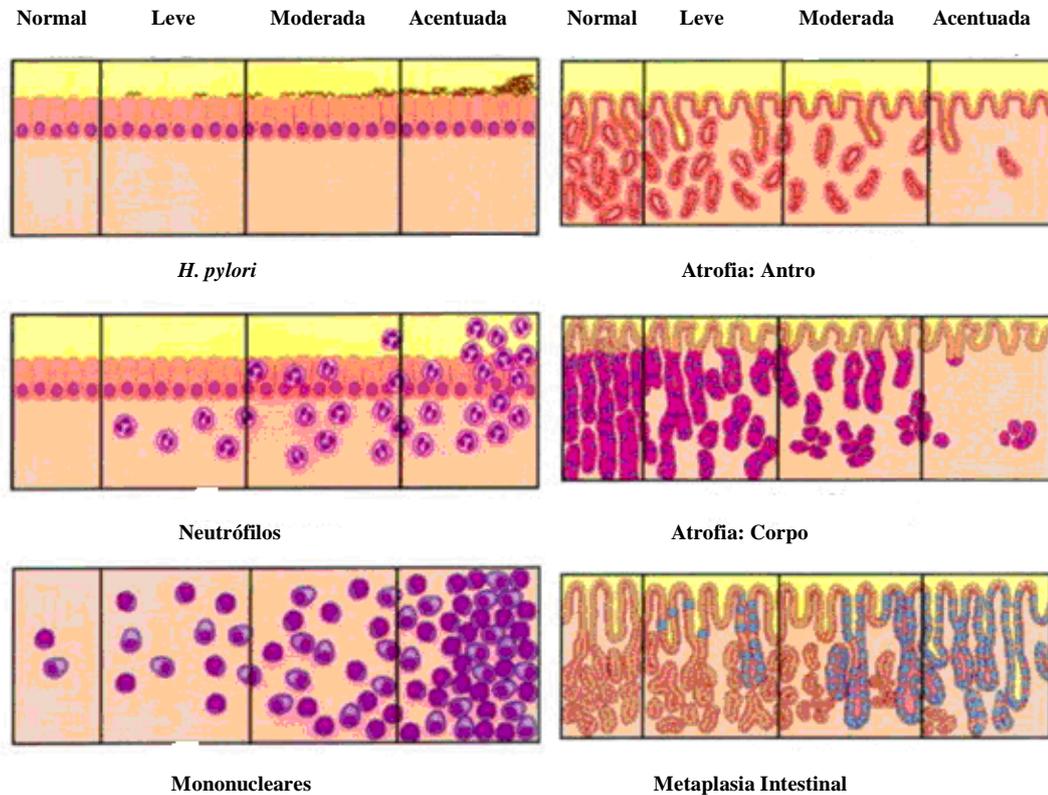


Figura 4: Escala visual análoga, Sistema Sydney modificado, adaptado de (Dixon, Genta et al. 1996)

A análise da inflamação crônica, da atividade dos polimorfonucleares bem como da presença ou ausência de infecção por *H. pylori*, de atrofia glandular e de metaplasia intestinal deve ser realizada em todos os casos de gastrite e graduada em leve, moderada e acentuada, conforme a escala visual (DIXON et al., 1996).

Algumas considerações sobre o Sistema Sydney (DIXON et al., 1996):

- Biópsias:
 - ▶ Os fragmentos de biópsia gástrica devem ser coletados conforme esquematizado na Figura 5.

- ▶ Lesões endoscópicas devem ser biopsiadas independentemente da coleta dos fragmentos recomendados.
- ▶ Atrofia e metaplasia intestinal costumam ser mais proeminentes na região da incisura angular, de modo que, pelo menos um fragmento de biópsia deve ser coletado dessa região.
- Densidade Bacteriana:
 - ▶ Recomenda que a classificação da densidade de *H. pylori* seja baseada somente nas bactérias presentes no epitélio gástrico.
- Atividade:
 - ▶ A presença de neutrófilos é um fenômeno praticamente universal na gastrite induzida por *H. pylori*.
 - ▶ A densidade de neutrófilos intraepiteliais tem sido correlacionada com a extensão do dano tecidual promovido pela bactéria.
- Inflamação crônica:
 - ▶ O infiltrado celular na infecção por *H. pylori* é composto por linfócitos T CD4+ e CD8+, plasmócitos, monócitos, mastócitos e eosinófilos.
- Atrofia glandular:
 - ▶ Atrofia da mucosa gástrica é definida como perda do tecido glandular e é o denominador comum de muitos processos patológicos.
 - ▶ É difícil de ser diagnosticada no antro gástrico devido à grande quantidade de tecido conjuntivo presente nesta região.
 - ▶ A substituição do epitélio antral por metaplasia intestinal pode ser um indicador de que haja atrofia, porém a metaplasia por si só é um processo independente. Pode ser encontrada na ausência de metaplasia.
 - ▶ Atrofia extensa aumenta o risco de malignidade.

- Metaplasia intestinal:
 - ▶ É dependente do tempo de duração da doença.
 - ▶ Pode ser categorizada em intestino delgado ou colônica e em completa ou incompleta.
 - ▶ Predispõe à malignidade.
- Outros aspectos histológicos não graduáveis:
 - ▶ Folículos linfoides são característicos da gastrite crônica induzida por *H. pylori*. A sua presença em pacientes não infectados pela bactéria sugere que o micro-organismo possa não ter sido visualizado.

Gastrite por *H. pylori* costuma ser mais proeminente no antro do que no corpo gástrico (DIXON et al., 1996).

Tanto a atrofia quanto a metaplasia intestinal podem ser difusa ou multifocal (DIXON et al., 1996). Atrofia gástrica multifocal é uma lesão histológica associada à úlcera gástrica e, em algumas populações, ao adenocarcinoma gástrico (DIXON et al., 1996).

Sepulveda et al. (2002) sugerem que certos aspectos histológicos presentes em pacientes infectados por *H. pylori*, tais como a pangastrite e uma alta densidade de folículos linfoides, possam servir de rastreamento para câncer gástrico em populações jovens com alta prevalência e história familiar dessa doença (SEPULVEDA et al., 2002).

A eliminação do *H. pylori* costuma ser acompanhada por um rápido desaparecimento dos neutrófilos, os quais podem estar ausentes dentro de uma semana após o término do tratamento (DOHIL et al., 1999). Já o infiltrado inflamatório crônico e a hiperplasia folicular linfoide demoram mais tempo para desaparecer, podendo ainda estar presentes na mucosa gástrica por mais de um ano (DOHIL et al., 1999).

2.6.2 Úlceras gástrica e duodenal

H. pylori é um fator de risco essencial para o desenvolvimento de úlcera duodenal em adultos e crianças, de modo que a sua presença na ausência de infecção é incomum (BITTENCOURT et al., 2006; ATHERTON; BLASER, 2009). Já a força da associação entre infecção por *H. pylori* e úlcera gástrica em crianças apresenta evidências mais fracas na literatura (PACIFICO et al., 2010).

Mesmo ambas estando associadas à presença do *H. pylori* os mecanismos patogênicos que levam ao surgimento das úlceras gástrica e duodenal são distintos (ATHERTON; BLASER, 2009).

A gastrite, predominantemente, antral induzida pelo *H. pylori* costuma ser a lesão inicial que antecede o surgimento da úlcera duodenal (ATHERTON; BLASER, 2009). Esse tipo de gastrite costuma causar uma hipergastrinemia e elevar a acidez do estômago (ATHERTON; BLASER, 2009). Presumivelmente, em resposta à sobrecarga de ácido a que é exposto, o duodeno desenvolve metaplasia gástrica, sendo então colonizado pelo *H. pylori*, com conseqüente inflamação e ulceração (ATHERTON; BLASER, 2009).

A úlcera gástrica costuma surgir na junção entre a mucosa corporal e antral, cursa com níveis gástricos de acidez normais ou reduzidos e um contexto de gastrite, predominantemente, corporal ou de pangastrite parece ser a lesão inicial associada ao seu surgimento (ATHERTON; BLASER, 2009).

O aspecto endoscópico das úlceras depende da fase do ciclo em que se encontra, sendo a classificação de Sakita a mais utilizada para descrever o estágio da lesão (CARVALHO et al., 2003). O ciclo da úlcera é dividido em três fases: ativa (A, do inglês *active*), de cicatrização (H, do inglês *healing*) e cicatrizada (S, do inglês *scar*) (CARVALHO et al., 2003).

A úlcera gástrica surgiu no século XIX, nos Estados Unidos e na Europa, e atingiu seu pico de prevalência no início do século XX (ATHERTON; BLASER, 2009). Já o surgimento e pico de prevalência da úlcera duodenal aconteceu cerca de 10 a 30 anos após (ATHERTON; BLASER, 2009).

Diversos estudos têm descrito uma queda na prevalência dessas doenças, fato que se observa concomitantemente com a diminuição da prevalência da infecção por *H. pylori* (BITTENCOURT et al., 2006; ATHERTON; BLASER, 2009; DRUMM; ROWLAND, 2011), inclusive no Rio Grande do Sul, com prevalência de 3,3% de úlcera duodenal em adultos no ano de 2005 (SAUL et al., 2007).

Na população pediátrica, há poucos estudos publicados até o momento que demonstrem essa tendência (PACIFICO et al., 2010).

Úlcera duodenal foi diagnosticada em menos de 5% dos pacientes infectados por *H. pylori* em um estudo multicêntrico europeu que incluiu 1233 crianças sintomáticas com idade inferior a 12 anos (KOLETZKO et al., 2011).

2.6.3 Adenocarcinoma Gástrico

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou o *H. pylori* um carcinógeno classe I (IARC, 1994). No entanto, o risco de desenvolver câncer gástrico não depende somente da infecção pela bactéria propriamente dita, mas, sobretudo, da presença de certos fatores de virulência bacterianos, assim como depende de fatores genéticos do hospedeiro, do tempo de duração da infecção e de fatores ambientais, dentre os quais destaca-se a dieta (ATHERTON; BLASER, 2009; YAMAOKA, 2010).

O adenocarcinoma gástrico tem sido classificado em dois tipos: difuso e intestinal (ATHERTON; BLASER, 2009).

O tipo difuso é o menos prevalente e estudado, porém é o mais agressivo e tende a ocorrer em adultos jovens (ATHERTON; BLASER, 2009).

O tipo intestinal costuma ser o estágio final de uma sequência de alterações que progridem de uma simples gastrite para atrofia gástrica, metaplasia, displasia e carcinoma e costuma estar associado à presença de cepas *cagA*-positivas (BLASER, 1998; FOX; WANG, 2007; ATHERTON; BLASER, 2009).

Uma vez estabelecida a atrofia da mucosa gástrica, mesmo após a erradicação do *H. pylori*, o câncer pode se desenvolver, o que demonstra que essa seja a lesão histológica crucial para o desenvolvimento da doença (WONG et al., 2004; ATHERTON; BLASER, 2009).

A erradicação da infecção por *H. pylori* em pacientes com lesões pré-cancerosas, procedentes de região com elevada incidência de câncer gástrico, diminuiu significativamente o número de casos novos da doença (WONG et al., 2004).

Indivíduos infectados pelo *H. pylori* cujos pai e/ou mãe tiveram câncer gástrico são considerados como grupo de risco para desenvolverem a doença e devem receber tratamento para a erradicação da bactéria, visto que eles não só compartilham do mesmo ambiente e carga genética mas também das mesmas cepas bacterianas com mesmo potencial patogênico (KOLETZKO et al., 2011).

O câncer gástrico é a segunda maior causa de morte por neoplasia no mundo (KODAIRA et al., 2002; FOX; WANG, 2007; YAMAOKA, 2010).

Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), de 2010, o câncer de estômago é o quinto em incidência no estado do Rio Grande do Sul em ambos os gêneros, correspondendo a 16,5 e 9,5 casos novos para cada 100.000 homens e mulheres, respectivamente¹.

¹ Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> acesso em 18 de setembro de 2011.

Embora ainda represente um importante impacto em termos de saúde pública, a mortalidade mundial por câncer de estômago vem decrescendo nos últimos anos (FOX; WANG, 2007; DRUMM; ROWLAND, 2011).

No Brasil, um estudo realizado entre 1980 e 2004, nas capitais dos estados brasileiros, também demonstrou um declínio na mortalidade por câncer de estômago (FONSECA et al., 2010).

Até o presente momento, não há nenhum caso relatado na literatura de adenocarcinoma gástrico na população pediátrica (PACIFICO et al., 2010). No entanto, o seu desenvolvimento está intimamente associado à duração da infecção, de modo que, quanto mais cedo *H. pylori* é adquirido maior o risco (FERRECCIO et al., 2007).

2.6.4 Linfoma MALT gástrico

A partir da década de noventa, relatos e séries de casos têm demonstrado a associação entre linfoma MALT gástrico e infecção por *H. pylori* (BLECKER et al., 1995; PACIFICO et al., 2010).

Em adultos, *H. pylori* foi encontrado ao exame histológico em 92 a 100% dos pacientes com linfoma MALT gástrico (PACIFICO et al., 2010). Essa neoplasia tem sido observada mais comumente em idosos ou em indivíduos de meia idade (PACIFICO et al., 2010).

