



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA BACTÉRIA *Helicobacter pylori* EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS AMAZÔNICAS E A VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO COPROMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO.

JOCILENE GUIMARÃES SILVA

MANAUS-AM

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

JOCILENE GUIMARÃES SILVA

ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA BACTÉRIA *Helicobacter pylori* EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS AMAZÔNICAS E A VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO COPROMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA INFECCÃO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

MANAUS
2012

JOCILENE GUIMARÃES SILVA

ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA BACTÉRIA *Helicobacter pylori* EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS AMAZÔNICAS E A VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO COPROMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Saúde.

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Odair Pereira
Universidade Federal do Amazonas

Profª. Dra. Adriana Malheiro
Universidade Federal do Amazonas

Profª. Dra. Jaila Dias Borges
Universidade Federal do Amazonas

Profª. Dra. Juliana Vianna Pereira
Universidade Federal do Amazonas

Profª. Dra. Sonia Maria da Silva Carvalho
Universidade Federal do Amazonas

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G963e Guimaraes Silva, Jocilene
Estudo Soroepidemiológico da Bactéria *Helicobacter pylori* em Populações Ribeirinhas Amazônicas e a Validação de um Ensaio Copromolecular para Determinação da Infecção. / Jocilene Guimaraes Silva. 2012
124 f.: il. color; 21 cm.

Orientador: José Odair Pereira
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Soroepidemiologia. 3. Copromolecular. 4. Ribeirinhos. 5. Amazonas. I. Pereira, José Odair II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“A cada um será dado de acordo com suas obras...”

Jesus Cristo.

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais, pelo legado de honestidade, respeito e superação das adversidades, que sacrificaram seus sonhos em prol dos filhos e disso nunca esqueço, saibam que naqueles dias em que o desânimo e o cansaço predominaram, era só pensar em vocês que eu via o sentido na vida., obrigada por me concederem a oportunidade de ir além do sonho de ser Cientista.....

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por me mostrar que só realizamos aquilo que ele deseja.

Ao meu orientador Dr. José Odair Pereira, grande Cientista e ser Humano, pela confiança, incentivo e paciência (quanta paciência), por ter acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava, por nunca me dizer não, que compreendeu meus momentos de crise, sem nunca me cobrar ou pressionar e, sobretudo pela competência, amizade, dedicação e oportunidade que foram essenciais no desenvolvimento dessa tese. Muito obrigada!!!!

Aos meus amados pais Normam e Selma, pelo amor, força e exemplo de vida, que me proporcionaram o exemplo e a luz necessária para percorrer meu caminho e sobrepor os percalços, apoiando-me com amor e dedicação, sem vocês eu nada seria, meu eterno amor e gratidão.

Aos meus irmãos Roberto, Heslei e Joanielson Guimarães, pelo amor e carinho dispensados a única e mais legal irmã que vocês poderiam ter.

A amiga Rosane Loiola pela amizade, bondade, paciência e sabedoria, demonstradas na arte de transmitir seus conhecimentos em Biologia Molecular, provavelmente este trabalho não seria concluído sem a sua ajuda, sou-lhe eternamente grata e orgulho-me de tê-la como amiga desde os loucos anos de graduação.

A minha “eterna” orientadora, Dra. Tereza Cristina Corvelo, pela amizade de longa data, pela valiosa orientação desde a iniciação científica, pelas importantes contribuições na realização deste trabalho e principalmente por me permitir, o livre acesso, ao laboratório de Imunogenética da UFPA, minha terceira casa.

Aos meus filhotes Carl Sagan, Leão, Titi e Braquela que enfrentaram os períodos em que estive longe, sempre dispostos a ficar com sua tia Nana e tio Fofão, obrigado pela companhia nas longas madrugadas e principalmente por sempre me ouvirem sem reclamar, vocês são como faróis na escuridão.

A irmã de coração Alana Fernandes pela amizade, incentivo, carinho, paciência e compreensão, durante os anos da realização desta tese. Pela atenção incomparável com minha casa e meus filhotes, nas inúmeras vezes que necessitei viajar; pelo auxílio magnífico durante as coletas, por viver literalmente na merda comigo durante as técnicas laboratoriais, por me ensinar que amigos de verdade, assim como ela, estão presentes nas horas mais difíceis.

A amiga e agora Dra. Danielle Albuquerque, pela amizade incondicional desde nossa chegada ao Amazonas; pelo apoio psicológico durante nossa adaptação em Coari; pelo estímulo e cooperação, em diversas fases do Doutorado; por me ouvir e iluminar meus momentos de trevas; pelos conselhos sensatos, *os quais insisto em não seguir*; por me acolher sempre em sua morada e demonstrar que amigos verdadeiros, superam as diferenças.

Ao amigo Ramon Brito, meu parceiro científico, um coração iluminado que Deus escolheu a dedo para combinar tanto comigo, que ficou a frente do LABMAIP e de todos os “seus pepinos”, quando do meu afastamento total, por (deso)orientar meus alunos de PIBIC e PIBEX, e principalmente por me proporcionar grandes risadas.

Ao Dobles Reis Junior por toda a dedicação na coleta e processamento das amostras, toda vez que você estava na bancada eu ficava despreocupada.

Ao amigo Tiótrfes Fernandes pelo auxílio epidemiológico.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xí
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRAT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1. A bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	06
2.1.1. Classificação Taxonômica	06
2.1.2. Morfologia bacteriana	08
2.1.3. Genoma bacteriano	10
2.1.4. Fatores de virulência	12
2.2. Resposta imunológica à bactéria <i>H. pylori</i>	17
2.3. Aspectos epidemiológicos da <i>Helicobacter pylori</i>	22
2.3.1. Transmissão	22
2.3.2. Prevalência	29
2.3.3. Fatores de risco	28
2.4. Manifestações clínicas na infecção por <i>H. pylori</i>	32
2.4.1. Sintomatologia observada na infecção por <i>H. pylori</i>	32
2.4.2. Patologias associadas à infecção por <i>H. pylori</i>	32
2.5. Métodos de Diagnóstico para <i>Helicobacter pylori</i>	38
2.6. A Biologia Molecular como ferramenta de diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i>	47

2.6.1. Princípios da Reação em cadeia da polimerase	47
2.6.2. Detecção por PCR da <i>H. pylori</i> nas fezes	48
2.7. Os sistemas sanguíneos ABH e Lewis	51
2.7.1. A expressão dos grupos sanguíneos ABH e Lewis	51
2.7.2. A rota biossintética dos antígenos ABH e Lewis	53
2.7.3. Associação entre a <i>Helicobacter pylori</i> e os antígenos ABH e Lewis	57
3. OBJETIVOS	59
4. MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1. Delineamento do Estudo	60
4.2. Região Estudada	60
4.2.1. O município de Coari	60
4.3. Tamanho calculado da amostra	61
4.3.1. Estudo Piloto	61
4.3.2. Cálculo da Amostra	62
4.4. Aspectos éticos da pesquisa	63
4.5. Populações estudadas	63
4.6. Amostras controle	64
4.7. Critérios de inclusão e exclusão no estudo	64
4.8. Obtenção das informações	65
4.9. Coleta e tratamento das amostras	67
4.10. Descrição das técnicas laboratoriais	69
4.10.1.1. Detecção sorológica dos anticorpos do tipo IgG anti-<i>H. pylori</i> específicos	69

4.10.1.2. Detecção de Antígenos Fecais para <i>H. pylori</i>	70
4.11. Técnicas de identificação de grupos sanguíneos ABO e Lewis	72
4.11.1. Hemaglutinação	72
4.11.2. Dot-Blot-ELISA	72
4.12. Detecção Parasitária de Helminhos e/ou Protozoários	74
4.13. Detecção Molecular de DNA bacteriano	75
4.13.1. Extração de DNA bacteriano	75
4.13.2. Análise e quantificação de DNA total	77
4.13.3. Identificação molecular da <i>H. pylori</i>	77
4.14. Análise Estatística	78
5- RESULTADOS	81
5.1. Análise sorológica e de antígeno fecal para infecção por <i>H. pylori</i> pelos testes de ELISA	81
5.2. Análise epidemiológica relacionada à infecção	83
5.2.1. População estudada	83
5.2.2. Sintomatologia observada	84
5.2.3. Variáveis epidemiológicas analisadas	87
5.3. Análise dos antígenos de grupos sanguíneos relacionados à sorologia	89
5.4. Análise de enteroparasitismo associados à infecção por <i>H. pylori</i>	91
5.5. Detecção molecular da bactéria <i>H. pylori</i> nas amostras de fezes	93

5.5.1. Detecção de <i>Helicobacter pylori</i> ssp pelo gene RNAr16S	94
5.5.2. Detecção de <i>Helicobacter pylori</i> pelo gene Ag	96
5- DISCUSSÃO	99
6- CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO I	119
ANEXO II	120
ANEXO III	122
ANEXO IV	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1- Desenho esquemático da morfologia da <i>Helicobacter pylori</i>	9
Figura 2- Microscopia eletrônica de varredura de <i>H. pylori</i> em uma cultura de sete dias, indicando a presença de formas bacilares e cocóides	10
Figura 3- Representação do genoma da bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 4- Fotografia mostrando a presença de polimorfos nucleares em mucosa gástrica infectada por <i>Helicobacter pylori</i>	19
Figura 5- Indução de inflamação e lesão da mucosa gástrica pela <i>H.pylori</i>	22
Figura 6- Prevalência mundial da infecção pela <i>H. pylori</i>	27
Figura 7- Fotografia do processo de gastrite crônica na mucosa gástrica.	35
Figura 8- O processo ulcerativo na mucosa duodenal e na mucosa gástrica associado à bactéria <i>H. pylori</i>	36
Figura 9- Mapa mostrando a localização do Estado do Amazonas. Em destaque o município de Coari	61
Figura 10- Prevalência da infecção por <i>H. pylori</i> pelos métodos de ELISA	81
Figura 11- Prevalência da infecção por <i>H. pylori</i> na população estudada	83
Figura 12- Soroprevalência da infecção por <i>H. pylori</i> associada ao grau de parasitismo na população estudada	92
Figura 13- Prevalência de espécies enteroparasitárias encontradas na população estudada	93
Figura 14- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S	95
Figura 15- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o	95

RNAr 16S

Figura 16- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o 97

Ag, através dos primers p1 e p2

Figura 17- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o 97

Ag, através dos primers p1 e p2

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
Tabela 1- Organização taxonômica da bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	7
Tabela 2- O gênero <i>Helicobacter</i> e suas espécies	7
Tabela 3- Testes de diagnóstico utilizados para a detecção da infecção por <i>H. pylori</i>	39
Tabela 4- Distribuição de antígenos e anticorpos nas hemácias e no soro dos grupos sanguíneos do sistema ABO em humanos	51
Tabela 5- Distribuição de antígenos ABH nos secretores e não secretores	52
Tabela 6- Interação dos genótipos Lewis e secretor, no fenótipo Lewis	53
Tabela 7- Determinantes antigênicos resultado da ação das glicosiltransferases sobre controle dos genes Se e Le	56
Tabela 8- Lista de iniciadores utilizados na detecção molecular da <i>H. pylori</i> por PCR	79
Tabela 9- Tempos, temperatura e números de ciclos das reações de PCR para cada iniciador	80
Tabela 10- Comparação de detecção da infecção por <i>H. pylori</i> através do método ELISA Sorológico e Fecal	82
Tabela 11- Comparação da concordância e discordância nos testes de ELISA na população geral analisada	84
Tabela 12- Associação de quadros sintomáticos e assintomáticos com a infecção por <i>H. pylori</i>	85
Tabela 13- Principais sintomas apresentados pela população estudada associados à soroprevalência de infecção por <i>H. pylori</i>	86

Tabela 14- Análise das variáveis epidemiológicas associadas à infecção por <i>H. pylori</i> mediante o teste sorológico	88
Tabela 15- Prevalência dos grupos sanguíneos ABH e Lewis entre os indivíduos estudados	90
Tabela 16- Associação entre a infecção por <i>H. pylori</i> e os quadros de enteroparasitismo na população analisada	91
Tabela 17- Prevalência da infecção por <i>Helicobacter pylori</i> nos testes sorológico, fecal e copromolecular p1p2	96
Tabela 18- Comparação da concordância e discordância entre os testes de ELISA e PCR	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cag A	Gene associado a citotoxina vacuolizante
Cag PAI	Ilha de patogenicidade
DNA	Ácido dexossoribonucléico
HCL	Ácido Clorídrico
Hsp	Proteína de choque térmico
Hp	<i>Helicobacter pylori</i>
IgA	Imunoglobulina de cadeia α
IgG	Imunoglobulina de cadeia γ
IL	Interleucina
INF γ	Interferon gama
Kb	Kilobases
Le	Lewis
Le ^a	Antígeno Lewis a
Le ^b	Antígeno Lewis b
Le ^x	Antígeno Lewis x
Le ^y	Antígeno Lewis y
LPS	Lipopolissacarídeo
Mb	Megabases
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNAr	Ácido ribonucéico ribossômico
Se	Secretor
SOD	Superóxido dismutase
Th	Linfócito T auxiliar
TLAM	Tecido linfoíde associado a mucosa
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UD	Úlcera duodenal
UG	Úlcera gástrica

RESUMO

As comunidades ribeirinhas amazônicas parecem ter todas as condições de saneamento e sócio-econômicas suspeitas para o condicionamento à infecção por *Helicobacter pylori*, bactéria associada à etiopatogenia de várias doenças gastrointestinais. No Brasil, são registrados em média, quinze mil casos de câncer do aparelho digestivo por ano, com um maior percentual na região norte. Uma vez que o *H. pylori* é considerada um dos agentes etiológicos desta malignidade, o objetivo deste estudo foi determinar a prevalência da infecção por *H. pylori* e realizar o levantamento de variáveis epidemiológicas e de suscetibilidade relacionados à infecção bacteriana em comunidades ribeirinhas, e validar um ensaio copromolecular para diagnóstico da infecção. O estudo realizado foi do tipo transversal, contemporâneo, analítico e observacional, compreendendo uma amostra de 200 indivíduos, dos quais foram coletados sangue, saliva e fezes, além da aplicação de um questionário epidemiológico empregado, com questões dirigidas à sua identificação, obtendo dados sobre as condições socioeconômicas, higiênicas, sanitárias e sintomatologia apresentada. Para detecção sorológica de anticorpos do tipo IgG anti-*H. pylori* específicos foram utilizados amostras de plasma que foram testadas para anticorpos sistêmicos do tipo IgG anti-*H. pylori* através de um ensaio imunoenzimático, usando o Kit Ridascreen *Helicobacter* IgG (R-Biopharm AG, Alemanha); para detecção ativa do *H. pylori*, foi utilizado as amostras de fezes que foram testadas através do Kit MKBIO *H. pylori* (MK BIO GMBH, DIMA, Alemanha). Além da detecção de anticorpos e antígenos para *H. pylori*, também foram aplicadas técnicas de biologia molecular, nas amostras fecais, para confirmar o diagnóstico da infecção, por detecção direta do DNA bacteriano, utilizando os *primers RNAr16S* que amplificam um fragmento gênico de 1200bp do gênero *Helicobacter* e os *primers P1 e P2*, os quais amplificam um fragmento gênico de 298 pb que codifica uma proteína antigênica de 26kDa espécie específica da *H. pylori*. Esta pesquisa teve como ponto central à infecção pela bactéria *H. pylori*, que foi detectada através de três métodos de diagnóstico: A sorologia, o antígeno fecal e PCR. A sorologia foi a técnica escolhida para relacionar com os aspectos epidemiológicos referentes ao estudo, sendo que os resultados obtidos revelaram uma frequência de soropositividade de 83,5% (167/200). A análise das variáveis epidemiológicas relacionadas à infecção bacteriana demonstrou uma maior frequência de indivíduos infectados do sexo feminino, na faixa etária de 0 a 17 anos, além do que 97,4% da população que ingeriam água sem tratamento foram positivos a infecção. A comparação da prevalência da infecção, obtidas através dos três diferentes métodos de detecção, foram elevadas, no entanto a detecção copromolecular foi o que detectou um menor número de indivíduos positivos (113/200), embora apresente os maiores índices de sensibilidade 79% e especificidades 100%. A detecção copromolecular demonstrou ser uma ferramenta importante na detecção da infecção bacteriana, possibilitando nestas populações a aplicação de um teste de elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicada na detecção precoce do patógeno.

