

**MARCELO PILONETTO**

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO  
*Helicobacter pylori* EM DOADORES DE SANGUE DE CURITIBA E  
REGIÃO METROPOLITANA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara José Taborda  
Messias-Reason

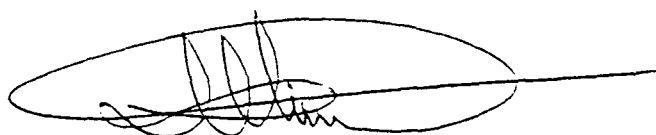
CURITIBA  
2001

**“SOROEPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO *HELICOBACTER PYLORI* EM CURITIBA ”.**

por

***Marcelo Pilonetto***

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de mestre no Programa de  
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão  
Examinadora



Prof. Dra. Iara José T. de Messias (Orientadora/Presidente)



Prof.<sup>a</sup> Dra. Lorete Kotze (PUC-PR)



Prof. Dr. Sergio O Ioshii (UFPR)

Curitiba, 10 de dezembro de 2001

## MEMORIAL

Marcelo Pilonetto é Farmacêutico-Bioquímico formado em 1993 pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Especialista em Bacteriologia pela mesma instituição (1994). Desde então exerceu a atividade de bacteriologista em diversos laboratórios de Curitiba (Hospital de Clínicas – UFPR - de 1993 a 1995; Hospital Geral de Curitiba - 1994; Laboratório Champagnat – de 1993 a 1995; GR Análises Clínicas e Toxicológicas – de 1995 a 1998). É assessor científico e Diretor técnico da Newprov Produtos para Laboratórios Ltda desde 1995, onde também atua no setor de Desenvolvimento e Pesquisa da empresa. Atualmente é responsável pelo Setor de Microbiologia do LabAC – Laboratório de Bacteriologia e Análises Clínicas. É assessor e consultor científico da empresa Microscience Assessoria para Laboratórios, onde exerce também o cargo de Diretor Geral. Já prestou assessoria e consultoria para diversos Laboratórios de Análises Clínicas e empresas de Cosméticos, especificamente na área de Controle de Qualidade Microbiológico.

Na área acadêmica leciona as disciplinas de Microbiologia Clínica, Imunologia, desde 1995, para os alunos de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Também é coordenador e professor do Curso de Especialização em Microbiologia Clínica da PUCPR / NEBaC desde 1997. Publicou o livro *Manual de Procedimentos Laboratoriais em Microbiologia*, em 1998.

A pesquisa realizada na presente dissertação propiciou a publicação de dois resumos, um apresentado no *XIV International Workshop on Gastrointestinal Pathology and Helicobacter pylori* (Strasbourg, FR – Setembro de 2001), o qual foi agraciado com o prêmio *Young Scientist Award* e encontra-se publicado em suplemento da revista *GUT*. O outro resumo foi apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia (Foz do Iguaçu, PR – Novembro de 2001).

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Iara J. T. Messias-Reason, pelo apoio, paciência, horas de dedicação na correção de textos e por todas sugestões apresentadas.

À Coordenação do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná - UFPR pela oportunidade concedida.

À Direção do Curso de Farmácia e Bioquímica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR pelo incentivo e estímulo sempre presentes.

À Dra. Lorete M. S. Kotze pelas sugestões e colaboração nas diversas etapas deste trabalho.

À Andressa Sprada pelo auxílio na parte laboratorial, de busca e arquivamento de dados e das amostras.

À equipe do Hemobanco de Curitiba pela concessão das amostras e em especial à Dra. Simone Nappa e ao Dr. Paulo Tadeu Rodrigues de Almeida.

À equipe do serviço de endoscopia do Hospital Cajuru pela coleta de amostras e fornecimento de resultados e em especial a Dra. Ana Paula Brabila Rodrigues.

Ao prof. Dr. Aguinaldo José Nascimento pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao prof. Dr. Antônio Pádua Gomes da Silva pelo auxílio nas análises histopatológicas.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas Cajuru e à ao Serviço de Análises Clínicas do HC-UFPR (setor de Sorologia) por possibilitar a leitura dos testes sorológicos e

À minha esposa Daniela e aos meus filhos Camila, Marcelo Henrique e Lorenzo, pela compreensão durante minha ausência e por tornarem minha vida muito mais significativa ( $p < 0,00000000001$ ).

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E QUADROS</b> .....	iv
<b>LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS</b> .....	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	03
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	04
3.1 HISTÓRICO.....	04
3.2 O <i>Helicobacter pylori</i> .....	07
3.2.1 Morfologia Celular e da Colônia .....	07
3.2.2 Propriedades Fisiológicas e Bioquímicas .....	09
3.2.3 Taxonomia .....	09
3.3 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO <i>Hp</i> .....	11
3.3.1 Fatores Envolvidos na Colonização da Mucosa Gástrica .....	12
3.3.2 Permanência e Patogênese .....	15
3.4 DOENÇAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO <i>Hp</i> .....	18
3.5 EPIDEMIOLOGIA .....	22
3.5.1 Transmissão.....	22
3.5.2 Taxa de Infecção Anual e Outros Fatores .....	24
3.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	27
3.6.1 Métodos invasivos.....	28
3.6.2 Métodos não invasivos.....	31
3.7 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	40
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	77

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1	- Morfologia espiralada do <i>Helicobacter pylori</i> .....	07
Figura 2	- Diferentes morfologias do <i>H. pylori</i> aderidas a pérolas magnéticas .....	08
Figura 3	- Morfologia da colônia de <i>H. pylori</i> em ágar sangue .....	08
Quadro 1	- Espécies de <i>Helicobacter</i> associadas à mucosa gastrointestinal .....	10
Figura 4	- Aderência e patogênese do <i>H. pylori</i> na mucosa gástrica .....	14
Figura 5	- Estimativa mundial da freqüência da infecção pelo <i>H. pylori</i> , nas diferentes doenças gastrointestinais .....	21
Figura 6	- Distribuição geográfica da infecção pelo <i>H. pylori</i> em adultos, no mundo .....	26
Figura 7	- Sistema comercial utilizado para a detecção de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> .....	36
Figura 8	- Calibradores utilizados na detecção de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> .....	36
Figura 9	- Resultados do ELISA (Seradyn®), realizados em duplicata .....	37
Figura 10	- Kit utilizado para confirmação da pesquisa de anti- <i>H. pylori</i> em doadores anti-Hbc e anti-Hbs positivos .....	37
Figura 11	- Resultados do ELISA (Monobid®) realizados em duplicata, antes e depois da adição da solução STOP .....	39

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1	- Prevalência de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> , de acordo com a faixa etária dos doadores .....	40
Gráfico 2	- Prevalência de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> nos doadores e universitários, segundo o sexo .....	41
Gráfico 3	- Comparação da positividade de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> , de acordo com o a origem geográfica e nível socioeconômico .....	42
Gráfico 4	- Distribuição do nível socioeconômico entre doadores e no grupo controle, segundo o Critério Brasil.....	43
Gráfico 5	- Prevalência de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> , de acordo com o grupo sanguíneo ABO .....	44
Gráfico 6	- Prevalência de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> , de acordo com o grupo sanguíneo-Sistema Rh (D).....	44
Tabela 1	- Prevalência de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> nos doadores Anti-Hbc e Anti-Hbs positivos .....	46
Tabela 2	- Prevalência de marcadores sorológicos de outras doenças infecciosas, nos doadores .....	46
Tabela 3	- Resultados dos diferentes testes para diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i> , utilizados na validação da sorologia .....	47
Tabela 4	- Resultados da validação do método sorológico .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	- Antiinflamatórios Não Esteroidais.
AP-PCR	- Arbitrarily Primed- Polymerase Chain Reaction
BHI	- Brain and Heart Infusion
BHM	- Belo Horizonte Medium
<i>CagA</i>	- Cytotoxin – associated gene A
DNU	- Dispepsia Não-Ulcerosa
ELISA	- Enzyme Linked ImunoSorbent Assay
G+C	- Guanina e Citosina
HM-CAP	- High Molecular – Cell Associated Protein
<i>Hp</i>	- <i>Helicobacter pylori</i>
HRPO	- Horse Radish Peroxidase
HspA	- Heat shock protein A
Ig	- Imunoglobulina
IARC	- International Agency of Cancer Research
IL	- Interleucina
LPS	- Lipopolissacarídeo
MALT	- Mucosa – Associated Lymphoid Tissue
NIH	- National Institutes of Health
ns	- Não significante
PCR	- Polimerase Chain Reaction
RAPD-PCR	- Random Amplified Polymorphic DNA – Polimerase Chain Reaction
RFLP	- Restricition Fragment Lenght Polymorphism
TMB	- Tetra-Metil Benzidina
TNF	- Tumor Necrosis Factor
VacA	- Citotoxina vacuolizante A

## RESUMO

A prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* (*Hp*) é bem conhecida em todo o mundo, entretanto no Brasil há apenas alguns relatos epidemiológicos, nas regiões Sudeste (Minas Gerais) e Centro-Oeste (Mato Grosso). O objetivo do presente estudo foi avaliar a soroprevalência da infecção pelo *Hp* na cidade de Curitiba e região metropolitana (RMC), correlacionando com dados demográficos (idade, sexo, origem geográfica, nível socioeconômico), grupo sanguíneo ABO e Rh e com os marcadores sorológicos para hepatite, sífilis, HIV e doença de Chagas. Amostras de 276 doadores de sangue foram obtidas no banco de sangue Hemobanco de Curitiba. A idade dos doadores variou de 18 a 60 anos (média 33 anos), sendo 97 (35%) do sexo feminino e 179 (65%) do sexo masculino; 61,6% (170/276) eram provenientes de Curitiba, 34,8% (96/276) da RMC e 3,6% (10/276) do interior, todos pertencendo à classe média/média-baixa/baixa. Quanto à origem racial, 243 (88%) eram caucasóides, 29 (10%) mulatos, três (1%) negros e um (0,3%) asiático. Como controle de nível socioeconômico foram estudados 79 universitários, com idade de 18 a 26 anos (média 20 anos), sendo 10 (12,7%) homens e 69 (87,3%) mulheres e todos pertencentes à classe alta/média-alta. A presença de anticorpos anti-*Hp* foi determinada por ELISA (Seradyn/ Biobrás) utilizando como antígeno uma proteína de alto peso molecular (HM-CAP®). A metodologia foi validada comparando-se a presença de anticorpos anti-*Hp* com os testes de urease e histológicos de 23 pacientes submetidos à endoscopia e que apresentavam distúrbios gastrointestinais. A prevalência de anticorpos anti-*Hp* foi significativamente mais elevada nos doadores quando comparada à observada nos universitários (58,3%, 161/276 versus 26,6%, 21/79  $p < 0,001$ ); e aumentou significativamente com a idade ( $p < 0,01$ ), conforme a seguir: 18-29 anos, 48% (56/117); 30-39 anos, 55% (48/87); 40-49 anos, 66% (29/46); 50-60 anos, 81% (21/26). Observou-se também um aumento significativo da presença de anti-*Hp* nos doadores da região metropolitana (69,8% - 67/96) quando comparados com os provenientes da capital (52,9 % - 90/170;  $p < 0,01$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada para a prevalência de anti-*Hp* nos doadores relacionada ao sexo ou grupo sanguíneo ABO e Rh ( $p = ns$ ). Entretanto, uma associação significativa entre os marcadores sorológicos da hepatite B e a presença de anticorpos anti-*Hp* ( $p = 0,0001$ ) foi observada, sugerindo um provável papel do *Hp* como co-fator nestas infecções. Os resultados obtidos, portanto, demonstram uma alta prevalência da infecção por *Hp* no nosso meio, estando esta relacionada diretamente com a idade e inversamente com o nível socioeconômico. A alta prevalência de anticorpos anti-*Hp* em indivíduos assintomáticos e o fato da infecção por *Hp* dificilmente apresentar cura espontânea e poder causar lesões mais graves a longo prazo, deve servir de alerta à saúde pública quanto à profilaxia e ao tratamento desta infecção.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, soroprevalência, prevalência, doadores de sangue, Curitiba.

## ABSTRACT

The prevalence of *Helicobacter pylori* (*Hp*) infection is well known around the world, however in Brazil there have only been few epidemiological reports made mainly in the southeast (Minas Gerais) and central-west (Mato Grosso) regions. The aims of this study were the following: - to determine the seroepidemiology of *Hp* infection in southern Brazil, - to correlate it with demographic data (sex, age, geographic origin, socioeconomic status), blood groups ABO and Rh (D) and with serological markers of other infectious diseases (hepatitis B, syphilis, HIV and Chagas' disease). The blood samples were obtained from a group of 276 donors (Hemobanco Blood Bank - Curitiba, Brazil). Ninety seven (35%) individuals were females and 179 (65%) males, with age ranging from 18 to 60 years (mean 33 yr); 61,6% (170/276) were from Curitiba, 34,8% (96/276) from the metropolitan area and 3,6% (10/276) from the country side. All of them belonged to low/middle-low/middle socioeconomic level. Their ethnic backgrounds were: 243 (88%) Caucasoids, 29 (10%) Mulattos, three (1%) Negroids and one (0,3%) Asiatic. A control group of 79 university students with age varying from 18 to 26 years (mean 20 yr), belonging to high/middle-high socioeconomic level were included. The presence of anti-*Hp* antibodies was carried out with an ELISA (Seradyn/Biobrás) using as antigen a high-molecular weight-cell associated protein (HM-CAP®). The methodology was validated comparing the serological results for *Hp* with the positivity of histology and urease test of 23 patients presenting gastrointestinal symptoms. The overall prevalence of anti-*Hp* antibodies in the blood donors was significantly higher when compared to the university students (58,3% - 161/276 and 26,6% - 21/79, respectively;  $p < 0,001$ ); and increased significantly with age as follow: 18-29 yr, 48% (56/117); 30-39 yr, 55% (48/87); 40-49 yr, 66% (29/46); and 50-60 yr, 81% (21/26) ( $p < 0,01$ ). Also, a higher prevalence of anti-*Hp* was observed in the blood donors from the metropolitan area when compared to those from the city (69,8% or 67/96 versus 52,9 % or 90/170, respectively;  $p < 0,01$ ). No significant differences were observed for gender or blood groups ( $p = ns$ ). However, a significant association between serological markers for hepatitis B and anti-*Hp* was observed ( $p = 0,0001$ ), suggesting a possible role for *Hp* as a co-factor in hepatitis. These results demonstrated a high prevalence of anti-*Hp* antibodies in Curitiba and metropolitan area, showing a direct association with ageing and an inverse correlation with socioeconomic status.

Keywords: *Helicobacter pylori*, seroepidemiology, prevalence, blood donors, Curitiba.

## 1 INTRODUÇÃO

As enfermidades gastrointestinais acometem uma parte expressiva da população mundial, causando desde desconforto até doenças mais graves, podendo até levar ao óbito. Dentre as principais doenças associadas ao trato gastrointestinal inclui-se a gastrite, a úlcera duodenal, a úlcera gástrica, o adenocarcinoma e linfomas. A infecção pelo *Helicobacter pylori* (*Hp*) está associada com a maioria destas enfermidades, ou como agente causal ou representando um fator adicional de risco. Está comprovado que o fumo aumenta o risco de desenvolvimento de úlcera péptica em duas vezes e as drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) em 10 a 20 vezes. A infecção pelo *Hp*, por outro lado, aumenta este risco de cinco a sete vezes (Graham e Rakel, 1999). Além disso, o *Hp* é considerado carcinógeno desde 1994, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisas em Câncer - *International Agency of Cancer Research* (IARC, 1994). Embora muitos pesquisadores associaram a infecção por esta bactéria com adenocarcinoma (Forman et al., 1991; Parsonet et al., 1991; Siponnen, 1994; Blaser et al., 1995;) e linfoma (Wotherspoon, 1991; Muller et al., 1995; Isaacson, 1996) e muitas hipóteses tenham sido apresentadas, o exato mecanismo pelo qual o *Hp* desencadeia estas neoplasias ainda necessita ser esclarecido.

Desde a primeira vez que foi isolada, em 1982, houve grandes debates na comunidade científica de todo o mundo a respeito da associação do *Hp* com diferentes doenças. O grande questionamento que surgia era o seguinte: “Será que agora então a gastrite, e até mesmo as úlceras e linfomas de baixo grau, devem ser tratados com antibióticos?” Hoje se pode dizer que a resposta mais correta é sim. Isto porque muitos estudos científicos já comprovaram o papel do *Hp* como agente causal de gastrite e úlcera péptica (Warren, 1984; Marshall, 1985b; Coghlan et al., 1987; Marshall et al., 1988; Raws e Tytgat, 1990), e como um importante fator predisponente para o desenvolvimento de adenocarcinoma e linfomas (Wotherspoon, 1991; Nomura et al., 1991; Parsonnet et al., 1991; Forman et al., 1991).

Acredita-se que, em países em desenvolvimento, quatro em cada cinco pessoas (80%) estão contaminadas (colonizadas ou infectadas) pelo *Hp* (Graham e Rakel,

1999). Em torno de 1 a 3% da população mundial torna-se infectada a cada ano e durante sua vida cerca de 6 a 20% dos indivíduos infectados não tratados poderão desenvolver úlcera péptica (Feldman et al., 1998). Até o momento são escassos os dados brasileiros a respeito do número de indivíduos infectados e a prevalência de anticorpos anti-*Hp* na população em geral. A maioria dos estudos publicados no Brasil são relacionados a indivíduos com distúrbios gastrointestinais (Queiroz et al., 1991; Coelho et al., 1992; Pilonetto et al., 1993; Nogueira et al., 1993; Bezerra et al., 1996; Ribeiro, 1998; Oliveira et al., 1999a; Ogata et al., 2001) e apenas alguns estudos em indivíduos saudáveis (Rocha et al., 1992; Oliveira et al., 1994; Souto et al., 1998; Oliveira et al., 1999b). Estes estudos foram realizados em regiões geográficas restritas do país, particularmente em Belo Horizonte, MG; São Luís, MA e em Nossa Senhora do Livramento, MT. A prevalência da infecção por *Hp* nestas pesquisas oscilou de 16 a 77% em crianças e adolescentes (Oliveira et al., 1994; Souto et al., 1998) e em adultos foi de 62 a até 85% (Rocha et al., 1992; Souto et al., 1998). Estes dados demonstram a grande oscilação que existe na prevalência da infecção pelo *Hp*, no Brasil, nas regiões com diferentes níveis socioeconômicos e também entre as diferentes faixa etárias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1.1 Objetivo geral

Analisar a epidemiologia da infecção pelo *Hp* em indivíduos assintomáticos (doadores de banco de sangue) na cidade de Curitiba e região metropolitana.

### 2.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Hp* na população em estudo;
- Correlacionar a presença de anticorpos anti-*Hp* com dados demográficos tais como: idade, sexo, origem geográfica e nível socioeconômico;
- Verificar a associação entre anticorpos anti-*Hp* e os grupos sanguíneos ABO e Rh (D).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 HISTÓRICO

##### *As doenças gastrointestinais*

Muitos campos da medicina têm obtido avanços significativos nos últimos anos, porém em poucos deles o avanço foi tão significativo quanto nas doenças do trato gastrointestinal superior. A descoberta do *Hp* e do seu papel na patofisiologia destas doenças trouxe uma mudança importante de conceitos no campo da Gastroenterologia.

Em ampla revisão da literatura, Buckley e Morain (1998) resgatam o histórico das doenças gastrointestinais do *Hp*, desde o século XVI, conforme descrito a seguir.

Relatos de complicações de úlceras pépticas podem ser encontrados desde a época medieval e a primeira descrição de uma úlcera gástrica ocorreu em 1586 por um médico italiano chamado Donati. Já a úlcera duodenal foi descrita em 1688, na Suécia.

A sintomatologia da úlcera péptica foi descrita em detalhes por Brinton em 1857, sendo que na época freqüentemente observava-se a úlcera gástrica e raramente a duodenal, em estudos anatomopatológicos. Em 1881 foi relatado o primeiro uso de um endoscópio. Durante o final deste século os relatos de úlcera duodenal foram aumentando dramaticamente e em 1900 esta já era mais comum que a úlcera gástrica.

Em 1910, o croata Karl Schwarz mudou radicalmente o conceito do tratamento das úlceras pépticas com a sua famosa frase *no acid, no ulcer* (sem ácido, sem úlcera). Em 1915 iniciou-se o uso de antiácidos para o tratamento de úlceras pépticas e anos mais tarde, o estiboestrol e a carbenoxolona mostraram-se também drogas promissoras. Em 1972 anunciou-se o primeiro antagonista do receptor H<sub>2</sub> (Black et al., 1972). O surgimento desta nova classe de drogas permitiu uma melhora significativa no tratamento das úlceras pépticas. Outro grande avanço significativo ocorreu com o aparecimento do primeiro inibidor da bomba de prótons (Lindberg et al., 1990). Portanto, ainda nesta época a teoria de Schwarz, que preconizava que ausência de ácido significa ausência de úlcera, continuava predominando no mundo todo.

### ***A descoberta de um patógeno***

Desde o final do século XIX os patologistas têm relatado a presença de bactérias espiraladas na mucosa gástrica. Primeiro Bizzozero, um patologista italiano, descreveu a presença destes microorganismos no estômago de caninos, em 1893. Três anos mais tarde, Salomon descreveu a presença de bactérias similares no estômago de gatos e ratos. Krienitz, em 1906, foi o primeiro pesquisador a demonstrar a presença destes microorganismos no estômago de seres humanos.

Freedberg e Barron, em 1940, observaram a presença de espiroquetas em 37% das amostras de ressecção gástrica de pacientes com úlcera duodenal ou carcinoma o que não foi confirmado em estudos subseqüentes. Portanto, o interesse nestes prováveis patógenos ficou de lado por muitos anos. Hoje, sabe-se que são necessárias múltiplas biópsias, preferencialmente do antro gástrico, para localizar o *Hp*.

O interesse pelas bactérias espiraladas voltou a ressurgir quando em 1975, Steer demonstrou a associação entre bactérias e gastrite em 80% das ressecções gástricas de pacientes com úlcera gástrica (Steer, 1975). O interesse no papel da bactéria gástrica nas condições “pépticas” ressurgiu em 1979, quando Fung et al. descreveram a presença de bactérias espiraladas na superfície luminal das células epiteliais de pacientes com úlcera gástrica.

### ***O início da era moderna***

A chamada era moderna do *Helicobacter* iniciou em 1981 na Austrália com Barry Marshall e Robin Warren, do *Royal Perth Hospital*. Warren observava a presença de bactérias na mucosa de biópsias gástricas. Enquanto isto, Marshall notou que a erradicação da infecção era acompanhada de melhoria da gastrite (Marshall, 1996). Nos anos de 1981 e 1982 várias tentativas de cultivo do bacilo curvo não tiveram sucesso. Porém, na semana da Páscoa, em 1982, as culturas foram incubadas não intencionalmente por 05 dias. No final dos cinco dias de feriado, Goodwin et al.,

do laboratório de Bacteriologia do *Royal Perth Hospital*, que trabalhavam em colaboração com Marshall, observaram colônias crescendo no ágar então utilizado (Goodwin, Lancet, 2001; Marshall e Warren, 1984). Warren e Marshall comunicaram os seus achados através de cartas ao editor publicadas na revista *Lancet* (Warren, 1983; Marshal, 1983).

### ***Surge um novo microorganismo***

A bactéria espiralada em questão, semelhante a um *Campylobacter* (*Campylobacter-like organism*), foi denominada *Campylobacter pyloridis* devido à sua morfologia (Figuras 1 e 2) e ao fato do conteúdo do seu DNA ser muito semelhante ao *Campylobacter jejuni* (Marshall e Warren, 1984). Contudo, a presença de múltiplos flagelos a diferenciava dos demais *Campylobacter* e por questões gramaticais foi reclassificada como *Campylobacter pylori* em 1987 (Marshall, 1987). Estudos bioquímicos e genéticos demonstraram mais tarde que esta bactéria era muito diferente dos *Campylobacter* e por isso, em 1989, foi proposto o binome *Helicobacter pylori*, devido à sua morfologia helicoidal (*helico*) *in vivo* e a freqüente forma de bastão (*bakter*) *in vitro* (Goodwin, 1989).