Somente um pequeno número de casos de linfoma MALT gástrico em crianças foram relatados na literatura até o momento (BLECKER et al., 1995; PACIFICO et al., 2010).

2.6.5 Outras doenças

Diversas doenças (anemia ferropriva, púrpura trombocitopênica imune, doença do refluxo gastroesofágico, obesidade, doenças alérgicas, colelitíase, colecistite, entre outras)

têm sido apontadas como tendo associação tanto com a presença quanto com a ausência do *H. pylori* atualmente (SILVA et al., 2003; COVER; BLASER, 2009; MALFERTHEINER; SELGRAD, 2010; PACIFICO et al., 2010; KOLETZKO et al., 2011).

Embora ainda bastante controverso na literatura, as sociedades europeia e norte-americana, no último consenso sobre *H. pylori*, recomendam que a testagem para a infecção deva ser considerada em crianças com anemia ferropriva refratária ao tratamento e terapia para erradicação instituída quando a bactéria estiver presente (KOLETZKO et al., 2011).

Há dados insuficientes para afirmar que a infecção por *H. pylori* está causalmente relacionada à presença de otite média, infecções do trato respiratório superior, doença periodontal, alergia alimentar, síndrome da morte súbita do lactente, púrpura trombocitopênica imune e baixa estatura em crianças (KOLETZKO et al., 2011).

*** 3. JUSTIFICATIVA ***

No Brasil, os estudos realizados acerca dos fatores de virulência na população pediátrica foram realizados, principalmente, na região Sudeste (QUEIROZ et al., 2000; ASHOUR et al., 2002; GATTI et al., 2006). Há poucos estudos no nosso meio envolvendo pesquisa de cepas de *H. pylori cagA*-positivo e suas associações clínicas que foram realizados, porém, com adultos (ROTA et al., 2001; RAMIS et al., 2010; MEINE et al., 2011).

Considerando-se que o Brasil é um país continental, com diversas etnias e culturas, que a infecção por *H. pylori* apresenta um comportamento variável quando avaliada em diferentes populações (FERREIRA et al., 1998; ESCOBAR-PARDO et al., 2011) e que não há nenhum estudo envolvendo análise molecular de fatores de virulência na população pediátrica do Sul do Brasil, justifica-se a realização deste estudo.

*** 4. OBJETIVOS ***

4.1 PRIMÁRIO

Identificar a prevalência de cepas de *H. pylori cagA*-positivo em crianças e adolescentes submetidos a EGD por queixas gastrointestinais.

4.2 SECUNDÁRIOS

- 1) Descrever as características clínicas e demográficas dos indivíduos infectados por cepas de *H. pylori cagA*-positivo e dos infectados por cepas *cagA*-negativo;
- 2) Descrever os achados endoscópicos dos indivíduos infectados por cepas de *H. pylori cagA*-positivo e dos infectados por cepas *cagA*-negativo;
- 3) Descrever os achados histológicos dos indivíduos infectados por cepas de *H. pylori cagA*-positivo e dos infectados por cepas *cagA*-negativo;
- 4) Verificar se existe associação entre a presença de cepas de *H. pylori cagA*-positivo e gastrite endoscópica nodular;
- 5) Verificar se existe associação entre a presença de cepas de *H. pylori cagA*-positivo com a classificação e a atividade de gastrite no exame histológico;
- 6) Verificar se existe associação entre a presença de cepas de *H. pylori cagA*-positivo com a densidade da bactéria no tecido.

*** 5. MÉTODO ***

5.1 DELINEAMENTO, LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

Estudo transversal com uma amostra de crianças e adolescentes com queixas gastrointestinais, encaminhados ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e ao Hospital Moinhos de Vento (HMV) para a realização de EGD, durante o período de março de 2008 a janeiro de 2011.

5.2 TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo da amostra foi realizado fazendo-se uma estimativa de infecção pelo *H. pylori* de 20% em pacientes submetidos à EGD (FERREIRA et al., 1998; SOUSA et al., 2001) e de prevalência do gene *cagA* de, no mínimo, 50% nas crianças e adolescentes do nosso meio. Considerando-se um intervalo de confiança de 95%, um poder de estudo de 80% e uma margem de erro de, no máximo, 15%, a amostra calculada foi de 43 sujeitos infectados pelo *H. pylori*.

5.3 SELEÇÃO DOS PACIENTES

5.3.1 Critérios de Inclusão:

- ter idade entre 1 e 18 anos;
- apresentar gastrite endoscópica nodular e/ou úlcera gástrica e/ou úlcera duodenal e/ou teste da urease positivo e/ou presença de *H. pylori* na análise histológica.

5.3.2 Critérios de Exclusão:

- presença de contra-indicação à realização de procedimento endoscópico com biópsia (por exemplo, coagulopatia);
- uso de antibiótico e/ou de bismuto e/ou de bloqueadores H2 e/ou de IBP nos 30 dias anteriores ao procedimento;

- uso de anti-inflamatório não esteróide e/ou de ácido acetil-salicílico nos 3 dias anteriores ao procedimento;

5.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo em questão obedeceu aos direitos dos sujeitos pesquisados, conforme estabelece a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde². A participação na pesquisa foi voluntária e não implicou qualquer alteração na rotina assistencial. Também não ofereceu riscos adicionais aos pacientes além dos que eles já estavam expostos ao se submeterem a um procedimento endoscópico sob anestesia geral ou sedação profunda. Os pacientes não foram identificados de forma alguma.

Os pais ou responsáveis de cada paciente elegível foram informados sobre a pesquisa e convidados a participar do estudo. Somente foram incluídos no estudo os pacientes cujos pais ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), vide Anexo A.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelos comitês de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (número 07-645) bem como do Hospital Moinhos de Vento (número 24).

5.5 FLUXOGRAMA DO ESTUDO

Praticamente todos os procedimentos foram realizados conforme a rotina assistencial das instituições participantes, com a exceção da aplicação de questionário específico e da coleta de 4 fragmentos de biópsia gástrica extras para a realização do teste da urease e da pesquisa de *H. pylori* e do gene *cagA* pelo método de PCR.

² A referência à Resolução 196/196 do Conselho Nacional de Saúde encontra-se disponível no sítio <http://www.ufrgs.br/bioetica/res19696.htm> acesso em 31 de outubro de 2011.

Os procedimentos foram realizados no Centro Cirúrgico-ambulatorial do HCPA e no Centro de Endoscopia do HMV.

Para realização da EGD, os pacientes foram, previamente, ou anestesiados ou sedados pelos anestesistas rotineiros.

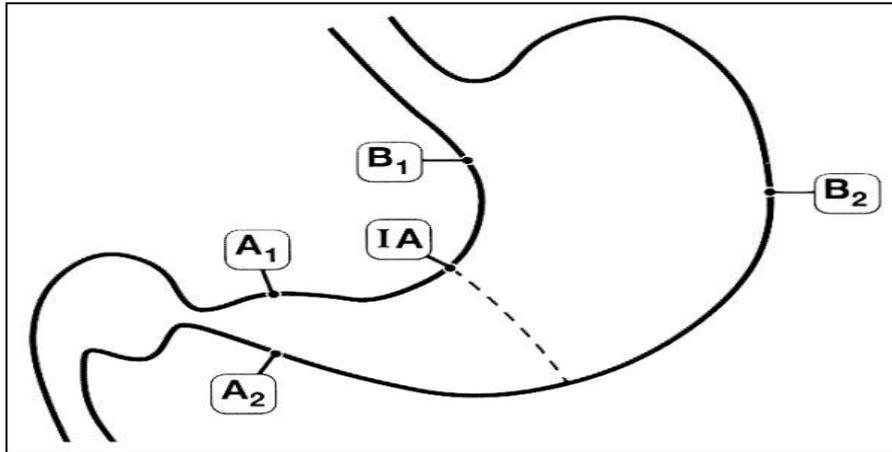
Os pais ou responsáveis, após a assinatura do TCLE, responderam a um questionário sobre características demográficas e clínicas do participante, vide anexo B.

Todas as endoscopias foram realizadas ou supervisionadas por um único e experiente endoscopista pediátrico (CHTF).

A presença de alterações endoscópicas foi realizada por exame visual direto da mucosa gástrica e os principais achados preenchidos de forma descritiva no laudo e transcritos para formulário específico da pesquisa, anexo B.

O videoendoscópio e as pinças de biópsia foram devidamente limpos e desinfetados, conforme procedimento padrão, entre um exame e outro, para evitar a contaminação entre os pacientes.

Foram coletados, ao todo, 9 fragmentos de biópsia da mucosa gástrica por paciente: 5 para análise histológica (2 de corpo, 2 de antro e 1 da incisura angular), 2 para teste da urease (1 de corpo e 1 de antro) e 2 para análise molecular (1 de corpo e 1 de antro) – conforme Sistema Sydney modificado.



Fonte: Sistema Sydney modificado

Figura 5: Representação esquemática dos locais de coleta dos fragmentos de biópsia gástrica, conforme recomendação do Sistema Sydney modificado (DIXON et al., 1996), onde: A1 e A2 – pequena e grande curvatura do antro gástrico, cerca de 2-3 cm do piloro; IA – incisura angular e B1 e B2 – pequena e grande curvatura do corpo gástrico.

5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cinco fragmentos de biópsia gástrica, encaminhados para análise histológica, foram fixados em solução de formol, desidratados e embebidos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 4 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina, para classificação da gastrite conforme o Sistema Sydney modificado (DIXON et al., 1996), e com Giemsa modificado, para a identificação do *H. pylori*. Todos os exames foram realizados e revisados por um único e experiente patologista (LM).

5.7 TESTE DA UREASE

Imediatamente após a coleta das biópsias, um fragmento do antro e outro do corpo gástrico eram colocados em frasco com solução comercial tamponada contendo 1 ml de fosfato de potássio, ureia a 10% e indicador de pH (Uretest®, Renylab Ltda., Minas Gerais, Brasil) para realização do teste rápido da urease. Os materiais foram incubados em temperatura ambiente e a leitura realizada em até 12 horas após a inoculação, conforme

orientação do fabricante. Na presença de *H. pylori* na amostra analisada, a coloração da solução modificava-se do amarelo para o rosa devido à elevação do pH resultante da degradação da ureia, já explicado anteriormente.

5.8 ANÁLISE MOLECULAR

Os fragmentos de biópsia de corpo e de antro, destinados à análise molecular foram, armazenados em frasco contendo solução fisiológica a 0,9% e mantidos congelados em temperatura inferior a 70 °C negativos até a obtenção do resultado dos demais exames realizados (teste da urease e análise histológica).

A análise molecular foi realizada naqueles fragmentos de indivíduos que apresentaram gastrite endoscópica nodular e/ou úlcera gástrica e/ou úlcera duodenal e/ou teste da urease positivo e/ou presença de *H. pylori* na análise histológica, conforme os critérios de inclusão acima citados.

Quando os critérios de inclusão não foram preenchidos os materiais coletados foram desprezados de acordo com Resolução Normativa 02/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA³.

5.8.1 Extração de DNA

O DNA foi isolado diretamente dos fragmentos de biópsia gástrica de corpo e antro através do *QIAamp* DNA mini-kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, Calif.) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 200 µL de tampão de eluição, sendo 10 µL usados para reação de amplificação do DNA. Gene da betaglobina foi utilizado como controle positivo da extração de DNA.

³ A referência à Resolução Normativa 02/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA encontra-se disponível no sítio <http://www.ufrgs.br/bioetica/res297hc.htm> acesso em 31 de outubro de 2011.

5.8.2 Detecção do *H. pylori* pelo método de PCR

Foram utilizados oligonucleotídeos que hibridizam em uma região conservada dos genes *ureA* e 16S rRNA do *H. pylori*, amplificando fragmentos com pesos moleculares de 394 e 132 pb, respectivamente.

As sequências dos *primers* escolhidos para serem utilizados no nosso estudo foram as seguintes:

- UREA1 5' – GCCAATGGTAAATTAGTT-3'
- UREA2 5' – CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'
- HPU18N 5' – CCCATTTGACTCAATGCGATG – 3'
- HPU54N 5' – TGGGATTAGCGAGTATGTCGG – 3'

A reação final de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo:

- 20 nmol de Tris-HCl (pH 8,4)/L
- 50 mmol de KCL/L
- 2,5 (para 16S rRNA) e 1,5 (para *ureA*) mmol de MgCL₂/L
- 200 µmol de cada desoxinucleosídeo trifosfato/L
- 2,5 UI de *Taq* DNA-polimerase (Invitrogen Life Technologies®)
- 25 pmol de cada oligonucleotídeo
- 10 µL de DNA

Condições da reação de PCR:

- Pré-incubação de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de:
 - 94°C por 1 minuto
 - 55°C (para 16S rRNA) e 45°C (para *ureA*) por 1 minuto
 - 72°C por 1 minuto
 - Extensão final de 7 minutos a 72°C.

Análise dos resultados:

Alíquotas de 20 µL foram examinadas por eletroforese em gel de agarose a 3 e 2% (para 16S rRNA e *ureA*, respectivamente), contendo brometo de etídeo, conforme procedimentos padrão de visualização dos produtos de amplificação em luz ultravioleta. Os resultados foram considerados positivos, indicando a presença de *H. pylori*, quando os fragmentos de amplificação (132 e 394 pb), comparados a um marcador de tamanho molecular, foram visualizados no gel, vide Figura 6 e 7. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada análise. A amplificação foi realizada em duplicata para cada amostra de DNA analisada.