ABSTRAT

The Amazonian riverine communities seem to have all of the conditions of sanitation and socioeconomic suspensions for the conditioning to the infection for *Helicobacter pylori*, bacterium associated to the etiopatogenia of several diseases gastrointestinais. In Brazil, they are registered on average, fifteen thousand cases of cancer of the digestive system a year, with a percentile adult in the north area. Once the *H. pylori* is considered one of the etiological agents of this malignitude, the objective of this study was to determine the prevalence of the infection for *H. pylori* and to accomplish the rising of epidemic variables and of susceptibility related to the bacterial infection in riverine communities, and to validate a rehearsal copromolecular for diagnosis of the infection. The accomplished study was of the type traverse, contemporary, analytical and observacional, understanding a sample of 200 individuals, of which they were collected blood, saliva and feces, besides the application of a questionnaire epidemic employee, with subjects driven to his/her identification, obtaining data on the conditions socioeconomic, hygienic, sanitary and symptoms. For detection sorologic of antibodies of the type IgG anti-*H. pylori* were used plasma samples that were tested for systemic antibodies of the type IgG anti-*H. pylori* through a rehearsal immunological, using the Kit Ridascreen Helicobacter IgG (R-Biopharm AG, Germany); for detection it activates of the *H. pylori*, it was used the samples of feces that were tested through the Kit MKBIO *H. pylori* (MK BIO GMBH, DIMA, Germany). Besides the detection of antibodies and antigens for *H. pylori*, they were also applied techniques of molecular biology, in the fecal samples, to confirm the diagnosis of the infection, for direct detection of bacterial DNA, using the primers RNAr16S that amplify a fragment gene of 1200bp of the gender Helicobacter and the primers p1 and p2, which amplify a fragment gênico of 298 pb that codifies a protein antigenic of 26kDa species specify of the *H. pylori*. This research had about central point to the infection for the bacterium *H. pylori*, that was detected through three diagnosis methods: The sorologia, fecal antigen and PCR. The sorologia went to the chosen technique to relate with the epidemic aspects regarding the study, and the obtained results revealed a frequency of soropositive of 83,5% (167/200). The analysis of the epidemic variables related to the bacterial infection demonstrated a larger frequency of infected individuals female, in the age group from 0 to 17 years, in addition 97,4% of the population that ingested water without treatment were positive the infection. The comparison of the prevalence of the infection, obtained through the three different detection methods, they were high, however the detection copromolecular was what detected a smaller number of positive individuals (113/200), although it presents the largest indexes of sensibility 79% and specificities 100%. The detection copromolecular demonstrated to be an important tool in the detection of the bacterial infection, making possible in these populations the application of a test high sensibility and specificity, could be applied in the precocious detection of the patogen.

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos o estômago humano foi considerado como sendo um ambiente inóspito para bactérias devido à presença do ácido clorídrico, no entanto no século XIX Bizzozero e colaboradores relataram, pela primeira vez, a presença de organismos espiralados em glândulas gástricas e células parietais de mamíferos, especialmente em caninos (1893 apud MARSHALL, 2002, P.147). O organismo espiral também foi observado na mucosa gástrica canina em 1896 por Salomon, que encontrou organismos similares em gatos e ratos (SALOMON, 1896). Em 1899 Jaworski encontrou bactérias com forma espiral em lavagens gástricas sedimentada obtida de um humano, que foi denominada de *Vibrio rugula*, este trabalho foi incluso no “Handbook of Gastric Disease”, mas, por ter sido escrito em polonês não teve impacto junto a comunidade científica (KONTUREK, 2003).

Nas décadas seguintes vários pesquisadores confirmaram e relataram a presença de bactérias espiraladas no estômago de mamíferos, inclusive de humanos. Em 1906, Balfour associou o organismo espiral com úlcera gástrica em cachorros e macacos, e no mesmo ano Krienitz relacionou microorganismos similares observados em biopsia gástrica e vômitos de pacientes com carcinoma gástrico (BALFOUR, 1906). Doenges em 1939 encontrou o organismo espiral em 43% de 242 autópsias de estômagos humanos (DOENGES, 1939), e em 1940 Freedberg e Barrom utilizando a técnica de coloração com prata, conseguem detectar na mucosa gástrica a presença de formas espiroquetas (apud GOODWING, 1986).

Quatorze anos depois, em 1954 Palmer estabeleceu um retrocesso na linha de pesquisa sobre a participação de bactérias na patogênese das doenças do trato gastrointestinal, utilizando espécimes gástricos, obtidos por sucção e corados pelo

método Hematoxilina-eosina (HE), ele não consegue identificar a presença de bactérias espirais, e postula que a presença das bactérias nos estudos anteriores não passava de contaminação, fato que desmotivou as pesquisas e publicações nesta área (1954 apud MARSHALL & WARREN, 1983, p.1311).

A estagnação das pesquisas durou cerca de vinte anos, até que em 1975 Sterr e Colin-Jones estudando amostras de biopsias gástricas da região antral, pó microscopia eletrônica, observaram que 80% dos pacientes com úlcera apresentavam bacilos Gram negativos, então descritos como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

Em 1979, o patologista Robin Warren iniciou suas pesquisas nesta área, e por exame histológico, observou que os micro-organismos presentes na camada de muco da mucosa gástrica eram parecidos aos descritos em trabalhos de outros patologistas ao final do século IX, mas devido as dificuldade no isolamento, pouco se conhecia sobre a bactéria, sendo muitas vezes ignorada por médicos e cientistas.

Em 1981, o jovem médico residente Barry Marshall, interessou-se pelas observações de Robin Warren e uniu-se a ele na tentativa de isolar esse microorganismo. Eles utilizaram culturas bacterianas feitas a partir de biópsias de pacientes com gastrite crônica. Em 1982, Marshall e Warren, acidentalmente, por um aumento no período de incubação, conseguiram isolar pela primeira vez a bactéria que posteriormente foi classificada como *Helicobacter pylori* (MARSHALL & WARREN, 1983).

A associação deste microorganismo e a inflamação gástrica, primeiramente com gastrite crônica, não foram inicialmente aceitas. Porém um experimento realizado em 1984 confirmou a associação. Marshall ingeriu uma cultura de *Campylobacter*, classificação adotada na época, e após a ingestão sintomas

dispépticos, que não se apresentavam anteriormente à ingestão, foram associados à gastrite crônica ativa, sendo esta confirmada por exames histopatológicos (MARSHALL *et al.*, 1985), comprovando sua teoria. Estas descobertas revolucionaram a gastroenterologia e a microbiologia, conduzindo as mudanças em condutas terapêuticas e diagnósticas.

Em 1994 a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer classificou a bactéria como um carcinógeno humano do tipo 1, pois pesquisas mostram que em humanos a presença deste organismo desencadeia uma infecção crônica que em muitos casos evolui e desenvolvem patologias gastrointestinais graves, sendo que em adultos a bactéria está associada ao desenvolvimento de gastrite crônica do tipo B, úlcera péptica, particularmente úlcera duodenal, carcinoma gástrico e linfoma de tecido linfóide associado à mucosa tipo célula – B (GRAHAM, 1994).

No ano de 2005, Marshall e Warren ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela identificação da bactéria *Helicobacter pylori*.

Em áreas tropicais e sub-tropicais, como a região Amazônica, enfermidades infecto-parasitárias são definidas como prioritárias para a saúde em consequência de claras necessidades e condições de impacto social. Tem sido constatado que na região norte, especificamente em populações ribeirinhas, observam-se elevados índices de infestações parasitárias que assolam toda a população, que na concepção geral, estão associadas às condições socioeconômicas, a falta de saneamento básico e o difícil acesso aos sistemas de saúde, este último em função de grandes distâncias, dificuldades de comunicação e transporte. Dessa maneira estudos epidemiológicos nestas populações são escassos, como resultado, muitas vezes

processos de doenças simples e de origem primária acabam por culminar em patologias graves.

As Comunidades ribeirinhas Amazônicas parecem ter todas as condições de saneamento e sócio-econômicas suspeitas para o condicionamento à infecção por *Helicobacter pylori*, bactéria associada à etiopatogenia de várias doenças gastrointestinais. Portanto, uma pesquisa sobre a prevalência deste microorganismo nesta região apresenta uma expectativa de resultados bastante significativos.

No Brasil, são registrados em média, quinze mil casos de câncer do aparelho digestivo por ano, com um maior percentual na região norte, sendo a bactéria *H. pylori* considerada um dos agentes etiológicos desta malignidade, no entanto observa-se escassez de estudos relacionados a este microorganismo, em nossa região, o que resulta na falta de conhecimento do real perfil de prevalência da infecção.

Os estudos sugerem que o *H. pylori* é adquirido principalmente na infância, e que o longo período assintomático da infecção possibilita um período maior de infecção crônica no tecido gástrico, causando graves danos à mucosa, elevando consideravelmente o risco de desenvolver adenocarcinoma gástrico. Constatou-se ainda que é muito rara a solicitação de métodos de diagnóstico para crianças e principalmente para pacientes assintomáticos inviabilizando um diagnóstico precoce.

Atualmente, a maioria das técnicas de diagnóstico disponíveis e com fácil acesso, necessitam de endoscopia, um método invasivo e traumático para crianças e inexistente em comunidades ribeirinhas da Amazônia. Portanto, há necessidade de um teste viável, sensível, específico e não-invasivo para diagnóstico da infecção por esta bactéria nessas populações, com finalidade de ampliar nosso limitado entendimento das doenças relacionadas ao patógeno.

No Amazonas não há registro de estudos que utilizem ensaios imunoenzimáticos para detecção da infecção por *Helicobacter pylori*, nem há relatos de padronização e utilização de técnicas para pesquisa molecular de antígenos bacterianos nas fezes. Deste modo, na perspectiva deste estudo, justifica-se a realização deste projeto, pois o desenvolvimento de uma abordagem quantitativa e acurada para detecção desta bactéria possibilitará que os estudos epidemiológicos sejam mais precisos na avaliação do risco para a aquisição e colonização deste patógeno. E assim sendo, poderá ser determinado o melhor método de escolha de diagnóstico para implantar um adequado tratamento, evitando possível resistência bacteriana, devido tratamento errôneo em consequência de falhas diagnósticas. A longo prazo, os resultados desta pesquisa poderá auxiliar no controle da disseminação deste agente nas comunidades ribeirinhas, até que medidas efetivas de erradicação, como a vacinação possam ser desenvolvidas pela comunidade científica e assim diminuir a incidência de gastrites, úlceras e câncer gástrico em nossa região.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A bactéria *Helicobacter pylori*

2.1.1. Classificação Taxonômica

Após estudos taxonômicos, incluindo análises moleculares de características ultraestruturais, propriedades enzimáticas, respiração e crescimento, ficou evidente que a espécie não poderia pertencer ao gênero *Campylobacter*, devido as suas características bioquímicas e genéticas que eram diferentes das de outras espécies do gênero.

O microorganismo que primeiramente foi nomeado como *Campylobacter pyloridis*, para notar a localização e a similaridade com as bactérias do gênero *Campylobacter* (MARSHALL, 1994) posteriormente *Campylobacter pylori*, ocupou em 1989 a posição taxonômica de gênero *Helicobacter*, originalmente com duas espécies: *Helicobacter pylori* (Tabela 1), patógeno gástrico humano e *H. mustalae*, uma bactéria similar encontrada no estômago de furões.

Nos últimos anos, foram incluídas no gênero *Helicobacter*, trinta espécies gástricas e não gástricas (BUNN *et al.*, 1997), que estão descritas na tabela 2, a maioria isolada de diferentes espécies de mamíferos.

As espécies de *Helicobacter* são caracterizadas de acordo com a análise da seqüência de seus genes de rRNA 16S, seus ácidos graxos celulares e pela presença de flagelos polares (MURRAY *et al.*, 2006).

Tabela 1- Organização taxonômica da bactéria *Helicobacter pylori*

<i>Taxonomia da Bactéria Helicobacter pylori</i>	
FILO	<i>Proteobacteria</i>
CLASSE	<i>Epsilonproteobacteria</i>
ORDEM	<i>Campylobacterales</i>
FAMÍLIA	<i>Helicobacteraceae</i>
GÊNERO	<i>Helicobacter</i>
ESPÉCIE	<i>Pylori</i>

FONTE: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy

Tabela 2- O gênero *Helicobacter* e suas espécies

<i>Helicobacter spp</i>	
<i>Helicobacter acinonychis</i>	<i>Helicobacter marmotae</i>
<i>Helicobacter anseris</i>	<i>Helicobacter mastomyrinus</i>
<i>Helicobacter aurati</i>	<i>Helicobacter mesocricetorum</i>
<i>Helicobacter bilis</i>	<i>Helicobacter muridarum</i>
<i>Helicobacter bizzozeroni</i>	<i>Helicobacter mustalae</i>
<i>Helicobacter bovis</i>	<i>Helicobacter nemestrinae</i>
<i>Helicobacter brantae</i>	<i>Helicobacter pametensis</i>
<i>Helicobacter canis</i>	<i>Helicobacter pullorum</i>
<i>Helicobacter cholecystus</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Helicobacter rodentium</i>
<i>Helicobacter equorum</i>	<i>Helicobacter salomonis</i>
<i>Helicobacter felis</i>	<i>Helicobacter suis</i>
<i>Helicobacter fennelliae</i>	<i>Helicobacter trogontum</i>
<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Helicobacter typholonicus</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Helicobacter westmeadii</i>

FONTE: DUNN *et al.*, 1997, p 227.

2.1.2. Morfologia bacteriana

A bactéria *H. pylori* é um bacilo gram-negativo, de forma curva ou espiralar, no entanto quando cultivada em meio sólido adquire formato arredondado, denominada forma cocóide. Sua extensão varia de 0,5 a 1µm em largura e 2,5 a 5µm de comprimento, possui de 4 a 6 flagelos unipolares embainhados (Figura 1), sendo que cada um possui aproximadamente 30 µm de comprimento e 2,5 nm de espessura, que garantem à bactéria grande motilidade (GOODWIN & ARMSTRONG, 1990).