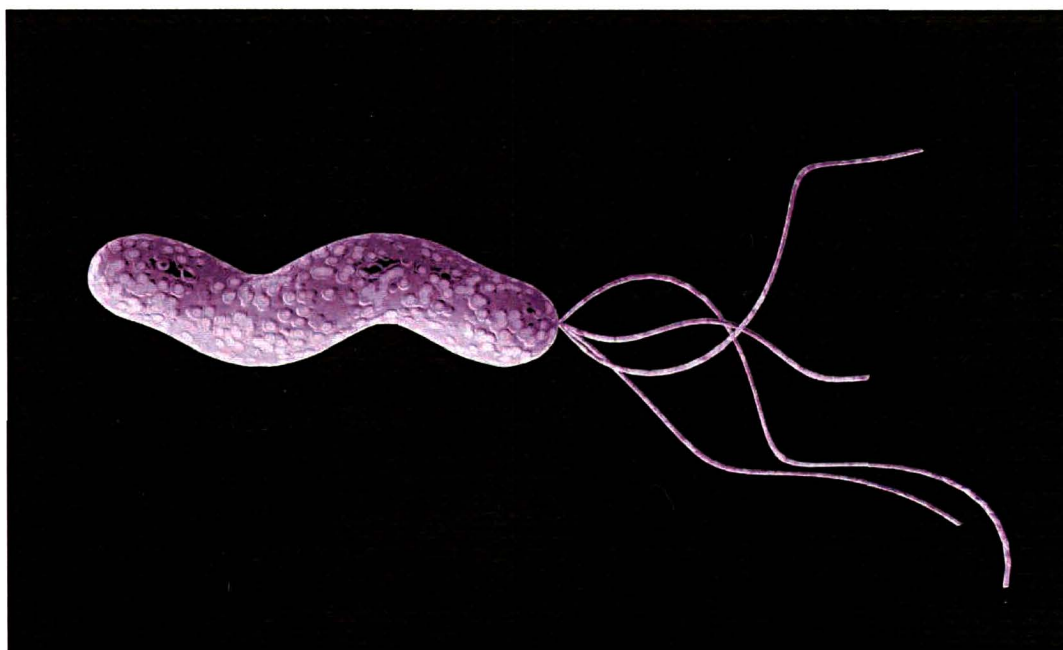
Em 1985 o postulado de Koch para comprovar o efeito patológico do *Hp* não estava completo. Então, Marshall realizou um experimento *in vivo* ingerindo deliberadamente um inóculo da bactéria. Após a ingestão do microorganismo, o pesquisador desenvolveu gastrite comprovada por biópsia gástrica, que foi tratada adequadamente e regrediu (Marshall et al., 1985a). Nos anos de 84 a 87 vários métodos de diagnóstico facilitaram os estudos epidemiológicos e intervencionistas, como os métodos sorológicos (Marshall et al., 1984); o teste rápido da urease (Langenberg, 1984) e o teste respiratório com uréia marcada (Graham et al., 1987; Bell et al., 1987). Desde então vários outros métodos têm sido introduzidos como: pesquisa de antígenos, biologia molecular e fluorescência *in situ* (Leodolter et al., 2001;Leodolter e Megraud, 2001).

## 3.2 O *Helicobacter pylori*

### 3.2.1 Morfologia Celular e da Colônia

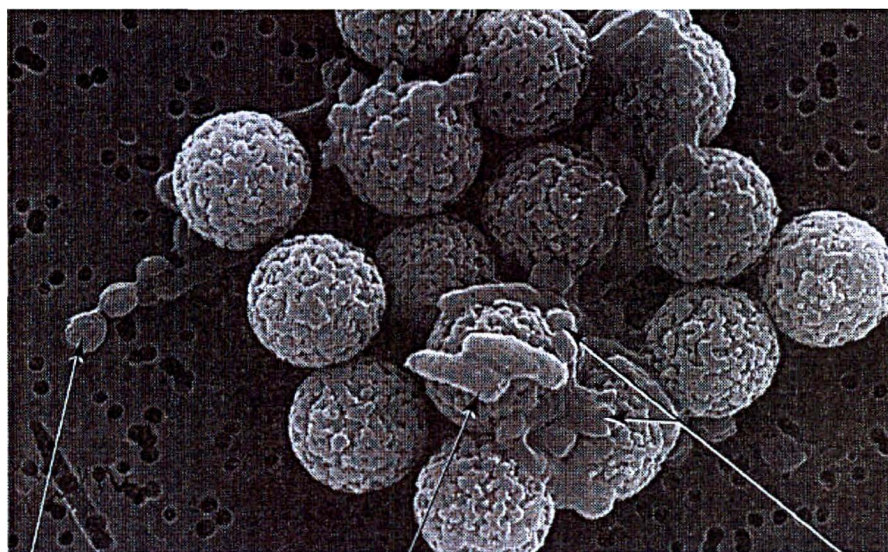
O *Hp* é um bacilo Gram negativo curvo ou em forma de “S” que às vezes se apresenta na forma espiralada. A forma curva, porém, é a mais frequentemente observada (Figura 1). O *Hp* apresenta até seis flagelos revestidos, de morfologia incomum e localização polarizada e ausência de esporos. As células têm aproximadamente 0,5 a 0,9  $\mu\text{m}$  de diâmetro e de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento, sendo a maioria móvel, embora em algumas culturas tenha sido observada a ausência de movimentos pela técnica de gota pendente. Outras formas descritas para as células de *Hp* em cultura e eventualmente *in vivo* incluem: esféricas, em forma de “V”, em forma de “U” e retilíneas. A forma cocóide costuma predominar em microscopias realizadas de culturas velhas (Figura 2) (Owen, 1998).

Figura 1 - Morfologia espiralada do *Helicobacter pylori*



Fonte: <http://www.hpylori.com.au/image/pylori1b.jpg>

Figura 2 - Diferentes morfologias do *H. pylori* aderidas a pérolas magnéticas



Forma cocóide

Forma de bacilo

Forma cocóide

FONTE: Murray, P. R. *Medical microbiology*. 3 ed. St. Louis: Mosby, 1998.

As colônias de *Hp* são circulares e de aspecto translúcente e forma convexa, tendo de 1 a 2 mm de comprimento em ágar sangue suplementado (Figura 3). Estas formam-se após 3 a 5 dias de incubação a 37° C, com um pequeno halo de hemólise e cor acinzentada (Owen, 1998). No meio BHM (*Belo Horizonte Medium*) as colônias são puntiformes e com brilho dourado metálico característico (Queiroz et al., 1987).

Figura 3 - Morfologia da colônia de *Hp* em ágar sangue



Fonte: <http://www.hpylori.com.au>

### 3.2.2 *Propriedades Fisiológicas e Bioquímicas*

O *Hp* é uma bactéria microaerófila, cujo crescimento ótimo se dá em atmosfera contendo 5% de oxigênio e de 5 a 10 % de CO<sub>2</sub>. Para o seu isolamento geralmente é necessário um meio rico suplementado como ágar BHI, ágar sangue de cavalo, ágar BHM entre outros. Embora todas as cepas se desenvolvam em temperaturas de 33° a 40° C, algumas podem se desenvolver escassamente a 30° ou 42° C. Em meio de cultivo apropriado o *Hp* se desenvolve em uma faixa ampla de pH (de 5.5 a 8.5), sendo o seu crescimento mais favorável em pH 6.9 a 8.0. Embora se desenvolva na mucosa estomacal, o *Hp* interessantemente não tolera pH baixo *in vitro* (Owen,1998).

O *Hp* se apresenta inerte para a maioria das provas bioquímicas convencionais, não fermentando e nem oxidando carboidratos. Suas principais características enzimáticas incluem a produção de catalase, oxidase e de urease (Owen, 1998; Pilonetto et al., 1993). Esta última enzima é típica do gênero, pois geralmente apresenta uma alta atividade, podendo ser detectada direto do espécime clínico (biópsia) ou da cultura isolada, em alguns minutos ou poucas horas após a inoculação em caldo uréia. A exemplo da enzima urease, a atividade de fosfatase alcalina também é elevada. Há relatos de cepas que não produzem catalase e urease, mas via de regra, o isolamento clínico destas cepas é raro (Owen, 1998).

### 3.2.3 *Taxonomia*

Inicialmente classificado como *Campylobacter pyloridis*, e posteriormente reclassificado em 1987 como *Campylobacter pylori* por questões gramaticais (Warren, 1984; Marshal et al., 1987) esta bactéria foi enquadrada em 1989 num novo gênero, *Helicobacter*, recebendo o nome *Helicobacter pylori*, sendo as características deste novo gênero: mobilidade através de flagelos revestidos; produção de um glicocálix externo em meio líquido *in vitro*; presença de menaquinona-6(MK-6) como principal quinona isoprenóide e um conteúdo de 35 a 44 mol% de G+C do DNA cromossomal (Goodwin et al., 1989).

A posição filogenética exata do gênero *Helicobacter* ainda é incerta. Têm sido proposto, através da análise da sub-unidade 16s do RNA ribossômico, que está localizado na sub-divisão Delta e Epsilon das bactérias púrpuras (proteobactérias). Os gêneros mais próximos do *Helicobacter* seriam então a *Wolinella* e o *Campylobacter* (Vandamme e Deley, 1991; Vandamme et al., 1991).

Hoje no gênero *Helicobacter* existem em torno de 18 espécies além do *Hp*, estando a classificação e nomenclatura de várias espécies ainda em discussão. A maioria destas espécies encontra-se apenas em animais (roedores, primatas, gatos, cachorros, etc.). Dentre as outras espécies que habitam o homem além do *Hp* pode-se citar o *H. cinaedie* e o *H. fennelliae* (Owen, 1998).

#### Quadro 01 - Espécies de *Helicobacter* associadas à mucosa gastrointestinal

Binome científico	Mucosa associada	Ano de publicação
<i>Helicobacter pylori</i>	Gástrica (homem)	1984
<i>Helicobacter acinonyx</i>	Gástrica (macaco)	1993
<i>Helicobacter nemestrinae</i>	Gástrica (macaco)	1991
<i>Helicobacter mustellae</i>	Gástrica (furão)	1988
<i>Helicobacter suis</i>	Gástrica (suínos)	1994
<i>Helicobacter fellis</i>	Gástrica (gatos)	1991
<i>Helicobacter bizozzeroni</i>	Gástrica (cães)	1996
<i>Helicobacter heilmannii</i>	Gástrica (homem)	1989
<i>Helicobacter cinaedi</i>	Intestinal (homossexuais)	1984
<i>Helicobacter fennelliae</i>	Intestinal (homossexuais)	1984
<i>Helicobacter canis</i>	Intestinal (cães)	1993
<i>Helicobacter pullorum</i>	Intestinal (homem,aves)	1994
<i>Helicobacter pametensis</i>	Intestinal (suínos e aves)	1994
<i>Helicobacter cholecystus</i>	Intestinal (hamster)	1996
<i>Helicobacter hepaticus</i>	Intestinal (ratos)	1994
<i>Helicobacter trogontum</i>	Intestinal (ratos)	1996
<i>Helicobacter bilis</i>	Intestinal (ratos)	1995
<i>Helicobacter muridarum</i>	Intestinal (roedores)	1992

Adaptado de Owen, R. J. *Helicobacter – species classification and identification*. *Brit Med Bull*, v. 54, n. 1, p. 17-30, 1998.

### 3.3 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO *Hp*

Para que uma infecção se estabeleça, primeiramente é necessário o contato do patógeno com o hospedeiro e sua conseqüente aderência/colonização, resultando na sua multiplicação, ativação de resposta imune e danos ao hospedeiro (Tortora, 2000). Várias são as hipóteses de como o homem entra em contato com o *Hp* e qual é o seu reservatório natural, sendo as rotas fecal-oral e oral-oral as mais prováveis.

Uma vez deglutido, o *Hp* encontrará no estômago um ambiente ácido e desfavorável à sua aderência. Para transpor estes obstáculos e poder se fixar à mucosa terá que lançar mão de uma série de fatores de virulência, a serem descritos adiante. A mucosa gástrica é recoberta por uma camada mucosa de gel, constituída por polímeros de mucina. O papel da mucina é justamente proteger o estômago do suco gástrico e da colonização bacteriana. Além disso, outros mecanismos estão envolvidos na proteção da mucosa, como: a presença de um glicocálix recobrindo as células epiteliais e a produção de bicarbonato e fosfolipídios. Como este tecido é normalmente desprovido de células efectoras do sistema imune, estas barreiras físicas são de fundamental importância na proteção desta mucosa (Ferrero et al., 1997).

O *Hp* possui certas características que conferem uma vantagem seletiva sobre as demais bactérias na colonização da mucosa gástrica, sendo capaz de colonizar a superfície das células epiteliais da mucosa antral e do fundo, bem como o tecido de metaplasia gástrica no duodeno (Gormally, 1996. *Apud* Ferrero, 1997). Uma vez estabelecida a colonização, o microorganismo pode produzir direta ou indiretamente uma série de alterações patológicas no tecido gástrico. A multiplicidade e a complexidade dos efeitos patológicos mediados pelo *Hp* reforçam a importância do papel de fatores da bactéria, do hospedeiro e das interações parasita-hospedeiro na patogênese da infecção (Ferrero et al., 1997).

Até pouco tempo, acreditava-se que a diversidade genômica do *Hp* tinha importante papel nas diferentes manifestações patológicas da infecção por este microorganismo. Entretanto em 1999, num estudo comparativo do genoma de duas cepas não relacionadas de *Hp*, Richard Alm et al. observaram grande semelhança

genômica entre elas, sendo que apenas 6 a 7 % dos genes eram específicos de cada cepa. Desta forma conclui-se que diferentes fatores da bactéria, do hospedeiro e do meio ambiente podem influenciar a patofisiologia e a gravidade da doença associada à infecção pelo *Hp* e na evolução clínica da infecção (Alm et al., 1999; Wunsch, 1999). Um exemplo disto é o fato de que diferentes populações apresentam níveis diferentes de susceptibilidade à infecções pelo *Hp* e das taxas de câncer gástrico (Fock, 1998).

Embora diversos fatores de virulência já estejam bem descritos e caracterizados na literatura, (Ferrero et al., 1997; Atherton, 1998) o respectivo papel de fatores da bactéria e do hospedeiro nas doenças associadas ao *Hp* necessitam ainda de melhor elucidação (Alm et al., 1999).

### 3.3.1 Fatores Envolvidos na Colonização da Mucosa Gástrica

#### ***Motilidade***

A presença de 5 a 6 flagelos unipolares confere ao *Hp* uma ótima motilidade, mesmo em meios altamente viscosos como é o caso da mucosa gástrica (Hazzel et al., 1986. *Apud* Ferrero et al., 1997). A primeira demonstração da importância da motilidade como um fator de virulência foi observado em 1992, quando se verificou que cepas imóveis de *Hp* eram incapazes de colonizar a mucosa de suínos gnotobióticos (Eaton et al., 1992).

Portanto a presença dos flagelos polares confere à bactéria a capacidade de penetrar a espessa camada de muco presente no estômago, escapando da acidez do lúmen gástrico e alcançando a superfície do epitélio gástrico (Ferrero et al., 1997). Os flagelos do *Hp* possuem um revestimento especial ou bainha, composto de uma bicamada de fosfolipídios, lipopolissacarídes e proteínas de membrana externa. Provavelmente este revestimento age protegendo a despolimerização da proteína que constitui os flagelos: a flagelina (Geis et al., 1993. *Apud*: Ferrero et al., 1997).

## *Urease*

Além de ser uma característica marcante da espécie, a urease é um dos mais estudados fatores de virulência do *Hp*. A urease do *Hp* possui uma alta constante de afinidade, diferente das ureases de outras espécies (0,17 a 0,8 mmol/L *versus* 1.7 a 3.4 mmol/L), o que lhe permite a utilização da uréia, mesmo em baixas quantidades, como é o caso do estômago (Ferrero et al., 1997).

Embora estudos pioneiros indicassem que a urease era essencial para a proteção *in vitro* do *Hp* contra a acidez, mutantes isogênicos urease negativos demonstraram mais tarde que a urease não é essencial para a sobrevivência da bactéria *in vitro* (Ferrero et al., 1997). Goodwin et al. (1986) postularam que o amônio e o gás carbônico produzido durante a ureólise pela urease do *Hp* criavam um microambiente neutro que protegia a bactéria do ambiente ácido. Por outro lado, vários estudos experimentais demonstraram que mutantes urease negativos não são capazes de colonizar a mucosa gástrica, até mesmo em condições de hipocloridria. Portanto, conclui-se que na infecção pelo *Hp*, o papel da urease é principalmente como fator de colonização, sendo também importante na proteção contra a acidez estomacal e em outras funções metabólicas (Ferrero, 1997).

## *Mecanismos de tolerância ao ácido*

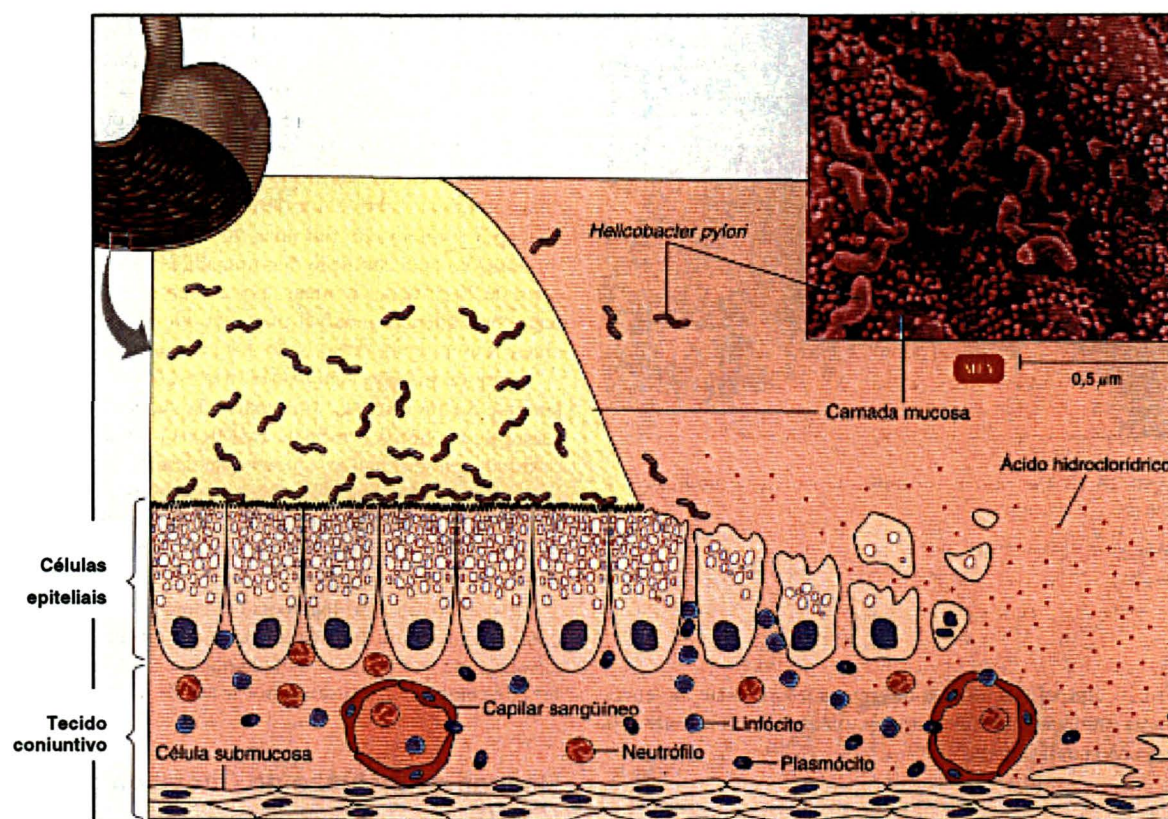
Vários mecanismos de adaptação têm sido postulados para explicar a capacidade do *Hp* sobreviver em ambientes ácidos. A urease do *Hp* tem atividade em uma ampla faixa de pH que vai desde 4 até 8.4. (Ferrero et al., 1997).

Recentemente foi descrito um canal protéico que permite a passagem de uréia para o citoplasma do *Hp*. O mais importante fato é que a internalização da uréia é estimulada por um pH ácido, que aumenta em torno de 300 vezes a quantidade de penetração da uréia no citoplasma. Desta maneira haverá a produção intracelular de amônia em quantidade suficiente para neutralizar o pH do periplasma bacteriano (Weeks et al., 2000).

## Aderência

Um passo crítico na colonização do estômago pelo *Hp* é a sua capacidade de se aderir à mucosa gástrica, sobrepondo os efeitos da renovação celular e da regeneração de muco. Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que o *Hp* é encontrado muito próximo da superfície das células do epitélio gástrico (Figura 4). A interação do *Hp* com as células da mucosa gástrica causa alteração das microvilosidades e produz um pedestal de aderência, semelhante ao da *E. coli* enteropatogênica (Goodwin et al., 1986). O *Hp* interage com a superfície de células epiteliais, evitando assim que este seja removido deste sítio. Entretanto, a forma exata de como a bactéria se liga ao epitélio precisa ainda ser elucidada (Ferrero et al., 1997).

Figura 4 - Aderência e patogênese do *H. pylori* na mucosa gástrica



Fonte: Tortora, G et al.. *Microbiologia: uma introdução*. 6. ed. Porto alegre: Artmed, 2000. p. 671.

### 3.3.2 Permanência e Patogênese

A camada mucosa é um ambiente viscoso, com baixa tensão de oxigênio e pobre em elementos essenciais, como íons metálicos. O *Hp* diante desta situação desenvolveu um arsenal de proteínas e processos bioquímicos adaptados a este nicho tão peculiar. A motilidade e a urease continuam sendo importantes fatores de virulência aqui também. Entretanto outros mecanismos estão envolvidos na capacidade de sobrevivência e multiplicação do *Hp* neste ambiente hostil (Ferrero et al., 1997).

#### ***Metabolismo***

O metabolismo de uma bactéria está relacionado com a capacidade de multiplicação do microorganismo e de causar doenças. Por muitos anos acreditou-se que o *Hp* não era capaz de metabolizar carboidratos, porém em 1993 Mendz et al. demonstraram que esta bactéria era capaz de utilizar D-glucose (*Apud* Ferrero, 1997). A glucose não parece ser o metabólito preferido do *Hp*. Entre as necessidades para crescimento do *Hp* incluem-se aminoácidos como alanina, arginina, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina e valina. Para crescer *in vitro* o *Hp* necessita de uma atmosfera contendo uma concentração  $\geq 5\%$  de  $\text{CO}_2$  (Ferrero et al., 1997).

#### ***Proteínas ligadoras de ferro***

O ferro é um elemento essencial para o crescimento bacteriano. A capacidade de seqüestrar e armazenar ferro são habilidades que o hospedeiro possui para se defender dos microorganismos patogênicos. As bactérias possuem diferentes sistemas desenvolvidos para adquirir ferro que competem com os sistemas do hospedeiro. A análise genômica do *Hp* sugere a presença de uma variedade de mecanismos para a internalização de ferro. Entre estes, destaca-se aquele semelhante ao sistema *fec* da *E. coli* e outro semelhante ao sistema *feo* da *E. coli*. Outros sistemas presentes no *Hp* codificam proteínas similares às de ligação da lactoferrina ou do grupo-heme (Ferrero et al., 1997; Tomb et al., 1997).

### ***Mecanismos de evasão da resposta imune***

Embora a colonização da mucosa gástrica pelo *Hp* produza uma intensa resposta celular e humoral local, com produção de IgA e IgG, esta bactéria é capaz de sobreviver na camada mucosa. Isto sugere que o *Hp* desenvolveu algum mecanismo de evasão da resposta imune. Os íons amônio liberados durante a degradação da uréia podem em parte explicar a capacidade do *Hp* de sobreviver à fagocitose dos neutrófilos (Ferrero, 1997).