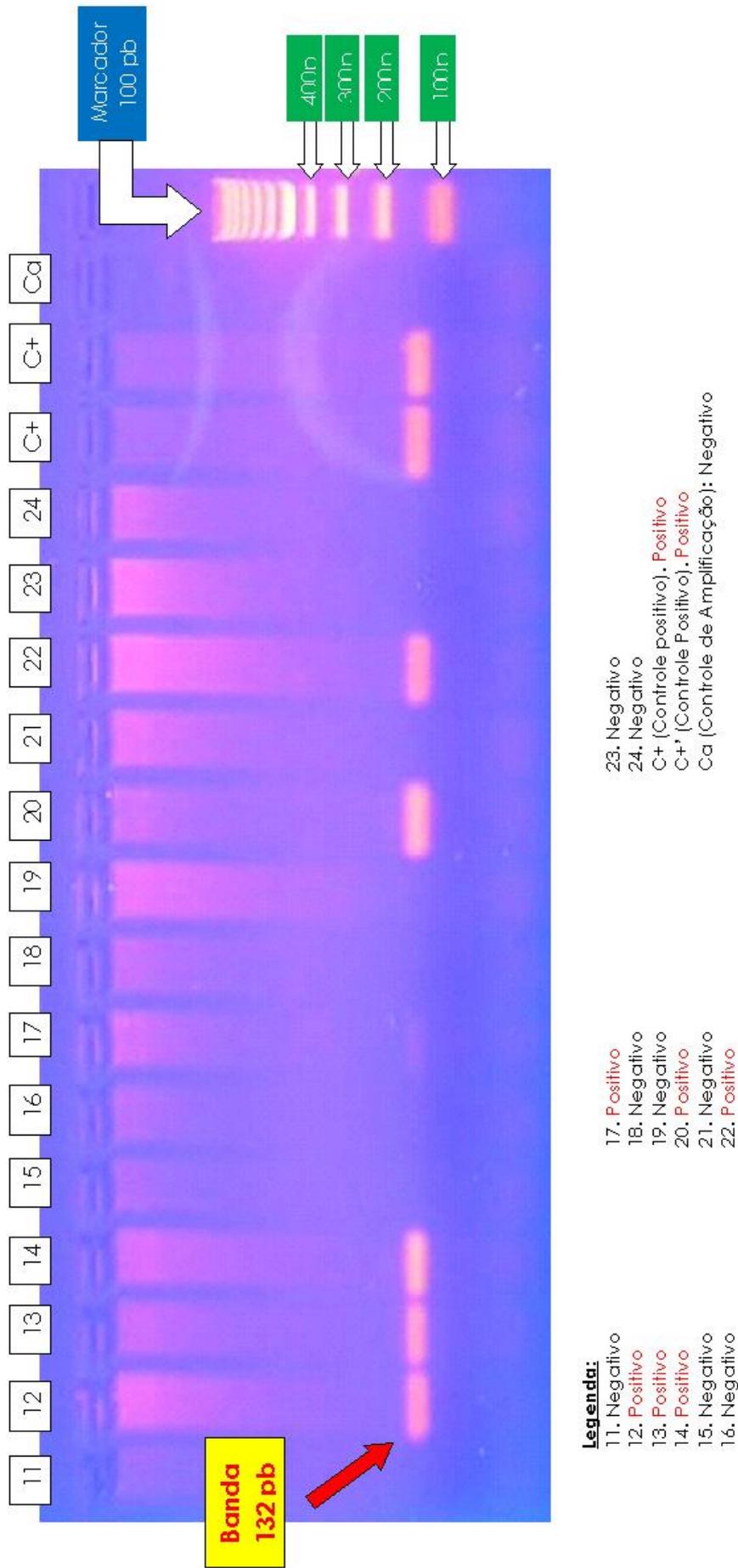


Figura 6: Resultado final da eletroforese em gel de agarose a 3% para pesquisa de *H. pylori* utilizando-se o primer 16S rRNA.

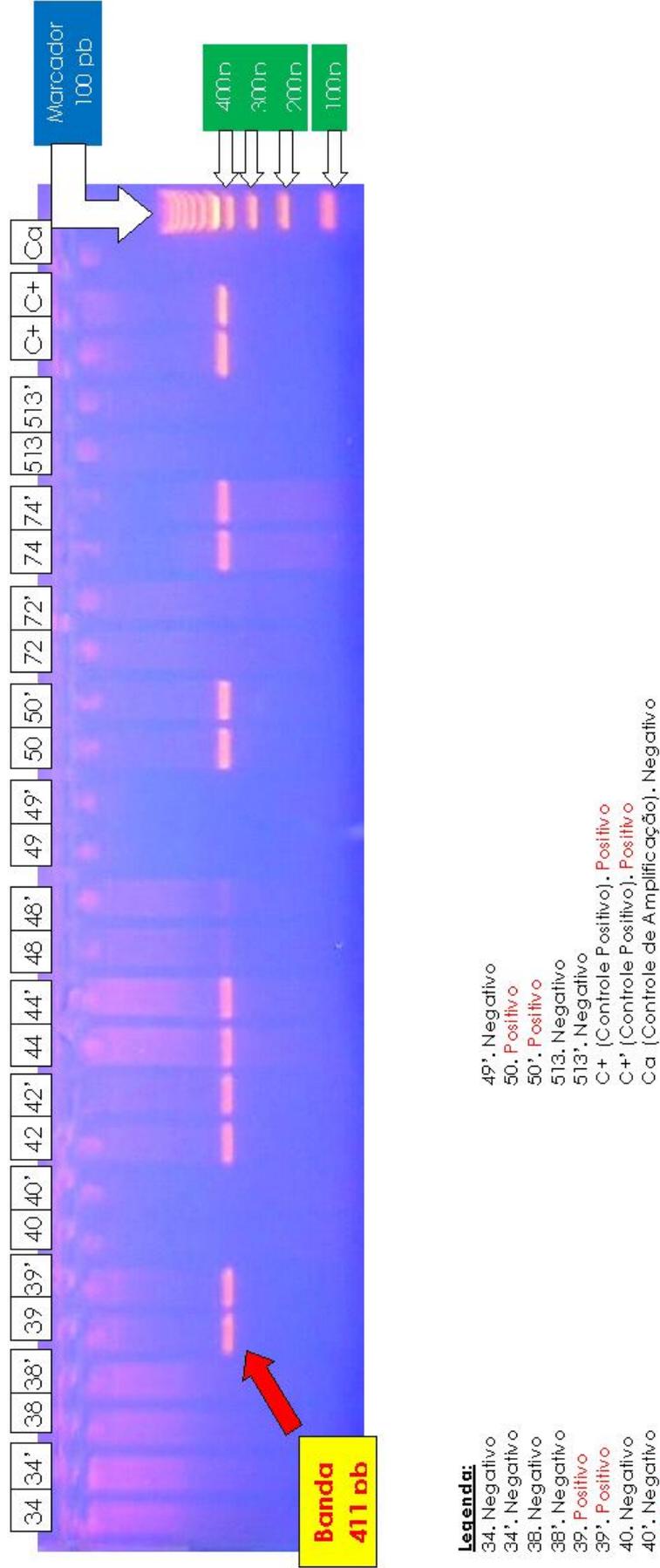


Figura 7: Resultado final da eletroforese em gel de agarose a 2% para pesquisa de *H. pylori* utilizando-se o primer *ureA*

5.8.3 Pesquisa do gene *cagA* pelo método de PCR

A presença ou ausência do gene *cagA* em pacientes *H. pylori* positivos foi realizada através da utilização de oligonucleotídeos específicos (*CagA/ConF* 5' – GTGCCTGCTAGTTTGTTCAGCG – 3' e seu reverso *CagA/ConR* 5' – TTGGAAACCACCTTTTGTATTAGC – 3') que hibridizam uma região conservada da porção 3' do gene *cagA* e amplificam um fragmento com peso molecular de 402 pb, já testados na nossa população, em adultos, com elevadas sensibilidade e especificidade (ROTA et al., 2001).

A reação final foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo:

- 20 nmol de Tris-HCl (Ph 8,4)/L
- 50 mmol de KCL/L
- 2,5 mmol de MgCL₂/L
- 200 µmol de cada desoxinucleosídeo trifosfato/L
- 2,5 UI de *Taq* DNA-polimerase (Invitrogen Life Technologies®)
- 25 pmol de cada oligonucleotídeo
- 10 µL de DNA

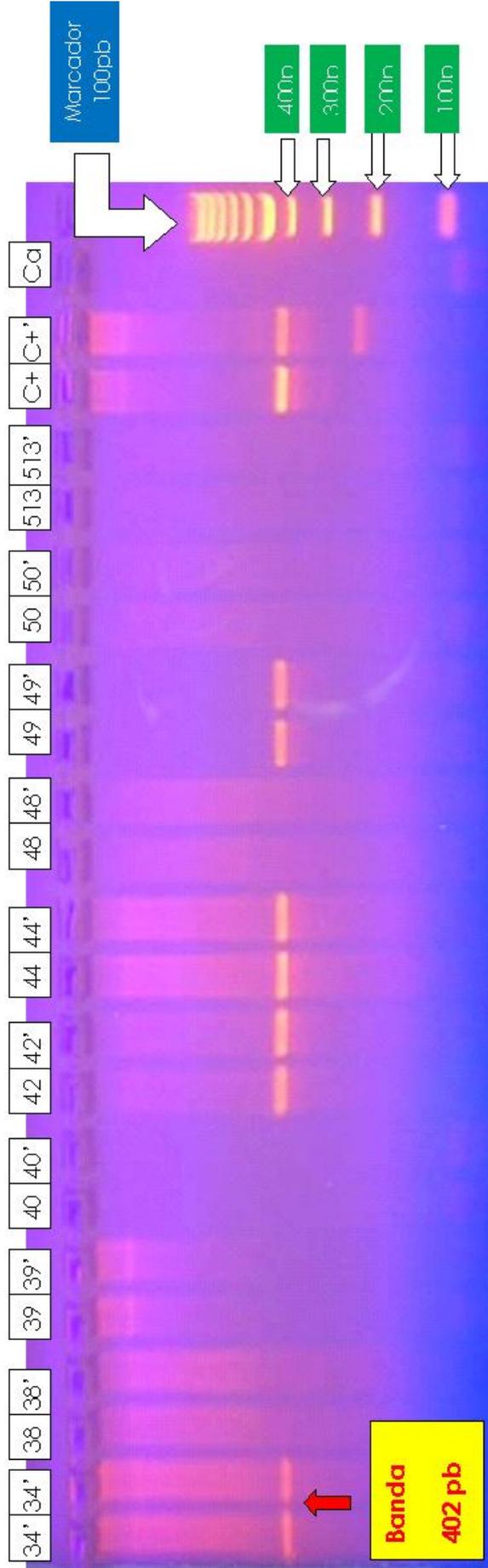
Condições da reação de PCR:

- Pré-incubação de 3 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de:
 - 94°C por 30 segundos
 - 50°C por 30 segundos
 - 72°C por 30 segundos
 - Extensão final de 7 minutos a 72°C.

Análise dos resultados:

Alíquotas de 20 µL foram examinadas por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídeo, conforme procedimentos padrão de visualização dos produtos de

amplificação em luz ultravioleta. Os resultados foram considerados positivos, indicando a presença de cepas de *H. pylori cagA*-positivo, quando um fragmento de amplificação de 402 pb, comparado a um marcador de tamanho molecular, foi visualizado no gel, vide Figura 8.



- Legenda:**
- 34. Positivo
 - 34'. Positivo
 - 38. Negativo
 - 38'. Negativo
 - 39. Negativo
 - 39'. Negativo
 - 40. Negativo
 - 40'. Negativo
 - 42. Positivo
 - 42'. Positivo
 - 44. Positivo
 - 44'. Positivo
 - 48. Negativo
 - 48'. Negativo
 - 49. Positivo
 - 49'. Positivo

- 50. Negativo
- 50'. Negativo
- 513. Negativo
- 513'. Negativo
- C+ (Controle Positivo). Positivo
- C+' (Controle Positivo). Positivo
- Ca (Controle de Amplificação). Negativo

Figura 8: Resultado final da eletroforese em gel de agarose a 2% para pesquisa de cepas de

***H. pylori cagA* positivo**

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados da pesquisa foi elaborado inicialmente no programa Microsoft Excel versão 2003 (Microsoft®, USA) e após convertido para o programa SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A análise dos dados foi realizada pelo programa SPSS versão 17.0 e WINPEPI (PEPI for Windows, Microsoft®, USA). Para comparação das variáveis categóricas que atenderam aos pressupostos paramétricos foi realizado o teste do qui-quadrado e, para as que não atenderam, o teste exato de Fisher. Para comparação das variáveis quantitativas foi utilizado teste t de *Student*. Um nível de significância (α) de 0,05 foi estabelecido.