A forma cocóide (Figura 2), apresenta uma membrana circular, que na maioria das vezes possui superfície grossa e irregular, sendo observada no seu interior poucas estruturas intracitoplasmáticas e grânulos. Frequentemente pode-se visualizar no interior da forma cocóide o bacilo em forma de “U” e os flagelos circundando o bacilo (COLE *et al.*, 1997; SAITO *et al.*, 2003). Ambas (espiralada e cocóide) são encontradas no estômago e duodeno, a conversão morfológica da forma espiral para cocóide pode se dar em uma diversidade de condições ambientais, como incubação prolongada, temperatura elevada, pH alcalino, aerobiose, tratamento com antibióticos, com inibidores da bomba de prótons e óxido nítrico (CHAN *et al.*, 1994; COLE *et al.*, 1997; HECZKO *et al.*, 2000).

Culturas com formas cocóides são metabolicamente ativas, porém não podem ser repicadas, pois o microorganismo já não seria capaz de produzir colônias no novo meio (DUNN *et al.*, 1997). Acredita-se que a forma cocóide seja uma forma de resistência, capaz de suportar as condições adversas do meio ambiente, que está associada à transmissão da bactéria, capaz de infectar água e alimentos e que em boas condições ambientais, poderia retornar a forma espiralada (CAVE, 1997; COLE *et al.*, 1997; GOODMAN & CORREA, 1995; HULTEN *et al.*, 1998).

O crescimento da bactéria *H. pylori* ocorre em uma atmosfera com microaerofila (5% a 15% de oxigênio) com adição de gás carbônico e a uma temperatura ideal de 37 graus centígrados (MARSHALL, 1994). Tem um longo tempo de incubação, de 5 a 7 dias, e cresce em meios sólidos (principalmente agar sangue e chocolate). Crescimento em meio líquido é possível quando em caldo de Brucela, e suplementado com soro bovino fetal (GORMALLY *et al.*, 1996; GOODWIN & WORSLEY, 1993).

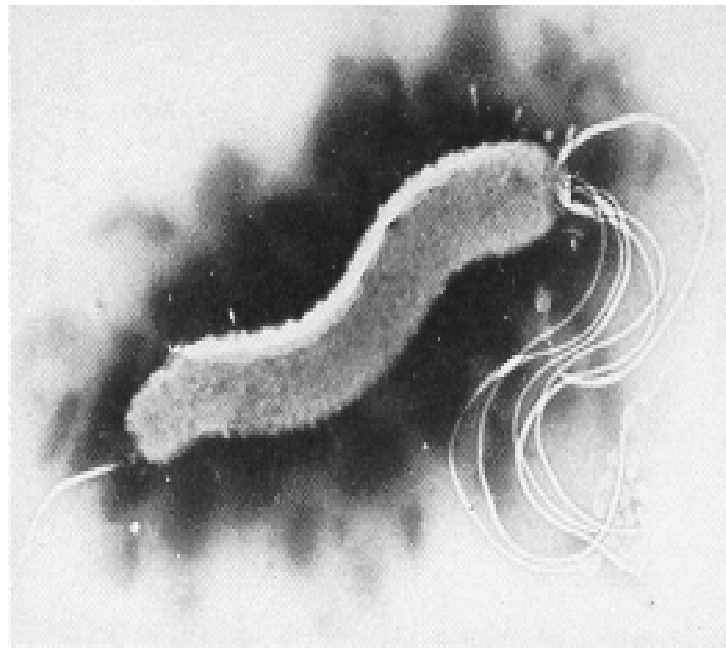


Figura 1- Desenho esquemático da morfologia da *Helicobacter pylori*
FONTE: www.helico.com.br

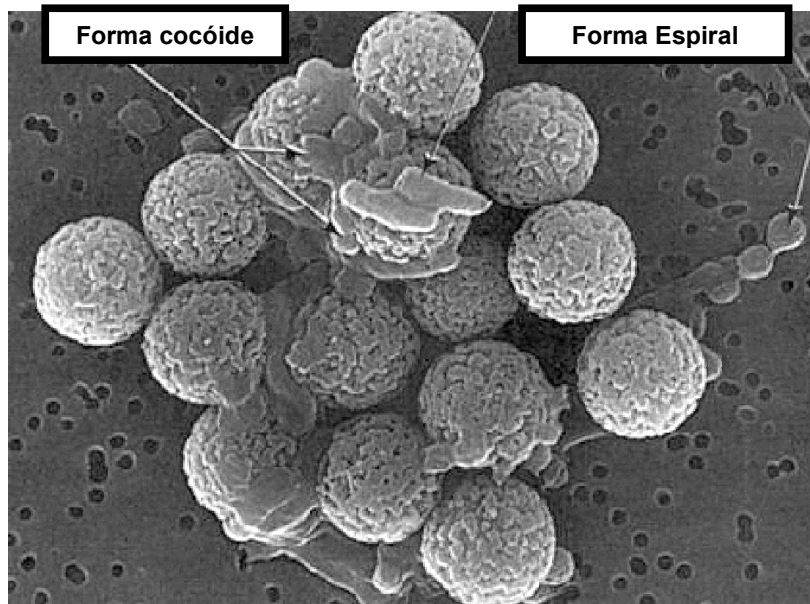


Figura 2- Microscopia eletrônica de varredura de *H. pylori* em uma cultura de sete dias, indicando a presença de formas bacilares e cocóides

FONTE: www.helico.com.br

2.1.3. Genoma bacteriano

A identificação e a caracterização da bactéria a nível genômico é de suma importância, principalmente quando se tenta elucidar a etiologia das doenças associadas ao microorganismo. A *Helicobacter pylori* possui um genoma que varia de 1.6 a 1.73 Mb. Aproximadamente 40% das bactérias isoladas possuem plasmídios com tamanho que varia de 1.5 a 23.2 Kb, mas não foram encontrados neles, genes que codificam fatores de virulência (DUNN *et al.*, 1997).

O primeiro genoma completo do *H. pylori* seqüenciado foi publicado em 1997 por Tomb e colaboradores (TOMB *et al.*, 1997), que seqüenciaram a cepa 26695, que foi isolada em 1997 de um paciente com gastrite no Reino Unido. No ano seguinte foi seqüenciado nos Estados Unidos o genoma da cepa J99, a partir de um paciente com ulcera duodenal (HANCOCK *et al.*, 1998). A comparação das duas cepas seqüenciadas

apresentou grande similaridade. Sendo a maior parte do genoma e proteoma conservados, somente 7% dos genes cepa específicos estão localizados em uma região única e variável do genoma, denominada zona de plasticidade (ALM *et al.*, 1999).

A análise de suas 1590 seqüências indica, entre outras coisas, que o microorganismo possui sistemas bem desenvolvidos para motilidade, homeostase do ferro e para restrição e modificação do DNA, revelando muitas proteínas que podem estar envolvidas na complexa interação parasita-hospedeiro, especialmente no tocante as suas variações antigênicas e sua evolução adaptativa para sobrevivência no ambiente ácido hostil do estômago.

Vários mecanismos podem contribuir para a diversidade genética do *H. pylori*. Entre esses se destacam os rearranjos intragênicos que podem ocorrer na bactéria: deleções, duplicações, inversões e translocações de parte do genoma. O DNA da *H. pylori* possui grande número de seqüências repetitivas, assim como de seqüências de inserção (ALM *et al.*, 1999; BJORKHOL & SALAMA, 2003).

Outro mecanismo importante é a transferência horizontal de genes. A análise do conteúdo G+C de algumas seqüências do genoma bacteriano sugere que esses tenham sido adquiridos de outros Procariontes, Archea ou Eucariontes. Um total de cinco regiões do genoma tem diferenças significativas na percentagem de G+C quando comparado ao resto do genoma, entre os quais se destaca a ilha de patogenicidade Cag (GARCIA-VALLVE *et al.*, 2002; SUERBAUM & ACTMAN, 1999).

A variação na localização de vários genes no mapa genômico sugere que ocorra um extensivo rearranjo no genoma da *H. pylori*. Neste, se encontra uma diversidade significativa em muitas seqüências gênicas, incluindo as que codificam a

urease, o flagelo, a proteína vacuolinizante (*vac A*) e a citotoxina associada ao gene A (*cag A*), os quais são considerados importantes fatores de virulência desta bactéria. Os estudos das variações alélicas da bactéria têm demonstrado a diversidade genética das cepas da *H. pylori*, entretanto o significado biológico desta ampla diversidade ainda não está completamente esclarecida (DUNN *et al.*, 1997; COVACCI *et al.*, 1999).

H. pylori é uma espécie fenotipicamente homogênea, mas apresenta, porém, uma diversidade genômica única no mundo bacteriano.

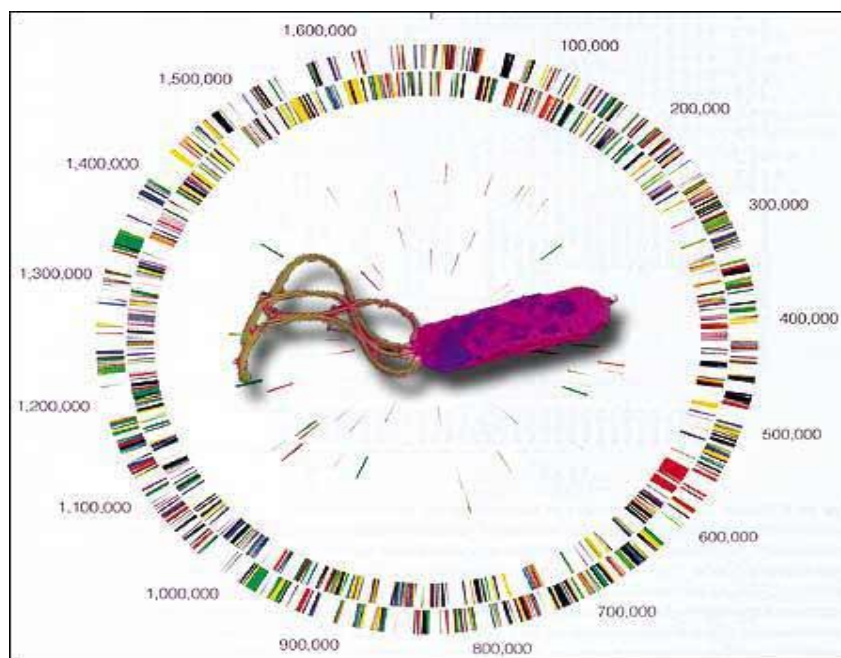


Photo Researchers / Nature Vol. 388, August 7, 1997 ©1997 by Macmillan Magazines Ltd.

Figura 3- Representação do genoma da bactéria *Helicobacter pylori*
FONTE: TOMB *et al.*, 1997.

2.1.4. Fatores de virulência

A bactéria é altamente adaptada à mucosa gástrica do homem, devido a sua capacidade de sintetizar proteínas e metabólicos necessários para a colonização, persistência na mucosa gástrica e ainda fatores que causam diversos danos patológicos à

mucosa gastroduodenal (MARSHAL, 1994; MOBLEY, 1997; COVACCI *et al.*, 1999; TORRES *et al.*, 2000). Estes fatores podem ser divididos em três classes:

1- Fatores de Colonização: que permitem ao patógeno estabelecer-se no Hospedeiro.

2- Fatores de Persistência: que permitem colonização prolongada e sobrevivência da bactéria.

3- Fatores de Indução: que induzem a doença, os quais causam efeitos patológicos adversos na mucosa gástrica.

Entre os fatores de virulência destacam-se:

→ **Flagelos:** A motilidade flagelar tem sido demonstrada como sendo essencial na habilidade que a bactéria possui de mover-se no suco e muco gástrico, possibilitando o alojamento na superfície da célula de revestimento permitindo assim penetração na mucosa e, sobrevivência do organismo no estômago humano (EATON *et al.*, 1989).

→ **Urease:** a capacidade de sobrevivência da *H. pylori* no meio ácido de estômago é possível devido a potente enzima urease, a bactéria expressa altos níveis desta enzima que hidrolisa a uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), fisiologicamente presente no suco gástrico, em bicarbonato (HCO_3^-) e amônia iônica (NH_4^+), elevando o pH da mucosa gástrica de 6,0 para 7,0 tornando-se básico, desta forma o microorganismo fica protegido, ao menos temporariamente, dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago podendo ter acesso à camada protetora de muco (BODE *et al.*, 1989; MARSHALL *et al.*, 1990; MURAKAMI *et al.*, 1990).

A amônia, gerada em decorrência da atividade ureásica do *H. pylori*, pode produzir alterações morfológicas e funcionais no epitélio gástrico, incluindo aumento da difusão retrógrada de íons H^+ na célula epitelial, aumento de aderência

bacteriana e inativação do complemento contribuindo para o processo de inflamação (PARSONS *et al.*, 1987).

→ **Proteínas de choque térmico:** A bactéria *H. pylori* expressa proteínas de choque térmico (Hsp) homólogas as de humanos. Acredita-se que a expressão de proteínas de choque térmico como a HspA e HspB aumentem a atividade da urease e influenciem na habilidade da *H. pylori* tolerar as condições extremas do estômago (DUNN *et al.*, 1997).

→ **Catalase e a Superóxido Dismutase:** são enzimas bacterianas envolvidas no mecanismo de escape do microorganismo, associadas à resistência bacteriana, que atuam na neutralização da ação oxidativa tóxica de radicais livres, conferindo proteção à bactéria contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, impedindo uma resposta inflamatória eficaz do hospedeiro (DUNN *et al.*, 1997), (HAZELL *et al.*, 1991).

→ **Enzimas degradativas:** A produção de proteases A e fosfolipases leva à degradação das membranas das células epiteliais e do complexo lipídico-glicoprotéico da camada de muco, aumentando a solubilidade do mesmo, acarretando danos à mucosa gástrica (TORRES *et al.*, 2000).

→ **Adesinas:** A adesão da *H. pylori* à membrana celular da mucosa é realizada pelas adesinas e este processo representa o passo final da associação do microorganismo com a mucosa gástrica. As adesinas estão intimamente implicadas na interação entre a bactéria e receptores celulares da mucosa. Entre as adesinas da *H. pylori*, destacam-se a hemaglutinina fibrilar e a fímbria. Muitos estudos têm indicado como receptores para estas adesinas, antígenos de grupos sanguíneos, destacando-se o antígeno H e Lewis b (RIEGG *et al.*, 1995).

→ **Mecanismos de escape:** O lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular bacteriana possui baixa imunogenicidade, importante no processo de escape da bactéria ao sistema imune do hospedeiro. Este mimetismo molecular é um dos mais importantes mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro. O LPS de muitas cepas de *H. pylori* expressa antígenos de grupos sanguíneos Lewis (Le^x, Le^y, Le^a, Le^b), os quais são similares com aqueles expressos pelas células epiteliais gástricas, o que pode resultar em tolerância imunológica contra antígenos do patógeno, e/ou em auto-imunidade. O mimetismo camufla o agente e os antígenos bacterianos, permitindo a bactéria sua sobrevivência e o escape aos mecanismos de reconhecimento do sistema imune, contribuindo para a cronicidade da infecção (APPELMELK *et al.*, 1997; DUNN *et al.*, 1997). O *H. pylori* não apenas expressaria antígenos Lewis, mas a relativa proporção desta expressão corresponderia ao fenótipo Le do hospedeiro, sugerindo uma adaptação do microorganismo ao hospedeiro (WIRTH *et al.*, 1997).