Outras proteínas que também podem estar envolvidas nos mecanismos antifagocíticos são a catalase e a superóxido dismutase SOD. Outro mecanismo estaria relacionado à liberação de antígenos para o meio extracelular, saturando assim os anticorpos locais e permitindo a evasão da resposta imune do hospedeiro (Ferrero, 1997).

### ***Outros fatores de virulência***

O *Hp* induz uma série de alterações patológicas na mucosa gástrica do hospedeiro. A inflamação intensa, a lesão tissular e a alteração da secreção de ácido gástrico representam algumas das modificações causadas. Estas alterações podem ser brandas ou até mesmo evoluírem para úlceras ou processos neoplásicos. Vários fatores de virulência em potencial já foram descritos para esta bactéria. Entretanto, muitos deles são enzimas que foram estudadas a partir de extratos de cultura e não há evidências diretas do seu envolvimento na patogênese, pois não estavam puras e não havia modelos animais disponíveis para reproduzir a infecção pelo *Hp*. Mesmo assim, muitos fatores estão bem caracterizados e há evidência experimental do seu papel na patogênese da infecção (Ferrero et al., 1997).

Embora o *Hp* não invada a mucosa gástrica é capaz de provocar gastrite, devido possivelmente à secreção de substâncias que induzem a quimiotaxia e a proliferação de células inflamatórias na mucosa (Ferrero, 1997).

Provavelmente o *gen A associado a citotoxina (gen cagA)* seja o fator de virulência do *Hp* mais estudado até hoje. O produto do gene *cagA (citotoxyn – associated gene A)* foi demonstrado no soro de mais de 80% dos indivíduos infectados pelo *Hp*. O nome dado a este gen é inadequado pois, a sua inativação não possui nenhum efeito na síntese, secreção ou atividade da citotoxina vacuolizante A – VacA . O papel da CagA ainda não está elucidado mas, sabe-se que indivíduos infectados por cepas CagA positivas expressam quantidades significativamente maiores de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, do que indivíduos infectados por cepas CagA negativas (Crabtree et al., 1991; Ferrero et al., 1997).

A cultura de certas cepas de *Hp* induz a formação de vacúolos em culturas de tecidos, devido à ação de uma toxina denominada VacA. Embora todas as cepas de *Hp* possuam o gene *vacA*, nem todas o expressam. A atividade citotóxica do *Hp* está provavelmente mais associada à ulcerogênese do hospedeiro (Ferrero et al., 1997).

Além dos fatores já mencionados, o *Hp* possui ainda várias outras moléculas supostamente envolvidas na sua patogenicidade. O lipopolissacarídeo (LPS) do *Hp* difere dos demais sendo que possui uma atividade biológica reduzida em comparação ao LPS das enterobactérias. Dentre as propriedades biológicas deste LPS estariam a sua capacidade de estimular a secreção de IL-8, aumentar a secreção de pepsinogênio (fator importante na ulcerogênese) e induzir reposta auto-imune (Ferrero et al., 1997).

Em síntese, o mecanismo pelo qual o *Hp* causa doença pode ser classificado como um processo de várias etapas. Primeiro, o *Hp* deve passar pela barreira de ácido gástrico e penetrar a camada mucosa (colonização), a partir daí terá que se adaptar e multiplicar nas condições adversas da mucosa gástrica (persistência) e finalmente a presença da bactéria irá causar inflamação local e sistêmica, bem como vários níveis de lesão tecidual. Muitos fatores de virulência já foram identificados e caracterizados. Entretanto vários candidatos aguardam melhores estudos a nível molecular *in vivo*. O

desenvolvimento da infecção em modelos murinos também deve auxiliar muito no esclarecimento da patogênese deste microorganismo (Ferrero et al., 1997).

### 3.4 DOENÇAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO *Hp*

Estudos epidemiológicos da era pré-*Hp* estabeleceram a relação entre a gastrite e várias outras doenças tais como: o carcinoma gástrico, a úlcera gástrica, a úlcera duodenal e a anemia perniciosa. Além disso, a gastrite era associada com nível socioeconômico baixo (Graham, 1991; Graham et al., 1991b). Após o isolamento do *Hp* em 1983, estes estudos puderam ser reavaliados e muitas hipóteses foram então confirmadas.

A infecção pelo *Hp* geralmente é assintomática e muitos indivíduos infectados não desenvolvem doença clínica (Blaser et al., 1995). Atualmente esta infecção está relacionada com uma série de distúrbios gástricos (gastrite, câncer gástrico, linfoma e dispepsias) e não gástricos (doenças isquêmicas, baixa estatura entre outros), sendo considerada um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Brown, 2000).

O primeiro relato de associação entre uma bactéria isolada, gastrite e a úlcera péptica ocorreu em 1984 (Warren, 1984). Atualmente é aceito o fato de que quase metade da população mundial está infectada pelo *Hp* e que esta infecção é a principal causa de gastrite. A infecção por *Hp*, juntamente com a cárie e as doenças periodontais estão entre as infecções crônicas mais comuns da humanidade (Breuer et al., 1997). A gastrite envolvida com o *Hp* pode apresentar diferentes evoluções do ponto de vista patológico, existindo a gastrite predominante no antro (fenótipo de úlcera) e a gastrite atrófica multifocal ou avançada (fenótipo cancerígeno) (Sipponen, 2001; Breuer et al., 1997). Por outro lado, o achado anatomopatológico de uma mucosa gástrica normal, não infectada é muito importante, pois pacientes com este perfil dificilmente desenvolverão úlcera péptica ou câncer gástrico (Laine et al., 1992).

A infecção pelo *Hp* constitui-se numa das principais causas de úlcera péptica, (Breuer, 1997; Blaser, 1995b), onde se observa uma predominância de inflamação no antro e mucosa não atrófica no corpo, conferindo um risco aumentado de úlcera duodenal. Este tipo de patologia é denominado de gastrite com fenótipo de úlcera duodenal (Sipponen, 2001). Duas observações são cruciais na confirmação da participação do *Hp* nas úlceras pépticas: uma alta prevalência do *Hp* (95-100%) nos pacientes com úlceras duodenais (Carrick, 1989; Tytgat, 1993; Pilonetto, 1993) e a cura da infecção que muda o curso natural da doença de modo que as recorrências são praticamente eliminadas (Graham, 1994). O antigo ditado “uma vez uma úlcera, sempre uma úlcera” mudou para o conceito de que a erradicação do *Hp* significa a cura da úlcera, desde que não ocorra re-infecção.

O câncer gástrico foi a principal causa de morte por neoplasias em homens até o final da década de 50. Ainda hoje é a segunda causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (Whelan et al., 1993). Mesmo na era pré - *Hp* o câncer gástrico já estava associado à gastrite. Portanto, os achados do *Hp* como agente etiológico da gastrite (Warren, 1984), tornaram muito provável a associação entre o *Hp* e o câncer gástrico (Breuer, 1997). Diferentes regiões do mundo apresentam prevalências diferentes quanto às doenças relacionadas ao *Hp*. Há regiões com alta prevalência de câncer gástrico e outras com alta prevalência de úlceras pépticas, mas raramente ambas estão elevadas ao mesmo tempo (Breuer et al., 1997). Esta observação pode ser explicada pelo fato de que a úlcera duodenal está associada com a presença de gastrite predominantemente antral, a qual não causa distúrbios na secreção de ácido pelo corpo do estômago. Por outro lado, a gastrite multifocal progressiva com atrofia e metaplasia intestinal é um desenvolvimento patológico associado com o câncer gástrico (Breuer et al., 1997; Sipponen, 2001). A atrofia gástrica e/ou a gastrite atrófica bem como a metaplasia intestinal são consideradas lesões precursoras do carcinoma gástrico (Breuer et al., 1997).

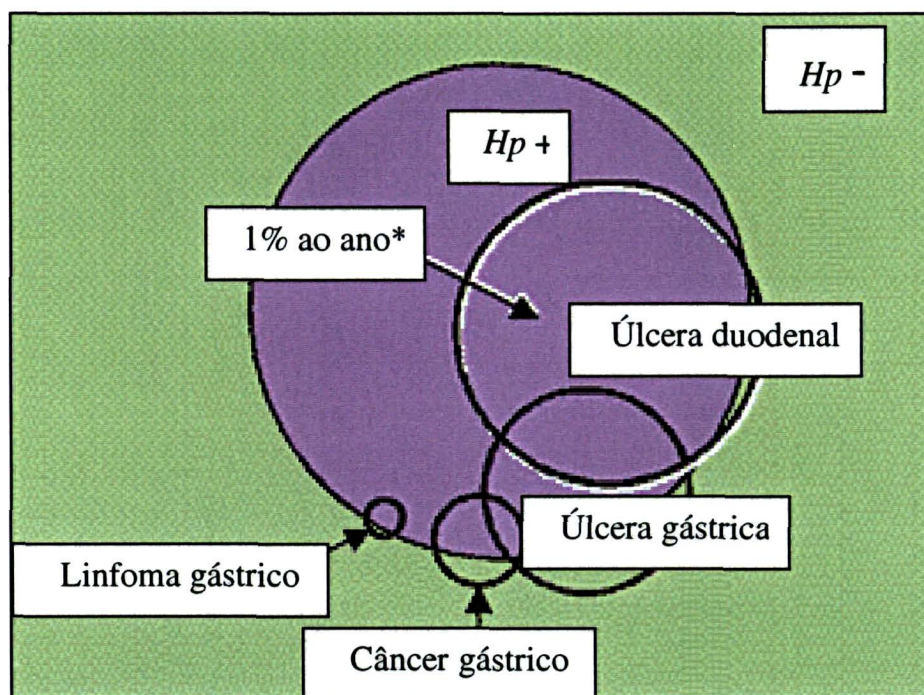
O processo destrutivo envolvido na patogênese do carcinoma gástrico é lento podendo levar de 20 a 40 anos (Breuer, 1997). Existe a hipótese de que, o carcinoma

gástrico pode ser uma doença comum, em países onde a infecção pelo *Hp* é adquirida cedo na infância (Graham, 1993). Embora os argumentos apresentados demonstrem o papel do *Hp* no desenvolvimento do câncer gástrico, sabe-se que diversos fatores provavelmente estão envolvidos na patogênese desta neoplasia, assim como em muitas outras doenças. Neste sentido, além dos co-fatores ambientais como dieta, ingestão de anti-oxidantes e sal; a geração de radicais livres pelo *Hp* estaria envolvida na patogênese do câncer gástrico (Breuer et al., 1997; Correa e Miller, 1998). Ainda, diferenças genéticas do hospedeiro, observadas em estudos com gêmeos mono e dizigóticos, assim como entre as cepas de *Hp* podem ter um papel importante no desenvolvimento de neoplasias gástricas (Breuer et al., 1997; Malaty et al., 1994).

O *Hp* foi associado com linfoma gástrico de MALT pela primeira vez em 1991, num estudo retrospectivo onde a infecção pelo *Hp* estava presente em mais de 90% dos pacientes com linfoma gástrico (Wotherspoon, 1991). A cura da infecção pelo *Hp* leva a uma regressão do linfoma gástrico em uma alta porcentagem dos casos. Parsonett et al., em 1994, verificaram através de um estudo soroepidemiológico prospectivo que havia um risco seis vezes maior de linfoma gástrico em pessoas infectadas pelo *Hp*. Atualmente aceita-se a hipótese de que a erradicação do *Hp* seja um componente central no controle do linfoma MALT (Wotherspoon, 1998).

A definição internacional para dispepsia não-ulcerosa (DNU) é “dor recorrente ou persistente ou desconforto localizado na parte superior do abdômen” excluindo a azia (Talley et al., 1991). A prevalência das dispepsias na população em geral é de 25%, se os sintomas de refluxo forem excluídos. Nos países ocidentais a prevalência da infecção pelo *Hp* em pacientes com DNU, é de 30 a 60 %, entretanto esta associação ainda é inconsistente (Talley e Xia, 1998). É provável que o *Hp* seja responsável pelos sintomas em um pequeno número de pacientes com DNU. Portanto, o diagnóstico e o tratamento de rotina da infecção por *Hp* em pacientes com DNU documentada não é aceito atualmente (Talley e Xia, 1998). Na Figura 5 pode-se observar a frequência da infecção pelo *Hp* nas diferentes doenças gastrointestinais.

Figura 5 – Estimativa mundial da freqüência da infecção pelo *H. pylori*, nas diferentes doenças gastrointestinais



Fonte: <http://www.hpylori.com>

NOTA: *Hp* + (roxo) - indivíduos infectados; *Hp* - (verde): indivíduos não infectados; \* - % de indivíduos *Hp* + que desenvolvem úlcera duodenal

A associação do *Hp* com outras doenças não está bem definida (Strachan et al., 1998). Diversos distúrbios extra-intestinais têm sido associados ao *Hp*, entre eles o prejuízo do crescimento; doenças coronárias, diabetes e cálculos na vesícula (Fox et al., 2001; Strachan et al., 1998; Owen, 1998). Entre os mecanismos sugeridos para o modo como a infecção pode aumentar o risco de doença cardiovascular estão: liberação de proteínas de fase aguda, redução do colesterol HDL, aumento dos níveis de homocisteína e reação cruzada entre proteínas de choque térmico humanas e bacterianas. Recentemente várias espécies de *Helicobacter* entero-hepáticos têm sido descritas. Modelos animais têm demonstrado a capacidade destas bactérias de causar doenças intestinais e hepáticas. O volume de evidências associando estes microorganismos a doenças em humanos tem aumentando continuamente (Fox et al., 2001).

## 3.5 EPIDEMIOLOGIA

### 3.5.1 *Transmissão*

Embora muito discutido, o mecanismo exato da transmissão do *Hp* permanece ainda incerto. As hipóteses mais prováveis seriam a transmissão por água ou alimentos contaminados (fecal-oral), a transmissão direta pessoa-pessoa (oral-oral) ou através de animais ou fomites contaminados (Feldman et al., 1998; Parsonnet et al., 1999).

Segundo Graham, embora o mecanismo de transmissão do *Hp* seja desconhecido, o perfil social da infecção é condizente com a transmissão fecal-oral. Ainda, a evolução da epidemiologia do *Hp* seria semelhante à da poliomielite ou da hepatite A, cujas diferenças na prevalência não estão relacionadas à geografia, mas sim às práticas de higiene e condição socioeconômica (Graham et al., 1991a).

Estudos realizados em diferentes países (Chile, Colômbia e Suécia) com animais, trabalhadores de abatedouros, pessoas que ingerem carne e vegetarianos, além de ingestão de vegetais não cozidos têm sugerido que, embora importante em determinado momento, nenhum reservatório animal ou alimento contaminado parece ter papel significativo na transmissão do *Hp* (Feldman et al., 1998; Goodman et al., 1996).

Em investigações realizadas na América do Sul (Peru e Colômbia) sugeriu-se que a água seja um veículo de transmissão das infecções pelo *Hp*. Na população de área urbana, em Lima, demonstrou-se um maior risco de infecção nos indivíduos que ingerem água da rede municipal, sendo que esta associação foi observada tanto nas famílias de baixa quanto as de alta renda (Klein et al., 1991; Hulten et al., 1996). Já na área rural da Colômbia, a ingestão ou a natação em água corrente aumentou a taxa de infecção (Goodman et al., 1996). Por outro lado, estudos em países como Ilha Formosa, Turquia e Coréia não demonstraram associação entre a infecção por *Hp* e fontes de água (Teh et al., 1994; Ozturk et al., 1996; Malaty et al., 1996). Portanto, embora sugestivo como um veículo de transmissão, não parece que a água seja a principal fonte de contaminação do *Hp* (Feldman et al., 1998).

Estudos de biologia molecular no Japão e nos Estados Unidos têm demonstrado indivíduos infectados com a mesma cepa do *Hp* após uma série de endoscopias, sugerindo esta como uma fonte gastro-oral de transmissão da bactéria (Tytgat, 1995, Rohr et al., 1998).

A cavidade bucal, particularmente a placa dentária, tem sido investigada como provável reservatório na transmissão direta pessoa – pessoa. Entretanto, dentre os diversos estudos publicados não houve concordância quanto ao cultivo de *Hp* da cavidade bucal, sendo a taxa de isolamento relatada desde freqüente, ocasional, até ausente. Também os dados sobre a detecção do *Hp* na placa dentária, empregando métodos de PCR, são discordantes (Namavar et al., 1995; Nguyen et al., 1995; Feldman et al., 1998).

Embora os dados sobre a transmissão oral – oral sejam escassos, existem estudos demonstrando a transmissão de bactérias de mães para os filhos, entre cônjuges e membros da família (Feldman et al., 1988; Megraud, 1995). Quanto ao *H. pylori* há evidências da transmissão entre cônjuges, embora não esteja descartado o fato de ambos estarem expostos a uma mesma fonte de contaminação (Schutze et al., 1995). Além disso, a boca tem sido sugerida como um reservatório para re-infecções do *Hp*, especialmente entre casais (Schutze et al., 1995; Feldman et al., 1998).

O *Hp* já foi cultivado de fezes e também detectado deste material por PCR (Thomas et al., 1992; Kelly et al., 1994). Há um crescente interesse em se estabelecer o papel exato de transmissão do *Hp* pelas rotas fecal-oral e oral-oral (Sahay e Axon, 1996). Se a primeira for mais provável a disseminação do *Hp* deve ser semelhante à de enteropatógenos, sendo as crianças o principal grupo envolvido. Já se a transmissão for pela rota oral-oral, a exemplo do vírus Epstein-Barr, os grupos mais atingidos seriam as crianças (pré-escolares e também, crianças mais velhas) e os adultos pelo beijo. Entretanto, a maioria dos estudos até hoje foram realizados em adultos (Feldman et al., 1998). O desenvolvimento de novos métodos de pesquisa para antígenos do *Hp* em fezes, assim como novos estudos epidemiológicos em populações infantis irão auxiliar o esclarecimento destas dúvidas.

### 3.5.2 Taxa de Infecção Anual e Outros Fatores

Há evidências de que a presença de anticorpos contra o *Hp* pode predizer a presença de gastrite. Similarmente a presença de gastrite pode ser utilizada como um índice da taxa de infecção por *Hp* (Graham et al., 1991a). O aumento anual dos casos de gastrite do tipo B na Finlândia é de 1% (Siurala et al., 1988). Em países ocidentais, a frequência da infecção pelo *Hp* é baixa em crianças e aumenta com a idade em uma taxa semelhante à da gastrite (1 a 2% ao ano). Os dados encontrados por Graham et al. (1991a) na população de Houston, EUA são concordantes com estas informações, sendo de 1% ao ano a taxa de infecção anual.

Estudos mais recentes mostram que a soroconversão anual em países desenvolvidos está entre 0,2 a 1% (Xia e Talley, 1997). Em grupos específicos de adultos jovens, como os mochileiros de Israel que viajaram para o Sudeste da Ásia, América do Sul e África e também em militares do Golfo Pérsico, foram observadas taxas de infecção anual de 6.4 a 7.3 % (Potasman e Yitzhak, 1998; Taylor et al., 1997). Estes dados indicam uma taxa anual maior de soroconversão do *Hp* em situações específicas (Brown, 2000). No Brasil, a soroconversão em adultos de uma população de baixo nível socioeconômico em Belo Horizonte foi de 1,1% ao ano, analisando amostras de 213 voluntários nos anos de 1992 e 1997, com um intervalo de 56 meses (Oliveira et al., 1999b).

Uma das investigações pioneiras sobre a epidemiologia do *Hp* foi realizada em Houston, EUA em 485 voluntários saudáveis com idade entre 15 a 80 anos, demonstrando uma associação inversa entre a infecção pelo *Hp* e o nível socioeconômico (Graham et al., 1991a). Vários outros relatos em diferentes regiões geográficas confirmaram estes achados (Brown, 2000).

Estudos soroepidemiológicos sobre a prevalência de anticorpos anti-*Hp* têm demonstrado diferenças consideráveis nas diferentes populações estudadas (Graham et al., 1991a; Malaty et al., 1991; Oliveira et al., 1994; Goodman et al., 1996; Brown, 2000). A razão desta diferença de prevalência entre as diversas populações ainda não foi elucidada. Na maioria das vezes esta diferença reflete variações quanto à exposição

ao patógeno, tais como padrão socioeconômico e práticas higiênico-sanitárias ou a fatores genéticos (Graham et al., 1991a; Brown, 2000).

Num estudo realizado nos Estados Unidos por Graham et al. (1991a), demonstrou-se que a prevalência dos anticorpos anti-*Hp* em negros é o dobro da observada em brancos. Na Índia observou-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de anticorpos anti-*Hp*, em diferentes grupos etários, indo desde 50-60% em adultos jovens a até 80% nos idosos (Graham et al., 1991b).

Há um consenso na literatura mundial que a percentagem de indivíduos infectados pelo *Hp* é maior em indivíduos de maior faixa etária (Graham et al., 1991a; Oliveira et al., 1994; Ponder et al., 1995; Brown, 2000), entretanto a explicação para este fato ainda permanece em debate. A aquisição do *Hp* começa nos primeiros anos de vida e continua por várias décadas. Embora as taxas de prevalência nos estudos sejam diferentes (devido à influência na seleção de amostras ou na metodologia) a tendência de aumento da prevalência da infecção pelo *Hp*, em faixas etárias mais altas, permanece em todos os relatos (Graham et al., 1991a ; Rocha et al., 1992; Oliveira et al., 1994; Brown, 2000). A taxa de aquisição do *Hp* parece ocorrer mais cedo em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos (Mitchell et al., 1992; Ponder e Ng, 1995). Na China, observou-se que cerca de 70 % das crianças apresentavam-se infectadas já na idade de 5-6 anos , sugerindo um início precoce da infecção pelo *Hp* (Ma et al., 1998. In: Brown, 2000).

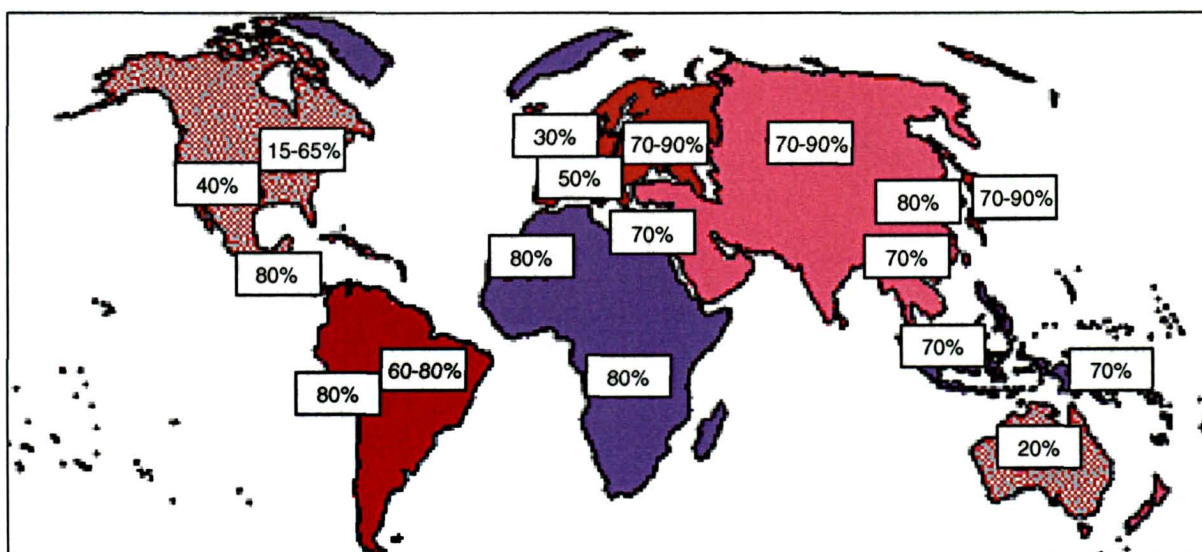
No Brasil, numa amostra de 380 doadores de banco de sangue em Belo Horizonte, observou-se a presença de anticorpos anti-*Hp* em 62,1% dos indivíduos, também com aumento da infecção com a idade (Rocha et al., 1992). Ainda em Belo Horizonte demonstrou-se que crianças de baixo nível socioeconômico tinham uma prevalência média de infecção por *Hp* de 34,1 %, sendo que esta evoluiu de 16,4% em crianças com menos de 2 anos para até 64%, em adolescentes de 15 a 18 anos (Oliveira et al., 1994), demonstrando assim um aumento significativo ( $p = 0,001$ ) da infecção por *Hp*, de acordo com a idade, também em crianças. Em um outro estudo realizado observou-se uma prevalência de 81,7% de infectados pelo *Hp* em voluntários, também em Belo Horizonte, com aumento significativo com a idade

(Oliveira et al., 1999b). Numa população rural de Nossa Senhora do Livramento, no estado de Mato Grosso também se observou um aumento da prevalência com a idade, sendo que anticorpos anti-*Hp* foram detectados em 77,5% das crianças e 84,7% dos adultos (Souto et al., 1998).