*** 6. REFERÊNCIAS ***

1. Akcan Y, Ersan S, Alper M et al. The transmission of *Helicobacter pylori* via exposure to common sources outweighs the person-to-person contact among spouses in developing countries. *Am J Gastroenterol* 2000;95(1):317-9.
2. Alvares MMD, Marino MC, Oliveira CA, et al. *Helicobacter pylori* associated gastritis: topographical pattern, associated diseases and correlation with *cagA* status. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42(1):51-9.
3. Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, et al. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1746-50.
4. Ashour AA, Gusmão VR, Magalhães PP, et al. *VacA* alleles, *cagA*, and duodenal ulcer in children in Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 2002;38(2):79-85.
5. Assumpção M, Martins L, Barbosa H, et al. *Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. *World J Gastroenterol* 2010;16(24):3033-9.
6. Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997;40(6):701-3.
7. Atherton JC. *CagA*: a role at last. *Gut* 2000;47(3):330-1.
8. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* 2009;119(9):2475-87.
9. Bahu MG, Silveira TR, Maguilnick I, Ulbrich-Kulczynski J. Endoscopic nodular gastritis: an endoscopic indicator of high-grade bacterial colonization and severe gastritis in children with *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36(2):217-22.
10. Barbosa AJ, Queiroz DM, Mendes EN et al. *Campylobacter pylori* associated acute gastritis in a child. *J Clin Pathol* 1989;42(7):779.
11. Benenson S, Halle D, Rudensky B, et al. *Helicobacter pylori* genotypes in Israeli children: the significance of geography. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35(5):680-4.
12. Bittencourt P, Rocha G, Penna F, Queiroz D. Úlcera péptica gastroduodenal e infecção pelo *Helicobacter pylori*. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(5):325-34.
13. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ* 1998;316(7143):1507-10.
14. Blecker U, McKeithan TW, Hart J, Kirschner BS. Resolution of *Helicobacter pylori*-associated gastric lymphoproliferative disease in a child. *Gastroenterology* 1995;109(3):973-7.

15. Bravo LE, van Doorn LJ, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: do they explain the African enigma? *Am J Gastroenterol* 2002;97(11):2839-42.
16. Bujanover Y, Konikoff F, Baratz M. Nodular gastritis and *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;11(1):41-4.
17. Camargo PL, Alfieri AA, Bracarense AP et al. Use of polymerase chain reaction and enzymatic cleavage in the identification of *Helicobacter spp.* in gastric mucosa of human beings from North Parana, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(2):265-8.
18. Cartágenes VD, Martins LC, Carneiro LM et al. *Helicobacter pylori* in children and association with *CagA* strains in mother-child transmission in the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(3):298-302.
19. Carvalho AST, Queiroz DMM, Mendes EN et al. Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of symptomatic children. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24(2):163-6(2):163-6.
20. Carvalho E, Franco A, Silva A, Caldas E. Doença péptica gastroduodenal. In: Ferreira C, Silva LRS, editores. *Gastroenterologia e Hepatologia em Pediatria Diagnóstico e Tratamento*. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda.; 2003. p. 69-113.
21. Castro LP, Oliveira CA, Prolla JC et al. Sistema Sydney: uma nova classificação das gastrites. *GED* 1991;10:75-82.
22. Catalano M, Matteo M, Barbolla RE, et al. *Helicobacter pylori vacA* genotypes, *cagA* status and *ureA-B* polymorphism in isolates recovered from an Argentine population. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;41(4):205-10.
23. Con SA, Takeuchi H, Valerin AL, et al. Diversity of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genes in Costa Rica: its relationship with atrophic gastritis and gastric cancer. *Helicobacter* 2007;12(5):547-52.
24. Corti RE. *Helicobacter pylori*: some epidemiological questions in Latin America after twenty-five years. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2009;39(3):175-6.
25. Covacci A. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. *Science* 1999;284:1328-33.
26. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology* 2009;136(6):1863-73.
27. Dattoli VC, Veiga RV, da Cunha SS et al. Seroprevalence and potential risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children. *Helicobacter* 2010;15(4):273-8.
28. De Gusmao VR, Nogueira Mendes E, De Magalhaes Queiroz DM, et al. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol* 2000;38(8):2853-7.

29. de Oliveira AM, Rocha GA, Queiroz DM, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28(2):157-61.
30. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20(10):1161-81.
31. Dohil R, Hassall E, Jevon G, Dimmick J. Gastritis and gastropathy of childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29(4):378-94.
32. Drumm B, Rowland M. Why is *Helicobacter pylori* disappearing? More questions than answers. *J Pediatr (Rio J)* 2011;87(5):369-70.
33. Dubois A. Spiral bacteria in the human stomach: the gastric *helicobacters*. *Emerg Infect Dis* 1995;1(3):79-85.
34. Dzierzanowska-Fangrat K, Crabtree JE, Rozynek E, et al. *Helicobacter pylori cagA* genotype and density of colonization in relation to gastric inflammation in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14(12):1303-7.
35. Escobar M, Kawakami E. Evidence of mother-child transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol* 2004;41(4):239-44.
36. Escobar-Pardo ML, de Godoy AP, Machado RS, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and intestinal parasitosis in children of the Xingu Indian Reservation. *J Pediatr (Rio J)* 2011;87(5):393-8.
37. Ferreccio C, Rollan A, Harris PR, et al. Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence country. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(4):662-7.
38. Ferreira CT, Berti MR, Pires AL et al. Upper gastrointestinal endoscopy in children: indications and results. *J Pediatr (Rio J)* 1998;74(1):39-44.
39. Fonseca LA, Eluf-Neto J, Wunsch Filho V. Cancer mortality trends in Brazilian state capitals, 1980-2004. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(3):309-12.
40. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007;117(1):60-9.
41. Gatti LL, de Lábio R, Silva LC et al. *cagA* positive *Helicobacter pylori* in Brazilian Children Related to Chronic Gastritis. *Braz J Infect Dis* 2006;10(4):254-8.
42. Gold, BD et al. Genotypic, clinical, and demographic characteristics of children infected with *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1348-52.
43. Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr*;169(1):15-25.

44. Hirschl AM, Makristathis A. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicobacter* 2007;12 Suppl 2:6-11.
45. Hsu PI, Hwang IR, Cittelly D, et al. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Am J Gastroenterol* 2002;97(9):2231-8.
46. Hussein NR. *Helicobacter pylori* and gastric cancer in the Middle East: a new enigma? *World J Gastroenterol* 2010;16(26):3226-34.
47. IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:1-241.
48. Ito LS, Oba-Shinjo SM, Shinjo SK et al. Community-based familial study of *Helicobacter pylori* infection among healthy Japanese Brazilians. *Gastric Cancer* 2006;9(3):208-16.
49. Janjetic MA, Goldman CG, Barrado DA, et al. Decreasing trend of *Helicobacter pylori* infection in children with gastrointestinal symptoms from Buenos Aires, Argentina. *Helicobacter* 2011;16(4):316-9.
50. Jones KR, Joo YM, Jang S, et al. Polymorphism in the *CagA* EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J Clin Microbiol* 2009;47(4):959-68.
51. Karhukorpi J, Yan Y, Kolho KL, et al. *cagA*, *vacA* and *iceA* virulence genes of *Helicobacter pylori* isolates of children in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(10):790-3.
52. Kato S, Sugiyama T, Kudo M, et al. *CagA* antibodies in Japanese children with nodular gastritis or peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):68-70.
53. Kawakami E, Machado RS, Ogata SK, Langner M. Decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* infection during a 10-year period in Brazilian children. *Arq Gastroenterol* 2008;45(2):147-51.
54. Kawakami E, Machado RS, Reber M, Patricio FR. 13 C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing *helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35(1):39-43.
55. Kindermann A, Lopes AI. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter* 2009;14 Suppl 1:52-7.
56. Kodaira M, Escobar A, Grisi S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Rev Saúde Pública* 2002;36(3):356-69.
57. Koletzko S, Jones NL, Goodman KJ, et al. Evidence-based guidelines from ESPGHAN and NASPGHAN for *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:230-43.

58. Leite KR, Darini E, Canavez FC et al. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med J* 2005;123(3):113-8.
59. Linz B, Balloux F, Moodley Y, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007;445(7130):915-8.
60. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):772-4.
61. Lizza F, Pensabene L, Imeneo M, et al. Antral nodularity and positive *CagA* serology are distinct and relevant markers of severe gastric inflammation in children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002;7(1):46-52.
62. Machado RS, Patricio FR, Kawakami E. 13C-urea breath test to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children aged up to 6 years. *Helicobacter* 2004;9(1):39-45.
63. Magalhaes Queiroz DM, Lizza F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006;11 Suppl 1:1-5.
64. Magista AM, Ierardi E, Castellaneta S, et al. *Helicobacter pylori* status and symptom assessment two years after eradication in pediatric patients from a high prevalence area. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(3):312-8.
65. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56(6):772-81.
66. Malfertheiner P, Selgrad M. *Helicobacter pylori* infection and current clinical areas of contention. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26(6):618-23.
67. Marshall B, Warren J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-14.
68. Mattana CM, Vega AE, Escobar F et al. Genotypic, phenotypic, and clinical characteristics of isolates of *Helicobacter pylori* from San Luis, Argentina. *Folia Microbiol (Praha)* 2007;52(5):519-24.
69. Meine GC, Rota C, Dietz J et al. 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):41-5.
70. Melo ET, Lopes EP, Almeida JR, Albuquerque MF, Moura IM. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in medical students and residents in Recife, Brazil. *J Clin Gastroenterol* 2003;36(2):134-8.

71. Miranda ACP, Machado RS, da Silva EMK, Kawakami E. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children of low socioeconomic level in São Paulo. Sao Paulo Med J 2010;128(4):187-91.
72. Mohamed R, Hanafiah A, Rose IM, et al. *Helicobacter pylori cagA* gene variants in Malaysians of different ethnicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009;28(7):865-9.
73. Monteiro L, Oleastro M, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2009;14 Suppl 1:8-14.
74. Moraes MMC, da Silva GAP. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children. J Pediatr (Rio J) 2003;79(1):21-8.
75. Morris A, Ali MR, Brown P et al. *Campylobacter pylori* infection in biopsy specimens of gastric antrum: laboratory diagnosis and estimation of sampling error. J Clin Pathol 1989;42(7):727-32.
76. Ogata SK, Kawakami E, Patricio FR, et al. Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children and adolescents. Sao Paulo Med J 2001;119(2):67-71.
77. Oliveira AM, Queiroz DM, Rocha GA, Mendes EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. Am J Gastroenterol 1994;89(12):2201-4.
78. Oona M, Utt M, Nilsson I, et al. *Helicobacter pylori* infection in children in Estonia: decreasing seroprevalence during the 11-year period of profound socioeconomic changes. Helicobacter 2004;9(3):233-41.
79. Pacifico L, Anania C, Osborn JF, et al. Consequences of *Helicobacter pylori* infection in children. World J Gastroenterol 2010;16(41):5181-94.
80. Pajares JM, Gisbert JP. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. Rev Esp Enferm Dig 2006;98(10):770-85.
81. Park CY, Kwak M, Gutierrez O, et al. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. J Clin Microbiol 2003;41(7):3336-8.
82. Pereira-Lima JC, Marques DL, Pereira-Lima LF, Hornos AP, Rota C. The role of *cagA Helicobacter pylori* strains in gastro-oesophageal reflux disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004;16(7):643-7.
83. Portorreal A, Kawakami E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. Arq Gastroenterol 2002;39(3):198-203.
84. Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, et al. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. Int J Cancer 1998;78(2):135-9.

85. Queiroz DM, Mendes EN, Carvalho AS, et al. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. *J Infect Dis* 2000;181(2):626-30.
86. Ramis IB, Fonseca TL, de Moraes EP, et al. Molecular Basis of pathogenicity in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2010;48(10):3776-8.
87. Rick JR, Goldman M, Semino-Mora C, et al. In situ expression of *cagA* and risk of gastroduodenal disease in *Helicobacter pylori*-infected children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50(2):167-72.
88. Rocha GA, Rocha AM, Silva LD, et al. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. *Trop Med Int Health* 2003;8(11):987-91.
89. Rodrigues MN, Queiroz DM, Rodrigues RT, et al. *Helicobacter pylori* infection in adults from a poor urban community in northeastern Brazil: demographic, lifestyle and environmental factors. *Braz J Infect Dis* 2005;9(5):405-10.
90. Rodrigues MN, Queiroz DM, Rodrigues RT, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 2005;39(5):847-9.
91. Rodrigues RV, Corvelo TC, Ferrer MT. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children of different socioeconomic levels in Porto Velho, State of Rondônia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40(5):550-4.
92. Rota CA. *Helicobacter pylori*. In: Rossetti ML et al. editores. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p 89-101.
93. Rota CA, Pereira-Lima JC, Blaya C, Nardi NB. Consensus and variable region PCR analysis of *Helicobacter pylori* 3' region of *cagA* gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):606-12.
94. Rothenbacher D, Schultze V, Jahnig P, et al. Evidence of a rapid decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of a high risk group living in Germany. *Eur J Pediatr* 2004;163(6):339-40.
95. Santos IS, Boccio J, Santos AS, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and associated factors among adults in Southern Brazil: a population-based cross-sectional study. *BMC Public Health* 2005;5:118.
96. Saul C, Teixeira CR, Pereira-Lima JC, Torresini RJ. Prevalence reduction of duodenal ulcer: a Brazilian study. (retrospective analysis in the last decade: 1996-2005). *Arq Gastroenterol* 2007;44(4):320-4.
97. Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, et al. Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 2008;4(10):e1000180.
98. Sepulveda A, Peterson LE, Shelton J, et al. Histological patterns of gastritis in *H. pylori*-infected individuals with a family history of gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2002;97(6):1365-70.

99. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadakos K, et al. *CagA* and *VacA* polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2426-34.
100. Silva CP, Pereira-Lima JC, Oliveira AG, et al. Association of the presence of *Helicobacter* in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5615-8.
101. Silva DG, Tinoco EM, Rocha GA, et al. *Helicobacter pylori* transiently in the mouth may participate in the transmission of infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105(5):657-60.
102. Sousa MB, Luz LP, Moreira DM, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children evaluated at "Hospital de Clinicas de Porto Alegre", RS, Brazil. *Arq Gastroenterol* 2001;38(2):132-7.
103. Souto FJD, Fontes CJF, Rocha GA, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in a Rural Area of the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(2):171-74.
104. Souza DS, Cipolotti R, Filho MNS. Findings of gastroduodenal endoscopy in children and adolescents of Sergipe, Brazil. *Rev Paul Pediatr* 2008;26(4):361-4.
105. Spee LA, Madderom MB, Pijpers M, et al. Association between *helicobacter pylori* and gastrointestinal symptoms in children. *Pediatrics* 2010;125(3):e651-69.
106. Staat MA, Kruszon-Moran D, McQuillan GM, Kaslow RA. A population-based serologic survey of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in the United States. *J Infect Dis* 1996;174(5):1120-3.
107. Talarico S, Gold BD, Fero J, et al. Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1680-8.
108. Thomazini CM, Pinheiro NA, Pardini MI, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: distribution of *cagA* and *vacA* genotypes in patients with gastric carcinoma. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42(1):25-30.
109. Tiveljung A, Borch K, Jonasson J, et al. Identification of *Helicobacter* in gastric biopsies by PCR based on 16S rDNA sequences: a matter of little significance for the prediction of *H. pylori*-associated gastritis? *J Med Microbiol* 1998;47(8):695-704.
110. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388(6642):539-47.
111. Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, et al. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2256-60.

112. Veres G, Pehlivanoglu E. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter* 2007;12 Suppl 1:38-44.
113. Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1(8336):1273-5.
114. Wilschanski M, Schlesinger Y, Faber J, et al. Combination of *Helicobacter pylori* strain and tumor necrosis factor-alpha polymorphism of the host increases the risk of peptic ulcer disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45(2):199-203.
115. Wong BC, Lam SK, Wong WM, et al. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *Jama* 2004;291(2):187-94.
116. Xiah X, Talley NJ, O'Morain CA. Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after succesful eradication: nature and possible causes. *Dig Dis Sci* 1997;42(9):1821-34.
117. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7(11):629-41.
118. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, et al. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different H. pylori-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998;36(8):2258-63.
119. Yamaoka Y, et al. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med* 2008; 47(12): 1077-83.
120. Yamaoka Y, Reddy R, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence factor genotypes in children in the United States: clues about genotype and outcome relationships. *J Clin Microbiol* 2010;48(7):2550-1.
121. Zaterka S, Eisig JN, Chinzon D, Rothstein W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. *Helicobacter* 2007;12(1):82-8.

*** 7. ARTIGO ***

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR CEPAS DE *HELICOBACTER PYLORI* CAGA-POSITIVO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DO SUL DO BRASIL

Artigo submetido à publicação no *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (JPGN)

INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é um dos patógenos mais comuns em seres humanos, sendo responsável pela infecção de mais de 50% da população mundial¹. Apesar de a infecção estar diminuindo em populações pediátricas de diferentes regiões, com prevalências descritas de menos de 10% até 28%²⁻⁶, ao *H. pylori* ainda é atribuído um importante papel na patogênese da doença ulcerosa péptica, do adenocarcinoma gástrico e do linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) gástrica⁷ – doenças com reconhecidas e elevadas taxas de morbimortalidade. A infância constitui-se no período de maior aquisição da infecção^{1,2}. Uma vez ocorrida a colonização do estômago pela bactéria, ela lá tende a permanecer por décadas senão por toda a vida do hospedeiro⁸. No entanto, a grande maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática⁹. O amplo espectro de manifestação clínica é determinado pela interação de fatores imunológicos próprios do hospedeiro com fatores ambientais e pela prevalência e expressão de fatores de virulência da bactéria¹⁰.

O fator de virulência do *H.pylori* mais estudado é o denominado *cytotoxin-associated gene A* (*cagA*). O *cagA* é um dos genes da “ilha de patogenicidade” *cag* (*cag*-PAI), sendo um dos marcadores da sua presença¹¹. Codifica a proteína *CagA*, a qual induz a secreção de citocinas inflamatórias, em especial, a interleucina-8 (IL-8), um potente fator quimiotático e ativador de leucócitos polimorfonucleares e de macrófagos¹¹. Resulta, ao final, uma intensa resposta inflamatória no hospedeiro¹¹. No entanto, a colonização por cepas *cagA*-positivo não

é, necessariamente, um preditivo de uma apresentação clínica adversa¹¹. O gene *cagA* apresenta diversidade na sua estrutura, especialmente na região 3', onde se observa uma variável sequência de repetições de aminoácidos, fato que contribui para o entendimento dessa diferença de apresentação clínica observada entre indivíduos colonizados por cepas *cagA*-positivo^{11,12}.

A infecção por *H. pylori* tem distribuição geográfica universal, porém apresenta grande variabilidade na prevalência, nos fatores de virulência e na apresentação clínica de acordo com a população estudada^{8,13}. No Brasil, um país continental composto por etnias e hábitos culturais diversos, o comportamento da infecção também parece variar conforme demonstrado em diferentes estudos^{14,15}. Até o momento, não há estudos publicados envolvendo análise molecular dos fatores de virulência em crianças da Região Sul do país. O presente estudo foi realizado com o objetivo de descrever a prevalência da infecção por cepas de *H. pylori cagA*-positivo em um grupo de crianças e adolescentes submetidos a esofagogastroduodenoscopia (EGD) em Porto Alegre, cidade situada na região Sul do Brasil.

MÉTODOS

Pacientes

Foi realizado um estudo transversal de março de 2008 a janeiro de 2011 com uma amostra de crianças e adolescentes, encaminhados para a realização de EGD por sintomas gastrointestinais no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Hospital Moinhos de Vento, ambos situados em Porto Alegre, RS, Brasil. Critérios de inclusão: ter idade entre 1 e 18 anos; ter gastrite endoscópica nodular (achado associado à presença da bactéria em crianças^{2,16}) e/ou úlcera péptica e/ou teste da urease positivo e/ou presença de *H. pylori* na análise histológica. Foram excluídos do estudo pacientes com contra-indicação à realização de biópsia gástrica; com história de uso de antibióticos, de inibidor de bomba de próton (IBP), de

sais de bismuto e/ou de bloqueadores H2 nos 30 dias anteriores à realização da EGD e pacientes com história de uso de anti-inflamatório não-esteróide (AINE) e/ou ácido acetil salicílico (AAS) nos 3 dias anteriores à realização do exame.

Considerações Éticas

Os pais ou responsáveis dos pacientes incluídos receberam orientações sobre o estudo, sendo solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após. Um questionário com dados demográficos foi aplicado com cada participante. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa de ambos os hospitais em que foi realizado.

Endoscopia

Todos os procedimentos endoscópicos foram realizados pelo mesmo endoscopista (CHTF). Os principais achados endoscópicos foram apresentados em termos descritivos¹⁷. Foram coletados 5 fragmentos de biópsia gástrica (2 de corpo, 2 de antro e 1 da incisura angular) para análise histológica, conforme rotina assistencial, seguindo recomendação do Sistema Sydney modificado¹⁸. Além disso, quatro fragmentos de biópsia (2 de corpo e 2 de antro), um de cada segmento, foram coletados para teste da urease e análise molecular, respectivamente, a fim de diminuir a possibilidade de erro de amostragem².

Análise Histológica

Os fragmentos de biópsia gástrica foram fixados em solução contendo formol, desidratados e colocados em parafina. Secções dos blocos de parafina de 4 µm foram realizadas e coradas com hematoxilina-eosina e com Giemsa modificado para avaliação das alterações histológicas e pesquisa da infecção pelo *H. pylori*, conforme rotina assistencial. A classificação de gastrite foi realizada de acordo com o Sistema Sydney modificado¹⁸. A

análise histológica foi realizada por um mesmo e experiente patologista, sem o conhecimento dos resultados dos outros exames (LM).

Teste Rápido da Urease

O teste rápido da urease foi realizado utilizando-se 1 fragmento de biópsia do corpo e outro do antro gástrico os quais foram colocados num frasco com uma solução comercial contendo ureia a 10%, 1 ml de solução tamponada de Fosfato de Potássio e um indicador de pH e mantidos em temperatura ambiente (Uretest®, Renylab Ltda., Minas Gerais, Brasil). A leitura dos resultados foi realizada em até 12 horas após o procedimento inicial e uma mudança na cor da solução de amarelo para rosa foi considerada positiva.

Pesquisa do *H. pylori* e de cepas *cagA*-positivo pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Um fragmento de biópsia do corpo e outro do antro gástrico foram colocados em um frasco contendo solução salina fisiológica. A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) da bactéria foi realizada diretamente no fragmento de biópsia através do *QIAamp tissue kit* (Qiagen Inc., Santa Clarita, Calif.), de acordo com as instruções do fabricante. Gene betaglobina foi utilizado como controle da extração de DNA.

Para a detecção do *H. pylori* foram utilizados os *primers* 16S rRNA e *ureA*, previamente testados na nossa população, em adultos, com boa sensibilidade e especificidade¹⁹. O *primer CagA/ConF* (5'-GTGCCTGCTAGTTTGTCAGCG-3') e seu reverso *CagA/ConR* (5'-TTGGAAACCACCTTTTGTATTAGC-3') foram utilizados para detectar a presença do gene *cagA*. O produto final da reação com o *primer* 16S rRNA foi examinado através de eletroforese em gel de agarose a 3%. Já os produtos finais das reações que utilizaram os *primers ureA, CagA/ConF e CagA/ConR* foram examinados por

eletroforese em gel de agarose a 2%. Os resultados foram considerados positivos quando produtos com pesos moleculares equivalentes ao previamente esperado foram encontrados. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação.

Análise Estatística

As variáveis categóricas foram descritas por percentuais e as contínuas por média e desvio-padrão. Comparações entre as variáveis categóricas foram realizadas pelo teste do qui-quadrado e pelo teste exato de Fisher, conforme necessário. Comparações entre variáveis quantitativas foram realizadas através do teste *t*. Um nível de significância (α) de 0,05 foi estabelecido. Os dados do estudo foram analisados utilizando-se o programa estatístico SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

Foram incluídos para a pesquisa do gene *cagA* 98 indivíduos. Desses, 76 apresentaram evidência de infecção por *H. pylori* pelo teste da urease e/ou análise histológica. *H. pylori* foi identificado em 54 indivíduos através da análise molecular, os quais foram, por conseguinte, avaliados quanto à presença do gene *cagA*. A Figura 1 demonstra o fluxograma do estudo.

Entra Figura 1

As características clínicas e demográficas dessa amostra de 54 pacientes podem ser evidenciadas na Tabela 1.

Entra Tabela 1

A prevalência da infecção por cepas *cagA*-positivo na amostra estudada foi de 16/54 (29,6% IC 95% 18 a 43,6%). Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto às características clínicas e demográficas dos pacientes infectados por cepas *cagA*-positivo em relação aos infectados por cepas *cagA*-negativo. Observou-se que os indivíduos *cagA*-positivos apresentaram com maior frequência história familiar de úlcera péptica ($p = 0,04$). Classificando-se os pacientes em 3 grupos etários (de 1 a 4 anos, de 5 a 10 anos e acima de 10 anos), não se identificou um aumento significativo da *cagA* positividade com o aumento da idade (p de tendência = 0,43).

Gastrite endoscópica nodular e hiperplasia folicular linfoide foram percentualmente mais frequentes entre os pacientes *cagA*-positivos em comparação aos negativos (63% versus 50% e 63% versus 39%), embora sem atingir o nível de significância estabelecido ($p=0,59$ e $p=0,21$). Úlcera duodenal foi identificada em um único paciente, sendo este colonizado por cepa *cagA*-negativo. À análise histológica, não foram encontradas diferenças na densidade bacteriana e atividade inflamatória entre os grupos. Atrofia gástrica foi observada em 2 indivíduos, ambos colonizados por cepas *cagA*-negativo. Os principais achados endoscópicos e histológicos dessa amostra de pacientes podem ser evidenciados na Tabela 2.