→ **Ilha de patogenicidade cag:** Cerca de 60% das linhagens de *H. pylori* possuem um locus com 31 genes, responsáveis pela codificação de potentes fatores de virulência, constituindo a ilha de patogenicidade cagA, cujo o principal marcador, da presença desta ilha, é o gene cagA que codifica uma citotoxina que atua como antígeno de superfície imunodominante da *Helicobacter pylori*. A função da citotoxina CagA ainda não está totalmente esclarecida, contudo, alguns trabalhos tem demonstrado que cepas CagA positivas quando inoculadas em culturas de células gástricas, tais como AGS (células de câncer gástrico), induzem modificações na morfologia destas, com acentuado alongamento e aumento celular, com rearranjo no citoesqueleto e aumento da motilidade, sendo essas alterações denominadas “fenótipo Beija-flor” (BLASER & ATHERTON, 2004; EVANS Jr & EVANS, 2001).

Indivíduos infectados por linhagens CagA desenvolvem anticorpos circundantes para a proteína CagA que podem ser utilizados como marcadores de diagnóstico (SHMUELY *et al.*, 2001). A presença desta citoxina associada ao gene A nas linhagens bacterianas possibilita a classificação das cepas como sendo do tipo I (cagA +) e tipo II (cagA -), as primeiras induzem forte processo inflamatório, com denso infiltrado de neutrófilos, que causam severos danos à mucosa gástrica (TELFORD *et al.*, 1994).

Estudos sorológicos têm demonstrado que pacientes com úlcera péptica e tumor gástrico são mais frequentemente infectados por cepas do tipo I (CENSINI *et al.*, 1996). Nos pacientes colonizados por *H. pylori*, portadores de gastrite crônica, úlcera péptica, cerca de 60% a 100% das linhagens eram cagA+, sugerindo que o gene *cagA* pode ser considerado um marcador genotípico e fenotípico para linhagens virulentas (COVACCI *et al.*, 1999).

→**Gene da Citotoxina Vacuolizante (*vacA*):** Embora este gene esteja presente em todas as linhagens de *Helicobacter pylori*, seu produto a citotoxina vacuolizante, será expressa em apenas 65% das cepas de *H. pylori*. O gene *vacA* apresenta dois tipos de seqüências sinalizadoras s1 e s2 (e seus subtipos s1a, s1b e s1c) e dois tipos de seqüências modeladoras m1 e m2. A combinação em mosaico das duas regiões do gene *vacA* é o que determina a produção da citotoxina e seu potencial patogênico. Todas as possíveis combinações são encontradas, embora a s2m1 seja rara. Linhagens com alelos *vac s1* são mais patogênicas e estão associados com doenças ulcerosas e adenocarcinoma gástrico, enquanto que o alelo s2 não exibe atividade vacuolizante e raramente são observados nas patologias anteriormente citadas. Também as cepas m1 são mais virulentas que a m2, sendo que linhagens s2m2 não produzem citotoxina,

s1m2 produzem quantidade moderada e s1m1 produzem grandes quantidades (TORRES *et al.*, 2000).

A citotoxina vacA é responsável pela erosão das células epiteliais gástricas, causando degeneração vacuolar nas células alvo, interferindo com a fusão intracelular da membrana. Recentemente foi demonstrado que esta toxina possui a capacidade de separar as junções celulares (COVACCI *et al.*, 1999). Estudos têm demonstrado associação entre a diversidade deste gene e a virulência da bactéria, com diferenças na intensidade da atividade citotóxica e da lesão epitelial, devido ao maior ou menor grau de infiltrado de neutrófilos na mucosa gástrica (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998).

2.2. Resposta imunológica a bactéria *H. pylori*

O epitélio gástrico representa a primeira linha ativa de defesa contra a bactéria. Além de atuar como uma barreira, as células epiteliais secretam mediadores inflamatórios que iniciam a resposta imune contra o patógeno. A resposta inicial do hospedeiro a infecção por *H. pylori* em adultos é caracterizada por intenso infiltrado de neutrófilos associado a períodos de acloridria (DUNN *et al.*, 1997).

A infecção crônica é caracterizada por um infiltrado de células inflamatórias na lamina própria da mucosa gástrica, como o *H. pylori* é pouco invasivo, este produz mediadores de resposta inflamatória, tais como fator ativador plaquetário e proteínas de superfície, que estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos e leucócitos mononucleares, como macrófagos e monócitos para o sítio de infecção, uma vez que essa fase apresenta redução na produção de ácido, se torna benéfico para bactéria facilitando o processo de colonização gástrica (DUNN *et al.*, 1997).

A ativação de células inflamatórias pode ser induzida tanto por fatores bacterianos, incluindo o CagA e mediadores pré inflamatórios, tal como a Urease e LPS que são capazes de induzir uma forte reação imune e inflamatória na mucosa gástrica, e fatores do hospedeiro como o interferon, interleucina 1, interleucina 6, interleucina 8, fator de necrose tumoral (TNF) e radicais superóxidos (TORRES *et al.*, 2000).

O *H. pylori* é capaz de estimular indiretamente a ativação de uma série de citocinas responsáveis pelo processo inflamatório, principalmente envolvidas na expressão de IL-8, uma quimiocina que parece estar intimamente associada à inflamação e lesão da mucosa gástrica (DUNN *et al.*, 1997), pois desempenha uma função fundamental na iniciação do processo inflamatório local, o que contribui com seqüelas mais severas associadas com infecção pela bactéria. Secretada por vários tipos celulares, esta quimiocina é um potente mediador inflamatório, que age recrutando e ativando neutrófilos que contribuem aumentando a lesão tecidual, pois além de atuarem na fagocitose e digestão das bactérias, liberam também seus grânulos e substâncias tóxicas, como potentes enzimas intracelulares, que agem com um mecanismo patogênico importante. A ação neutrofílica é persistente, porém ineficaz na eliminação do *H. pylori* devido à ação de enzimas bacterianas, como a catalase e superóxido dismutase, que protegem a bactéria (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998).

Além da IL-8, as linhagens CagA positivas induzem a secreção de outras quimiocinas produzidas por macrófagos, neutrófilos, células assassinas (*natural killer*) e células epiteliais em geral, como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e o Interferon γ (IFN γ) que afetam a fisiologia gástrica, a interleucina 1 β (IL β) e interleucina 6 (IL 6) que auxiliam na destruição da mucosa (TORRES *et al.*, 2000).

As células mononucleares e os neutrófilos em resposta a infecção pelo *H. pylori*, liberam radicais livres de oxigênio, que juntamente com a redução nos níveis de antioxidantes levam ao estresse oxidativo, causando lesão oxidativa, importante na modificação estrutural do DNA e desequilíbrio do sistema de transdução de sinais das células epiteliais gástricas, considerado carcinogênico (GOLLNER *et al.*, 1997).

Seguindo a fase de inflamação, a contínua exposição ao patógeno resulta na ativação da resposta imune específica (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998). Esta resposta é predominante celular, onde há o predomínio de linfócito T auxiliar (LTa), principalmente tipo LTa-1. Observou-se maior destaque de células LTa-1 devido ao aumento de INF- γ e FNT- α , secretados por estas células, em resposta à estimulação do antígeno, na tentativa de proteger contra a infecção e reduzir os danos teciduais. Entretanto, também foi observado que estas citocinas contribuem para aumentar a inflamação na mucosa gástrica, principalmente o INF- γ , que ativa e recruta mais polimorfonucleares para a lâmina própria da mucosa gástrica (Figura 7) (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998; TELFORD *et al.*, 1997).



Figura 04- Fotografia mostrando a presença de polimorfos nucleares em mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori*

P (polimorfos nucleares) e as Setas indicam presença da bactéria.

FONTE: www.helico.com

Com a persistência da infecção pelo *H. pylori*, observou-se que, a expressão de moléculas do tipo MHC-II está aumentada nas células epiteliais da mucosa gástrica, sugerindo que estas células podem estar envolvidas na apresentação de antígenos. Notou-se ainda que neste tipo de infecção, a ativação do complemento ocorre tanto pela via clássica como pela alternativa, portanto este evento sugere o envolvimento do complemento no processo de lesão da mucosa (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998).

A resposta celular predominante é do tipo Th1, uma vez que há predomínio de linfócito T auxiliar (LTa), principalmente tipo LTa-1, evidenciados devido ao aumento de INF- γ e FNT- α . A resposta gástrica Th1 é mais freqüente em pacientes com ulceração gástrica, alguns estudos demonstraram uma redução significativa na inflamação gástrica em camundongos, depois da neutralização do IFN- γ , com supressão da resposta Th1, ressaltando a contribuição da resposta Th1 no aumento da inflamação e aos danos ao tecido do hospedeiro (TORRES *et al.*, 2000).

Fox e colaboradores têm demonstrado que pacientes infectados por helmintos tendem a desenvolver resposta predominantemente do tipo Th2 e estes, quando infectados por *H. pylori*, raramente desenvolvem patologias gástricas graves (FOX *et al.*, 2000).

Embora a resposta celular seja predominante na infecção por *H. pylori* a resposta humoral também é observada, normalmente uma resposta humoral sistêmica e estável, predominantemente do tipo IgG, no entanto na inflamação crônica observa-se a presença de anticorpos específicos também do tipo IgA contra o patógeno, ambos têm sido usados para diagnosticar a infecção por *H. pylori* no soro e saliva dos pacientes. Sendo que estes anticorpos diminuem somente após a eliminação da infecção, um evento que raramente ocorre espontaneamente (SHIMOYAMA & CRABTREE, 1998).

Anticorpos específicos contra uma variedade de antígenos desta bactéria podem ser encontrados no sangue. Porém, estes não conferem proteção e nem evitam uma nova infecção do hospedeiro por essa bactéria (FRIEDMAN & PETERSON, 1998).

A presença de estruturas bacterianas capazes de mimetizar estruturas do hospedeiro conferindo proteção á ação da resposta imune é um ponto crucial nos mecanismos de escape bacterianos. A bactéria pode induzir a produção de anticorpos que reconhecem antígenos presentes na mucosa gástrica normal do próprio hospedeiro. Estudos demonstraram que o LPS da bactéria contém antígenos Le^x e Le^y de grupos sangüíneos. Estas evidências indicam uma provável correlação entre o reconhecimento destes antígenos pelo sistema imune do hospedeiro e a indução de gastrite pela bactéria. A figura 8 mostra um esquema da infecção e mecanismos de resposta imunológica contra *H. pylori* (TELFORD *et al.*, 1997).

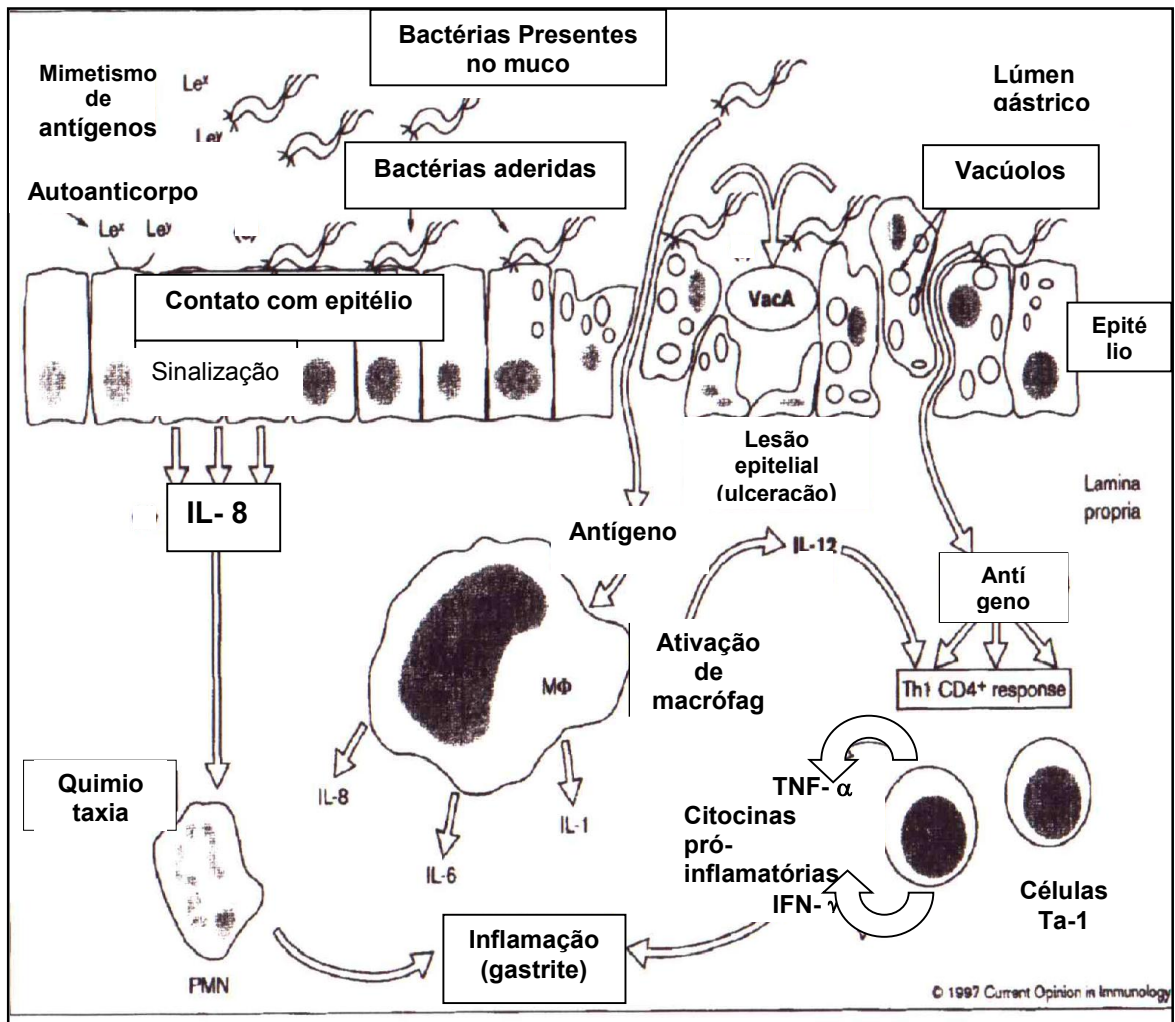


Figura 5- Indução de inflamação e lesão da mucosa gástrica pela *H.pylori*
 FONTE: Telford *et al.*, 1997.

2.3. Aspectos epidemiológicos da *Helicobacter pylori*

2.3.1. Transmissão

Embora mais da metade da população mundial estejam contaminados pelo *H. pylori*, os mecanismos de transmissão dessa bactéria não estão completamente definidos (COVACCI *et al.*, 1999; DUNN *et al.*, 1997).

A quantidade infectante para se adquirir naturalmente a infecção por *H. pylori* ainda é desconhecida. Marshall em 1985 na Austrália, descreveu a infecção após

a ingestão voluntária de cultura pura contendo dez organismos. Morris e Nicholson em 1987 empregaram dose de 3×10^5 deste microorganismo, durante ingestão voluntária, sendo hoje dita como dose mínima relacionada à infecção em adultos, no entanto observações feitas após procedimento endoscópico sugerem que a dose de microorganismos capaz de estabelecer a infecção é muito menor.