Existe a hipótese de que com a melhoria do nível socioeconômico da população de países desenvolvidos a prevalência da infecção pelo *Hp* esteja diminuindo. Portanto, o aumento da prevalência da infecção pelo *Hp* em indivíduos mais idosos seria explicado então pelo efeito de “coorte”. Num estudo realizado em dois grupos de “coorte”, em Gutenberg, Suécia foi observado um decréscimo significativo ( $p < 0,001$ ) na presença de anticorpos anti- *Hp* na população nascida em 1922, quando comparada com a nascida em 1901/1902. Os indivíduos tinham 70 anos de idade e a positividade foi de 75,8 - 80,6% para mulheres e homens nascidos em 1901/2 e de 48,7 - 57,1% para mulheres e homens nascidos em 1922, respectivamente (Gause, 1998).

A soroprevalência do *Hp* varia amplamente em todo o mundo. De um modo geral os indivíduos de países em desenvolvimento têm uma maior probabilidade de adquirir a infecção e acredita-se que a prevalência esteja diminuindo em países industrializados (Brown, 2000; Tytgat, 2000). A figura 6 ilustra um panorama geral da percentagem de indivíduos infectados na população mundial.

Figura 6 - Distribuição geográfica da infecção pelo *H. pylori* em adultos, no mundo



Adaptado de BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*, v. 22, n. 2, p. 283-297, 2000 e de <http://www.hpylori.com>

### 3.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As opções de diagnóstico do *Hp* são bastante diversificadas, tornando-se uma situação ímpar dentre as doenças infecciosas. As mais diversas amostras podem ser utilizadas, tais como: biópsia gástrica, soro, amostra respiratória, fezes, urina e suco gástrico (Leodolter et al., 2001). Dentre os métodos comumente utilizados podem ser citados: a pesquisa da urease, a histologia, o teste respiratório com a uréia marcada, a cultura e as técnicas de biologia molecular (Glupczynski, 1998).

Diferentes situações clínicas podem determinar qual a melhor metodologia a ser empregada. Por exemplo, em pacientes com dispepsia, sem sintomas alarmantes e abaixo de 45 anos, os testes não invasivos são os mais recomendados (teste respiratório ou pesquisa de antígeno nas fezes ou sorologia). Mas se a idade do paciente for superior a 45 anos recomenda-se testes invasivos (histologia, urease e cultura). Já em indivíduos com dispepsia e sinais alarmantes os testes invasivos são os recomendados, independente da idade (Leodolter et al., 2001).

Um dos mais recentes avanços no diagnóstico do *Hp* é a detecção de antígenos nas fezes ou saliva através de métodos imunoenzimáticos (Vaira et al., 1999; Vaira et al., 2000). Estes testes, além de não serem invasivos, permitem a determinação de perfil epidemiológico e também têm sido recomendados para se acompanhar o tratamento e até mesmo diagnosticar dispepsias leves causadas pelo *Hp*. Entretanto o custo destes testes ainda é proibitivo em nosso meio.

A sorologia tem recebido especial atenção como método de triagem por tratar-se de um método não invasivo, de baixo custo em relação à endoscopia (Evans et al., 1989; Sobala et al., 1991; Thijs et al., 1996; Glupczynski, 1998) e de grande utilidade em estudos epidemiológicos (Graham et al., 1991a; Malaty et al., 1991; Graham et al., 1991b; Hulten et al., 1996; Goodman et al., 1996), uma vez que a infecção pelo *Hp* desencadeia uma resposta imune local e sistêmica (Glupczynski, 1998).

Como a gama de testes utilizados para detecção da infecção por *Hp* é grande, o melhor método para se estabelecer o diagnóstico ou verificar a erradicação deve ser meticulosamente selecionado. Entre as variáveis a serem observadas no momento da

escolha, as mais importantes são: a) os efeitos do tratamento prévio com antibiótico e inibidores de bomba de prótons, que diminuem a sensibilidade da maioria dos métodos, e b) a prevalência da infecção na população estudada, que pode alterar dramaticamente os valores preditivos positivos e negativos do teste em questão (Malfertheiner et al., 2000; Leodolter et al., 2001).

### 3.6.1 Métodos invasivos

#### *Histologia*

A histologia está entre os métodos invasivos mais empregados para o diagnóstico da infecção pelo *Hp*. Uma de suas principais vantagens é que além de detectar diretamente a presença da bactéria, possibilita determinar as alterações morfológicas (p.ex.: neoplasias) eventualmente presentes na mucosa gástrica da biópsia em questão (Leodolter et al., 2001; Graham e Rakel, 1999).

Assim como todos os métodos invasivos, baseados em biópsia, um dos maiores problemas deste método é a probabilidade de erros devido à amostragem, uma vez que a infecção pelo *Hp* apresenta um perfil de distribuição anatômica irregular. Portanto, para se obter um resultado confiável recomenda-se que 4 a 5 biópsias sejam coletadas do antro e do corpo do estômago. Assim como outros testes, a sensibilidade é maior em biópsias do antro, caso o paciente não tenha sido tratado (Malfertheiner et al., 2000; Glupczynski, 1998).

Colorações apropriadas e específicas devem ser empregadas na detecção do *Hp* por histologia (Graham e Rakel, 1999). Dentre os métodos recomendados encontram-se as colorações de Giemsa modificado, Warthin-Starry, Genta, Diff-Quick e El-Zimaity (Malfertheiner et al., 2000; Graham e Rakel, 1999; El-Zimaity et al., 1998a; El-Zimaity et al., 1998b; Genta et al., 1994). O uso destas colorações geralmente diminui a variação intra-observadores, que nas infecções por *Hp* ainda é muito elevada (Malfertheiner et al., 2000). O recomendado é que seja realizada ao menos uma

coloração tradicional (p.ex.: HE) e uma especial (p.ex.: Diff-Quik) ou então uma coloração tripla como a de Genta ou El-Zimaity. A sensibilidade destes métodos varia de 80 a 100% e a especificidade geralmente é maior que 95% (Graham e Rakel, 1999).

### *Urease*

O teste rápido da urease apresenta as vantagens de ser simples, rápido e de custo acessível. O seu valor na prática não está baseado somente na sensibilidade e na especificidade (geralmente superiores a 95%), mas também na rapidez com a qual o endoscopista pode obter o resultado. A sensibilidade pode estar diminuída quando a leitura é feita em menos de uma hora (Glupczynski, 1998) ou em pacientes sob tratamento (Malfertheiner et al., 2000). Vários métodos têm sido propostos para aumentar a velocidade da viragem do pH, tais como pré-aquecimento do kit ou incubação a 37° C (Glupczynski, 1998; Pilonetto et al., 1993). Além de ser muito conveniente na prática clínica é um teste muito acurado (Leodolter et al., 2001).

### *Cultura*

Sem dúvida alguma a cultura é o teste mais específico para se diagnosticar a infecção pelo *Hp* (Leodolter et al., 2001), entretanto a sua sensibilidade tem variado muito entre os centros de diagnóstico. Provavelmente estas discrepâncias sejam explicadas pelas diferenças na habilidade e experiência em técnicas de cultivo (Glupczynski, 1998). Embora seja considerada por alguns como um método complicado, atualmente a cultura pode ser realizada na maioria dos laboratórios de Microbiologia. Entretanto, não é um exame necessário para se estabelecer o diagnóstico da infecção pelo *Hp*. Por outro lado, uma das grandes vantagens deste método é permitir a realização subsequente do teste de susceptibilidade a antibióticos (Glupczynski, 1998; Leodolter et al., 2001). Este teste pode ser de particular importância nos casos de pacientes que receberam o tratamento e houve falha

terapêutica ou em pacientes onde se suspeita a presença de um isolado resistente, como é o caso de regiões com altas taxas de resistência microbiana (van Zweet et al., 1996).

No Brasil, Queiroz et al. (1987) desenvolveram um meio de cultura a base de ágar BHI adicionado de suplemento e antibióticos e que recebeu o nome de BHM (*Belo Horizonte Medium*). Este meio demonstrou ter uma ótima sensibilidade e permite a triagem do *Hp*, pois as colônias que se desenvolvem apresentam um aspecto dourado brilhante, muito característico.

### ***Biologia Molecular e Outros Métodos***

Atualmente os exames de biologia molecular para a detecção de *Hp* têm uma maior aplicação em estudos científicos e não estão sendo utilizados em larga escala no diagnóstico laboratorial de rotina. As metodologias moleculares podem fornecer informações valiosas para estudos clínicos e epidemiológicos, dando uma noção da estrutura genética da população de *Hp* e auxiliam a compreensão da evolução do microorganismo. Para tanto é essencial o uso de técnicas sensíveis e eficientes. Várias técnicas moleculares têm sido desenvolvidas, baseadas no alto grau de variabilidade genética dentre as cepas de *Hp* (Ge e Taylor, 1998). Dentre estas técnicas encontram-se: a ribotipagem, a técnica de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), o método de PCR-RFLP, as técnicas de AP-PCR (*Arbitrarily primed PCR*), também conhecida como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) e a de tipificação seqüencial de PCR-DNA, entre outras (Ge e Taylor, 1998). De grande interesse diagnóstico futuro, encontra-se a possibilidade de detecção por PCR do gen que confere resistência à Claritromicina em biópsias, sem a necessidade de isolamento da bactéria em cultura (Leodolter e Megraud, 2001).

### 3.6.2 Métodos não-invasivos

#### *Sorologia*

Durante a infecção por *Hp* o perfil da resposta sistêmica é constituído por um aumento transitório de IgM, seguido de um aumento de IgA e IgG específicas que persistem durante a infecção. Diversos sistemas comerciais têm sido desenvolvidos para a detecção destes anticorpos, sendo a maioria designada à detecção e principalmente de IgG e eventualmente de IgA, no soro. A metodologia empregada geralmente é o ELISA ou eventualmente o látex. Recentemente, técnicas rápidas de imunocromatografia têm sido empregadas principalmente em consultórios. Também é possível a detecção de IgG na urina e de IgA e IgG na saliva, embora os kits para estes dois últimos ensaios sejam menos sensíveis do que os métodos que utilizam soro (Glupczynski, 1998; Fallone et al., 1996; Alemohammad et al., 1993).

Há uma recomendação geral de que qualquer metodologia sorológica deve ser validada e padronizada localmente, antes de ser implantada como ferramenta de diagnóstico (Debonnie et al., 1993). Em muitas situações isto pode implicar inclusive em ajuste do “cut-off” recomendado pelo fabricante (Thijs et al., 1996). A acurácia diagnóstica da sorologia é um pouco menor que os demais testes e deve ser utilizada para *screening* ou, se for utilizada para diagnóstico deve-se realizar uma validação local da metodologia, especialmente em populações com baixa prevalência da infecção (Leodolter et al., 2001).

Numa ampla revisão metodológica, Glupczynski sugere que o *screening* sorológico é particularmente interessante em pacientes jovens (menos de 45 anos) dispépticos, antes da endoscopia ou como triagem pré-tratamento, em caso onde não haja nenhum sintoma alarmante (Glupczynski, 1998). Esta afirmação é corroborada pelo relatório do Consenso Europeu sobre a conduta na infecção por *Hp* e por vários outros autores (Malfertheiner et al., 1997; Leodolter et al., 2001).

Diversos testes sorológicos rápidos foram também desenvolvidos, a princípio para uso em consultórios, utilizando-se ELISA em fase sólida, aglutinação em látex ou imunocromatografia (Graham, 1996). Dentre as principais vantagens destes *kits* está a sua praticidade: possibilidade de se utilizar sangue total; resultados em 5 a 10 minutos; interpretação simples (mudança de cor) e não são necessários equipamentos. Entretanto, a sensibilidade fica entre 80-85% e a especificidade entre 75-80% (Glupczynski, 1998). Em um estudo piloto, utilizando método imunocromatográfico, o autor do presente trabalho encontrou uma especificidade e sensibilidade inferior a 50% (Pilonetto, 2000 - dados não publicados). Enfim, não se recomenda a utilização destes métodos em locais onde não esteja disponível um método de bancada para confirmação dos resultados. No Brasil, estes testes são geralmente usados em laboratório e não em consultórios.

### ***Teste Respiratório***

É o *gold standard* dos métodos não invasivos e apresenta uma elevada acurácia tanto no período pré quanto no pós-tratamento (Bell et al., 1987; Bell, 1998; Leodolter et al., 2001). Este teste é realizado após a ingestão de uréia marcada com carbono-13 ou carbono-14 e está baseado na detecção da atividade de urease do *Hp*. Esta enzima hidrolisa a uréia marcada, liberando amônia e bicarbonato marcado, o qual é rapidamente absorvido para a corrente circulatória, onde é convertido em água e CO<sub>2</sub>. Então o dióxido de carbono marcado pode ser detectado no ar expirado pelo paciente, através de espectrofotometria de massa ou infravermelho (Leodolter et al., 2001). O teste é realizado comumente após uma refeição ou bebida especial antes da administração da uréia marcada. Alternativamente o substrato pode ser dissolvido na bebida-teste e então esta é administrada. O uso de ácido cítrico nestas refeições parece aumentar a sensibilidade do teste. O uso da refeição previamente à administração da uréia é muito importante para garantir uma melhor distribuição do substrato no corpo

gástrico e no fundo. Esta distribuição homogênea da uréia marcada é crucial, principalmente nos casos pós-tratamento onde a densidade do *Hp* no antro está reduzida e pode até aumentar no fundo (Leodolter et al., 2001).

Outras técnicas recentemente descritas e que terão grande impacto no diagnóstico da infecção pelo *Hp* incluem: a pesquisa de antígeno nas fezes e a hibridização fluorescente *in situ* (Vaira et al., 1999; Braden et al., 2000; Vaira et al., 2000; Leodolter et al., 2001; Leodolter e Megraud, 2001).

### 3.7 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

O *Hp* geralmente apresenta-se resistente ao tratamento que utiliza apenas uma droga. Portanto, para erradicação desta infecção emprega-se habitualmente de duas a até quatro drogas de diferentes grupos tais como inibidores de bomba de prótons, antibióticos e sais de bismuto coloidal (Graham e Rakel, 1999; Valarini, 1999; Coelho et al., 2000).

Atualmente os esquemas que utilizam o metronidazol são desaconselhados, pois a taxa de resistência chega a 47-70 % nos países latino-americanos (Coelho et al., 2000; Castro e Coelho, 1998). Valarini, estudando oito esquemas terapêuticos em pacientes provenientes de Curitiba, PR verificou que a melhor opção seria a terapia triplíce associando amoxicilina, metronidazol e omeprazol, pois apesar de outras associações terem se mostrado igualmente eficazes ou até ligeiramente superiores (p.ex.: omeprazol, claritromicina e metronidazol), este protocolo foi o que demonstrou maior adesão e menos efeitos colaterais (Valarini, 1999).

Numa análise do perfil de resistência do *Hp*, Mendonça et al. (2000) detectaram resistência ao metronidazol em 42% (38/90) dos pacientes; à amoxicilina em 29 % (26/90); à claritromicina e à tetraciclina em 7% (6/90) e à furazolidona em apenas 4% (4/90). Estes resultados corroboram a necessidade de se realizar a cultura e estabelecer o perfil de resistência do *Hp*, em áreas geográficas específicas, antes do uso generalizado de esquemas terapêuticos. Também fica evidente a necessidade de se associar dois ou mais antibióticos para alcançar um melhor efeito terapêutico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### *Casuística*

Foram utilizadas amostras de sangue de 276 doadores provenientes do banco de sangue Hemobanco de Curitiba –PR, obtidas no período de junho a julho de 2000.

Dentre os doadores estudados, 65% (179/276) eram homens e 35% (97/276) mulheres, com idade de 18 a 60 anos (média: 33 anos). De acordo com a distribuição da faixa etária, 42,4% (117/276) dos doadores encontravam-se entre 18 a 29 anos; 31,5% (87/276) entre 30 a 39 anos; 16,7% (46/276) entre 40 a 49 anos e 9,4% (26/276) acima de 50 anos. A distribuição da origem racial foi a seguinte: 88,0% (243/276) caucasóides, 10,5% (29/276) mulatos, 1,1% (3/276) negros e 0,4% (1/276) asiáticos. Quanto à origem geográfica dos doadores 61,6% (170/276) eram da cidade de Curitiba, 34,8% (96/276) da região metropolitana e os 3,6% (10/276) restantes do interior do Paraná. A determinação do nível socioeconômico foi determinada pelo perfil dos doadores do banco de sangue Hemobanco, seguindo os parâmetros do Critério Brasil (IBOPE, 2001), sendo a maioria pertencente à classe socioeconômica baixa e média-baixa (níveis C, D e E).

Para efeitos de comparação da prevalência de anticorpos anti-*Hp* em diferentes níveis socioeconômicos foi estabelecido um grupo controle constituído por 79 universitários com idade entre 18 e 26 anos (média 20 anos), sendo 12,7% (10) homens e 87,3% (69) mulheres; de classe socioeconômica alta e média-alta (níveis A1, A2, B1, B2), predominantemente caucasóides (95%), provenientes de Curitiba (95%) e região metropolitana (5%).

### *Amostras biológicas*

As amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo. Os soros foram separados por centrifugação (3000 RPM por 5 minutos) e acondicionados em frascos

Eppendorf de 1,2 mL e conservados a  $-20^{\circ}$  C, até o momento de análise. A detecção de anticorpos foi executada de agosto de 2000 a março de 2001.

### ***Detecção dos anticorpos IgG anti-Hp***

Os anticorpos anti-*Hp* (IgG) foram determinados qualitativamente pelo método de enzimaímmunoensaio (ELISA), utilizando-se como antígenos proteínas de alto peso molecular associados à célula bacteriana - HM-CAP<sup>®</sup>, segundo as recomendações do fabricante do *kit* (ProSpecT para *Helicobacter pylori*<sup>®</sup>, Seradyn/Biobrás – Figura 7). Os antígenos de *Hp* (HM-CAP<sup>®</sup>) são obtidos conforme descrito por Evans e cols. (1989). Para a determinação da presença ou ausência de anticorpos foram pré-estabelecidos valores de *cut-off* empregando-se os calibradores fornecidos pelo fabricante (Figura 8). Sucintamente, pipetou-se em duplicata 100  $\mu$ L de cada calibrador (negativo, baixo e alto) na microplaca, para obtenção da curva-padrão. Os soros foram diluídos 1:100 em tampão apropriado, sendo 100  $\mu$ L transferidos para as microplacas revestidas com antígenos *Hp*. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente, as microplacas foram lavadas por três vezes com tampão apropriado. Em seguida, 100  $\mu$ L de conjugado enzimático (anti-IgG humana ligada à peroxidase - HRPO) foram adicionados e incubados por 20 minutos. Após nova etapa de lavagem adicionou-se 100  $\mu$ L de substrato (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina - TMB) aos orifícios. Após incubação por 10 minutos adicionou-se 100  $\mu$ L da solução *STOP* constituída de ácido sulfúrico 1 N. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro modificado para leitura de placas de ELISA (modelo ETI-System<sup>®</sup>, Sorin Biomedica). Amostras cujos resultados apresentaram valores superiores a 2,2 VE (Valor de ELISA) foram consideradas positivas e abaixo de 1,8 VE negativas. Amostras cujos resultados apresentaram valores entre 1,8 e 2,2 VE foram consideradas indeterminadas tendo sido excluídas do presente estudo. Para se verificar a exatidão do *kit*, dezesseis testes (13 soros e 3 controles) foram determinados em duplicata e demonstraram uma concordância de 100% (Figura 9).