Entra Tabela 2

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou uma menor prevalência de infecção por cepas de *H. pylori* *cagA*-positivo em crianças e adolescentes da região Sul do Brasil em comparação à prevalência observada em outras regiões brasileiras, onde a frequência dessas cepas variou de 67 a 78% em diferentes estudos, vide tabela 3²¹⁻²⁴. Ressalta-se que há limitações para fins de comparação entre esses estudos em virtude da grande heterogeneidade dos indivíduos

incluídos quanto a características clínicas e demográficas além da variedade de métodos diagnósticos empregados. No entanto, nota-se que a prevalência mais elevada de infecção por cepas *cagA*-positivo (78%) foi observada no único estudo que incluiu crianças assintomáticas e que utilizou sorologia por método imunoenzimático para avaliar a presença desse gene²⁴. Embora esse resultado possa não ser comparável ao nosso estudo sob o ponto de vista metodológico, visto que a sorologia pode encontrar anticorpos circulantes por longa data mesmo após uma erradicação espontânea da infecção²³, torna nossos achados ainda mais relevantes visto que nossa amostra incluiu pacientes com queixas gastrointestinais. Mesmo não havendo associação entre a presença da infecção com um sintoma específico², poderia se esperar que numa amostra mais “doente” a prevalência desse gene fosse maior²⁵ do que a encontrada (29,6%). Diferentes estudos realizados no Sul do Brasil, inclusive na nossa cidade, demonstraram uma prevalência de infecção por cepas *cagA*-positivo de 65 a 71% nos adultos avaliados^{19,26} e uma associação entre a presença desse gene e úlcera duodenal¹⁹ e câncer gástrico²⁷. A diferença observada entre adultos e crianças de uma mesma população pode denotar um diferente comportamento da infecção em crianças^{1,2,12}.

Entra Tabela 3

A colonização por cepas *cagA*-positivo parece aumentar com a idade²³, embora não tenhamos confirmado esse achado no nosso estudo. Queiroz et al.²³ discutem que em crianças a suscetibilidade à colonização por cepas *cagA*-positivo pode estar relacionada a diferenças na expressão de moléculas de adesão na mucosa gástrica, que se modificam com o passar do tempo. Sgouras et al.²⁸ observaram que crianças tendem a apresentar, de fato, uma mais alta prevalência de cepas *cagA*-negativo do que adultos e acreditam que esse seja um mecanismo utilizado pela bactéria a fim de permitir o sucesso da colonização, visto que essas cepas

induzem uma menor resposta inflamatória no hospedeiro. Outro aspecto, discutido por Cover e Blaser²⁹, refere-se às mudanças na prevalência do tipo de cepa predominante em algumas populações. A colonização predominante por cepas *cagA*-positivo tende a ser frequentemente observada em países em desenvolvimento enquanto que uma igual proporção de cepas *cagA*-positivo e *cagA*-negativo é observada em países desenvolvidos²⁹. Cepas *cagA*-positivo costumam apresentar menor resistência aos antimicrobianos²⁹. Os autores acreditam que o uso indiscriminado de antibióticos na atualidade pode justificar essa diferença de predomínio entre cepas observada em algumas populações²⁹.

O método aplicado também pode auxiliar no entendimento dos resultados. A extração do DNA da bactéria obtido a partir de isolados de múltiplas colônias de *H. pylori* cultivados em meio de cultura pode, teoricamente, levar a resultados diferentes quando comparada à técnica que realiza a extração diretamente nos fragmentos de biópsia gástrica³⁰, conforme realizado no nosso estudo. Dois dos quatro estudos brasileiros^{21,23} envolvendo a pesquisa de fatores de virulência do *H. pylori* em crianças utilizou a análise molecular a partir de isolados obtidos por meio de cultura, o que poderia justificar a menor prevalência observada na nossa população. A técnica de PCR quando realizada diretamente no fragmento de biópsia tem a tendência de subestimar a pesquisa de um determinado fator de virulência, especialmente quando há uma baixa densidade da bactéria no tecido³⁰. A infecção por múltiplas cepas de *H. pylori* também pode interferir na sensibilidade do método e, mesmo embora a pesquisa de outros fatores de virulência não tenha sido realizada no nosso estudo, essa possibilidade não pode ser desconsiderada³⁰. Deleções parciais no gene *cag*-PAI também podem levar a resultados falso-negativos^{9,30}.

Na literatura internacional, encontramos valores de prevalência semelhantes aos nossos em pacientes pediátricos da Jordânia e de Israel, com prevalências de cepas *cagA*-positivas de 26,4 e 25,5%, respectivamente^{13,31}. A presença dessas cepas não apresentou

associação com gastrite histológica mais pronunciada e úlcera duodenal nesses estudos^{13,31} em conformidade com nossos achados, porém ao contrário do que vem sendo descrito na literatura²¹⁻²³.

A presença de um dado fator de virulência da bactéria não é o único determinante da apresentação clínica, sendo esse o resultado da interação entre os fatores da bactéria com o hospedeiro e com o ambiente em que ele está inserido³⁰. Vários autores^{12,28,32} argumentam que polimorfismos dentro do gene *cagA* podem afetar a sua função biológica, justificando a falta de associação entre a presença do gene e uma maior severidade na apresentação clínica da doença, fato observado neste e em outros estudos^{12,28,33}. Também, não basta o gene estar presente simplesmente, mas, sim, que ele seja expresso no hospedeiro para que se possa avaliar o seu papel na patogênese das doenças³⁴.

Não podemos deixar de mencionar que em 22 indivíduos que tinham evidência de infecção por *H. pylori* no teste da urease e/ou na análise histológica, o DNA da bactéria não foi identificado pela técnica de PCR, mesmo utilizando-se 2 primers (*ureA* e *16s rRNA*) com elevadas sensibilidade e especificidade, já testados em isolados da nossa população¹⁹. Analisando esses 22 casos, verificamos que eles não apresentavam nenhuma diferença quanto às características clínicas, demográficas e endoscópicas em relação aos 54 *H. pylori* positivos pelo método PCR. No entanto, houve uma diferença estatisticamente significativa quanto à densidade bacteriana no tecido, que em 100% desses 22 casos e em 19 % dos 54 era leve ($p < 0,001$). Em todos os casos em que a bactéria não foi identificada foi realizado controle da extração de DNA, com o gene da betaglobina estando presente em 100% dos casos. Isso nos leva a pensar que, embora tenhamos coletado dois fragmentos de biópsia para análise molecular, erro de amostragem possa ter ocorrido, em virtude da distribuição irregular da bactéria no estômago. Na literatura, a pesquisa de *H. pylori* pelo método PCR é capaz de

detectar cerca de 10 a 100 células da bactéria³⁵. A sensibilidade dos testes considerados invasivos está associada com a densidade bacteriana no tecido³⁶.

Resolvemos extrapolar a sugestão de Sackett³⁷, para análise de dados perdidos em ensaios clínicos, para o nosso estudo, analisando nossos achados sob a perspectiva do melhor e pior cenário. Na perspectiva do melhor cenário, se incluirmos no denominador os 76 indivíduos com teste da urease e/ou análise histológica positiva, e considerarmos os 22 indivíduos com PCR negativo para *H. pylori* como *cagA*-negativos, a prevalência de cepas *cagA*-positivo pode ser de 21% (16/76) na amostra estudada. Já na perspectiva do pior cenário, a prevalência de cepas *cagA*-positivo pode ser de 50% (38/76) – se também incluirmos no denominador os 76 indivíduos com teste da urease e/ou análise histológica positiva e considerarmos os 22 indivíduos com PCR negativo para *H. pylori* como *cagA*-positivos. De qualquer forma, somente na perspectiva do pior cenário chegamos a valores próximos aos descritos anteriormente nos estudos brasileiros envolvendo crianças²¹⁻²⁴, o que nos leva a crer que nossa prevalência seja realmente mais baixa, vide figura 2.

Entra Figura 2

Por fim, a heterogeneidade clínica da nossa amostra, que incluiu pacientes com sintomas gastrointestinais diversos e com ampla faixa etária, pode ser considerada a maior limitação do nosso estudo. A baixa prevalência de cepas *cagA*-positivo, assim como a baixa prevalência de doenças observada na nossa amostra, podem servir de justificativa para a ausência de associação clínica entre a presença dessas cepas e gastrite crônica mais intensa e úlcera duodenal.

Concluindo, este estudo demonstrou uma baixa prevalência da infecção por cepas de *H. pylori* *cagA*-positivo em crianças e adolescentes submetidos à EGD no sul do Brasil. Não

houve associação entre a presença de cepas *cagA*-positivo e apresentação clínica adversa na amostra estudada.

REFERENCIAS:

1. Talarico S, Gold BD, Fero J, et al. Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1680-8.
2. Koletzko S, Jones NL, Goodman KJ, et al. Evidence-based guidelines from ESPGHAN and NASPGHAN for *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:230-43.
3. Rothenbacher D, Schultze V, Jahnig P, et al. Evidence of a rapid decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of a high risk group living in Germany. *Eur J Pediatr* 2004;163(6):339-40.
4. Janjetic MA, Goldman CG, Barrado DA, et al. Decreasing trend of *Helicobacter pylori* infection in children with gastrointestinal symptoms from Buenos Aires, Argentina. *Helicobacter* 2011;16(4):316-9.
5. Kawakami E, Machado RS, Ogata SK, Langner M. Decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* infection during a 10-year period in Brazilian children. *Arq Gastroenterol* 2008;45(2):147-51.
6. Oona M, Utt M, Nilsson I, et al. *Helicobacter pylori* infection in children in Estonia: decreasing seroprevalence during the 11-year period of profound socioeconomic changes. *Helicobacter* 2004;9(3):233-41.
7. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* 2009;119(9):2475-87.
8. Yamaoka Y, Reddy R, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence factor genotypes in children in the United States: clues about genotype and outcome relationships. *J Clin Microbiol* 2010;48(7):2550-1.
9. Hsu PI, Hwang IR, Citty D, et al. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Am J Gastroenterol* 2002;97(9):2231-8.
10. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388(6642):539-47.
11. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7(11):629-41.
12. Mohamed R, Hanafiah A, Rose IM, et al. *Helicobacter pylori* *cagA* gene variants in Malaysians of different ethnicity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(7):865-9.
13. Hussein NR. *Helicobacter pylori* and gastric cancer in the Middle East: a new enigma? *World J Gastroenterol* 2010;16(26):3226-34.

14. Dattoli VC, Veiga RV, da Cunha SS et al. Seroprevalence and potential risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children. *Helicobacter* 2010;15(4):273-8.
15. Souto FJD, Fontes CJF, Rocha GA, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in a Rural Area of the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(2):171-74.
16. Bahu MG, Silveira TR, Maguilnick I, Ulbrich-Kulczynski J. Endoscopic nodular gastritis: an endoscopic indicator of high-grade bacterial colonization and severe gastritis in children with *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36(2):217-22.
17. Dohil R, Hassall E, Jevon G, Dimmick J. Gastritis and gastropathy of childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29(4):378-94.
18. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20(10):1161-81.
19. Rota CA, Pereira-Lima JC, Blaya C, Nardi NB. Consensus and variable region PCR analysis of *Helicobacter pylori* 3' region of *cagA* gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):606-12.
20. Staat MA, Kruszon-Moran D, McQuillan GM, Kaslow RA. A population-based serologic survey of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in the United States. *J Infect Dis* 1996;174(5):1120-3.
21. Ashour AA, Gusmão VR, Magalhães PP, et al. *VacA* alleles, *cagA*, and duodenal ulcer in children in Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 2002;38(2):79-85.
22. Gatti LL, de Lábio R, Silva LC et al. *cagA* positive *Helicobacter pylori* in Brazilian Children Related to Chronic Gastritis. *Braz J Infect Dis* 2006;10(4):254-8.
23. Queiroz DM, Mendes EN, Carvalho AS, et al. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. *J Infect Dis* 2000;181(2):626-30.
24. Cartágenes VD, Martins LC, Carneiro LM et al. *Helicobacter pylori* in children and association with *CagA* strains in mother-child transmission in the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(3):298-302.
25. Elitsur Y, Neace C, Werthammer MC, et al. Prevalence of *CagA*, *VacA* antibodies in symptomatic and asymptomatic children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 199; 4: 100-5.
26. Ramis IB, Fonseca TL, de Moraes EP, et al. Molecular Basis of pathogenicity in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2010;48(10):3776-8.

27. Meine GC, Rota C, Dietz J et al. 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):41-5.
28. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadakos K, et al. *CagA* and *VacA* polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2426-34.
29. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology* 2009;136(6):1863-73.
30. Park CY, Kwak M, Gutierrez O, et al. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3336-8.
31. Benenson S, Halle D, Rudensky B, et al. *Helicobacter pylori* genotypes in Israeli children: the significance of geography. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35(5):680-4.
32. Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, et al. Higher number of *Helicobacter pylori* *CagA* EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol* 2011; 11:61.
33. Gold, BD, van Doorn LJ, Guarner J, et al. Genotypic, clinical, and demographic characteristics of children infected with *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1348-52.
34. Rick JR, Goldman M, Semino-Mora C, et al. In situ expression of *cagA* and risk of gastroduodenal disease in *Helicobacter pylori*-infected children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50(2):167-72.
35. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, et al. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 192-200.
36. van Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, et al. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 13-7.
37. Sackett DL. The tactics of performing therapeutic trials. In: Haynes RB, Sackett DL, Guyatt GH, et al, eds. *Clinical epidemiology: how to do clinical practice research*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 66-172.