A respeito do reservatório ambiental da *H. pylori*, o homem é praticamente o único reservatório animal bem definido, entretanto relatos recentes defendem a possibilidade de que os gatos domésticos sejam hospedeiros naturais da bactéria (FOX *et al.*, 1995).

VAIRA *et al.*, em 1988, relataram que funcionários envolvidos no abate de porcos têm um número maior de anticorpos para o *H. pylori* do que os que trabalham em escritórios, e sugerem que os porcos poderiam ser fonte de infecção desta bactéria. Em contraste, GOODWIN *et al* (1988) acham que estes resultados podem ocorrer devido à reação cruzada entre *H.pylori* e *Campylobacter jejuni*, tais dados foram confirmados pelo estudo de ROCHA *et al.*, em 1992 cujos resultados não evidenciaram diferença significativa na prevalência de *H. pylori* entre os abatedores (65,6%) e os doadores de sangue (61,8%), como também entre os abatedores e as pessoas que não tinham contato direto com os animais (65%). Além do mais, o *H. pylori* não foi isolado da mucosa gástrica dos 200 porcos estudados, nem foram detectados anticorpos anti-*H. pylori*. Com estes dados, conclui-se que os porcos não são fonte de infecção deste microorganismo.

O mecanismo exato da transmissão do *H. pylori* é desconhecido, o único fato universalmente aceito é de que a bactéria só consegue alcançar a mucosa gástrica pela boca, pois se trata de um microorganismo não invasivo sendo que o local de

colonização e estabelecimento bacteriano é o estômago (DUNN *et al.*, 1997), com base neste fato, uma das maiores questões a se esclarecer é como a bactéria *H. pylori* passa do estômago de uma pessoa para o de outra, as altas taxas de prevalência em indivíduos que vivem em condições de aglomeração humana sugerem que a transmissão pessoa-pessoa seja uma importante via na transmissão do agente (KODAIRA *et al.*, 2002), resultando em duas rotas básicas possíveis e aceitas nos meios de transmissão, de que a bactéria passaria do estômago para a boca transitoriamente ou permanentemente, sugerindo uma transmissão oral-oral, e/ou é excretada nas fezes.

→**Transmissão por via oral-oral:** A cavidade bucal tem sido proposta como reservatório da infecção e reinfecção pela *H. pylori*, pois a regurgitação do suco gástrico pode contaminar a boca, predispondo a colonização por essa bactéria por tempo não determinado. Na literatura vários estudos sugerem importante participação da via oral-oral na transmissão.

Estudos realizados na Colômbia, China e Gâmbia detectaram maior frequência da infecção entre indivíduos que se alimentam no mesmo recipiente e que utilizam as mãos na alimentação, favorecendo a transmissão. Na África o ato da pré-mastigação e de soprar os alimentos, realizado pelas mães, representa um significativo papel na transmissão (KODAIRA *et al.*, 2002).

Recentes relatos de isolamento da *H. pylori* em biofilme dental e saliva proporcionam apoio indireto para transmissão oral-oral. O microorganismo no biofilme dental é muito freqüente em crianças e em adultos saudáveis indianos (MOURA *et al.*, 2004) e não é raro em pacientes com dispepsia nos países desenvolvidos. Nguyen *et al* e Mapstone *et al* (1993) na Índia, mostraram a presença da *H. pylori* na placa dentária em

100% (40/40) dos voluntários saudáveis através do CLO teste, esfregaço e cultura. Desai *et al.*, (1991), em Bombay, detectaram a bactéria, através do CLO teste no biofilme dental, corpo gástrico e mucosa antral em 98%, 70 % e 67% respectivamente dos 43 pacientes com dispepsia, 20% dos indivíduos possuíam *H. pylori* no biofilme dental e na mucosa gástrica, estes foram tratados com Terapia tríplice (Bismuto, Tinidazol e Amoxicilina ou Doxiciclina) administrada por 15 dias a 24 pacientes, o que eliminou o microorganismo da mucosa gástrica de todos eles e em nenhum caso da placa dentária. Com estes dados, concluíram que o biofilme dental é um reservatório importante e permanente da bactéria, já que o mesmo não responde à terapia sistêmica (PYTKO-POLONCZYK *et al.*, 1996).

→ **Transmissão por via fecal-oral:** O conceito de que a *H. pylori* é transmitido por via fecal-oral é aceito por muitos pesquisadores. Este tipo de transmissão é defendido pelos relatos de Thomas *et al.*, (1992) que isolaram o microorganismo em fezes diarréicas de 9 das 23 crianças gambianas infectadas, com idade média de 13,8 meses e por Kelly *et al* (1994) que descreveram na Inglaterra o isolamento da bactéria nas fezes de 25 pacientes adultos dispépticos infectados. Apesar da constatação de que a *H. pylori* pode ser eliminada nas fezes, não se conhece o mecanismo exato de transmissão do agente por essa via, embora se saiba que a nível populacional, a disseminação de doenças infecciosas pela água baseia-se em sua contaminação por fezes.

Klein *et al.*, (1991) relataram que a prevalência da infecção pela *H. pylori* em 407 crianças peruanas saudáveis teve uma associação direta com a fonte de suprimento de água, independentemente da classe social. Isto indica que o suprimento de água pode ser a fonte de infecção da *Helicobacter pylori*, principalmente nos países

em desenvolvimento.

→ **Transmissão iatrogênica:** Este tipo de infecção pelo *H. pylori* tem sido documentada, a alta prevalência da infecção entre os endoscopistas, particularmente àqueles sem o hábito de usar luvas, sugere que a infecção pela bactéria pode ser transmitida por instrumentos contaminados com secreções gástricas, sobretudo quando a lavagem do equipamento é manual (em torno de 1 a 3% dos casos) (GRAHAM *et al.*, 1988a; LANGENBERG *et al.*, 1990).

Este possível meio de transmissão pode ser responsável pela reinfecção por ocasião de um novo exame, Coelho *et al* (1995) estudaram 228 pacientes em que a bactéria foi erradicada, num período de 8 a 48 meses e observaram um índice de reinfecção de 42,6% quando o método usado para o diagnóstico baseou-se em endoscopia e teste respiratório, em contraste com 27,1% quando o teste respiratório foi usado isoladamente, reforçando a hipótese de que o endoscópio e as pinças podem ser fonte de infecção.

Os primeiros estudos epidemiológicos a respeito da infecção por esta bactéria começaram a surgir na literatura em 1986, os estudos iniciais foram realizados em adultos, mas evidências sugerem que essa infecção é adquirida na infância.

Admitindo-se que a infância é a fase em que se contrai a infecção e, a menos que tratada pode permanecer por décadas e por toda a vida do indivíduo. Esses dados são de grande relevância, já que evidências sugerem que o tempo de duração da infecção esta diretamente relacionado ao desenvolvimento de patologias gastrointerstiniais (AL-MOAGEL *et al.*, 1990).

A infecção por este microorganismo é considerada como a segunda

infecção bacteriana mais comum do mundo, perdendo somente para a infecção de cárie dentária por *Streptococcus mutans*, provocando grande desconforto em milhares de pessoas e leva a morte pelo menos 1 milhão de indivíduos anualmente, dada a sua abrangência, fatos que tem sido subestimados pelas autoridades de saúde pública e por especialistas em doenças infecciosas (TELFORD *et al.*, 1997).

2.3.2. Prevalência

A infecção é considerada mundial e a prevalência da bactéria varia de acordo com a área geográfica, sendo significativamente maior em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos, ocorrendo em cerca de 40% da população nos países desenvolvidos e em 70% nos países em desenvolvimento (CAVE & HOFFMAN, 1996) (Figura 6).

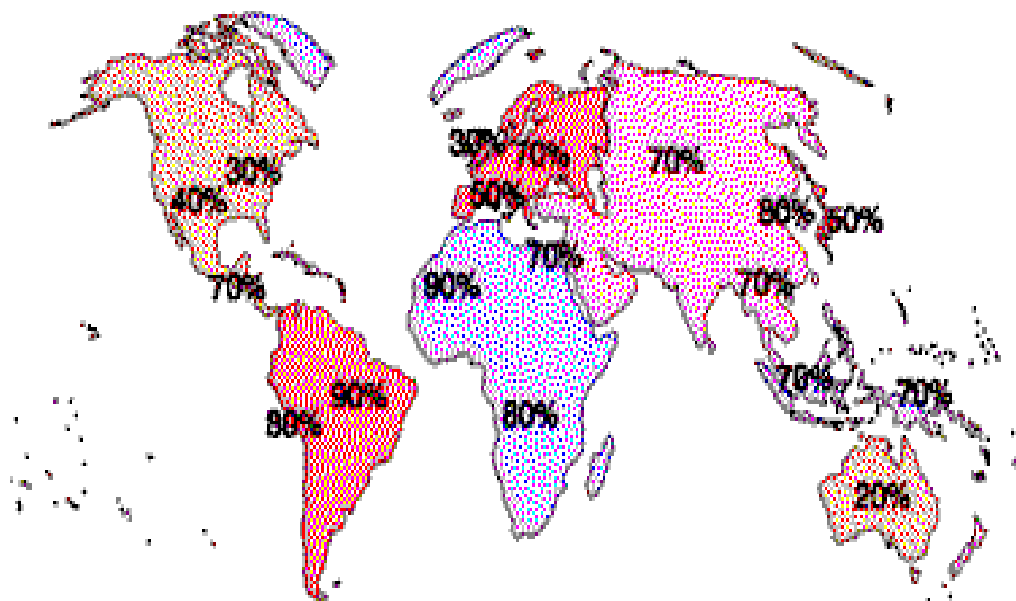


Figura 6- Prevalência mundial da infecção por *H. pylori*
FONTE: [http:// www.helico.com.br](http://www.helico.com.br)

Quanto à distribuição geográfica, observa-se que a infecção por *H. pylori* é menos prevalente em países desenvolvidos do que em desenvolvimento, provavelmente devido ao baixo nível socioeconômico, onde a transmissão do microorganismo pode ser facilitada pelas precárias condições de higiene, aglomerados urbanos e por contato mais íntimo entre as crianças e os adultos, aumentando o risco da contaminação infantil (COVACCi *et al.*, 1999) (DUNN *et al.*, 1997) (KODAIRA *et al.*, 2002) (Tabelas 3 e 4).

Estudos realizados no Brasil demonstram que a prevalência varia dependendo da região, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, observou-se que a infecção ocorre precocemente com uma taxa de prevalência de 34,1%. Nos indivíduos adultos, a prevalência observada foi entre 65 e 85% (OLIVEIRA *et al.*, 1994). Na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, foi encontrada uma prevalência de 24,86% em pacientes pediátricos do Hospital de Clínicas da cidade (SOUSA *et al.*, 2001). Estas prevalências, entretanto, são baixas quando comparadas a dados de outras cidades, como a prevalência encontrada em crianças em Belém do Pará, em torno de 80% (GUIMARÃES, 1999, 2003) já em adultos, no mesmo estado, verificou-se que pacientes que apresentavam distúrbios gástricos demonstraram uma prevalência entre 64% a 74% (SAGICA, 2000; AGUIAR, 2001) e de 82% em indivíduos com diagnóstico de úlcera gástrica (MARTINS, 2001).

A respeito do perfil da infecção, nos países em desenvolvimento a prevalência da infecção é mais alta em todas as faixas etárias quando compara com os países desenvolvidos (KODAIRA *et al.*, 2002).

A recorrência da *H. pylori* também é mais freqüente em populações de baixo nível sócio-econômico e precárias condições de higiene e de habitação. Vários relatos apresentam amplas variações nas taxas de reinfecção, mesmo após erradicação

bem sucedida pois embora intensa a resposta imunológica gerada durante a infecção por *Helicobacter pylori* não confere proteção a infecções subseqüentes. A recorrência do *H. pylori* é motivo de debate. Não está claro se a re-colonização do organismo reflete o reaparecimento da infecção original não totalmente eliminada (recrudescência) ou se indica uma verdadeira reinfecção com a mesma cepa ou com outra diferente (BELL *et al.*, 1993).

Muitos estudos têm relatado taxas de recorrência do *H. pylori* nos primeiros 12 meses, principalmente aqueles em que os períodos de seguimento são relativamente curtos e representam provavelmente uma pseudo-erradicação com recrudescência da infecção original, que é indetectável em 4 semanas do término do tratamento (BELL *et al.*, 1993, PATCHETT *et al.*, 1992; MARSHALL *et al.*, 1988).

Em países em desenvolvimento as taxas de re-infecção pós erradicação são freqüentes (em aproximadamente 50% dos casos), atingindo 100% dos casos ao ano, entretanto nos países desenvolvidos esta taxa varia entre 0,6% a 4,7% ao ano (KODAIRA *et al.*, 2002).

2.3.3. Fatores de risco

Quanto aos fatores de risco que influenciam a prevalência e a transmissão de *Helicobacter pylori*, SIQUEIRA (2007), relatam que a presença desta bactéria está associada à baixa condição econômica, maior densidade de moradia, baixo nível educacional, baixas condições de saneamento básico e fatores dietéticos.

Fatores intrínsecos, como idade, sexo e etnia, fatores ambientais e contextuais ligados ao nível socioeconômico, são tidos como sendo de risco para a aquisição da infecção pelo *H. pylori*. (TORRES *et al.*, 2000; KODAIRA *et al.*, 2002).

A infecção bacteriana pode ser adquirida em qualquer faixa etária, porém estudos epidemiológicos indicam que a infância, particularmente nos cinco primeiros anos, constitui o período de idade de maior aquisição da bactéria *H. pylori*, e que a taxa de prevalência aumenta progressivamente com a idade. Quanto ao sexo, ambos são infectados igualmente (TORRES *et al.*, 2000).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a prevalência da infecção difere significativamente entre os subgrupos populacionais que habitam uma mesma área. Graham & Malaty (1991), realizaram estudos na área metropolitana dos EUA, envolvendo indivíduos assintomáticos de etnias negra, branca e hispânica, encontrando menor prevalência do microorganismo em indivíduos de etnia branca e expressiva relação inversa entre o baixo nível socioeconômico na infância e a presença de infecção.

Em populações pediátricas, vários estudos relatam menor prevalência da infecção por *H. pylori* em caucasianos. Embora dados na literatura cite diferenças estatisticamente significativas relacionadas à prevalência da infecção e etnias, mesmo após ajuste das variáveis com sexo, idade e condições socioeconômicas, não se conhece a razão exata deste fenômeno, podendo estar associado a fatores socioeconômicos, ambientais e/ou predisposição genética (KODAIRA *et al.*, 2002).

Dentre os fatores ambientais relacionados aos adultos, que podem influenciar e que estariam ligados a uma maior prevalência da infecção pelo *H. pylori*, destaca-se o fumo, o consumo de álcool, a dieta e a exposição ocupacional que influenciariam na aquisição da infecção (BROWN, 2000).

Os estudos evidenciam que más condições sanitárias, ausência de suprimento de água e baixo nível educacional do chefe de família são outros fatores de risco para a infecção. Através da água contaminada, pessoas podem infectar-se, como

foi demonstrado em um trabalho no Peru, no qual as crianças, cuja fonte de água era municipal, apresentaram uma prevalência de infecção em torno de 37% (KLEIN *et al.*, 1991).