Figura 7 - Sistema comercial utilizado para a detecção de anticorpos anti-*H. pylori*

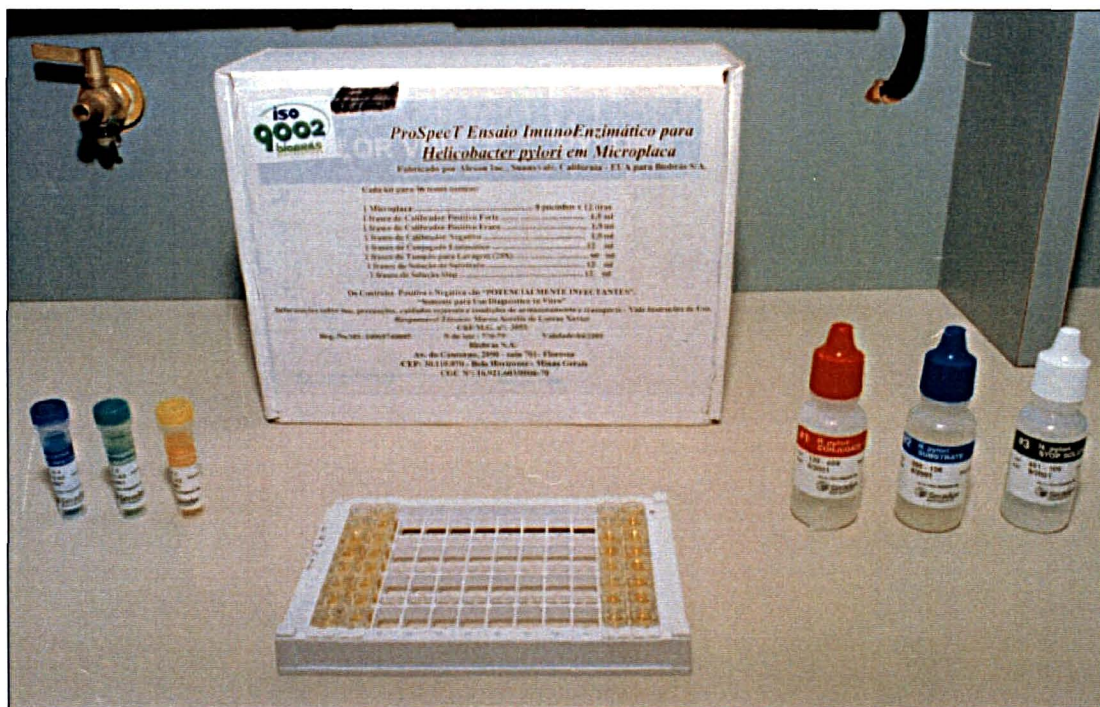
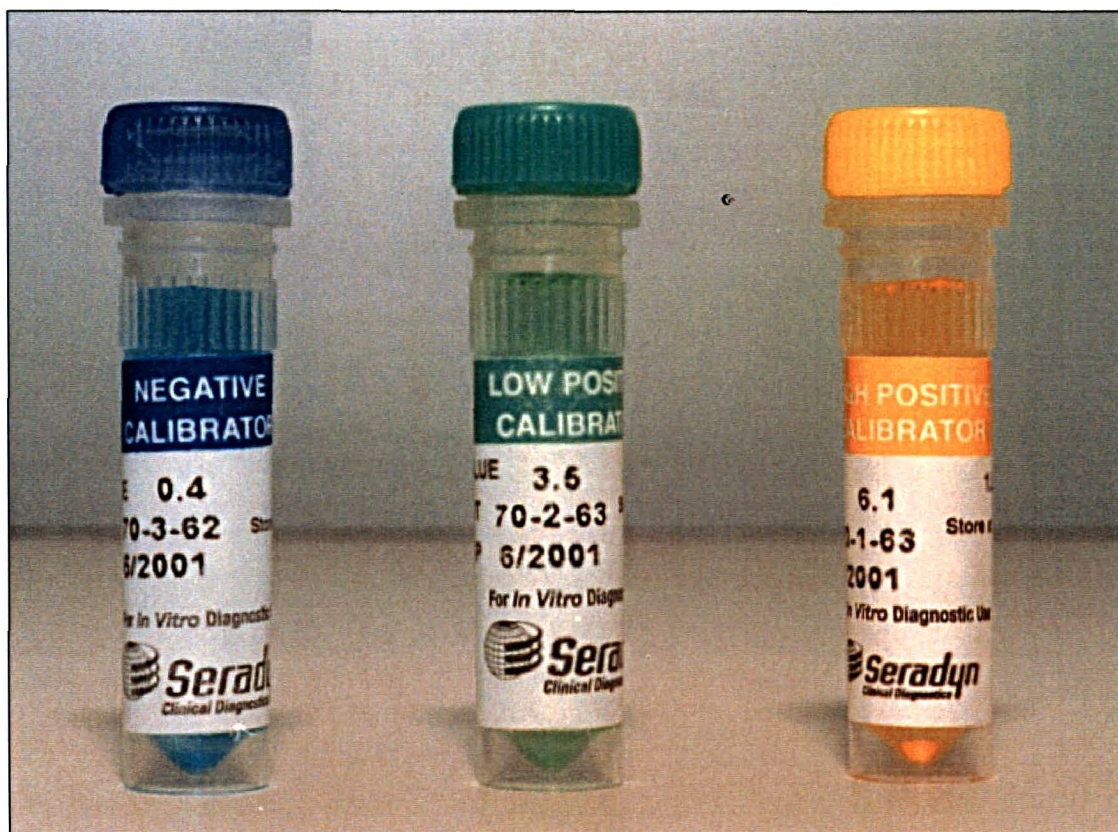
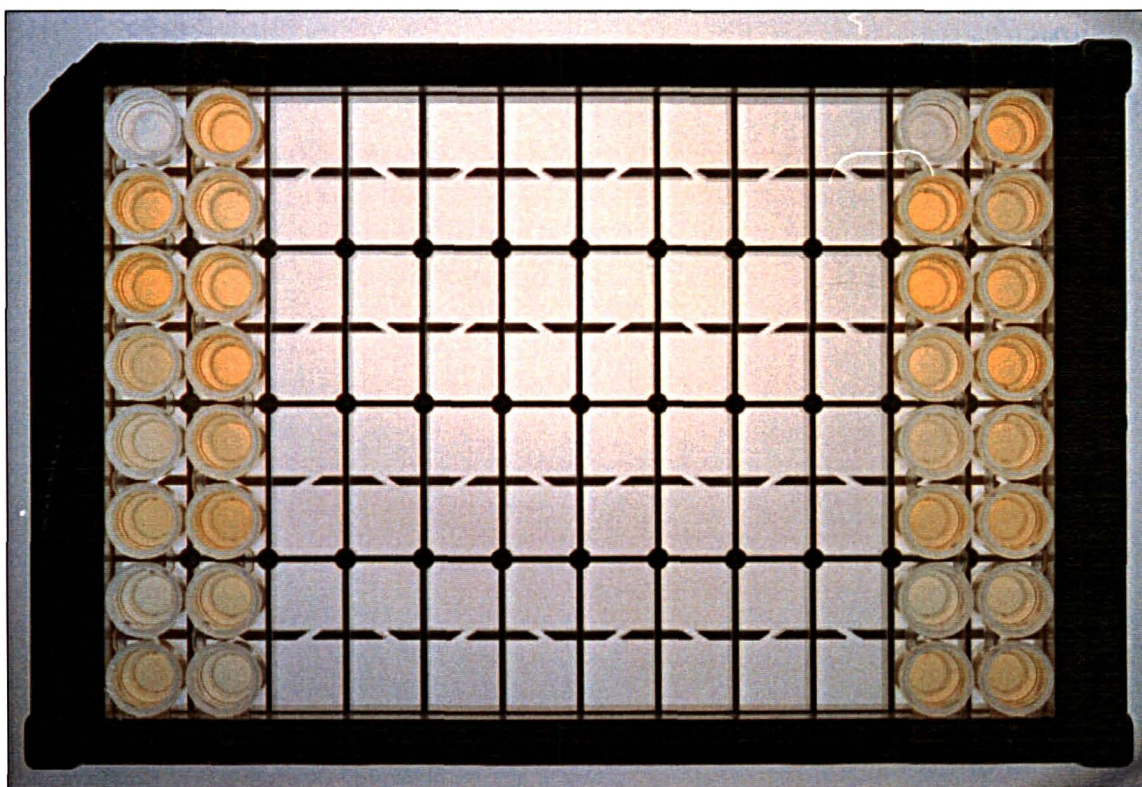


Figura 8 - Calibradores utilizados na detecção de anticorpos anti-*H. pylori*



NOTA: tampa azul – calibrador negativo; tampa verde – calibrador baixo; tampa amarela – calibrador alto.

Figura 9 - Resultados do ELISA (Seradyn®), realizados em duplicata



NOTA: As colunas da esquerda são duplicatas da coluna da direita, sendo os três primeiros testes da primeira coluna os controles negativo, baixo e alto, respectivamente.

Figura 10 - Kit utilizado para confirmação da pesquisa de anti-*H. pylori* em doadores anti-Hbc e anti-Hbs positivos



### *Detecção de marcadores sorológicos*

Os resultados dos marcadores sorológicos foram obtidos através de consulta ao banco de dados do Hemobanco. Neste serviço, as pesquisas de anticorpos anti-Hbc, anti-Hbs e de antígeno HbsAg foram realizadas utilizando-se kits de ELISA (Biorad®). Resultados duvidosos foram repetidos em duplicata (ELISA) e se necessário era realizado *Immunoblot*, conforme o preconizado nas portarias 1376 e 121 do Ministério da Saúde. O mesmo protocolo foi aplicado para determinação do Anti-HCV, sendo utilizado um kit de ELISA (Murex 4.0®). A pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* foi conduzida através do método de ELISA (Wiener®) e hemaglutinação (Imunoserum®). A pesquisa de VDRL foi executada utilizando-se reativo de látex para pesquisa de anticorpos anti-cardiolipina (Biolab®). Os anticorpos anti-HIV foram pesquisados utilizando dois métodos de ELISA (Murex 1.2.0® e Biochem®) e a confirmação, caso necessária, era realizada através de Western-Blot.

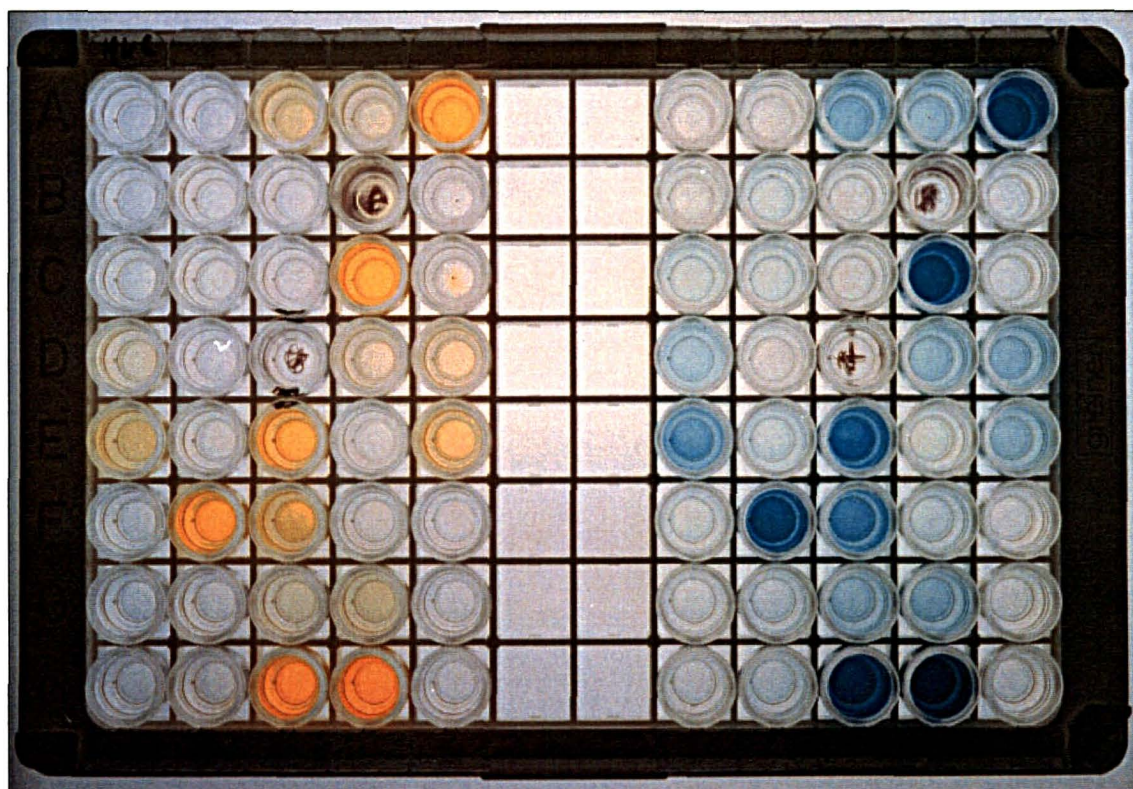
Nas amostras positivas para anti-*Hp* e anti-Hbs e/ou Anti-Hbc, utilizou-se um outro kit (Monobid®) para determinação dos anticorpos anti-*Hp*; para confirmação dos resultados (Figura 10). Este método baseia-se na utilização do princípio estreptavidina-biotina, e os antígenos são sonicados de células bacterianas totais de *Hp*. A ótima reprodutibilidade deste kit pode ser observada na figura 11, onde a coluna à direita constitui uma duplicata da coluna à esquerda, embora estas se encontrem em etapas diferentes do teste – antes e depois da adição da solução *STOP* (comparar a intensidade das cores).

### *Validação da metodologia*

Para validação da metodologia sorológica foram coletadas amostras (soro e biopsia) de 23 pacientes sintomáticos submetidos à endoscopia, com indicação clínica para pesquisa e tratamento de infecção pelo *Hp*. Para determinar o diagnóstico de infecção por *Hp* foram utilizados como critério de infecção a histologia pela

carbolfucsina (El-Zimaity et al., 1998b) e/ou teste da urease (Glupczynski, 1998) positivos. As amostras foram obtidas de pacientes do serviço de endoscopia do Hospital Universitário Cajuru. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cajuru e os pacientes deram o seu consentimento por escrito (anexo 1).

Figura 11 - Resultados do ELISA (Monobid®) realizados em duplicata, antes e depois da adição da solução *STOP*



NOTA: cor azul – antes da adição da solução *STOP*; cor amarela - após adição da solução *STOP*. Observar a reprodutibilidade do método (colunas à esquerda x colunas à direita) pela intensidade da cor.

### ***Análise estatística***

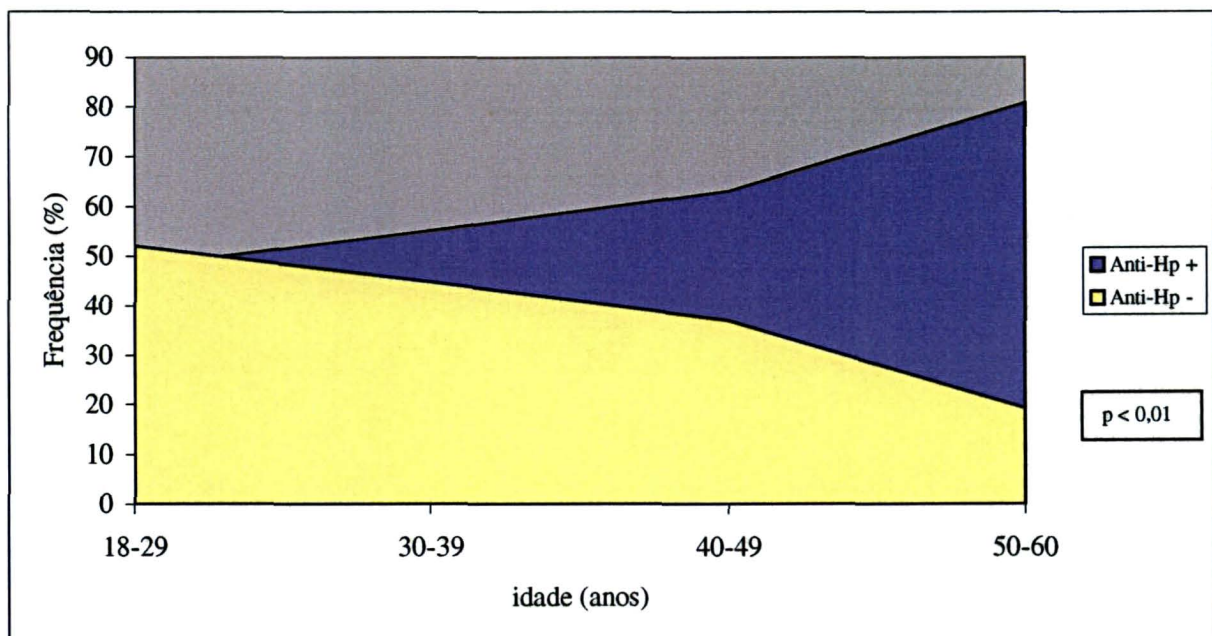
Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se os testes não-paramétricos de qui - quadrado de Pearson, com auxílio do software Statistica, versão 5.5 e do software Microstat.

## 5 RESULTADOS

Dos 276 doadores cujos dados foram analisados, 161 apresentaram sorologia positiva para anticorpos IgG anti-*Hp*, demonstrando uma soropositividade de 58,3%.

A análise da positividade de anticorpos anti-*Hp* de acordo com a idade dos doadores demonstrou um aumento conforme a seguir: em indivíduos entre 18 a 29 anos, 47,9% (56/117) tinham a presença de anti-*Hp*. Na faixa etária entre de 30 a 39 anos, 55,2% (48/87) dos indivíduos foram positivos. Para indivíduos entre 40 a 49 anos, a taxa de positividade foi de 63,0% (29/46) e acima de 50 anos a positividade foi de 80,8% (21/26). O aumento da positividade de anti-*Hp* nos doadores, de acordo com a idade, foi estatisticamente significante ( $p < 0,01$ ). A presença de anticorpos anti-*Hp*, de acordo com a faixa etária, encontra-se demonstrada no Gráfico 1.

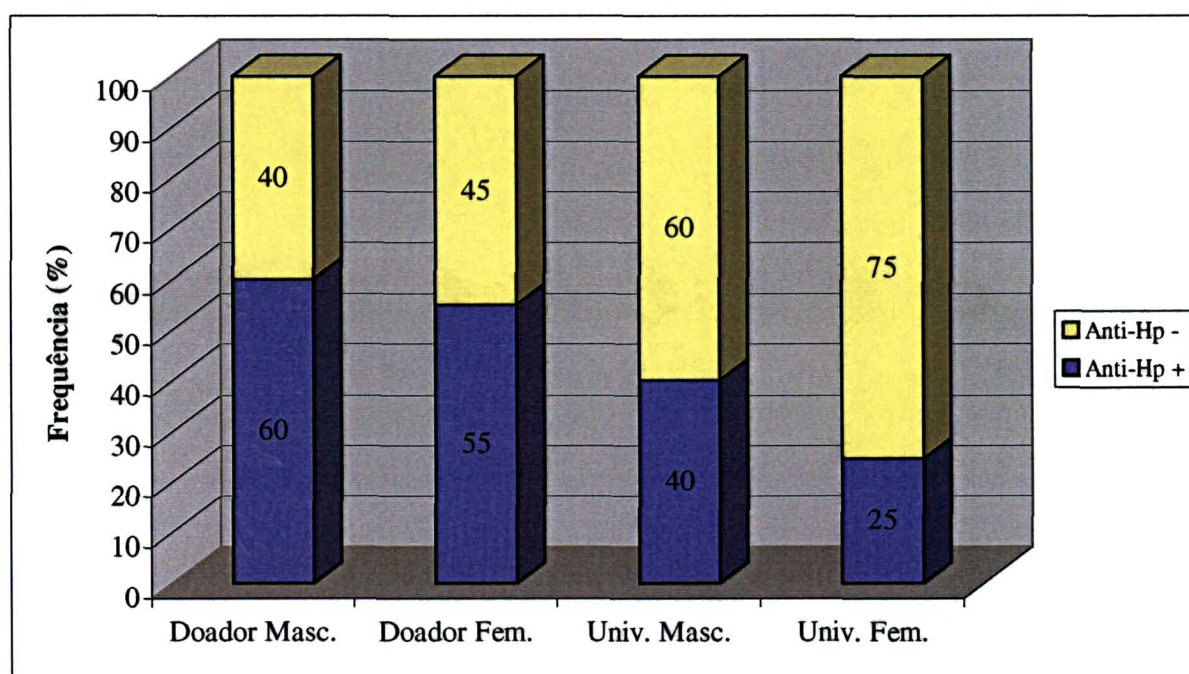
Gráfico 1 - Prevalência de anticorpos anti-*H. pylori*, de acordo com a faixa etária dos doadores



A soropositividade para anticorpos anti-*Hp* de acordo com o sexo demonstrou que entre os doadores de sangue 55% (53/97) das mulheres e 60% (108/179) dos

indivíduos do sexo masculino apresentaram anticorpos anti-*Hp* (Gráfico 2). Em relação aos universitários, 40,0% (4/10) dos homens eram soropositivos e 25% (17/69) das mulheres tinham anticorpos anti-*Hp* (Gráfico 2). Estes resultados não demonstraram diferença significativa entre o número de mulheres e homens infectados pelo *H. pylori* ( $p = 0,43$  e  $p = 0,30$ , respectivamente).

Gráfico 2 - Prevalência de anticorpos anti-*H. pylori* nos doadores e universitários, segundo o sexo



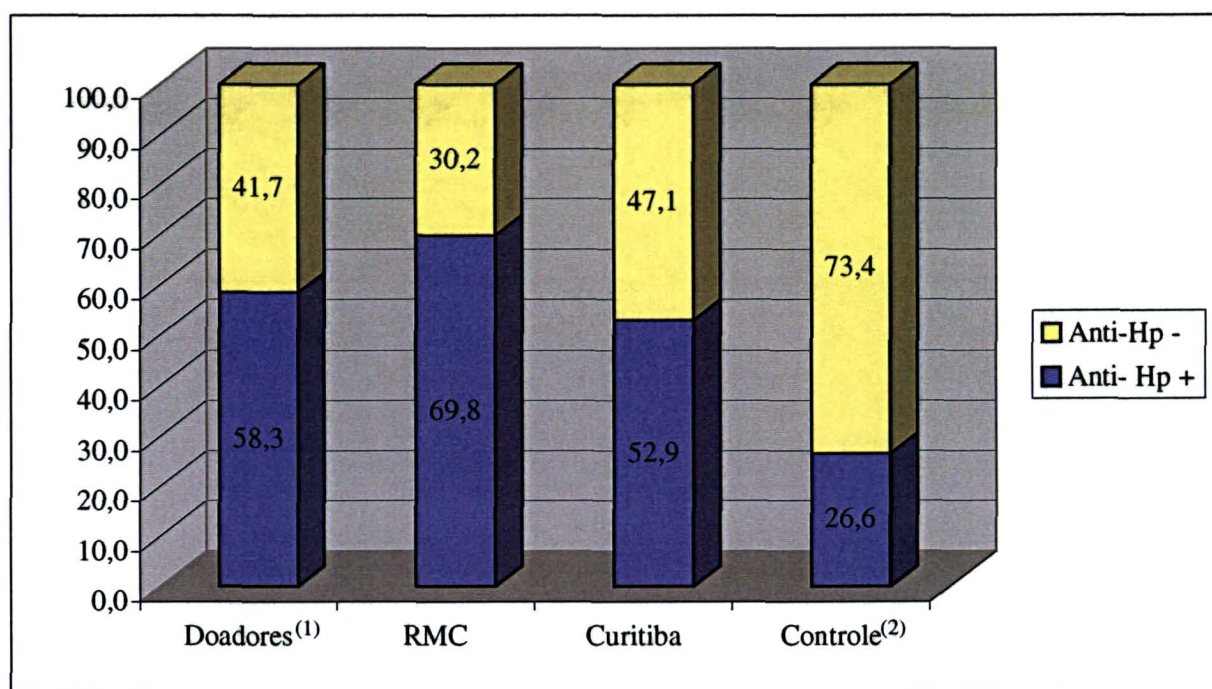
NOTA: Doador Masc. X Doador Fem.–  $p = 0,43$ ; Univ. Masc. X Univ. Fem.–  $p = 0,30$ ; Masc.: Masculino; Fem.: Feminino

A prevalência de anticorpos anti-*Hp*, analisada quanto à origem geográfica dos doadores, foi subdividida em: Curitiba e Região Metropolitana de Curitiba (RMC). Dos 170 indivíduos da cidade de Curitiba, 90 (52,9%) foram anti-*Hp* positivos enquanto que dos 96 indivíduos provenientes da RMC, 67 (69,8%) apresentaram anticorpos anti-*Hp*. Analisando a prevalência de anti-*Hp* na cidade de Curitiba em

comparação à RMC, estes resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa, sendo  $p = 0,0073$  (Gráfico 3).

Analisando-se o nível socioeconômico e a prevalência de anticorpos anti-*Hp*, esta foi significativamente maior nos doadores (predominantemente de classe média-baixa/baixa ou níveis B2, C-E) do que a observada nos universitários (classe alta/média-alta ou níveis A1, A2 e B1; Gráfico 4), sendo a positividade 58,3% (161/276) em doadores versus 26,6% (21/79) nos universitários ( $p < 0,001$ ; Gráfico 3).

Gráfico 3 – Comparação da positividade de anticorpos anti-*H. pylori*, de acordo com a origem geográfica e nível socioeconômico

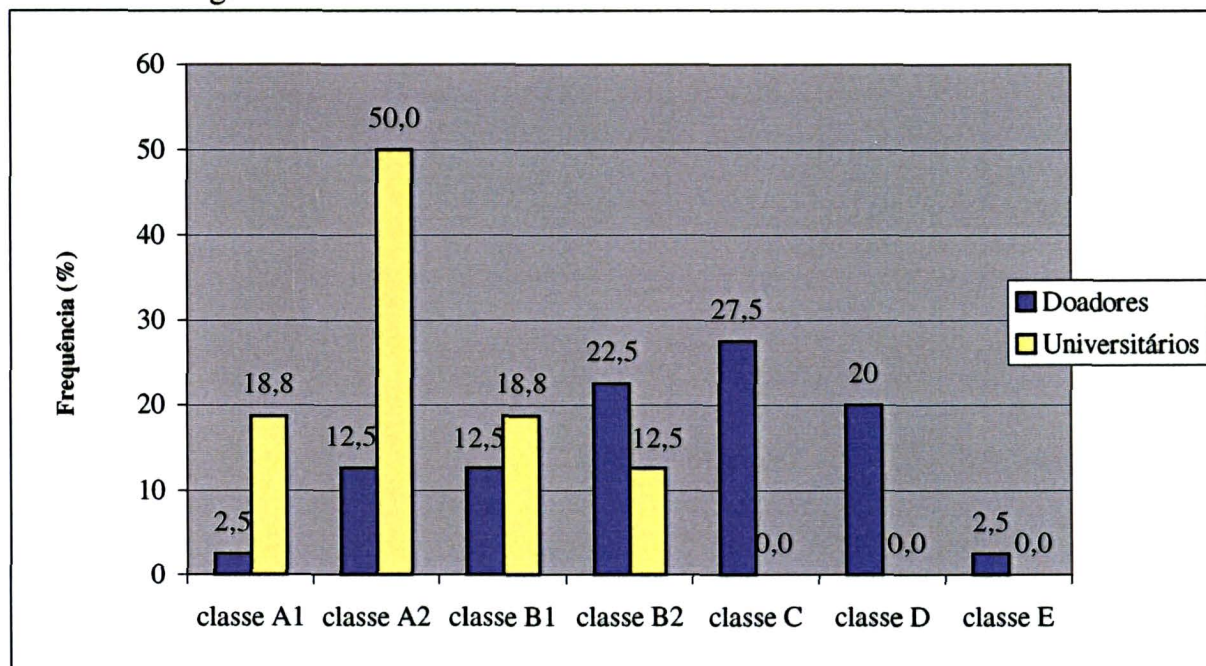


NOTAS: RMC x Curitiba -  $p = 0,0073$ ; Doadores x Controle:  $p < 0,001$ .