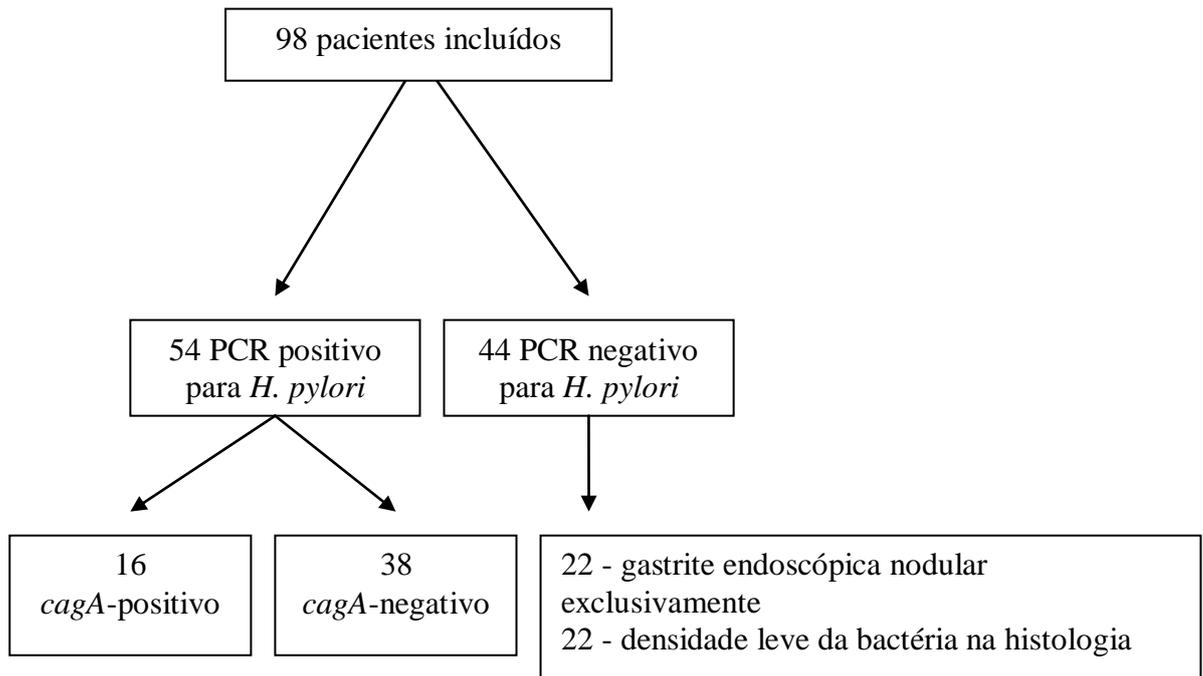


Figura 1: Fluxograma do estudo

Tabela 1: Características dos 54 indivíduos *H.pylori* positivos pelo método PCR

Parâmetro	Característica	Resultado
Idade*		9,8 ± 4,4 (1,8 – 18,5)
Gênero†	Masculino	27 (50)
	Feminino	27 (50)
Indicação EGD†	Dor Abdominal	18 (34,6)
	Vômitos/DRGE	13 (24,9)
	Investigação má absorção	11 (21,2)
	Hemorragia Digestiva	7 (13,4)
Suprimento de Água†	Outras	5 (5,9)
	Rede Pública	47 (94)
Rede de Esgoto†	Poço Artesiano	3 (6)
	Sim	47 (94)
Escolaridade da Mãe†	Não	3 (6)
	≤ 8 anos	29 (60)
	9 a 11 anos	14 (29)
Escolaridade do Pai†	> 11 anos	5 (11)
	≤ 8 anos	33 (72)
	9 a 11 anos	7 (15)
Índice Pessoas/Peça†‡	> 11 anos	6 (13)
	≤ 0,5	4 (8)
	0,5 a 0,99	17 (35)
História Familiar de Úlcera Péptica†	1 a 1,99	24 (49)
	≥ 2	4 (8)
	Sim	15 (29)
História Familiar de Câncer Gástrico†	Não	37 (71)
	Sim	10 (19)
	Não	42 (81)

onde: PCR = reação em cadeia da polimerase; EGD = esofagogastroduodenoscopia; DRGE = doença do refluxo gastroesofágico.

* Média ± Desvio-Padrão e (Mínimo e Máximo)

† Frequência observada (% = percentual dos válidos)

‡ excetuando-se banheiro. Baseado em Staat et al²⁰.

Tabela 2: Principais achados endoscópicos e histológicos dos 54 indivíduos infectados por cepas de *H. pylori* *cagA*-positivo e *cagA*-negativo

			<i>cagA</i> -positivo (n = 16) n (% válidos)	<i>cagA</i> -negativo (n = 38) n (% válidos)	Valor p
Achado Endoscópico	Normal		5 (31)	5 (13)	0,14
	Gastrite Nodular		10 (63)	19 (50)	0,59
	Outras gastrites		2 (13)	12 (32)	0,19
	Úlcera Duodenal		0	1	NR*
Achado Histológico	Classificação Gastrite	Leve	6 (38)	17 (45)	0,89
		Moderada	9 (56)	19 (50)	
		Acentuada	1 (6)	2 (5)	
	Atividade	Leve	9 (56)	23 (61)	0,78
		Moderada	7 (44)	13 (34)	
		Acentuada	0	2 (5)	
	Densidade <i>H.</i> <i>pylori</i>	Leve	3 (19)	7 (18)	0,89
		Moderada	11 (69)	27 (71)	
		Acentuada	2 (12)	4 (11)	
	Hiperplasia Linfoide	Sim	10 (63)	15 (39)	0,21
		Não	6 (37)	23 (61)	
	Metaplasia Intestinal	Sim	0	0	NR*
	Não	16 (100)	38 (100)		
Atrofia	Sim	0	2 (5)	NR*	
	Não	16 (100)	36 (95)		

* NR = não realizado devido ao pequeno número de observações.

n = frequência observada; % percentual dos válidos.

Tabela 3: Prevalência de cepas *cagA*-positivo em crianças no Brasil

Autor, ano Local do estudo	Método utilizado para genotipagem	Prevalência n /total (%) IC95%	Apresentação Clínica (n) e <i>cagA</i> positividade
Queiroz et al., 2000 Belo Horizonte, MG	PCR a partir de isolados obtidos por meio de cultura	60 /80 (75) 64 a 81	Úlcera duodenal (27) 100% <i>cagA</i> -positivos
Ashour et al., 2002 Belo Horizonte, MG	PCR a partir de isolados obtidos por meio de cultura	38 /55 (69) 55 a 81	Úlcera duodenal (24) 94,7% <i>cagA</i> -positivos
Gatti et al., 2006 Marília, SP	PCR direto no fragmento de biópsia	38 /57 (67) 53 a 79	Gastrite crônica (29) 69% <i>cagA</i> -positivos
Cartagenes et al.,2009 Belém, PA	Pesquisa do anticorpo anti- <i>CagA</i> Método ELISA	39 /50 (78) 64 a 89	Não descrito
<i>Nosso estudo</i>	PCR direto no fragmento de biópsia	16 /54 (29,6) 18 a 43,6	Sem associação estatisticamente significativa

PCR= reação em cadeia da polimerase; ELISA = ensaio imunoenzimático; n = frequência observada; n /total = frequência/total de casos avaliados; % = percentual; IC95% = intervalo de confiança de 95%.

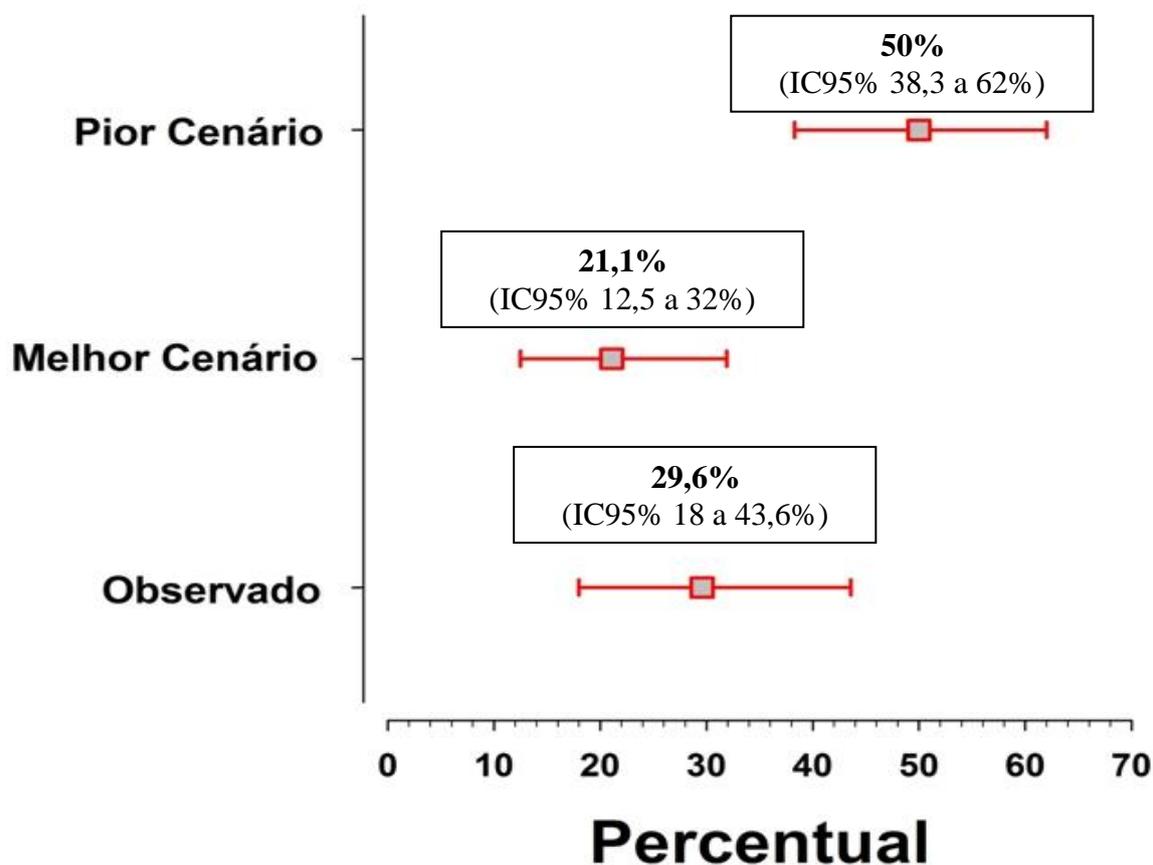


Figura 2: Prevalência de cepas de *H. pylori* *cagA*-positivo em três possíveis cenários, segundo Sackett³⁷, onde:

Pior cenário – considerando os 22 indivíduos com teste da urease e/ou análise histológica positiva para *H. pylori* e PCR negativo como sendo *cagA*-positivos (38/76);

Melhor cenário – considerando os 22 indivíduos com teste da urease e/ou análise histológica positiva para *H. pylori* e PCR negativo como sendo *cagA*-negativos (16/76).

IC 95% = Intervalo de confiança de 95%

*** 8. CONCLUSÕES ***

A prevalência da infecção por cepas de *H. pylori cagA*-positivo na amostra de crianças e adolescentes submetidas à EGD por queixas gastrointestinais em Porto Alegre, RS estudada foi de 29,6 % (IC95% 18 a 43,6%).

Nossos resultados sugerem uma menor prevalência da infecção por cepas de *H. pylori cagA*-positivo no sul do Brasil em relação aos estudos anteriormente realizados com amostras de crianças e de adolescentes de outras regiões brasileiras.

Observou-se que os indivíduos infectados por cepas de *H. pylori cagA*-positivo apresentam com maior frequência história familiar de úlcera péptica em relação aos infectados por cepas *cagA*-negativo.

Não foram encontradas diferenças nas características clínicas e demográficas avaliadas bem como nos achados endoscópicos e histológicos entre os indivíduos infectados por cepas *cagA*-positivo e os infectados por cepas *cagA*-negativo.

A presença de cepas de *H. pylori cagA*-positivo não se associou, de forma estatisticamente significativa, com gastrite endoscópica nodular.

A presença de cepas de *H. pylori cagA*-positivo não se associou, de forma estatisticamente significativa, com uma classificação e atividade de gastrite específica na análise histológica assim como não se associou com a densidade de bactéria encontrada no tecido.

*** ANEXO A ***

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Prevalência do gene *cagA* do *Helicobacter pylori* (Hp) em crianças e adolescentes infectados submetidos à endoscopia digestiva alta”

Pesquisadora: dra Juliana Ghisleni de Oliveira – telefone para contato: 9249-2569

Orientadora: dra Themis Reverbel da Silveira – telefone para contato: 2101-8749

Senhores pais e/ou responsáveis de

O seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa que tem o objetivo de estudar a presença de um tipo de bactéria (*Helicobacter pylori*) que pode estar relacionada ao desenvolvimento de úlcera no estômago e no intestino e de câncer no estômago.

Por indicação do seu médico assistente, o seu filho (a) está sendo submetido (a) à endoscopia digestiva alta, exame que permite a visualização direta do esôfago, estômago e parte inicial do intestino, sendo possível, desta forma, o diagnóstico de doenças como gastrites, úlceras e tumores. Porém, existem alguns diagnósticos que só são realizados através da coleta de pequenos fragmentos (biópsias) destes órgãos e da análise destes fragmentos por médico patologista, como a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*. Por esta razão, são coletados biópsias do esôfago, estômago e duodeno de todas as crianças e adolescentes que realizam endoscopia digestiva, a menos que eles apresentem alguma contra-indicação clínica (por exemplo, problema na coagulação do sangue – “sangue fino”). Os riscos de complicação da biópsia são raros, porém incluem: bacteremia (presença de bactéria no sangue), transmissão de infecções e hemorragia (sangramento abundante).