Com base nos fatores contextuais, os estudos consideram, por unanimidade, que o maior fator preditivo para infecção por *H. pylori* é a condição socioeconômica durante a infância. A renda familiar, por razões óbvias, é um excelente indicador desta condição, estudos realizados nos EUA demonstraram que a infecção apresenta relação inversa a renda familiar (FIEDOREK *et al.*, 1991), precárias condições de saneamento também estão associadas a maior taxa de aquisição da infecção (OLMOS *et al.*, 2000).

Em relação à coabitação, fatores como o número de habitantes por cômodo da casa e o tipo de unidade familiar, são ressaltados como variáveis associadas à prevalência da infecção. Alguns estudos demonstraram concordância de tipos moleculares de cepas da bactéria entre os indivíduos da mesma família indicando que a transmissão pode ocorrer entre estes membros. A presença de infecção nos pais, especialmente nas mães, é um importante fator na prevalência da *H. pylori* em seus filhos (DRUMM *et al.*, 1990). Confirmando assim, o alto risco de infecção em pessoas que vivem agrupadas em conglomerados humanos, familiares ou institucionais, tais como asilos, creches, escolas e populações de militares em combate (BROWN, 2000, COVACCI *et al.*, 1999; DUNN, *et al.*, 1997; KODAIRA *et al.*, 2002, MEGRAUD, 1995; WISLA-DERAMBURE *et al.*, 2000).

O número de habitantes por moradia/cômodo, sobretudo na infância, é considerado importante fator para a aquisição da doença. É possível que as crianças, além de serem mais predispostas a adquirir a infecção por meio de seus hábitos, tenham

também a facilidade de transmiti-la, tanto para adultos como para outras crianças. (OLIVEIRA *et al.*, 1994 OLMOS *et al.*, 2000).

2.4. Manifestações clínicas na infecção por *H. pylori*

2.4.1. Sintomatologia observadas na infecção por *H. pylori*

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma infecção crônica, de longo período assintomático e potencialmente grave. Mais de 70% das pessoas infectadas têm sintomas muito leves, mesmo na ausência de tratamento. Embora existam controvérsias entre alguns pesquisadores, em relação à sintomatologia observada, em alguns estudos os sintomas relatados são: desconforto, dor epigástrica, plenitude gástrica, náuseas ou vômitos. Nos quadros ulcerosos associados à bactéria alguns pacientes apresentam azia, dor na parte superior do abdômen, usualmente em jejum ou na alta madrugada, dispepsia e sangramentos.

Embora esta relação sintomática á infecção por *H. pylori* não esteja clara, pois em indivíduos assintomáticos, mesmo sendo detectada a presença do microorganismo na mucosa gástrica esse quadro sintomático não é observado, alguns testes foram validados para populações com sintomas específicos e seu desempenho sob diferentes circunstâncias é imprevisível; assim o clínico deve ser cauteloso ao atribuir os sintomas do paciente a uma concomitância com *H. pylori* (BOURKE *et al.*, 1996).

2.4.2. Patologias associadas à infecção por *H. pylori*

A infecção por *H. pylori* é considerada um dos maiores fatores na patogênese de várias doenças gastrointestinais, tais como: gastrite crônica, gastrite atrófica, úlceras pépticas, carcinoma e linfoma gástrico (COVACCI *et al.*, 1999;

SUERBAUN & MICHETTI, 2002). Contudo, a maioria dos pacientes infectados permanecem portadores assintomáticos por toda vida e somente 20% podem evoluir para uma patologia gastroduodenal mais grave no decorrer da vida (AXON, 1997).

O estômago é um órgão exócrino e endócrino que digere os alimentos e secreta hormônios. É uma dilatação do tubo digestivo e tem como funções principais continuar a digestão dos carboidratos iniciados na boca, acrescentar um fluido ácido aos alimentos ingeridos e transformá-los, pela ação enzimática e pela contração muscular, numa massa viscosa, o quimo. O estômago armazena grandes quantidades de alimento, até que possam ser acomodadas no duodeno; seu esvaziamento para o intestino delgado é controlado para que o intestino delgado possa trabalhar numa velocidade adequada para a digestão e absorção eficientes.

A superfície interna da mucosa gástrica encontra-se coberta por células epiteliais colunares, secretoras de muco e fluidos alcalinos, que protegem o epitélio de danos mecânicos e do HCl. Também se observa a presença de invaginações do epitélio de revestimento para dentro da lamina própria, formando depressões microscópicas chamadas de fossetas gástricas. A mucosa do estômago é constituída essencialmente por um grande número de pequenas glândulas, que se abrem no fundo dessas fossetas. As glândulas do estômago localizam-se sempre na lamina própria, nunca passando da muscular da mucosa para ocupar a submucosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

As fossetas têm sempre a mesma estrutura em todas as partes do estômago, mas as glândulas gástricas possuem diferenças histológicas entre elas e baseado nessa diferença o estômago é dividido em três regiões: A região cárdia, as regiões corpo-fundo e a região pilórica ou antral (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Os conhecimentos sobre os mecanismos patogênicos envolvidos na associação entre o *H. pylori* e a inflamação gástrica ainda são incompletos. Sabe-se que todos os indivíduos infectados pelo microorganismo desenvolveram gastrite aguda, embora tanto adultos quanto crianças sejam inicialmente assintomáticos a infecção, podendo permanecer somente como portadores assintomáticos durante toda a vida. Este fato está relacionado, principalmente, à infecção por cepas não virulentas, ou Tipo II (RAVEL, 1997).

A fase inicial da infecção pelo *H. pylori* é caracterizada pelo desenvolvimento de uma gastrite aguda, com aumento transitório da secreção ácida e da resposta inflamatória, sendo precursora para o desenvolvimento de gastrite crônica (figura 7) ativa com denso infiltrado celular na mucosa, que com o passar dos anos tende a decrescer (GISBERT *et al*, 2000). Contudo, o quadro inflamatório persiste por vários anos e causam sérios danos à mucosa gástrica, podendo evoluir para patologias mais graves (BLASSER, 1990; SUERBAUN & MICHETTI, 2002).

A distribuição do quadro inflamatório no estômago está diretamente associada ao desenvolvimento das diferentes patologias gástricas, devido a inflamação alterar a função de diversas células gástricas, principalmente das glândulas, tal como células D, células G e parietais, alterando assim a homeostase do ácido gástrico (SUERBAUN & MICHETTI, 2002).

Contudo, quando a gastrite ocorre na região do corpo gástrico, observa-se uma diminuição na produção do ácido clorídrico, devido à inibição das células enterocromatófílicas, produtoras de histamina e das células parietais. Nestes casos é comum a observação de destruição das glândulas gástricas (gastrite atrófica) e da

diminuição da camada do muco, sendo este ambiente então favorável ao desenvolvimento de úlcera gástrica ou câncer gástrico.

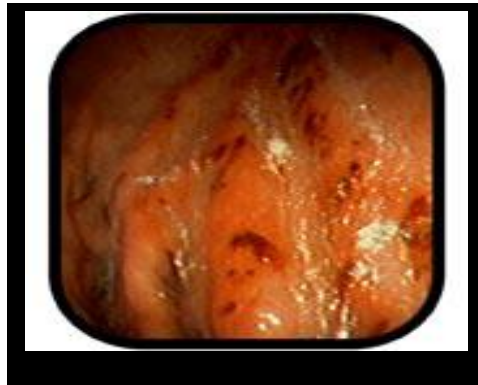


Figura 7- Fotografia do processo de gastrite crônica na mucosa gástrica
FONTE: www.hospvit.or.br

A associação entre a infecção por *H. pylori* com o desenvolvimento da úlcera péptica já esta bem esclarecida. A bactéria está presente em 90% a 100% dos pacientes com úlcera duodenal e em 70% a 90% nos com úlcera gástrica (GISBERT *et al.*, 2000; MARSHALL *et al.*, 1994, MARTINS *et al.*, 2002). A Úlcera péptica gastroduodenal (Figura 8) é a perda circunscrita de tecido que ocorre nas porções do trato digestivo expostas á secreção cloridropéptica, é uma doença heterogênica, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese e uma das doenças crônicas mais comuns em adultos. Em pediatria, tem-se observado um aumento do número de casos diagnosticados em decorrência da disponibilidade de técnicas endoscópicas seguras para essa faixa etária (CARVALHO 2000).

Embora associação entre úlcera péptica e *H. pylori* seja bem estabelecida, acredita-se que a bactéria seja responsável por diminuir as defesas da mucosa gástrica, facilitando o processo ulcerativo (MARTINS *et al.*, 2002), crianças

com ulceração e colonizadas pelo *H. pylori* apresentam maiores níveis séricos de gastrina e de pepsinogênio I, assim como maiores níveis do conteúdo da gastrina na mucosa antral do que as não infectadas, estes níveis diminuem após a erradicação do patógeno (ODERDA *et al.*, 1992). A infecção pela bactéria também apresenta níveis elevados de acidez duodenal, predispondo á metaplasia gástrica no duodeno. A hipótese é de que o *H. pylori*, antes restrito ao estômago, coloniza as áreas de metaplasia gástrica no duodeno, e, como resultado, ocorrerá à duodenite crônica que facilita a retrodifusão de íons hidrogênio e subsequentemente a formação de ulceração (CARVALHO, 2000).

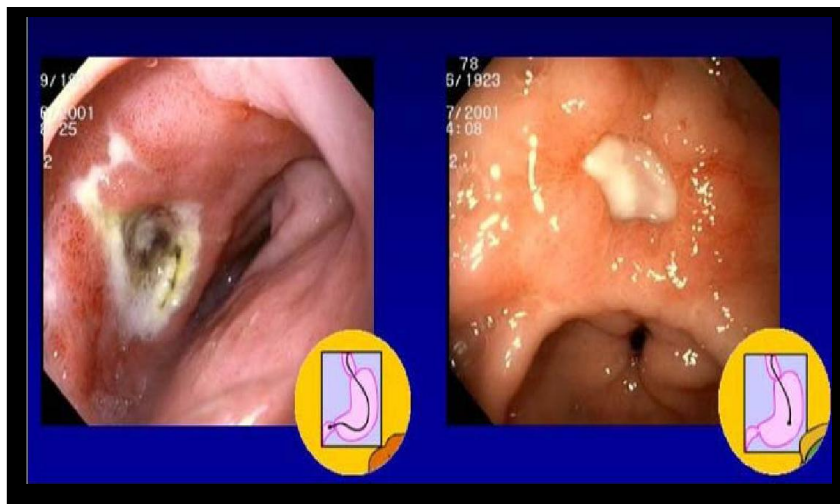


Figura 8- O processo ulcerativo na mucosa duodenal e na mucosa gástrica associado à bactéria *H. pylori*

FONTE: www.hospvit.or.br

O desenvolvimento de câncer gástrico raramente ocorre abaixo dos 40 anos, crianças não desenvolvem câncer gástrico, mas a aquisição da *H. pylori* na infância pode levar a um aumento da prevalência da atrofia gástrica, que aumentaria o risco de desenvolver posteriormente adenocarcinoma gástrico (TORRES *et al.*, 2000).

Em 1994, a Agência Internacional de Estudos de Câncer, ligada a Organização Mundial de Saúde, designou a bactéria *H. pylori* como carcinógeno de

classe I. Essa decisão foi baseada em estudos epidemiológicos que demonstraram uma prevalência mais alta da infecção pelo *H. pylori* entre pacientes com câncer gástrico do que nos controles (WILLINS *et al*, 1999). Mas assim como na úlcera péptica, nem todos os indivíduos com câncer gástrico estão infectados pelo *H. pylori* e nem todos os indivíduos infectados desenvolvem câncer gástrico. Portanto, a etiologia do carcinoma gástrico certamente é multifatorial e a infecção pelo *H. pylori* é apenas um dos vários fatores que contribuem para o desenvolvimento (WILLINS *et al*, 1999).

O mecanismo exato pelo qual a infecção bacteriana pode estimular a carcinogênese gástrica não é conhecido. O fato é que a bactéria altera as condições físicas e químicas do muco gástrico, o que pode tornar a mucosa do estômago menos resistente aos carcinógenos ambientais e dietéticos. A infecção por *H. pylori* também diminui a secreção gástrica de ácido ascórbico, cujos níveis reduzidos favorecem a formação de N-nitroso carcinogênico.

A bactéria *H. pylori* também tem sido associada ao linfoma gástrico. Embora o estômago normal não tenha folículos linfóides, esses elementos se desenvolvem em resposta às infecções locais pelo *H. pylori*. Na realidade a maioria dos linfomas gástricos primários tem origem no tecido linfóide associado às mucosas (TLAM). Em pacientes com gastrite crônica ativa associada com *H. pylori*, foi observada uma grande variedade de folículos linfóides na mucosa gástrica, levando a hipótese de que a indução da gastrite por *H. pylori* poderia ser o precursor do linfoma ao longo do tempo de infecção (WOTHERSPOON, 1993).

Em crianças, os linfomas (Figura 8) representam apenas 10% de todas as malignidades, e apenas 13% destes tumores não são originados no abdômen. Alguns

estudos relatam que em crianças portadoras de linfoma, após a erradicação da bactéria o mesmo regrediu (TORRES *et al.*, 2000).

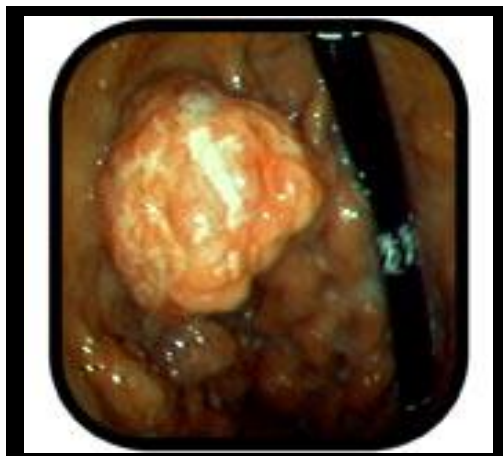


Figura 8- Fotografia de Linfoma gástrico na mucosa gástrica infantil
FONTE: www.hospvit.org.br

2.5. Métodos de Diagnóstico para *Helicobacter pylori*

Diversos métodos têm sido utilizados para diagnosticar a presença de *H. pylori* na mucosa gástrica. Estes atualmente são divididos em endoscópicos e não endoscópicos, ou ainda invasivos e não invasivos, embora nenhum deles seja eficaz o suficiente a ponto de ser aceito como o padrão ouro (Tabela 3).

Tabela 3- Testes de diagnóstico utilizados para a detecção da infecção por *H. pylori*

Testes Não Invasivos	Testes Invasivos	
	Biopsia	Escovado gástrico
Teste Respiratório	Teste da Urease	Citologia
Teste Sorológico	Histologia	Cultura
PCR em Antígeno Fecal	Imunohistoquímica	
	PCR	
	Cultura	

FONTE: Suerbaun & Michetti,2002.

Os diagnósticos através de testes invasivos incluem cultura, histologia teste rápido da urease e reação em cadeia da polimerase (PCR), todos necessitam da coleta de biópsia gástrica, obtida por endoscopia digestiva, um método invasivo, que apresenta restrições em populações pediátricas. No entanto como crianças colonizadas por *H. pylori* são assintomáticas, estes testes que empregam endoscopias não são indicados.

O uso de métodos não endoscópicos permitem a pesquisa da infecção por *H. pylori*, destacando-se entre os testes não invasivos existentes, o teste de respiração de uréia e o teste de pesquisa de antígenos bacterianos nas fezes e como invasivos os de determinação sorológica de anticorpos específicos para *H. pylori*, sendo estes os mais empregados no diagnóstico infantil desta infecção.