(1) - nível socioeconômico médio-baixo/baixo,

(2) (2) - nível socioeconômico alto/médio-alto;

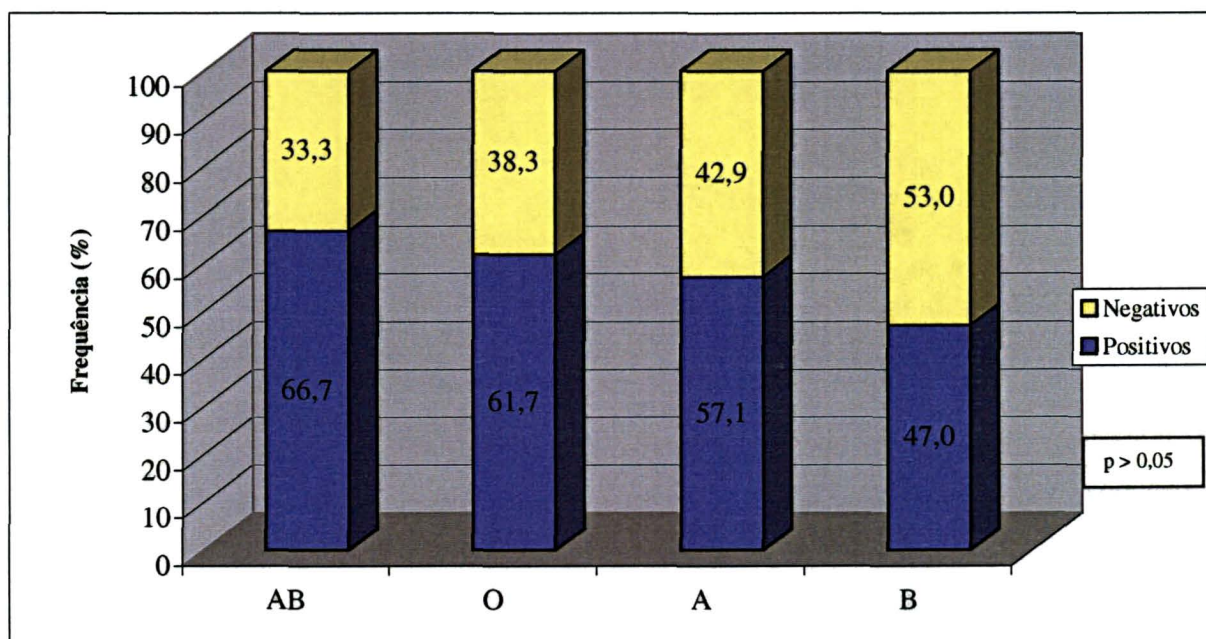
Gráfico 4 - Distribuição do nível socioeconômico entre doadores e no grupo controle, segundo o Critério Brasil



NOTA: classe A1 e A2 – classe alta; classe B1 – média-alta; classe B2 – média; classe C – média-baixa; classe D e E – baixa

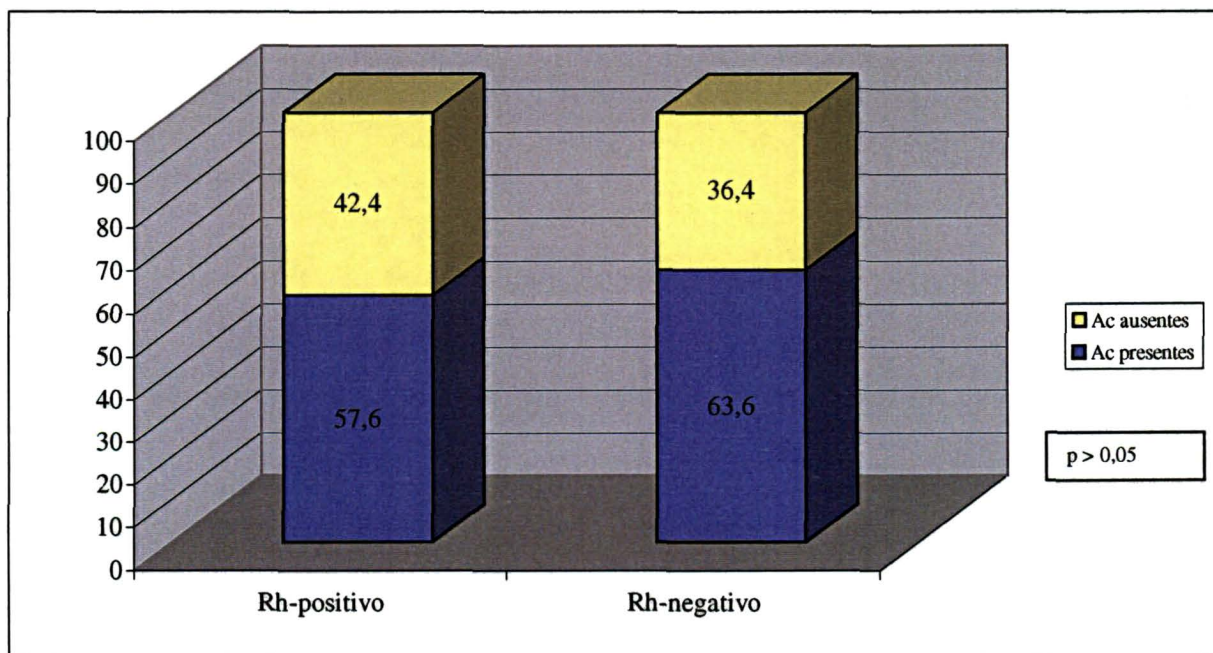
A distribuição dos grupos sanguíneos ABO entre os doadores foi a seguinte: 46,4% (128/276) eram do grupo O, 38% (105/276) do grupo A, 12,3% (34/276) do grupo B e 3,3% (9/276) do grupo AB. Quanto ao sistema Rh, 88% (243/276) eram Rh positivo e 12% (33/276) eram Rh negativo. Em relação ao grupo sanguíneo ABO, observou-se uma maior soropositividade para anti-*Hp* entre os indivíduos AB: 66,7% (6/9), quando comparados com indivíduos O: 61,7% (79/128), indivíduos do grupo A: 57,1% (60/105) e indivíduos do grupo B: 47,0% (16/34). Não houve diferença estatisticamente significativa para a presença de anticorpos anti-*Hp* entre os diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO ( $p = 0,44$ ; Gráfico 5). A prevalência para anticorpos anti-*Hp* em doadores Rh (D) positivos e negativos foi de 57,6% (140/243) e 63,6% (21/33) respectivamente, sem diferença significativa ( $p > 0,05$  – Gráfico 6).

Gráfico 5 - Prevalência de anticorpos anti-*H. pylori* em doadores, de acordo com o grupo sanguíneo ABO



NOTA: Negativos – ausência de anti-*Hp*; Positivos – presença de anti-*Hp*.

Gráfico 6 - Prevalência de anticorpos anti-*H. pylori*, de acordo com o grupo sanguíneo -Sistema Rh (D)



NOTA: Ac – anticorpos anti-*Hp*

Quanto à positividade dos anticorpos anti-*Hp* concomitantemente com outros marcadores de doenças infecciosas, observou-se uma maior prevalência de doadores que possuíam simultaneamente anticorpos anti-*Hp* e anticorpos da hepatite B (definidos pela presença de anti-Hbc e Anti-Hbs). Dos 276 doadores da pesquisa, 16 (5,8%) apresentaram anticorpos anti-Hbc. Destes, 12 (4,3% do total) apresentaram também anticorpos anti-Hbs. Três doadores (1,1% do total) apresentaram somente anticorpos Anti - Hbc e um único indivíduo (0,4% do total) foi positivo para Anti-Hbc e HbsAg. Dentre os doadores anti-Hbc e Anti-Hbs positivos, 91,7% (11/12) deles apresentaram anticorpos anti-*Hp*, enquanto que apenas um (1/12 ou 8,3%) indivíduo anti-Hbc e Anti-Hbs positivos foi negativo para anti-*Hp*. Em relação aos doadores positivos somente para anti-Hbc, todos os três (100%) foram positivos para anti - *Hp*. O único indivíduo que apresentou positividade para o antígeno Austrália (HbsAg) e Anti-Hbc, foi negativo para anticorpos anti-*Hp* (Tabela 1).

No geral, dos 16 doadores que apresentaram pelo menos um marcador para hepatite B, 14 (87,5%) também apresentaram anticorpos anti-*Hp*, demonstrando uma diferença estatisticamente significativa, sendo  $p = 0,0001$  (Tabela 1).

Quanto às demais doenças infecciosas, dois indivíduos apresentaram positividade para anti-cardiolipina (VDRL positivo), dois para anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (Chagas – EIA) e dois para anticorpos anti-HCV. Todos estes seis indivíduos também apresentaram anticorpos anti-*Hp*. Nenhum indivíduo da população estudada apresentou anticorpos anti-HIV (Tabela 2).

Tabela 1 - Prevalência de anticorpos anti-*H. pylori* nos doadores Anti-Hbc e Anti-Hbs positivos

Anticorpos presentes	Anti - <i>Hp</i> Positivos	Anti - <i>Hp</i> Negativos
	n (%)	n (%)
Anti-Hbc e Anti-Hbs	11 (91,7)	1 (8,3)
Anti-Hbc	03 (100)	0 (0)
HbsAg e Anti-Hbc	0 (0)	1 (100)
Total	14 (87,5)	2 (12,5)

NOTA: p = 0,0001

Tabela 2 - Prevalência de marcadores sorológicos de outras doenças infecciosas, nos doadores

Anticorpos presentes	Anti - <i>Hp</i> Positivos	Anti - <i>Hp</i> Negativos
	n (%)	n (%)
Anti-cardiolipina (VDRL)	02 (0,7)	0 (0)
Anti-HCV	02 (0,7)	0 (0)
Anti- <i>T. cruzi</i>	02 (0,7)	0 (0)
Anti-HIV	0 (0)	0 (0)
Total	06 (2,1)	0 (0)

Na validação realizada para o método sorológico observou-se que 78,3% (18/23) dos pacientes submetidos à biópsia foram positivos para o teste da urease e 69,6 % (16/23) para a análise histológica utilizando-se a coloração de carbolfucsina. A presença de anticorpos anti-*Hp* foi detectada em 86,9 % (20/23) destes pacientes (Tabela 3). Tendo sido considerado infectado o indivíduo que apresentou teste da urease e/ou histologia positivos, a sensibilidade da sorologia foi de 86,4% (19/22), e o valor preditivo positivo (VPP) foi de 95% (Tabela 4).

Tabela 3 – Resultados dos diferentes testes para diagnóstico da infecção por *H. pylori*, utilizados na validação da sorologia

<b>Método</b>	<b>Positivos n (% no grupo)</b>	<b>Negativos n (% no grupo)</b>	<b>Total (n = 23)</b>
<b>Urease</b>	18 (78,3)	5 (21,7)	23
<b>Histologia</b>	16 (69,6)	7 (30,4)	23
<b>Anti -Hp</b>	20 (86,9)	3 (13,1)	23

Tabela 4 – Resultados da validação do método sorológico

<b>Método</b>	<b>Urease e Histologia positivos n (% no grupo)</b>	<b>Urease e/ou Histologia negativos n (% no grupo)</b>	<b>Total (n = 23)</b>
<b>Anti -Hp Positivos</b>	19 (82,6)	1 (4,4)	20 (86,9)
<b>Anti -Hp Negativos</b>	3 (13,0)	0 (0,0)	3 (13,0)
<b>Total</b>	22 (95,6)	1 (4,4)	23 (100,0)

NOTA: Sensibilidade - 86,4% (19/22); VPP - 95% (19/20); Especificidade e VPN - não aplicável.

## 6 DISCUSSÃO

Desde que foi isolado em 1982 (Marshall e Warren, 1983), o *Helicobacter pylori* tem sido associado com diversos distúrbios gastrointestinais como gastrite e úlceras pépticas (Warren, 1984), dispepsias não ulcerosas (Talley et al., 1991), adenocarcinoma (Forman et al., 1991; Parsonett et al., 1991) e linfoma MALT (Wotherspoon et al., 1991). Outras hipóteses levantadas incluem a associação desta bactéria com outros distúrbios não gastrointestinais como: hepatopatias, baixa estatura, doenças coronárias, doenças auto-imunes, entre outras (Queiroz, 2001; Ponzetto et al., 2000a; Strachan et al., 1998; Brown, 2000). Portanto há praticamente duas décadas, desde que Marshall et al. (1983) isolaram o *Hp*, pesquisadores no mundo todo vêm estudando este microorganismo e inúmeros trabalhos têm sido publicados sobre o assunto.

### *A prevalência do Hp no Brasil e no mundo*

Vários estudos epidemiológicos têm procurado estabelecer a prevalência da infecção por *Hp* em diferentes partes do globo, bem como tentado encontrar o mecanismo exato de transmissão desta bactéria (Megraud et al., 1989; Graham et al., 1991a; Malaty et al., 1991; Graham et al., 1991b; Goodman et al., 1996; Feldman et al., 1998; Brown, 2000).

Acredita-se que a prevalência da infecção pelo *Hp* em países desenvolvidos seja em torno de até 40% e em países em desenvolvimento pode ser acima de 80 % (Brown, 2000; Souto et al., 1998; Oliveira et al., 1999b).

No Brasil, os estudos publicados são escassos, sendo a maioria relacionados a indivíduos com distúrbios gastrointestinais (Queiroz et al., 1991; Coelho et al., 1992; Rocha et al., 1992; Pilonetto et al., 1993; Nogueira et al., 1993; Bezerra et al., 1996; Ribeiro et al., 1998; Oliveira et al., 1999a; Ogata et al., 2001) e alguns poucos em indivíduos saudáveis (Oliveira et al., 1994; Souto et al., 1998; Oliveira et al., 1999b). Estes estudos foram realizados em regiões geográficas restritas do país,

particularmente em Belo Horizonte, MG; São Luís, MA e em Nossa Senhora do Livramento, MT. Como existem diferenças importantes na soroprevalência dos indivíduos estudados nestas regiões foi proposto o presente estudo com o intuito de verificar a prevalência de anticorpos anti-*Hp* em Curitiba e região metropolitana, estado do Paraná, sul do Brasil. Revisões realizadas em ferramentas de busca na Internet e em base de dados internacionais e nacionais (Medline, Lilacs, Bireme, Ovid) não indicaram a existência de trabalhos similares nesta região do país.

A amostragem escolhida foi a de doadores de banco de sangue devido à facilidade de obtenção da amostra em grande escala. Embora alguns autores questionem a utilização deste grupo de indivíduos acredita-se que eles representam, de maneira significativa, a população saudável da cidade; sendo que muitos trabalhos têm sido desenvolvidos em todo o mundo com este tipo de população (Rocha et al., 1992; Veenendaal, 1992; Holtmann et al., 1994; Menegatti et al., 1998; Menegatti et al., 2000, Rocha et al., 2001). O grupo de universitários foi incluído para efeitos de comparação da prevalência de anticorpos anti-*Hp* em doadores com uma população de diferente nível socioeconômico.

### ***Idade de aquisição e efeito “coorte”***

É provável que a infecção pelo *Hp* seja adquirida ainda cedo na infância (Graham et al., 1991a; Brown, 2000). O presente estudo demonstrou um nítido aumento na soroprevalência de *Hp* de acordo com a idade, pois no grupo de doadores de 18 a 29 anos a positividade foi de 48 %, chegando a 81% nos indivíduos acima dos 50 anos de idade. Um desenho de estudo do tipo “coorte” seria necessário para verificar se este aumento na prevalência é devido ao efeito de “coorte” ou a uma aquisição da infecção que começa na infância e perdura na idade adulta.

De acordo com estudo realizado em Belo Horizonte com crianças de baixo nível socioeconômico, a prevalência evolui de 16,4% em crianças com menos de dois anos para até 64%, em adolescentes de 15 a 18 anos (Oliveira et al., 1994). Este aumento significativo ( $p = 0,001$ ) na prevalência de anticorpos anti-*Hp*, de acordo com a idade,

indica um provável efeito de “coorte”. Outros estudos deixam ainda mais clara a idéia de que em países em desenvolvimento a infecção pelo *Hp* é adquirida muito cedo (Mitchell et al., 1992; Pounder e Ng, 1995; Ma et al., 1998). Na China, relatou-se uma alta prevalência de *Hp* (70%) em crianças de cinco a seis anos (Ma et al., 1998). Esta taxa é similar à de adultos provenientes da mesma área geográfica (Zhang et al., 1996).

O efeito “coorte” foi sugerido por alguns autores como uma possível explicação para a diferença de prevalência de anticorpos anti-*Hp* de acordo com a idade (THE EUROGAST STUDY GROUP, 1993; Gause, 1998). Segundo esta teoria, as condições higiênico-sanitárias eram bem precárias há décadas atrás, propiciando uma maior disseminação do *Hp*. Nos dias de hoje, principalmente em países desenvolvidos, as condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias evoluíram e as pessoas, principalmente crianças e jovens, estariam menos expostas à infecção pelo *Hp*. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, estas condições não estariam evoluindo de maneira satisfatória e haveria um risco, nos dias de hoje, de se adquirir a infecção pelo *Hp*, mesmo em adultos (Oliveira et al., 1999b; Potasman e Yitzhak, 1998; Taylor et al., 1997).

Um outro fator importante na elucidação do aumento da prevalência com a idade é o fato do mecanismo exato da transmissão da infecção pelo *Hp* ainda não estar bem esclarecido. Provavelmente a transmissão pessoa-pessoa seja a mais provável (Malaty et al., 1991) e a rota seja fecal-oral ou oral-oral (Graham et al., 1991a; Megraud, 1995; Brown, 2000). Entretanto, vários outros mecanismos provavelmente também contribuem na transmissão deste patógeno (Tytgat, 1995; Feldman et al., 1998; Brown, 2000). No presente estudo, o número limitado de informações epidemiológicas sobre os indivíduos pesquisados não permitiu uma análise mais ampla dos fatores de risco e mecanismos de transmissão da infecção pelo *Hp*.

### ***Anti-*Hp* e sexo***

Não se encontrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quanto à prevalência de anticorpos anti-*Hp* entre os indivíduos masculinos e femininos, sendo que, entre os

doadores, 60% (108/179) dos homens e 55% das mulheres (53/97) apresentavam soropositividade. Situação semelhante ocorreu nos universitários onde a positividade em homens foi de 40% (4/10) e em mulheres foi de 25% (17/69), sendo  $p > 0,05$ . Embora alguns autores tenham observado o contrário (Reploge et al., 1995; Smoak et al., 1994), em geral não há diferença significativa entre a prevalência de anti-*Hp* nos diferentes sexos (Brown, 2000).

### *Origem geográfica e nível socioeconômico*

A população de doadores estudada no presente trabalho foi proveniente principalmente da cidade de Curitiba (61,6%) e da região metropolitana (34,8%). Uma minoria dos indivíduos (3,6%) era proveniente do interior do Paraná. Os resultados obtidos demonstraram que a média geral da soroprevalência para o *Hp* nos doadores estudados foi de 58,3%, sendo significativa a diferença de positividade entre os indivíduos oriundos da cidade de Curitiba (52,9%), quando comparados com os da região metropolitana de Curitiba (69,8%;  $p < 0,01$ ).

A explicação para esta observação pode ser o fato de que, embora não acessada de maneira detalhada neste estudo, o nível socioeconômico e o índice de agrupamento das famílias provenientes da região metropolitana, bem como a renda familiar e as condições higiênico-sanitárias, tendem a ser inferiores aos da capital. Estes fatores já foram evidenciados como fatores de risco por vários autores (Brown, 2000; Graham et al., 1991a).

Considerando-se cinco níveis de classe social, a maioria dos doadores (72,5%) que freqüentam o banco de sangue Hemobanco são provenientes de classe baixa/média-baixa/média (níveis B2, C, D e E). A soroprevalência de anti-*Hp* nestes doadores (58,3 %) e mesmo a da região metropolitana de Curitiba (69,8 %) foi menor do que a relatada por Oliveira et al. (1999), em indivíduos saudáveis de baixo nível socioeconômico (81,7%), da região metropolitana de Belo Horizonte. Um outro estudo conduzido na área rural do Mato Grosso (Nossa Senhora do Livramento) demonstrou

uma soroprevalência para o *Hp* de 77,5% em crianças e de 84,7% em adultos, sendo ambas mais elevadas quando comparadas ao presente estudo (Souto et al., 1998).

Por outro lado, um estudo realizado por Rocha et al. (1992), em doadores de banco de sangue em Belo Horizonte, demonstrou uma prevalência de 62,1%, semelhante à encontrada no presente estudo (58,3%). A presença de anticorpos anti-*Hp* foi detectada em apenas 26,6% (21/79) dos indivíduos pertencentes ao grupo de universitários de Curitiba, cuja idade variou de 18 a 26 anos (média 20 anos). A maioria destes (87,5%) eram provenientes de classe média-alta e alta (níveis A e B1). Essa positividade foi bem menor que a encontrada no grupo de doadores do presente estudo, mesmo com a faixa etária pareada (47,3% ou 44/93). Portanto, estes resultados corroboram o fato de que os níveis socioeconômicos e de instrução podem exercer uma importante influência na soroprevalência de anti-*Hp* em populações distintas.

### ***Hp, úlcera e grupos sanguíneos***

A associação entre a úlcera duodenal e determinados grupos sanguíneos é conhecida desde a década de 50 (Aird, 1954; Clarke, 1956. In: Hook-Nikanne, 1990). Os indivíduos pertencentes ao grupo O têm uma incidência da doença de 30 a 40% maior que os demais indivíduos de outros grupos sanguíneos. Enquanto isso, os indivíduos não secretores têm uma probabilidade de 40 a 50% maior de desenvolver úlcera em relação aos secretores (Hook-Nikanne et al., 1990). Em 1993, Boren et al. postularam, segundo um estudo *in vitro* que o antígeno Lewis<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>) e o antígeno H-1 (Grupo "O") são as estruturas químicas responsáveis pela ligação do *Hp* às células gástricas. (In: Hook-Nikanne et al., 1990).

Com a evidente associação entre úlcera duodenal e a infecção pelo *Hp*, que ocorre em 90% dos casos (Hook-Nikanne et al., 1990), seria de se esperar uma maior prevalência de anticorpos anti-*Hp* em indivíduos do grupo sanguíneo O (Loffeld, 1991), pois estes possuem antígenos Le<sup>b</sup> expostos, possibilitando assim a aderência do *Hp* às células gástricas (Niv et al., 1996). Entretanto, os achados em relação a estas associações não são concordantes. Hook-Nikanne et al. (1990) também demonstraram

não existir correlação entre a presença de anticorpos anti-*Hp* do tipo IgG, IgA e IgM e qualquer grupo sanguíneo ABO e nem com os diferentes fenótipos do sistema Lewis.