O procedimento endoscópico será realizado pela equipe de endoscopia do hospital e acompanhado por mim, a pesquisadora. A participação no estudo consiste em responder um questionário com alguns dados sobre as condições de moradia, renda familiar, nível de escolaridade etc. e em coletar quatro biópsias de estômago a mais do que normalmente é realizado de rotina. Caso o seu filho (a) apresente a bactéria *Helicobacter pylori* no estômago, este material “extra” será enviado para um laboratório para análise do “tipo” de bactéria (se é do tipo mais agressivo).

Serão garantidos sigilo e anonimato de todos os dados do questionário, endoscopia, biópsia e análise da bactéria. O seu consentimento é voluntário e a sua não aceitação não prejudicará e/ou modificará o atendimento prestado ao seu filho (a). Não haverá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicito o seu consentimento para que seu filho (a) participe desta pesquisa.

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, _____, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento para que meu (minha) filho (a) participe da pesquisa

Assinatura Pai, Mãe e/ou responsável

Assinatura Pesquisadora

Data: / /

*** ANEXO B ***

QUESTIONÁRIO

Número:

Nome do paciente:

Prontuário:

Data de Nascimento:

Idade:

Sexo:

Cor:

Procedência:

Número de pessoas que moram na casa:

Número de cômodos da casa:

Renda Familiar mensal:

Rede de esgoto () Sim () Não

Suprimento de água () Rede pública () Poço artesiano

Nível de escolaridade pai () Nível de escolaridade mãe ()

1 – analfabeto, 2 – ensino fundamental incompleto, 3 – ensino fundamental completo,
 4 – ensino médio incompleto, 5 – ensino médio completo, 6 – ensino superior incompleto,
 7 – ensino superior completo

Uso de antibióticos nos últimos 30 dias () Sim () Não Qual:

História familiar de úlcera gástrica () Sim () Não Quem:

História familiar de úlcera duodenal () Sim () Não Quem:

História familiar de câncer gástrico () Sim () Não Quem:

História familiar de gastrite () Sim () Não Quem:

Realizou EGD: () Sim () Não

Indicação EGD:

Anestesia Geral () Sedação ()

Instrumento utilizado:

Descrição:

Esôfago:

Estômago:

Duodeno:

Conclusões:

*** ANEXO C ***

Tabela 1a: Comparação das características clínicas e demográficas entre os indivíduos *H. pylori* positivo e *H. pylori* negativo pelo método PCR

Parâmetro	Característica	<i>H. pylori</i> POS (n = 54) n (% válidos)	<i>H. pylori</i> NEG (n = 44) n (% válidos)	Total (n = 98) n (% válidos)	Valor p
Idade*		9,8 ± 4,4	9,0 ± 4,2	9,5 ± 4,4	0,39
Gênero†	Masculino	27 (50)	25 (57)	52 (53)	0,63
	Feminino	27 (50)	19 (43)	43 (47)	
Indicação EGD†	Dor Abdominal	18 (34,6)	21 (48)	39 (39,8)	0,07
	Vômitos/DRGE	13 (24,9)	3 (7)	16 (16,3)	
	Investigação má absorção	11 (21,2)	5 (11)	16 (16,3)	
	Hemorragia Digestiva	7 (13,4)	9 (20)	16 (16,3)	
	Outras	5 (5,9)	6 (14)	11 (11,3)	
Suprimento de Água†	Rede Pública	47 (94)	37 (84)	84 (90)	0,29
	Poço Artesiano	3 (6)	6 (16)	9 (10)	
Rede de Esgoto†	Sim	47 (94)	38 (88)	85 (91)	0,46
	Não	3 (6)	5 (12)	8 (9)	
Escolaridade da Mãe†	≤ 8 anos	29 (60)	25 (61)	54 (61)	0,94
	9 a 11 anos	14 (29)	11 (27)	25 (28)	
	> 11 anos	5 (11)	5 (12)	10 (11)	
Escolaridade do Pai†	≤ 8 anos	33 (72)	26 (63)	59 (68)	0,25
	9 a 11 anos	7 (15)	12 (29)	19 (22)	
	> 11 anos	6 (13)	3 (8)	9 (10)	
Índice Pessoas/Peça†‡	≤ 0,5	4 (8)	1 (3)	5 (5)	0,27
	0,5 a 0,99	17 (35)	11 (26)	28 (31)	
	1 a 1,99	24 (49)	22 (52)	46 (51)	
	≥ 2	4 (8)	8 (19)	12 (13)	
História Familiar de Úlcera Péptica†	Sim	15 (29)	20 (47)	35 (37)	0,11
	Não	37 (71)	23 (53)	60 (66)	
História Familiar de Câncer Gástrico†	Sim	10 (19)	7 (16)	17 (18)	0,91
	Não	42 (81)	36 (84)	78 (82)	

onde: PCR = reação em cadeia da polimerase; EGD = esofagogastroduodenoscopia; DRGE = doença do refluxo gastroesofágico.

* Média ± Desvio-Padrão e (Mínimo e Máximo)

† Frequência observada (% = percentual dos válidos)

‡ excetuando-se banheiro. Baseado em Staat et al (1996).

*** ANEXO D ***

Tabela 2a: Comparação dos principais achados endoscópicos e histológicos entre os indivíduos *H. pylori* positivo e *H. pylori* negativo pelo método PCR

		<i>H. pylori</i> POS (n = 54) n (% válidos)	<i>H. pylori</i> NEG (n = 44) n (% válidos)	Total (n = 98) n (% válidos)	Valor p	
Achado Endoscópico	Normal	10 (19)	8 (18)	18 (18)	> 0,99	
	Gastrite Nodular	29 (54)	22 (50)	51 (52)	0,87	
	Outras gastrites	14 (26)	15 (34)	29 (29,5)	0,51	
	Úlcera Gástrica	0	1 (2)	1 (1)	0,44	
	Úlcera Duodenal	1 (2)	3 (7)	4 (4)	0,32	
Achado Histológico	Gastrite Crônica	Sim	54 (100)	27 (61)	81 (83,5)	< 0,001
		Não	0	17 (39)	17 (16,5)	
	Classificação Gastrite	Leve	23 (43)	27 (100)	50 (62)	< 0,001
		Moderada	28 (52)	0	28 (35)	
		Acentuada	3 (5)	0	3(4)	
	Atividade	Ausente	0	3 (11)	3 (4)	< 0,001
		Leve	32 (59)	24 (89)	56 (69)	
		Moderada	20 (37)	0	20 (25)	
		Acentuada	2 (4)	0	2 (2)	
	Presença <i>H. pylori</i>	Sim	54 (100)	22 (50)	76 (77,5)	< 0,001
		Não	0	22 (50)	22 (22,5)	
	Densidade <i>H. pylori</i>	Leve	10 (19)	22 (100)	32 (42)	< 0,001
		Moderada	38 (70)	0	38 (50)	
		Acentuada	6 (11)	0	6 (8)	
	Hiperplasia Linfoide	Sim	25 (46)	6 (14)	31 (32)	0,002
Não		29 (54)	38 (86)	67 (68)		
Metaplasia Intestinal	Sim	0	2 (4,5)	2 (2)	0,19	
	Não	54 (100)	42 (95,5)	96 (98)		
Atrofia	Sim	2 (4)	1 (2)	3 (3)	> 0,99	
	Não	52 (96)	43 (98)	95 (97)		

onde: n = número de observações; % = percentual; (% válidos) = percentual de observações válidas.

*** ANEXO E ***

Tabela 3a: Comparação das características clínicas e demográficas entre os indivíduos procedentes do HCPA e os procedentes do HMV

Parâmetro	Característica	HCPA (n = 84) n (% válidos)	HMV (n = 14) n (% válidos)	Total (n = 98) n (% válidos)	Valor p
Idade*		9,5 ± 4,3	9,1 ± 4,8	9,5 ± 4,4	0,70
Gênero†	Masculino	46 (55)	6 (43)	52 (53)	0,59
	Feminino	38 (45)	8 (57)	43 (47)	
Indicação EGD†	Dor Abdominal	32 (38)	7 (50)	39 (39,8)	0,24
	Vômitos/DRGE	13 (15)	3 (21)	16 (16,3)	
	Investigação má absorção	15 (18)	1 (8)	16 (16,3)	
	Hemorragia Digestiva	16 (19)	0	16 (16,3)	
	Outras	8 (10)	3 (21)	11 (11,3)	
Suprimento de Água†	Rede Pública	72 (90)	12 (92)	84 (90)	> 0,99
	Poço Artesiano	8 (10)	1 (8)	9 (10)	
Rede de Esgoto†	Sim	72 (90)	13 (100)	85 (91)	0,59
	Não	8 (10)	0	8 (9)	
Escolaridade da Mãe†	≤ 8 anos	53 (69)	1 (8)	54 (61)	< 0,001
	9 a 11 anos	20 (26)	5 (42)	25 (28)	
	> 11 anos	4 (5)	6 (50)	10 (11)	
Escolaridade do Pai†	≤ 8 anos	58 (77)	1 (9)	59 (68)	< 0,001
	9 a 11 anos	15 (20)	4 (33)	19 (22)	
	> 11 anos	2 (3)	7 (58)	9 (10)	
Índice Pessoas/Peça†‡	≤ 0,5	2 (3)	3 (25)	5 (5)	0,18
	0,5 a 0,99	24 (30)	4 (33)	28 (31)	
	1 a 1,99	43 (54)	3 (25)	46 (51)	
	≥ 2	10 (13)	2 (17)	12 (13)	
História Familiar de Úlcera Péptica†	Sim	28 (35)	7 (50)	35 (37)	0,42
	Não	53 (65)	7 (50)	60 (66)	
História Familiar de Câncer Gástrico†	Sim	14 (17)	3 (21)	17 (18)	0,71
	Não	67 (83)	11 (37)	78 (82)	

onde: PCR = reação em cadeia da polimerase; EGD = esofagogastroduodenoscopia; DRGE = doença do refluxo gastroesofágico.

* Média ± Desvio-Padrão e (Mínimo e Máximo)

† Frequência observada (% = percentual dos válidos)

‡ excetuando-se banheiro. Baseado em Staat et al (1996).

*** ANEXO F ***

Tabela 4: Comparação dos achados endoscópicos e histológicos entre os indivíduos procedentes do HCPA e os procedentes do HMV

			HCPA (n = 84) n (% válidos)	HMV (n = 14) n (% válidos)	Total (n = 98) n (% válidos)	Valor p
Achado Endoscópico	Normal		17 (20)	1 (7)	18 (18)	0,46
	Gastrite Nodular		38 (45)	13 (93)	51 (52)	< 0,001
	Outras gastrites		29 (35)	0	29 (29,5)	0,009
	Úlcera Gástrica		1 (1)	0	1 (1)	> 0,99
	Úlcera Duodenal		3 (4)	1 (7)	4 (4)	0,46
Achado Histológico	Gastrite Crônica					
	Sim		69 (82)	12 (86)	81 (83,5)	> 0,99
	Não		15 (18)	2 (14)	17 (16,5)	
	Classificação					
	Gastrite					
	Leve		41 (59)	9 (75)	50 (62)	0,71
	Moderada		25 (37)	3 (25)	28 (35)	
	Acentuada		3 (4)	0	3(4)	
	Atividade					
	Ausente		3 (4)	0	3 (4)	0,86
	Leve		48 (70)	8 (67)	56 (69)	
	Moderada		16 (23)	4 (33)	20 (25)	
	Acentuada		2 (3)	0	2 (2)	
	Presença					
	<i>H. pylori</i>					
Sim		67 (80)	9 (64)	76 (77,5)	0,51	
Não		17 (20)	5 (36)	22 (22,5)		
Densidade						
<i>H. pylori</i>						
Leve		25 (37)	7 (78)	32 (42)	0,09	
Moderada		36 (54)	2 (22)	38 (50)		
Acentuada		6 (9)	0	6 (8)		
Hiperplasia						
Linfoide						
Sim		22 (27)	7 (50)	29 (30)	0,11	
Não		62 (73)	7 (50)	69 (70)		
Metaplasia						
Intestinal						
Sim		2 (2)	0	2 (2)	> 0,99	
Não		82 (98)	14 (100)	96 (98)		
Atrofia						
Sim		3 (4)	0	3 (3)	> 0,99	
Não		81 (96)	14 (100)	95 (97)		

onde: n = número de observações; % = percentual; (% válidos) = percentual de observações válidas.

*** ANEXO G ***

Tabela 5: Comparação do resultado da análise molecular entre os indivíduos procedentes do HCPA e os procedentes do HMV

Parâmetro		HCPA (n = 84) n (%)	HMV (n = 14) n (%)	Valor p
Pesquisa <i>H. pylori</i> pelo método PCR	Positivo	45 (54)	9 (64)	0,64
	Negativo	39 (46)	5 (36)	
Gene <i>cagA</i>	Positivo	13 (12)	3 (21)	0,69
	Negativo	71 (88)	11 (79)	

onde: n = número de observações; (%) = percentual.