→ **Teste Rápido da Uréase:** Este teste baseia-se na forte actividade ureásica, principal característica bioquímica da bactéria. Ao colocar uma ou varias biopsias em contato

com o meio contendo uréia e um indicador de pH, se a bactéria se encontrar presente na biopsia, a uréase produzida vai hidrolizar a uréia do meio com formação de gás carbônico e amônia, alterando o pH do meio. Esta amônia ao alcalinizar o meio conduz a mudança de cor, que indica a presença da bactéria (TORRES *et al.*, 2000). Para diagnóstico do *H. pylori* na prática clínica, o teste da uréase é barato, rápido e fácil de realizar, entretanto não fornece informações sobre a intensidade da inflamação.

A sensibilidade varia de 89% a 98%, na maioria dos estudos com adultos, em crianças de 44% a 96,6% e a especificidade oscilou entre 96,8% e 100%. Falso-positivos podem ocorrer devido à presença de outros organismos produtores de uréase, do mesmo modo falso-negativos podem ocorrer quando o paciente está sendo tratado com inibidores de bomba de prótons como omeprazol, lansoprazol ou pantoprazol (LIM *et al.*, 2004).

→**Histologia:** Os exames histológicos são realizados após a endoscopia, a partir de biópsias gástricas de dois ou mais fragmentos da região do corpo e antro gástrico, que são corados por Giemsa.

Embora esse tipo de teste seja importante não apenas no diagnóstico do patógeno como na avaliação das mudanças histopatológicas, alguns autores justificam a menor frequência de sua utilização em relação a outros, pelo fato de *H. pylori* não se distribuir uniformemente na mucosa, existindo regiões infectadas ao lado de regiões sem a presença do microorganismo, outro fator relevante e que em populações pediátricas as mudanças ocasionadas pela infecção não são muito dramáticas e a endoscopia não é indicada nesta população (MÉGRAUD, 1996). A sensibilidade do método histológico varia de 86,4 a 95% e a especificidade de 96,4 a 99%.

→**Imunohistoquímica:** Ao lado dos testes histológicos regulares, este método associa-se a imunoquímicos e imunoflorescentes. Sendo baseado na detecção de antígeno por um anticorpo (monoclonal ou policlonal) em conjunto com outros processos de visualização, com métodos de coloração. Por exigir o uso de microscópicos fluorescentes, assim como anticorpos, o sistema se torna caro, sem contribuir para maiores informações aos achados dos métodos comuns de histologia. Portanto não são rotineiramente utilizados. Sendo aplicado principalmente em estudos de doenças neoplásicas infecciosas (THOME *et al.*, 2005).

Uma das vantagens, é que a técnica pode ser particularmente útil na detecção das formas cocóides de *H. pylori*. Porém, até o momento, não há evidências que a detecção destas formas tenha algum significado clínico.

→**Teste com Escovado Gástrico:** Caracteriza-se pelo modo como é coletado o material a partir de um escovado da mucosa gástrica para realizar o preparo de um esfregaço em lâmina. Estudos sugerem que a citologia do esfregaço gástrico é uma técnica pouco divulgada, com maior sensibilidade quando comparado aos métodos que fazem uso de biópsia para identificar o *H. pylori*, pois envolve uma maior superfície gástrica, sendo de fácil execução e com resultados em um menor tempo em comparação às técnicas histológicas (OGATA *et al.*, 2001).

→**Cultura:** é teoricamente o método de referência para a detecção de *H. pylori* é o único que permite o estudo da susceptibilidade aos antibióticos, além de combinar características bioquímicas e morfológicas na identificação bacteriana (RICCI *et al.*,

2007). Tecidos obtidos por biópsia gástrica são homogeneizados, as amostras são semeadas em pelo menos um meio de cultura seletivo adequado e em seguida incubadas a 37°C, numa atmosfera de microaerofilia, durante um período que pode ir até aos 14 dias, em função da viabilidade da bactéria. Quando a cultura é positiva, a identificação é feita de acordo com o aspecto morfológico das colônias e com base em características bioquímicas e citomorfológicas por coloração Gram. Contudo a cultura é um método muito difícil de ser realizado e têm várias limitações.

Existem vários meios de cultura para *H. pylori*. Os mais conhecidos são o agar sangue e agar chocolate. A cultura apresenta uma especificidade de 100% e sensibilidade de 77-92%, e em geral, tem sido utilizado em associação com outro método de diagnóstico (BROWN & PEURA, 1993). A cultura bacteriana é dificultada devido ao *H. pylori* ser uma bactéria muito adaptada ao seu habitat e de crescimento lento, sendo assim muito difícil cultivá-la *in vitro*. O crescimento pode ser afetado por vários fatores como o número de biópsias, o meio, a duração e a temperatura do transporte e o próprio método de cultivo. Sua detecção pode ser influenciada também pelo uso prévio de alguns medicamentos, usados por pacientes em tratamentos de dispepsia, como o omeprazol, bismuto ou benzocáínas (DUNN *et al.*, 1997).

→ **Teste Respiratório com uréia marcada:** O teste respiratório ¹³C-uréia, consiste na coleta de amostras respiratórias pós-ingestão da solução de carbono-13-uréia, quando o *H. pylori* estiver presente, haverá quebra da uréia sendo identificado no teste apenas o Carbono 13.

Atualmente os métodos respiratórios são considerados os de escolha, após o tratamento da infecção pela *H. pylori*, para verificar a erradicação da bactéria,

pois detectam a atividade da urease de todo o estômago e não requerem endoscopia. Resultados falsos-negativos podem ocorrer em pacientes que sofreram cirurgia gástrica e também devido ao rápido esvaziamento gástrico da uréia ingerida, ou ainda, logo após o paciente ter recebido antibióticos, sais de bismuto ou bloqueadores da bomba de prótons. Falso-positivos também são possíveis, quando existirem outras bactérias produtoras de urease no estômago ou por atividade de urease de bactérias bucais.

A sensibilidade e especificidade dos testes respiratórios para detectar a bactéria são maiores do que 95% em adultos. O teste respiratório com C-13 em crianças pode ser utilizado devendo-se calcular a dose da uréia com C-13 marcado a ser administrada e lembrar que o valor *cutoff* é menor do que o dos adultos (cerca de 3,5% no lugar dos 5% dos adultos), este teste com crianças foi validado em alguns estudos (CADRANEL *et al.*, 1998), e foi proposto que a acurácia em crianças está correlacionada a densidade bacteriana gástrica. Devido a esses fatores o teste não está bem padronizado para o uso nestes pacientes, tendo seu uso limitado em crianças.

→ **Testes sorológicos:** Os testes sorológicos juntamente com o teste respiratório, são os métodos não-invasivos mais utilizados no diagnóstico da infecção pela *H. pylori*. Os testes sorológicos são importantes e muito utilizados em estudos epidemiológicos adultos e pediátricos na avaliação da taxa de prevalência da infecção pela bactéria (ROCHA *et al.*, 2001), principalmente no caso de indivíduos assintomáticos identificando anticorpos específicos à infecção por esta bactéria no soro, na secreção gástrica, urina, saliva e fezes (WILCOX *et al.*, 1996).

Os testes sorológicos têm como princípio identificar anticorpos específicos, com diferentes metodologias empregadas entre elas a imunofluorescência

indireta, hemaglutinação, fixação do complemento, *Imunoblot* e ELISA, sendo este último o mais utilizado por apresentar resultados satisfatórios quanto à sensibilidade e especificidade da técnica.

Embora o *H. pylori* não seja uma bactéria invasiva, estimula ativamente o sistema imunitário do hospedeiro pela liberação de lipopolissacarídeos e de proteínas imunogênicas. A colonização da mucosa gástrica por *H. pylori* leva a uma resposta imune, e ao desenvolvimento de anticorpos da classe IgA, IgM e IgG. A determinação das alterações séricas destes anticorpos constitui o método sorológico (BROEN & PEURA, 1993).

O teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-linked immunosorbed assay*) é o método mais comumente utilizado para a determinação de anticorpos anti *H. pylori* no soro. Com este teste é possível detectar os anticorpos tipo IgG e IgA assim como obter resultados quantitativos. Atualmente os melhores testes disponíveis no mercado para a detecção dos anticorpos do tipo IgG apresentam uma sensibilidade e uma especificidade de 90% e 95% respectivamente, sendo considerado um procedimento ideal para o diagnóstico em crianças e adolescentes, pois não se faz necessário submeter os pacientes à endoscopia para que seja detectada a infecção (OLIVEIRA *et al.*, 1994).

Entretanto, os métodos sorológicos não devem ser utilizados para monitorar a erradicação bacteriana, visto que a sorologia não reflete a infecção aguda, e sim a exposição à bactéria. Os títulos dos anticorpos anti-*H. pylori* específicos diminuem lentamente durante 6 a 12 meses após a erradicação com antibióticos (BRADEN *et al.*, 2000). A sorologia negativa correlaciona-se com a cura, porém testes negativos são infreqüentes antes de 2 anos pós-terapia (HUSSON *et al.*, 2000). Portanto, a identificação de anticorpos não implica em infecção.

Os testes sorológicos são de grande importância nos estudos epidemiológicos, na avaliação da taxa de prevalência da infecção pelo *H. pylori*, principalmente no caso de indivíduos assintomáticos (RAYMOND *et al.*, 2000).

Os fatores que afetam a acurácia do ELISA são a natureza da preparação do antígeno de *H. pylori*, a classe do anticorpo contra o antígeno no soro humano e o *cutoff* selecionado. Sendo este mais alto em adultos do que em crianças. Podem ocorrer resultados falso-negativos com o método sorológico, uma vez que não há um único antígeno a qual todos os infectados reagem, ou porque existe enorme heterogeneidade na resposta imune a infecção entre os indivíduos. Ocorrem falso-positivos, quando o paciente tiver realizado tratamento de erradicação prévia, houver uma imunoglobulina inespecífica ligada ao anticorpo, houver uma reação cruzada com outros anticorpos e em casos de gastrite atrófica. Os níveis de anticorpos podem permanecer elevados por anos, após a erradicação ou resolução da infecção, assim, um teste positivo não necessariamente significa a existência da infecção, no momento de sua realização (PORTORREAL & KAWAKAMI, 2002).

Recentemente foi desenvolvido um novo método não invasivo, para o diagnóstico da infecção por *H. pylori*, que baseia-se na detecção imunoenzimática de antígenos de *H. pylori* nas fezes. Além do caráter não invasivo, a facilidade e a rapidez de execução constituem vantagens adicionais deste método. A sua precisão e boa mesmo em situações de avaliação pos-terapêutica (RICCI *et al.*, 2007).

Os testes baseados na detecção de antígenos bacterianos nas fezes estão sendo considerados ideais para o diagnóstico na infância (ODERBA *et al.*, 2001), pois são altamente sensíveis e específicos, em torno de 92 a 95%, possuindo a vantagem de ser não-endoscópico, fácil e rápido de operar, e mais econômico que o teste respiratório

de uréia com carbono marcado (BRADEN *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2000). O HpSA é um teste imunoenzimático não invasivo, de baixo custo, introduzido recentemente para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*, e demonstra alta acurácia no diagnóstico pré-tratamento e alta especificidade. O teste detecta antígenos anti *Helicobacter pylori* nas fezes de pacientes infectados, foi desenvolvido no norte da América e está em estudo no Brasil visando sua utilização no controle da erradicação como uma alternativa ao exame de endoscopia digestiva.

Em estudo multicêntrico realizado na Itália, Oderda *et al* em 1992, utilizaram a pesquisa de antígeno específico do *H. pylori* nas fezes com o objetivo de validá-lo para diagnóstico em estudos epidemiológicos de populações infantis. Os resultados obtidos evidenciaram alta sensibilidade, 98,0%, como também elevada especificidade e acurácia 99,0%, respectivamente, quando comparado com outros testes invasivos, urease, histologia e cultura, e a um teste não invasivo, o teste respiratório da uréia marcada com C13. No Brasil, ZEITUNE *et al* em 2000, apresentaram resultados preliminares de estudo para validação da pesquisa de antígenos fecais como método diagnóstico numa população pediátrica, concluindo que o teste nas fezes, utilizando técnica de ELISA, é adequado e confiável para esta finalidade. Por conseguinte, este teste apresenta as características ideais que o habilitam como ferramenta preferida para diagnóstico da infecção por *H. pylori*, principalmente para estudos epidemiológicos.

→ **PCR:** A reação em cadeia da polimerase é um método usado para detecção de *H. pylori* que apresenta altíssima sensibilidade e especificidade, permitindo identificar uma única copia de DNA do microorganismo no material examinado, podendo ser feito

diretamente da biopsia gástrica ou duodenal, do suco gástrico, da placa dentária, da saliva, da cultura e até mesmo das fezes.

2.6. A Biologia Molecular como ferramenta de diagnóstico da Infecção por *Helicobacter pylori*

A utilização de ferramentas de Biologia Molecular para fins de diagnóstico permite uma identificação mais precisa e rápida, com custos reduzidos. Dentre as ferramentas mais usadas esta a reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.6.1. Princípios da Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase permite a identificação de microorganismos, a partir de seu material genético. Esta ferramenta tem como princípio a produção em grande quantidade de cópias de fragmentos de DNA, obtida a partir de uma fita de DNA de sequência conhecida. A polimerase é a enzima que realiza a multiplicação de uma fita molde. A complementariedade entre as bases nitrogenadas constituintes dos ácidos nucleicos e variações de temperatura permitem a produção *in vitro* do processo que ocorre *in vivo* (apud GOSSEN *et al.*, 2002).

A fim de que a amplificação ocorra, inicialmente o DNA é aquecido e desnaturado a uma temperatura que varia de 94 a 96⁰C. Os oligonucleotídeos iniciadores são posteriormente alinhados em suas seqüências alvo a 30-60⁰C. A DNA polimerase a partir de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) adicionados ao sistema, sintetizam o fragmento de DNA desejado. A repetição destas etapas por 20 a 30 ciclos permite a amplificação de um segmento de DNA milhares de vezes (CLAYTON *et al.*, 1993).

A PCR pode trabalhar tanto com o DNA cromossomal quanto plasmidial. Aliadas a outras ferramentas moleculares, é possível traçar o perfil genético de um organismo a partir de genes conhecidos e únicos para uma espécie. O perfil pode ser obtido por enzimas de restrição, os quais clivam o DNA em sítios específicos. A análise em gel de eletroforese do material genético clivado permite a visualização do padrão obtido. E esse padrão será comparado com o banco de dados já existentes e em constante atualização.

2.6.2. Detecção por PCR da *H. pylori* nas fezes

A Detecção do *H. pylori* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi introduzida pela primeira vez no início de 1990, em amostras de biopsias obtidas por endoscopia. Devido à sua sensibilidade, o PCR é um dos métodos, de escolha para avaliar a resposta ao tratamento, principalmente na erradicação bacteriana (CLAYTON *et al.*, 1992).