No presente estudo, não foi verificada maior prevalência de anticorpos anti-*Hp* em indivíduos do grupo O em relação aos demais grupos do sistema ABO ( $p > 0,05$ ). Os dados apresentados aqui demonstram uma soropositividade de 61,7 % para o *Hp*, em indivíduos O, portanto, bem próximo da média geral de indivíduos infectados, que foi de 58,3%. Também não foi encontrada diferença significativa quanto à prevalência de anticorpos anti-*Hp* em relação aos doadores do grupo sanguíneo Rh (D) positivo e negativo ( $p > 0,05$ ).

Como nos doadores e no grupo de universitários do presente estudo foi analisado somente a soroprevalência do *Hp* e estes indivíduos não foram submetidos a exames diagnósticos (endoscopia), não foi possível verificar a presença de úlcera duodenal nestes grupos. Mesmo assim, um estudo conduzido por Henriksson et al. (1993) também não encontrou diferença significativa entre os diversos grupos sanguíneos e a presença de doenças gastrointestinais.

### ***Anticorpos anti-*Hp* e marcadores sorológicos para hepatopatias***

Um achado interessante do presente estudo foi a associação entre a presença de anticorpos anti-*Hp* e marcadores sorológicos para a Hepatite B. Dentre todos os doadores estudados somente 5,8% (16/276) apresentavam um ou mais marcadores de hepatite como o anti-Hbs e o anti-Hbc, indicando provavelmente infecções passadas. Porém, o fato mais importante é que destes 16 indivíduos, 14 (87,5%) também apresentavam positividade para anticorpos anti-*Hp*. Quando comparada ao grupo de indivíduos soronegativos para anti-*Hp* esta diferença foi significativa ( $p = 0,0001$ ).

Uma associação entre a aquisição simultânea da infecção pelo *Hp* e o vírus da hepatite B parece ser pouco provável uma vez que os mecanismos de transmissão já descritos destas duas infecções são bem distintos e não apresentariam, portanto, sobreposições. Uma provável hipótese seria a de que nos indivíduos onde há a

presença de marcadores sorológicos para hepatite B estaria ocorrendo uma reação cruzada com os antígenos do *Hp* utilizados neste estudo para a detecção de anticorpos. Entretanto, utilizando-se um outro antígeno e outra metodologia menos sensível para a detecção de anticorpos anti-*Hp* nestes dezesseis doadores, demonstrou-se uma concordância de 81% (13/16) dos resultados.

Outra possibilidade seria uma possível reação cruzada entre anticorpos anti-*H. hepaticus* com antígenos de *Hp*. Nilsson, I. et al. (2000) encontraram diversos anticorpos contra *H. hepaticus* reagindo cruzadamente com o *Hp*. Para comprovação definitiva de uma reação cruzada entre anticorpos anti-*H. hepaticus* e antígenos de *Hp*, teria que se realizar uma adsorção destes anticorpos em coluna de cromatografia, contendo sonicado de *H. hepaticus* e repetir a determinação sorológica do soro eluído (Avenaudo – comunicação pessoal, 2001). Entretanto tal metodologia não se encontra disponível em nosso meio, no momento.

Embora o *H. hepaticus* tenha sido postulado como provável causador de hepatite crônica e associado com tumor hepatocelular em ratos de idade avançada (Fox et al., 1996), a sua patogenicidade em humanos ainda não foi comprovada (Nilsson, I et al., 2000). Por outro lado, DNA de *Hp* tem sido encontrado em amostras biliares (Lin et al., 1995) e DNA de outras espécies de *Helicobacter* em colangite esclerosante primária (Nilsson, HO et al., 2000).

Segundo Tsai et al. (1999) a úlcera péptica é mais freqüente em indivíduos cirróticos. Porém, a hepatite pelo vírus B é apenas uma das várias causas de cirrose hepática, o que torna a associação entre o *Hp* e o vírus da hepatite B apenas indireta e vaga. Ponzetto et al. (2000a) demonstraram uma alta prevalência de anticorpos anti-*Hp* em indivíduos com cirrose associada à hepatite B (89%), quando comparados com doadores de sangue em geral (59%). Outros autores já verificaram uma maior prevalência de anticorpos anti-*Hp* em indivíduos com cirrose hepática, independentemente da sua etiologia, mas acreditam que esta maior positividade seja devido a hospitalizações ou endoscopias prévias (Siringo et al., 1997).

Uma evidência importante foi constatada recentemente por Queiroz (2001) que corrobora o provável papel patogênico do *Hp* nas hepatites. Estes pesquisadores

isolaram uma cepa de *Helicobacter pylori* de tecido hepático de uma jovem de 23 anos de idade, que apresentava cirrose devido à doença de Wilson. Este isolamento confirma que o *Hp* pode colonizar o tecido hepático do homem, bem como o de animais. As hipóteses levantadas pelos autores sugerem que o *Hp* teria chegado ao fígado por transferência retrógrada a partir do duodeno ou por translocação do lúmen intestinal para a circulação do sistema porta. De qualquer maneira, o isolamento desta cepa de *Hp* não necessariamente o incrimina como patógeno hepático. Esta bactéria poderia estar apenas colonizando secundariamente o fígado adoecido deste paciente (Queiroz, 2001). Outros achados importantes relatam a presença de DNA de *Helicobacter* spp no tecido hepático de oito indivíduos com carcinoma hepático primário, levantando assim a hipótese da associação de *Helicobacter* spp. também com câncer hepático, como ocorre em ratos (Fox et al., 2001). Porém, tanto o envolvimento do *Hp* quanto do *H. hepaticus* em hepatites humanas requer maiores investigações e está sendo apontada como uma importante área de pesquisa. Neste sentido o desenvolvimento de modelos animais para estudo das doenças hepáticas e sua relação com o *Helicobacter* torna-se de grande importância (Fox et al., 2001).

Já em relação ao vírus da hepatite C, tem sido postulado que as diferenças na progressão da forma crônica da doença seriam devidas a um co-fator o qual poderia ser uma co-infecção por *Hp* ou outra espécie de *Helicobacter*. Em um estudo conduzido na Itália, demonstrou-se a presença de anticorpos anti-*Hp* em 77% dos indivíduos com cirrose e infecção pelo HCV e em 59 % de doadores de sangue ( $p = 0.004$ ). Ainda, RNA ribossômico com seqüências genômicas do *Hp* e do *H. pullorum* foram detectados no tecido hepático de 23 dos 25 pacientes estudados (Ponzetto et al., 2000b).

Enfim, qualquer que seja a explicação para estes fatos, torna-se necessária uma investigação mais aprofundada, com um número maior de indivíduos e que procure estabelecer qual a exata associação entre as pessoas com história pregressa ou atual de hepatite B e a infecção pelo *Hp*.

No que se refere a outras doenças infecciosas todos os indivíduos com evidência sorológica de sífilis (VDRL positivo), Doença de Chagas (anti-

*Trypanosoma cruzi* positivo) e Hepatite C (anti-HCV positivo) também apresentavam evidência sorológica de infecção pelo *Hp*. Entretanto, a casuística era muito limitada (apenas seis indivíduos no total) para permitir qualquer inferência sobre estas doenças e infecção pelo *Hp*. De qualquer maneira, Oliveira et al. (1997) já detectaram uma frequência aumentada de doenças pépticas e infecção por *Hp* em indivíduos com Doença de Chagas.

### ***Validação da metodologia***

A sorologia mostrou-se como um método de alta sensibilidade (86,4%), para estudos epidemiológicos, uma vez que a finalidade deste estudo não é a de se estabelecer o diagnóstico, mas sim avaliar prevalência da doença em determinada população. A baixa especificidade encontrada na validação do método pode ser explicada pela alta prevalência da infecção por *Hp* no grupo de pacientes estudados, dificultando assim o estabelecimento de valores precisos para especificidade e VPN, pois nenhum paciente apresentou resultados negativos nos três métodos. Leodolter et al. (2001) relatam que um resultado de sorologia negativo para *Hp*, numa população com uma prevalência de 10%, praticamente exclui a possibilidade do indivíduo estar infectado. Porém, para um resultado negativo numa outra população com prevalência de 90%, a probabilidade do indivíduo estar infectado ainda é alta.

Thijs et al. (1996) publicaram um amplo estudo de meta-análise com diferentes *kits* comerciais de ELISA. A sensibilidade oscilou entre 90-95% e a especificidade entre 80-90%. A inclusão de pacientes previamente tratados com antibióticos especificamente para erradicar a infecção por *Hp* ou para outras infecções intercorrentes pode explicar a baixa especificidade encontrada em alguns destes estudos, a exemplo do que pode ter ocorrido no presente trabalho. Outras possíveis explicações para as variações de acurácia encontradas entre estes estudos são:

utilização de diferentes *gold standards*, vários tipos de preparações antigênicas, diferentes cepas infectantes causando respostas imunes variadas.

Para a sorologia ser aplicada como ferramenta de diagnóstico, o que não era objetivo deste estudo, a validação do método teria que ser feita com um número maior de pacientes, incluir mais um método de diagnóstico (p.ex.: cultura ou teste respiratório) e também um grupo controle (pacientes biopsiados, com mucosa normal).

### ***Anti-Hp e indivíduos assintomáticos***

A detecção de anticorpos anti-*Hp* mesmo em indivíduos assintomáticos (p.ex.: doadores) pode ser de extrema importância a nível de saúde pública. Em 1994, Vaira e cols. detectaram úlcera péptica em 20% de doadores sanguíneos assintomáticos, com positividade para anticorpos anti-*Hp*. Menegatti et al. (1998) realizaram endoscopia de 298 doadores de sangue com a presença de anticorpos anti-*Hp*. A infecção foi detectada por histologia (Giemsa) em 274 destes indivíduos. Quanto aos achados endoscópicos destes indivíduos, apenas 15,4% tinham uma mucosa gástrica normal; 46,6% apresentavam gastrite, 13,7% duodenite, 16,8% úlcera duodenal, 6,7% úlcera gástrica e dois indivíduos apresentavam câncer gástrico. Quando analisados 61 doadores negativos para a presença de anticorpos anti-*Hp*, 62,3% apresentavam mucosa gástrica normal e 32,8% gastrite; nenhum destes indivíduos apresentava úlcera péptica nem câncer gástrico. Estas observações merecem atenção e reforçam a idéia da possibilidade de se utilizar a sorologia como uma triagem pré-endoscópica pois, como observado em outros estudos (Patel et al., 1995a; Menegatti et al., 1998; Slade et al., 1999), indivíduos com menos de 45 anos e sorologia negativa para anti-*Hp* dificilmente apresentam uma doença mais séria (úlcera ou câncer).

A realização de endoscopia nos indivíduos com sorologia positiva para o *Hp* está além do escopo do presente estudo, mas poderia ser de grande benefício para os indivíduos infectados, uma vez que existe a hipótese de que a persistência da infecção pelo *Hp* pode levar ao surgimento de doenças graves como o adenocarcinoma (Sipponen, 1994; Blaser et al., 1995). Ainda, é possível que a presença de doenças

gastroduodenais em indivíduos assintomáticos apresente variação entre diferentes regiões geográficas (Menegatti et al., 1998), tornando necessário estudos adicionais na região de Curitiba. Além disso, o fato da infecção por *Hp* dificilmente apresentar cura espontânea e poder causar lesões a longo prazo, deve servir de alerta à saúde pública e abrir discussões futuras sobre profilaxia e tratamento da infecção em larga escala.

Finalmente, o envolvimento do *Hp* em doenças hepáticas ainda é incerto, mas deve gerar especulação dentro da comunidade científica.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que:

- A prevalência de anticorpos anti-*Hp* na população de doadores estudada (indivíduos assintomáticos) é elevada (58,3 %), sendo semelhante à de vários países da América do Sul;
- A soropositividade aumentou significativamente com a idade, indo de 48 % no grupo de 18 a 29 anos de idade a até 81 % em indivíduos acima de 50 anos ( $p < 0,01$ );
- Não houve diferença quanto a prevalência de anticorpos anti-*Hp* entre os sexos feminino e masculino na população estudada;
- A presença de anti-*Hp* foi significativamente mais elevada nos indivíduos da região metropolitana (81,5%) quando comparados com os da cidade de Curitiba (52,9%;  $p < 0,01$ ), provavelmente devido a condições higiênico-sanitárias e nível socioeconômico inferiores;
- O nível socioeconômico demonstrou exercer influência inversa na soropositividade para o *Hp*, sendo que no grupo de universitários (classe média/alta) a positividade foi de 26,6%, sendo significativamente diferente da observada nos doadores (58 %), de classe baixa/média-baixa ( $p < 0,001$ );
- A presença de anticorpos anti-*Hp* não teve associação com os grupos sanguíneos do sistema ABO e Rh ( $p = ns$ );
- Uma significativa associação entre a presença de anticorpos anti-*Hp* e marcadores sorológicos para hepatite B (anti-Hbc e anti-Hbs) foi observada ( $p = 0,0001$ ), sugerindo a infecção por *Hp* como possível co-fator nas hepatites. Este achado necessita ainda ser melhor investigado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ASSI, M. T.; GENTA, R. M.; KARTTUNEN, T. J. et al. Ulcer site and complications: relation to *Helicobacter pylori* infection and NSAID use. **Endoscopy**, v. 28, p. 229-233, 1996.
- ALEMOHAMMAD, M. M.; FOLEY, T. J.; COHEN, H. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. **J Clin Microbiol**, v. 31, p. 2174-2177, 1993.
- ALM, R. A.; LING, L. L.; MOIR, D. T. et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 397, p. 176-180, 1999.
- ALSAHLI, M.; FARREL, R. J.; MICHETTI, P. Vaccines: an ongoing promise. **Dig Dis**, v. 19, p. 148-157, 2001.
- ASH, A. S. F.; SCHILD, H. O. Receptors mediating some actions of histamine. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 27, p. 427-439, 1966.
- ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori* virulence factors. **Brit Med Bull**, v. 54, n. 01, p. 105-120, 1998.
- BELL, G. D. Clinical practice - breath tests. **Brit Med Bull**, v. 54, n. 01, p. 187-194, 1998.
- BELL, G. D.; WEIL, J.; HARRISON, G. et al. 14C-urea breath test analysis, a non-invasive test for *Campylobacter pylori* in the stomach. **Lancet**, v. 1, p. 1367-68, 1987.
- BEZERRA, J. D.; VALE, A. V.; LOBATO FILHO, J. C. et al. *Helicobacter pylori* gastric infection in symptomatic patients from Sao Luis Island, MA: endoscopic, anatomopathologic and microbiological correlations. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 29, n. 03, p. 245-250, 1996.
- BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, C. J. et al. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. **Nature**, v. 236, p. 385-390, 1972.
- BLASER, M. J. The role of *Helicobacter pylori* in gastritis and its progression to peptic ulcer disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 9 (Supl. 1), p. 27-30, 1995.
- BLASER, M. J.; CHYOU, P. H.; NOMURA, A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. **Cancer Res**, v. 55, p. 562-565, 1995.

BOURKE, B.; JONES, N.; SHERMAN, P. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease in children. **Pediatr Inf Dis J**, v. 15, p. 1-13, 1996.

BRADEN, B.; TEUBER, G.; DIETRICH, C. F. et al. Comparison of a new faecal antigen test with <sup>13</sup>C-urea breath test for detecting *Helicobacter pylori* infection and monitoring eradication treatment: prospective clinical evaluation. **BMJ**, v. 320, p. 149-149, 2000.

BREUER, T.; MALATY, H. M.; GRAHAM, D. The epidemiology of *H. pylori*-associated gastroduodenal diseases. In: ERNST, P. B.; MICHETTI, P.; SMITH, P. D. (Eds.) **The Immunobiology of *H. pylori*: from pathogenesis to prevention**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 283-297, 2000.

BUCKLEY, M. J.; O' MORAIN, C. A. *Helicobacter* biology – discovery. **Brit Med Bull**, v. 54, n. 1, p. 7-16, 1998.

BUCKLEY, M. J.; O'SHEA, J.; GRACE, A. et al. A community-based study of the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and associated asymptomatic gastroduodenal pathology. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 05, p. 375-379, 1998.

CARRICK, J.; LEE, A.; HAZELL, S. et al. *Campylobacter pylori*, duodenal ulcer, and gastric metaplasia: possible role of functional heterotopic tissue in ulcerogenesis. **Gut**, v. 30, p. 790-797, 1989.

CASTRO, L. D.; COELHO, L. G. *Helicobacter pylori* in South America. **Can J Gastroenterol**, v. 12, n. 7, p. 509-512, 1998.

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

COELHO, L. G. V.; PASSOS, M. C.; CHAUSSON, Y. et al. Duodenal ulcer and eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. An 18-month follow-up study. **Scand J Gastroenterol**, v. 27, p. 362-366, 1992.

COGHLAN, J. G.; HUMPHRIES, H.; DOOLEY, C. et al. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers -a 12 month follow-up study. **Lancet**, v. 2, p. 109-111, 1987.

CORREA, P.; MILLER, M. J. S. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. **Brit Med Bull**, v. 54, n. 01, p. 151-162, 1998.

CORREA, P.; FOX, J.; FONTHAM, E. et al. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma: serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. **Cancer**, v. 66, p. 2569-2574, 1990.

CRABTREE, J. E.; SHALLCROSS, T. M.; HEATLEY, R. et al. Mucosal tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 32, p. 1473-1477, 1991.

DANI, R.; QUEIROZ, D. M.; DIAS, M. G. Omeprazole, clarithromycin and furazolidone for the eradication of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 13, n. 12, p. 1647-1652, 1999.

DEBONGNIE, J. C.; DUREZ, P.; LUYASU, V. Validation and clinical and epidemiological use of a serologic test recommended in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 17, n. 12, p. 98-102, 1993.

DEHESA, M.; DOOLEY, C. P.; COHEN, H. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic Hispanics. **J Microbiol Clin**, v. 29, p. 1128-1131, 1991.

DELLA LIBERA, E.; ROHR, M. R.; MORAES, M. Eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer and non-ulcer dyspepsia and analysis of one-year reinfection rates. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 06, p. 753-757, 2001.

EATON, K. A.; MORGAN, D. R.; KRAKOWKA, S. Motility as a factor in colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. **J Med Microbiol**, v. 37, p. 123-127, 1992.

EL-ZIMAITY, H. M.; OTA, H.; SCOTT, S. et al. A new triple stain for *Helicobacter pylori* suitable for the autostainer: carbol fuchsin/Alcian blue/hematoxylin-eosin. **Arch Pathol Lab Med**, v. 122, n. 02, p. 732-736, 1998b.

EL-ZIMAITY, H. M.; SEGURA, A. M.; GENTA, R. M. et al. Histologic assessment of *Helicobacter pylori* status after therapy: comparison of Giemsa, Diff -Quik, and Genta stains. **Mod Pathol**, v. 11, n. 03, p. 288-291, 1998a.

EVANS JR, D. J.; EVANS, D. G.; GRAHAM, D. Y. et al. A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 96, p. 1004-1008, 1989.

FALLONE, C. A.; ELIZOV, M.; CLELAND, P. et al. Detection of *Helicobacter pylori* infection by saliva IgG testing. **Am J Gastroenterol**, v. 91, p. 1145-1149, 1996.

FELDMAN, R. A.; ECCERSLEY, A. J. P.; HARDIE, J. M. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. **Brit Med Bull**, v. 54, n. 01, p. 39-54, 1998.

FENG, Y. Y.; WANG, Y. *Campylobacter pylori* in patients with gastritis, peptic ulcer, and carcinoma of the stomach in Lanzhou, China. **Lancet**, v. 1, n. 8593, p. 1055, 1988.

FERRERO, R. L.; LEE, A. The importance of urease in acid protection for the gastric-colonising bacteria *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis* sp. **Microb Ecol Health Dis**, v. 4, p. 121-134, 1991.

FERRERO, R.L.; KANSAU, I. N.; LABIGNE, A. Virulence factors produced by *H. pylori*. In: ERNST, P. B.; MICHETTI, P.; SMITH, P. D (Eds). **The Immunobiology of H. pylori: from pathogenesis to prevention**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

FOCK, K. M. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterol**, v. 114, p. A596, 1998.

FOLSOM, A. R.; NIETO, F. J.; SORLIE, P. *Helicobacter pylori* sero-positivity and coronary heart disease incidence. Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study Investigators. **Circulation**, v. 98, n. 09, p. 845-850, 1998.

FORMAN, D. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. **Scand J Gastroenterol**, v. 214, p. 31-33, 1996.

FORMAN, D.; NEWELL, D. G.; FULLERTON, F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. **BMJ**, v. 302, p. 1302-1305, 1991.

FOX, J. G.; LI, X.; YAN, L. et al. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis. **Infect Immun**, v. 64, n. 5, p.1548-58, 1996.

FOX, J. G.; SCHAUER, D. B.; WADSTRÖM, T. Enterohepatic *Helicobacter* spp. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 17 (supl. 1), s28-s31, 2001.

GAUSE, I. N. *Helicobacter pylori* serology in elderly people: a 21-year cohort comparison in 70-years-old and a 20-years longitudinal population study in 70-90-years-olds. **Age and Ageing**, v. 21, n. 4, p. 432-434, 1998.

GE, Z.; TAYLOR, D. E. *Helicobacter pylori* - molecular genetics and diagnostic typing. **Br Med Bull**, v. 54, n. 1, p. 31-8, 1998.

GENTA, R. M.; HARNNER, H. W. The significance of lymphoid follicles in the interpretation of gastric biopsy specimens. **Arch Pathol Lab Med**, v. 118, p. 740-743, 1994.

GENTA, R. M.; HARNNER, H. W.; GRAHAM, D. Y. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. **Human Pathol**, v. 24, p. 577-583, 1993.

GENTA, R. M.; ROBASON, G. O.; GRAHAM, D. Y. Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. **Human Pathol**, v. 25, n. 03, p. 221-226, 1994.

GLUPCZYNSKI, Y. Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing. In: LEE, A.; MÉGRAUD, F. (Eds.) ***Helicobacter pylori: Techniques for Clinical Diagnosis and Basic Research***. London: WB Saunders, 1996. p. 17-32.

GLUPCZYNSKI, Y. Microbiological and serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: an overview **Brit Med Bull**, v. 54, n. 01, p. 175-186, 1998.

GOODMAN, K. J.; CORREA, P.; AUX, H. J. T. et al. *Helicobacter pylori* in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. **Am J Epidemiol**, v. 114, p. 290-299, 1996.

GOODWIN, C. S. *Helicobacter pylori*: the story continues. (letter) **Lancet**, v. 357, n. 9273, p. 2056-2057, 2001.

GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; MARSHALL, B. J. *Campylobacter pyloridis*, gastritis and peptic ulceration. **J Clin Pathol**, v. 39, p. 353-365, 1986.

GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov., as *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. **Int J System Bacteriol**, v. 39, p. 397-405, 1989.

GRAHAM, D. Y. Benefits from elimination of *Helicobacter pylori* infection include major reduction in the incidence of peptic ulcer disease, gastric cancer and primary gastric lymphoma. **Prev Med**, v. 23, p. 712-716, 1994.

GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori*: its epidemiology and its role in duodenal ulcer disease. **Gastroenterol Hepatol**, v. 6, p. 105-113, 1991.

GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* and perturbations in acid secretion: the end of the beginning. **Gastroenterology**, v. 110, p. 1647-1650, 1996.

GRAHAM, D. Y.; GO, M. F. *Helicobacter pylori*: current status. **Gastroenterol**, v. 105, p. 279-282, 1993.

GRAHAM, D. Y.; ADAM, E.; REDDY, G.T. et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India: comparison of developing and developed countries. **Dig Dis Sci**, v. 36, p. 1084-1088, 1991b.

GRAHAM, D. Y.; EVANS, D. J.; PEACOCK, J. et al. Comparison of rapid serological tests (FlexSure HP and QuickVue) with conventional ELISA for detection of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Gastroenterol**, v. 91, p. 942-948, 1996.

GRAHAM, D. Y.; KLEIN, P. D.; EVANS, D. J. *Campylobacter pylori* detected non-invasively by the 13C-urea breath test. **Lancet**, v. 2, p. 1174-1177, 1987.

GRAHAM, D. Y.; MALATY, H. M.; EVANS, D. G. et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States: effect of age, race, and socioeconomic status. **Gastroenterology**, v. 100, p. 1495-1501, 1991a.

GRAHAM, D. Y.; RAKEL, R. E. Peptic Ulcer Disease. A three article symposium **Postgrad Med**, v. 105, n. 03, p. 93-148, 1999.

*Helicobacter pylori* Research Laboratory. Disponível: <<http://www.hpylori.com.au>> Acesso em: 06 jul. 2001.

HENRIKSSON, K.; URIBE, A.; SANDSTEDT, B. et al. *Helicobacter pylori* infection, ABO blood group, and effect of misoprostol on gastroduodenal mucosa in NSAID-treated patients with rheumatoid arthritis. **Dig Dis Sci**, v. 38, p. 1688-1696, 1993.

HOLTMANN, G.; GOEBELL, H.; HOLTMANN, M. et al. Dyspepsia in healthy blood donors. Pattern of symptoms and association with *Helicobacter pylori*. **Dig Dis Sci**, v. 39, n. 05, p. 1090-1098, 1994.

HOOK-NIKANNE, J.; SISTONEN, P.; KOSUNEN, T. U. Effect of ABO blood group and secretor status on the frequency of *Helicobacter pylori* antibodies. **Scand J Gastroenterol**, v. 25, n. 08, p. 815-818, 1990.

HULTEN, K.; HAN, S.W.; ENROTH, H. et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. **Gastroenterol**, v. 110, p. 1031-1035, 1996.

IARC International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Infection with *Helicobacter pylori*. In: **Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori***. Lyon: IARC, 1994. p. 177-241.

IBOPE. Disponível em: <<http://www.ibope.com.br>> Acesso em: 05 abr. 2000.

ISAACSON, P. G. Primary Gastric Lymphoma. **Pathol Oncol Res**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 1996.

ISRAEL, D.M.; HASSALL, E. Treatment and long-term follow-up of *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer disease in children. **J Pediatr**, v. 123, p. 53-58, 1993.

KANGATHARALINGAM, N.; AMY, P. S. *Helicobacter pylori* comb. nov. exhibits facultative acidophilism and obligate microaerophilism. **Appl Env Microbiol**, v. 60, p. 2176-2179, 1994.

KELLY, S. M.; PITCHER, M. C.; FARMERY, S. M. et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterol**, v. 107, p. 1671-1674, 1994.

KLEIN, P. D.; GRAHAM, D. Y.; GAILLOUR, A. et al. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. **Lancet**, v. 337, p. 1503-1506, 1991.

KUIPERS, E. J.; LUNDELL, L.; KLINKENBERG-KNOLL, E. C. et al. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. **N Engl J Med**, v. 334, p. 1018-1022, 1996a.

KUIPERS, E. J.; PALS, G.; PENA, A. S. et al. *Helicobacter pylori*, pepsinogens and gastrin: relationship with age and development of atrophic gastritis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 153-156, 1996b.

LAINE, L.; MARIN-SORENSEN, M.; WEINSTEIN, W. M. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastric ulcers do not require *Helicobacter pylori* for their development. **Am J Gastroenterol**, v. 87, p. 1398-1402, 1992.

LANGENBERG, M. L.; TYTGAT, G. N.; SCHIPPER, M. E. L. et al. *Campylobacter-like* organisms in the stomachs of patients and healthy individuals. **Lancet**, v. 1, p. 1348, 1984.

LEODOLTER, A.; MEGRAUD, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 17, (supl. 1), p. s19-s23, 2001.

LEODOLTER, A.; WOLLE, K.; MALFERTHEINER, P. Current standards in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Dig Dis**, v. 19, p. 116-122, 2001.

LIN, T. T.; YEH, C. T.; WU, C. S. *et al.* Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. **Dig Dis Sci**, v. 40, n. 10, p. 2214-9, 1995.

LINDBERG, P.; BRANDSTROM, A.; WALLMARK, B. *et al.* Omeprazole: the first proton pump inhibitor. **Med Res Ver**, v. 10, p. 1-54, 1990.

LOFFELD, R. J.; STOBBERINGH, E. *Helicobacter pylori* and ABO blood groups. **J Clin Pathol**, v. 44, n. 6, p. 516-517, 1991.

MA, J. L.; YOU, W. C.; GAIL, M. H. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and mode of transmission in a population at high risk of stomach cancer. **Int J Epidemiol**, v. 27, p. 570-573, 1998.

MACARTHUR, C.; SAUNDERS, N.; FELDMAN, W. *Helicobacter pylori*, gastroduodenal disease, and recurrent abdominal pain in children. **JAMA**, v. 273, p. 729-734, 1995.

MALATY, H. M.; ENGSTRAND, L.; PEDERSON, N. *et al.* *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. **Ann Intern Med**, v. 120, p. 982-986, 1994.

MALATY, H. M.; GRAHAM, D. Y.; KLEIN, P. D. *et al.* Transmission of *Helicobacter pylori* infection: studies in families of healthy individuals. **Scand J Gastroenterol**, v. 26, p. 927-932, 1991.

MALATY, H. M.; KIM, J. G.; KIM, S. D. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korean children: inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high prevalence in adults. **Am J Epidemiol**, v. 143, p. 257-262, 1996.

MALFERTHEINER, P.; LEODOLTER, A., GERARDS, C. Pitfalls in *Helicobacter pylori* diagnosis. In: HUNT, R.; TYTGAT, G.N.J. (Eds.) ***Helicobacter pylori: Basic Mechanisms for Clinical Cure 2000***. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 123-138.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C. *et al.* Current European concepts in the management of *H. pylori* infection -The Maastricht Consensus Report. **Gut**, v. 41, p. 8-13, 1997.

MARSHALL, B. J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 1, p. 1273-1275, 1983.

MARSHALL, B. J. Histoire de la découverte de *Helicobacter pylori*. In: MEGRAUD, F.; LAMOULIATTE, H. (Eds) *Helicobacter pylori, Épidémiologie, Pathogénie, Diagnostic*. v. 1. Paris: Elsevier, 1996. p. 35-43.

MARSHALL, B. J.; GOODWIN, C. S. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J System Bacteriol*, v. 37, p. 68, 1987.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, v. 1, p. 1311-1314, 1984.

MARSHALL, B. J.; ARMSTRONG, J. A.; MCGECHIE, D. B. et al. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*, v. 142, p. 436-439, 1985a.

MARSHALL, B. J.; GOODWIN, C. S.; WARREN, J. R. et al. A prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*, v. 2, p. 1437-1442, 1988.

MARSHALL, B. J.; JOYCE, H.; ANWAR, D. I. et al. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett*, v. 25, p. 83-88, 1984a.

MARSHALL, B. J.; MCGECHIE, D. B.; FRANCIS, G. J. et al. Pyloric *Campylobacter* Serology. *Lancet*, v. 2, p. 28- 46, 1984b.

MARSHALL, B. J.; MCGECHIE, D. B.; ROGERS, P. A et al. Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Aus*, v. 142, p. 439-444, 1985b.

MEGRAUD, F. Diagnostic bactériologique standard de l'infection à *H. pylori*. In: MEGRAUD, F.; LAMOULIATTE, H. (Eds) *Helicobacter pylori: Épidémiologie pathogénie, diagnostic*. v.1. Paris: Elsevier, 1996. p. 250-66.

MEGRAUD, F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 2, p. 85-91, 1995.

MEGRAUD, F.; BRASSENS-RABBE, M. P.; DENIS, F. et al. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol*, v. 27, p. 1870-1873, 1989.

MENDONÇA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M. S. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter*, v. 5, n. 2, p. 79-83, 2000.

MENEGATTI, M.; FIGURA, N.; FARINELLI, S. et al. *Helicobacter pylori* seroconversion in asymptomatic blood donors: a five-year follow-up. **Dig Dis Sci**, v. 45, n. 8, p. 1653-1659, 2000.

MENEGATTI, M.; HOLTON, J.; FIGURA, N. et al. Clinical significance of *Helicobacter pylori* seropositivity and seronegativity in asymptomatic blood donors. **Dig Dis Sci**, v. 43, n. 11, p. 2542-2548, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução 1376 de 19 de novembro de 1993. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br/correlatos/sangue/legis/portarias.htm>> Acesso em: 06 out. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução 121 de 24 de novembro de 1995. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br/correlatos/sangue/legis/portarias.htm>> Acesso em: 06 out. 2001.

MITCHELL, H. M.; LI, Y. Y.; HU, P. J. et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J Infect Dis**, v. 166, p. 149-153, 1992.

MULLER, A. F.; MALONEY, A.; JENKINS, D. et al. Primary gastric lymphoma in clinical practice 1973-1992. **Gut**, v. 36, p. 679-683, 1995.

MURRAY, P. R. **Medical Microbiology**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1998.

NAMAVAR, F.; ROOSENDAAL, R.; KUIPERS, E. J. et al. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 14, p. 234-237, 1995.

NGUYEN, A. M. H.; EL-ZAATARI, F. A.; GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: a critical review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 79, p. 705-709, 1995.

NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, v. 272, p. 65-69, 1994.

NILSSON, I.; LINDGREN, S.; ERIKSSON, S. et al. Serum antibodies to *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* in patients with chronic liver disease. **Gut**, v. 46, n. 3, p. 410-414, 2000.

NILSSON, H.O.; TANEERA, J.; CASTEDAL, M et al. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 1072-1076, 2000.

NIV, Y.; FRASER, G.; DELPRE, G. et al. *Helicobacter pylori* infection and blood groups. **Am J Gastroenterol**, v. 91, n. 1, p. 101-104, 1996.

NOGUEIRA, A. M.; RIBEIRO, G. M.; RODRIGUES, M. A. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Brazilian patients with gastric carcinoma. **Am J Clin Pathol**, v. 100, n. 3, p. 236-239, 1993.

NOMURA, A.; STEMMENNANN, G. N.; CHYOU, P. H. et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N Engl J Med**, v. 325, p. 1132-1136, 1991.

OGATA, S.K.; KAWAKAMI, E.; PATRICIO, F. R. 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**, v. 119, n. 2, p. 67-71, 2001.

OLIVEIRA, A. M.; QUEIROZ, D. M.; ROCHA, G. A. et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **Am J Gastroenterol**, v. 89, p. 2201-2204, 1994.

OLIVEIRA, A. M.; ROCHA, G. A.; QUEIROZ, D. M. 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**, v. 28, n. 2, p. 157-161, 1999a.

OLIVEIRA, A. M.; ROCHA, G. A.; QUEIROZ, D. M. et al. Seroconversion for *Helicobacter pylori* in adults from Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, n. 3, p.261-263, 1999b.

OLIVEIRA, L. C.; BUSO, A. G.; SIQUEIRA-FILHO, L. et al. Peptic disease and *Helicobacter pylori* are highly prevalent in patients with the indeterminate form of Chagas' disease: report of 21 cases. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 39, n. 4, p.209-12, 1997.

OWEN, R. J. *Helicobacter* - species classification and identification. **Br Med Bull**, v. 54, n. 01, p.17-30, 1998.

OZTURK, H.; SENOCAK, M. E.; UZUNALIMOGLU, B. et al. *Helicobacter pylori* infection in symptomatic and asymptomatic children: a prospective clinical study. **Eur J Pediatr Surg**, v. 6, p. 265-269, 1996.

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G. D.; VANDERSTEEN, D. P. et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v. 325, p. 1127-1131, 1991.

PARSONNET, J.; HANSEN, S.; RODRIGUEZ, L. et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **N Engl J Med**, v. 330, p. 1267-1271, 1994.

PARSONNET, J.; SHMUELY, H.; HAGGERTY, T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. **JAMA**, v. 282, p. 2240-2245, 1999.

PATEL, P.; KHULUSI, S.; MENDALL, M. A. et al. Prospective screening of dyspeptic patients by *Helicobacter pylori* serology. **Lancet**, v. 346, p. 1315-1318, 1995a.

PATEL, P.; MENDALL, M. A.; CARRINGTON, D. et al. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. **BMJ**, v. 311, p. 711-714, 1995b.

PILONETTO, M.; PILONETTO, D. V. **Manual de Procedimentos Laboratoriais em Microbiologia - POPs em Microbiologia**. Curitiba: Microscience, 1998.

PILONETTO, M.; SOUZA, H. H. M.; ALBINI, C. A.; DALLA COSTA, L. M. *Helicobacter pylori*: Avaliação de um teste de urease para o diagnóstico presuntivo. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 17. 1993, Santos, SP. **Anais**. São Paulo: SBM, 1993.

PONZETTO, A.; PELLICANO, R.; LEONE, N. et al. *Helicobacter pylori* seroprevalence in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. **Neth J Med**, v. 56, n. 6, p. 206-210, 2000a.

PONZETTO, A.; PELLICANO, R.; LEONE, N. et al. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? **Med Hypotheses**, v. 54, n. 2, p. 275-277, 2000b.

POTASMAN, I.; YITZHAK, A. *Helicobacter pylori* serostatus in backpackers following travel to tropical countries. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, p. 305-308, 1998.

POUNDER, R. E.; NG, D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 9, n. 2, p. 33-39, 1995.

QUEIROZ, D. M. First isolation of a helicobacter strain from the human liver. **Gastroenterol**, 2001 (no prelo).

QUEIROZ, D. M.; MENDES, E. N.; ROCHA, G. A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, v. 25, n. 12, p. 2378-2379, 1987.

QUEIROZ, D. M.; ROCHA, G. A.; MENDES, E. N. et al. Differences in distribution and severity of *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults with duodenal ulcer disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 12, n. 2, p. 178-181, 1991.

RAUWS, E. A. J.; TYTGAT, G. N. J. Eradication of *Helicobacter pylori* cures duodenal ulcer disease. **Lancet**, v. I, p. 1233-1235, 1990.

REPLOGLE, M. L.; GLASER, S. L.; HIATT, R. A. et al. Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. **Am J Epidemiol**, v. 142, p. 856-863, 1995.

RIBEIRO, V.L.; FILHO, J.S.; BARBOSA, A.J. Lymphocytic gastritis and *Helicobacter pylori*: a Brazilian survey. **J Clin Pathol**, v. 51, n. 1, p. 83-84, 1998.

ROCHA, G. A.; QUEIROZ, D. M.; MENDES, E. N. et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-*H. pylori* antibodies in Brazilian blood donors. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 7, p. 683-689, 1992.

ROHR, M. R.; CASTRO, R.; MORAIS, M. et al. Risk of *Helicobacter pylori* transmission by upper gastrointestinal endoscopy. **Am J Infect Control**, v. 26, n. 1, p. 12-15, 1998.

SAHAY, P.; AXON, A. T. R. Reservoirs of *Helicobacter pylori* and modes of transmission. **Helicobacter**, v. 1, p. 175-182, 1996.

SANTANDER, C.; GRAVALOS, R. G.; GOMEZ-CEDENILLA, A. J. et al. Antimicrobial therapy for *Helicobacter pylori* infection versus long-term maintenance antisecretion treatment in the prevention of recurrent hemorrhage from peptic ulcer: prospective nonrandomized trial on 125 patients. **Am J Gastroenterol**, v. 91, p. 1549-1552, 1996.

SCHUTZE, K.; HENTSCHEL, E.; DRAGOSICS, B. et al. *Helicobacter pylori* reinfection with identical organisms: transmission by the patients' spouses. **Gut**, v. 36, p. 931-933, 1995.

SIPPONEN, P. Gastric cancer- a long-term consequence of *Helicobacter pylori* infection? **Scand J Gastroenterol**, v. 29, n. 205, p. 24-27, 1994.

SIPPONEN, P. *Helicobacter pylori* gastritis-epidemiology. **J Gastroenterol**, v. 32, p. 273-277, 1997.

SIPPONEN, P. Update on the Pathologic Approach to the Diagnosis of Gastritis, Gastric Atrophy, and *Helicobacter pylori* and its Sequelae. **J Clin Gastroenterol**, v. 32, n. 3, p. 196-202, 2001.

SIRINGO, S.; VAIRA, D.; MENEGATTI, M. et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* in liver cirrhosis: relationship with clinical and endoscopic features and the risk of peptic ulcer. **Dig Dis Sci**, v. 42, n. 10, p. 2024-2030, 1997.

SIURALA, M.; SIPPONEN, P.; KEKKI, M. *Campylobacter pylori* in a sample of Finnish population: relations to morphology and functions of the gastric mucosa. **Gut**, v. 29, p. 909-915, 1988.

SLADE, P. E.; DAVIDSON, A. R.; STEEL, A et al. Reducing the endoscopic workload: does serological testing for *Helicobacter pylori* help? **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 8, p. 857-862, 1999.

SMOAK, B.L.; KELLEY, P.W.; TAYLOR, D.N. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in a cohort of US Army recruits. **Am J Epidemiol**, v. 139, p. 513-519, 1994.

SOBALA, G. M.; CRABTREE, J. E.; PENTITH, J. A. et al. Screening dyspepsia by serology to *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v. 338, n. 8759, p. 94-96, 1991.

SOUTO, F. J.; FONTES, C. J.; ROCHA, G. A. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 171-174, 1998.

STEER, H. W. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. **J Clin Pathol**, v. 28, p. 639-646, 1975.

STRACHAN, D. P.; MENDALL, M. A.; CARRINGTON, D. et al. Relation of *Helicobacter pylori* infection to 13-year mortality and incident ischemic heart disease in the caerphilly prospective heart disease study. **Circulation**, v. 98, p. 1286-1290, 1998.

TALLEY, N. J. *Helicobacter pylori* and non-ulcer dyspepsia. **Scand J Gastroenterol**, v. 31, n. 220, p. 19-22, 1996.

TALLEY, N. J.; COLIN-JONES, D.; KOCH, K. L. et al. Functional dyspepsia: a classification with guidelines for diagnosis and management. **Gastroenterol Int**, v. 4, p. 145-160, 1991.

TALLEY, N. J.; XIA, H. H. X. *Helicobacter pylori* infection and non-ulcer dyspepsia. **Brit Med Bull**, v. 54, n. 1, p. 63-70, 1998.

TAYLOR, D. N.; SANCHEZ, J. L.; SMOAK, B. L. et al. *Helicobacter pylori* infection in Desert Storm troops. **Clin Infect Dis**, v. 25, p. 979-982, 1997.

TEH, B. H.; LIN, J. T.; PAN, W. H. et al. Seroprevalence and associated risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Taiwan. **Anticancer Res**, v. 14, p. 1389-1392, 1994.

THE EUROGAST STUDY GROUP. Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 population. **Gut**, v. 34, p. 1672-1676, 1993.

THE HELICOBACTER FOUNDATION. **About *Helicobacter pylori***. Disponível em: <<http://www.helico.com> > Acessado em 12 jul. 2001.

THIJS, J. C.; VAN ZWET, A. A.; THIJS, W. J. et al. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. **Am J Gastroenterol**, v. 91, p. 2125-2129, 1996.

THOMAS, J. E.; GIBSON, G. R.; DARBOE, M. K. et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **Lancet**, v. 340, p. 1194-1195, 1992.

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

TORTORA, G. et al. **Microbiologia: uma introdução**. 6. ed. Porto alegre: Artmed, 2000.

TSAI, C. J. Does quantitative serologic testing for *Helicobacter pylori* predict peptic ulcer disease in cirrhosis? **Gastrointest Endosc**, v. 50, n. 3, p. 381-6, 1999.

TYTGAT, G. N. J. Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 9, n. 2, 1995.

TYTGAT, G. N. J. *Helicobacter pylori*: past, present and future. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 1, p. 30-33, 2000.

TYTGAT, G. N. J.; NOACH, L. A.; RAUWS, E. A. J. *Helicobacter pylori* infection and duodenal ulcer disease. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 22, p. 127-139, 1993.

UMLAUFT, F.; KEEFFE, E. B.; OFFNER, F. et al. *Helicobacter pylori* infection and blood group antigens: lack of clinical association. **Am J Gastroenterol**, v. 91, n. 10, p. 2135-2138, 1996.

VAIRA, D.; MIGLIOLI, M.; MULE, P. et al. Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. **Gut**, v. 35, n. 3, p. 309-312, 1994.

VAIRA, D.; MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen based assay. **Lancet**, v. 354, p. 30-33, 1999.

VAIRA, D.; MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F. et al. Noninvasive antigen-based assay for assessing *Helicobacter pylori* eradication: a European multicenter

study. The European *Helicobacter pylori* Study Group. **Am J Gastroenterol**, v. 95, p. 925-929, 2000.

VALARINI, S. B. M. **Análise comparativa entre oito esquemas terapêuticos na erradicação do *Helicobacter pylori* da mucosa gástrica.** Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Medicina, Clínica e Cirurgia do Trauma) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

VAN ZWET, A. A.; THUJS, J. C.; ROOSENDAAL, R. et al. Practical diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 501-507, 1996.

VANDAMME, P.; DELEY, J. Proposal for a new family: *Campylobacteraceae*. **Int J System Bacteriol**, v. 41, p. 451-455, 1991.

VANDAMME, P.; FALSEN, E.; ROSSAU, R. et al. Revision of *Campylobacter*, *Helycobacter* and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. **Int J System Bacteriol**, v. 41, p. 88-103, 1991.

VEENENDAAL, R. A.; BIEMOND, I.; PENA, A. S. et al. Influence of age and *Helicobacter pylori* infection on serum pepsinogens in healthy blood transfusion donors. **Gut**, v. 33, n. 4, p. 452-455, 1992.

WARREN, J. R. Spiral bacteria of the gastric antrum. **Med J Aust**, v. 141, n. 7, p. 477-478, 1984.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 1, p. 1273-75, 1983.

WEEKS, D. L.; ESKANDARI, S.; SCOTT D. R. et al. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 482- 485, 2000.

WHELAN, S. L.; PARKIN, D. M.; MASUYER, E. Trends in cancer incidence and mortality. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 1993.

WOTHERSPOON, A. C. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **Brit Med Bull**, v. 54, n. 1, p. 79-85, 1998.

WOTHERSPOON, A. C.; ORTIZ-HIDALGO, C.; FALZON, M. R. et al. *Helicobacter pylori* - associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. **Lancet**, v. 338, n. 8776, p. 1175-6, 1991.

WUNSCH, H. Variability of *H. pylori*-associated illness does not lie in bacterial genome. **Lancet**, v. 353, n. 9148, p. 213, 1999.

XIA, H. H.; TALLEY, N. J. Natural acquisition and spontaneous elimination of *Helicobacter pylori* infection: clinical implications. **Am J Gastroenterol**, v. 92, p. 1780-1787, 1997.

ZHANG, L.; BLOT, W. J.; YOU, W. C. et al. *Helicobacter pylori* antibodies in relation to precancerous gastric lesions in a high-risk Chinese population. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 5, p. 627-630, 1996.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Modelo de ficha de autorização e dados do paciente

#### AUTORIZAÇÃO PARA USO DE AMOSTRA CLÍNICA PARA FINS DE PESQUISA

Eu, \_\_\_\_\_,  
portador de RG nº \_\_\_\_\_ venho, através deste documento,  
voluntariamente autorizar a utilização de minha amostra de sangue para fins exclusivos de  
pesquisa a ser realizada nesta instituição.

Tenho consciência e fui informado que a doação desta amostra não me trará  
nenhuma obrigação futura ou prejuízos de qualquer ordem.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

Curitiba, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2001.

Obs.: O uso destas amostras será aplicado no projeto de pesquisa intitulado PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI - *Helicobacter pylori* EM DOADORES DE BANCO DE SANGUE.

**Anexo 2 - Mapa de trabalho para envio de amostras para o Laboratório****PROTOCOLO *HELICOBACTER***

Nome:	Sexo: M F	Data de Nasc.:
Data de coleta:	N. de registro:	
Suspeita clínica:	Diagnóstico:	
<b>Não preencher os itens abaixo</b>		
Histologia	Urease	
Sorologia – Título:		
Observações:		

Laboratório: separar o soro e congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$