Há evidências de que a *H. pylori* é excretada nas fezes de indivíduos infectados. Dessa maneira o patógeno pode ser detectado nestas amostras pela técnica de PCR, e raramente neste caso pela cultura, pois a presença de um número maciço de diversos microorganismos nas fezes pode dificultar o crescimento da *H. Pylori*. A presença da bactéria nas fezes é compatível com a rota de transmissão fecal-oral, pois as fezes com a presença deste microorganismo podem vir a contaminar o suprimento de água que comumente será utilizado por uma população, principalmente em regiões onde existam precárias condições de saneamento (MAPSTONE *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 1994).

As fezes contêm vários materiais, assim como diversos microorganismos, compostos inorgânicos, sais biliares, polissacarídeos, fibras vegetais não digeridas, numerosas enzimas degradativas, muco e produtos insolúveis do trato gastrointestinal. Dessa maneira a facilidade de acesso a estas amostra pode ser conveniente para a detecção do *H. pylori*, principalmente em crianças, uma vez que constitui um método não invasivo, como a endoscopia e/ou o teste da urease. Além disso, os pacientes podem realizar a coleta de maneira privativa, em suas casas.

As taxas de sucesso na detecção pela PCR variam de 25% a 100%. Esta variabilidade é provavelmente, devido à degradação do *H. pylori* no trato gastrointestinal e/ou a presença de inibidores, tais como polissacarídeos complexos, além de um número relativamente baixo de bactérias no cólon. O mecanismo pelo qual a *H. pylori* viável pode ser excretado nas fezes não é bem compreendido. O fato é de que a sensibilidade bacteriana a bile, impede o trânsito viável através do trato intestinal, mesmo em associação com as fezes ((MAPSTONE *et al.*, 1993; FUKUDA *et al.*, 2002). A provável explicação reside no fato de que durante o trânsito intestinal, o carreamento biliar e o ambiente anaeróbio, alterariam a morfologia espiral bacteriana para a forma cocóide, o provavelmente conferiria resistência à bactéria. Pois estudos recentes comprovam que em condições anaeróbias a forma cocóide é a mais viável (CAVE, 1997; COLE *et al.*, 1997; GOODMAN E CORREA, 1995; HULTEN *et al.*, 1998, KABIR *et al.*, 2001).

Há diversos protocolos para detectar uma grande variedade de genes de *H. pylori*, a seleção de iniciadores a serem utilizados é muito importante para a obtenção de bons resultados. Diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados na identificação da bactéria tais como os genes 16S rRNA, Urease *A*, *B* e *C*, *VacA* e *CagA*.

A análise do gene 16S rRNA é o mais comum método utilizado para o estudo molecular da filogenia e a taxonomia de bactérias, incluindo espécies de *Helicobacter* (GREISEN, 1992). Para a detecção bacteriana por PCR, *primers* gênero-específicos são usados para amplificar um segmento de 400-pb do gene 16S rRNA de espécies de *Helicobacter*, assim como são utilizados fragmentos maiores de 1200pb do mesmo gene para identificar o antígeno espécie-específico. Sendo que a sensibilidade da PCR tradicional para identificar o gene 16S rRNA de *Helicobacter* é em torno de 10^3 colônias / μ L (LI *et al.*, 1996; HO *et al.*, 1991).

Apesar da cultura de *H. pylori* continuar sendo o método de referência para o diagnóstico da infecção por este microorganismo, a técnica apresenta inconvenientes que podem ser ultrapassados pela utilização da PCR, como o longo período para a obtenção dos resultados e as condições estreitas de transporte da biopsia gástrica.

Do ponto de vista clínico-epidemiológico, a padronização de um ensaio copromolecular, que utilize amostras de fácil coleta, transporte, armazenamento, assim como sensível, específico e não-invasivo para diagnóstico da infecção por *H. pylori*, em crianças, adolescentes e pacientes assintomáticos é de suprema importância para ampliar o limitado entendimento das doenças relacionadas ao *H. pylori*. Atualmente o grande desafio no diagnóstico desta infecção e o desenvolvimento de métodos menos invasivos, neste sentido a PCR das fezes constitui uma ferramenta crucial para esse desenvolvimento.

2.7. Os sistemas sangüíneos ABH e Lewis

2.7.1. A expressão dos grupos sangüíneos ABH e Lewis

Em 1900, Landsteiner descobriu os grupos sanguíneos do sistema ABO e classificou os seres humanos de acordo com os antígenos presentes nas membranas das

hemácias (A,B ou AB), posteriormente, constatou-se a presença de anticorpos naturais presentes nos indivíduos contra estes antígenos, revelando a existência de uma relação inversa entre estes antígenos presentes nas hemácias e os anticorpos no soro do mesmo indivíduo (Tabela 4).

Os antígenos ABH aparecem em todos os tecidos, assim como nos eritrócitos e na maioria das pessoas são secretados sobre forma de glicoproteína solúvel em água em numerosos fluídos do corpo e sob a forma de glicolípideos solúveis em álcool nas hemácias. A capacidade de secretar estas substâncias nos fluídos do corpo é determinada pelo gene secretor **Se** e os indivíduos que os manifestam são considerados secretores, sendo seus genótipos **Se/Se** ou **Se/se**, os indivíduos que não secretam estas substâncias nos fluídos do corpo são considerados não secretores e seu genótipo é **sese** (Tabela 5).

Tabela 4- Distribuição de antígenos e anticorpos nas hemácias e no soro dos grupos sanguíneos do sistema ABO em humanos

Grupos Sanguíneos	Antígenos (hemácias)	Anticorpos (soro)
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	Nenhum
O	Nenhum	Anti-A e Anti-B

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

Tabela 5- Distribuição de antígenos ABH nos secretores e não secretores

Grupo sanguíneo	Antígenos dos secretores	Antígenos dos não secretores

	Hemácias	Saliva	Hemácias	Saliva
O	H	H	H	-
A	A	A	A	-
B	B	B	B	-
AB	A e B	A, B e H	A e B	-

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

Os antígenos Lewis são definidos comumente de Le^a e Le^b e ao contrário de outros sistemas sanguíneos o sistema Lewis têm a princípio uma explicação genética devido às interações com o sistema ABH e secretores. Os indivíduos cujas hemácias são $Le(a+b-)$ secretam apenas o antígeno Le^a , embora nunca secretam as substâncias ABH na saliva, indivíduos cujas hemácias são $Le(a-b+)$ os secretam sempre e indivíduos cujas hemácias são $Le(a-b-)$ podem ser classificados como secretores ou não secretores de substância ABH, dependendo da presença ou ausência do gene Se . A explicação é que as substâncias Lewis não são primeiramente antígenos das hemácias, mas antígenos das secreções do corpo e apenas são adsorvidos pelas hemácias a partir do plasma, a presença ou ausência dos antígenos Le^a e Le^b no soro é regulada por um par de genes alélicos, Le e le , (Tabela 6) (ORIOL, 1994).

Tabela 6– Interação dos genótipos Lewis e secretor, no fenótipo Lewis

Genótipo	Genótipo secretor	Fenótipo da hemácia
Lewis		
LeLe ou Lele	SeSe ou Sese	Le(a-b+)
Lele ou Lele	Sese	Le(a+b-)
Lele	SeSe, Sese ou sese	Le(a-b-)

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

2.7.2. A rota biossintética dos antígenos ABH e Lewis

Os antígenos dos grupos sanguíneos ABH são oligossacarídeos que podem apresentar-se como estruturas simples ligadas a proteínas, sob a forma de glicoproteínas ou de lipídios, sob a forma de glicolipídeos sendo expressos na porção terminal das cadeias carboidráticas, formados pela adição seqüencial de unidades monossacarídicas a cadeia precursora. O tipo de antígeno esta diretamente relacionado com a estrutura bioquímica da cadeia, sendo observado em humanos 4 tipos de cadeias, suas diferenças residem no dissacarídeo terminal. Estas alterações na estrutura das cadeias precursoras determinam as especificidades antigênicas que resultam da constituição gênica do indivíduo em relação aos loci polimórficos **Sese**, **Hh**, **Lele** e **ABO** (HENRY *et al.*, 1995; ORIOL *et al.*, 1986).

A via biossintética dos antígenos ABH e Lewis ocorrem de maneira diferente nas hemácias e em células de outros tecidos, devido às diferenças de natureza bioquímicas e genéticas. Nos indivíduos secretores, o gene secretor dominante (*Se*) é a forma ativa principalmente nos tecidos de origem endodermal, onde ele estimula a produção do antígeno H que distribui-se pelas mucosas, enquanto o gene recessivo (*se*) é incapaz de fazê-lo.

A síntese da substância H, que é o substrato do qual as substâncias A e B são originadas pela ação dos genes A e B, está sob controle de pelo menos dois sistemas genéticos polimórficos **H/h** e **Se/se**. Os genes **Se** e **H** dirigem a produção de distintas α -fucosiltransferases, que trabalham em diferentes cadeias precursoras. Nestas cadeias pela ação das enzimas produto dos genes **Se** e **H**, um monossacarídeo de L-fucose é transferido à galactose terminal, determinando a substância precursora H a partir da qual atuam enzimas codificadas pelos genes do locus ABO que encontra-se no braço longo do cromossomo 9 e possui diversos alelos dos quais os mais importantes são: *A*, *B* e *O*.

O gene *O* apresenta uma sequência de nucleotídeos quase idêntica ao do gene *A*, exceto pela simples deleção da base guanina na posição 261, levando à síntese de uma enzima inativa incapaz de modificar o antígeno H. Por isso é considerado um gene silencioso ou amorfo. No fenótipo O, os indivíduos possuem o genótipo homocigoto recessivo para o gene *O*, neste fenótipo encontra-se o antígeno H em concentrações máximas (HENRY *et al.*, 1995).

O gene *A* produz uma α -N-Acetil Galactosaminiltransferase, que transporta o açúcar N-Acetil Galactosamina para o antígeno H já formado, originando o antígeno A.

O gene *B* produz uma α -D-Galactosiltransferase que transporta uma D-Galactose para o antígeno H, originando o antígeno B. Desta maneira os fenótipos eritrocitários são definidos pelo antígeno presente na membrana globular e pelo anticorpo sérico natural correspondente ao antígeno ausente (SZULMAN, 1980).

Os eritrócitos não produzem os antígenos Lewis a e b, que são formados a partir da ligação de uma fucose no carbono 4 da NAc-Glucosamina (Glc-Nac). A substância precursora predominante nos eritrócitos são cadeias do tipo 2, onde o

carbono 4 não está livre para ligar a L-fucose (Le^a), dessa maneira as especificidades Lewis a e b presentes nas hemácias são glicolípídios plasmáticos produzidos por outras células e adsorvidas à membrana eritrocitária (HENRY *et al.*, 1995).

No epitélio salivar as células da mucosa produzem cadeias oligossacarídicas predominantemente do tipo 1, estruturalmente compostas de Gal β (1-3)GlcNAc (Tabela 7). Na cadeia precursora do tipo 1 a enzima α (1/3-4) fucosiltransferase produzida pelo gene ativo Lewis (*Le*), acopla uma L-fucose ao carbono 4 da NAc glucosamina (GlcNAc) produzindo o antígeno Le^a (ORIOLO, 1994).

O gene secretor *Se* produz a enzima 2 α -L-fucosiltransferase, que liga outra L-fucose ao carbono 2 da β -Galactose, produzindo um antígeno Le^d (H tipo 1). A especificidade definida pelos anticorpos anti- Le^b é um efeito de interação gênica pela presença simultânea dos antígenos Le^a e H em indivíduos portadores dos genes *Le* e *Se*. Os antígenos ABO ligam-se ao carbono 3 da β -Galactose pela ação de duas enzimas específicas, da mesma maneira que nas hemácias.

Os indivíduos do grupo O, por não expressarem os antígenos A e B, apresentam os antígenos Le^b em maior concentração concordante com o fenótipo de grupo O secretor e Lewis positivo.

Nas hemácias do grupo fenotípico A e/ou B, o antígeno Le^b está presente em menor quantidade que o esperado pelo genótipo salivar secretor e do grupo O. Isso se deve ao fato de que nos indivíduos A e B, a substância Le^b é transformada em uma substância de especificidade A Le^b ou B Le^b , onde a reatividade de Le^b é bastante diminuída (HENRY *et al.*, 1995).

Tabela 7- Determinantes antigênicos resultado da ação das glicosiltransferases sobre controle dos genes Se e Le

Genótipo		Fenótipo			Estruturas Químicas	Nome dos Antígenos		
		Saliva	Eritrócito		Propostas			
Secretor	Lewis	Secretor	Lewis	Lewis	%		Tipo 1	Tipo 2
se/se	Le/-	-	+	a+b-c-d-	20	$\beta\text{Gal} \rightarrow \beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ \uparrow αFuc	Le ^a	X
Se/-	Le/-	+	+	a-b+c-d-	69	$\beta\text{Gal} \rightarrow \beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ $\uparrow \quad \uparrow$ $\alpha\text{Fuc} \quad \alpha\text{Fuc}$	Le ^b	Y
se/se	le/le	-	-	a-b-c+d-	1	$\beta\text{Gal} \rightarrow \beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$	Le ^c	I
Se/-	le/le	+	-	a-b-c-d+	9	$\beta\text{Gal} \rightarrow \beta\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ \uparrow αFuc	Le ^d	H

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

2.7.3. Associação entre a *Helicobacter pylori* e os antígenos ABH e Lewis

A idéia de que alguns grupos sanguíneos poderiam estar associados á suscetibilidade ou á resistência a determinadas categorias de doenças foi ridicularizada durante muito tempo, mas no momento numerosos estudos feitos em todo o mundo, com resultados bastante consistentes, fazem com que seja impossível duvidar que determinadas associações sejam verdadeiras.

Os antígenos de grupos sanguíneos são expressos nas mucinas presentes em células do epitélio e muco gástrico. Estes histoantígenos de estrutura glicosilada são responsáveis pela expressão de ligantes fundamentais na interação celular e de determinantes antigênicos associados a patógenos (BOREN *et al.*, 1994).

A relação entre os grupos sanguíneos e infecções pode ser entendida a partir dos diferentes fenótipos de grupos sanguíneos. Na presença de anticorpos naturais anti-A e anti-B, a disseminação dos antígenos A ou B carregados por micróbios é impedida, enquanto que a ausência ou diminuição destes anticorpos facilita a propagação destes patógenos. Por outro lado, certos antígenos na superfície das células podem ser um pré – requisito para a entrada de alguns micróbios e a infecção do organismo (SCHONITZER, 1997).

A primeira prova importante foi dada por Aird em 1953, que observou um excesso de pessoas do grupo A entre os pacientes com câncer gástrico, observação que vem sendo confirmada em repetidos estudos. Uma associação ainda maior existe entre a ulcera péptica e o grupo O. Estudos "*in vitro*" têm mostrado que a ligação do *H. pylori* com a mucosa gástrica tem sido mediada por antígenos de grupos sanguíneos, especialmente os antígenos Lewis b e H (ILVER *et al.*, 1998). Observa-se que os

fenótipos de grupos sanguíneos O e L(a-b+) expressam uma grande quantidade de antígenos fucosilados quando comparados com outros grupos, levando a acreditar que esta diferença seria um fator predisponente para a aquisição da infecção (BORÉN *et al.*, 1994; MATOS *et al.*, 2002).

Os antígenos Lewis b (predominante no grupo secretor) e H1 ou Lewis d (predominante nos grupos sanguíneos O), consistem de açúcares com terminal fucose (antígeno H) ou terminal com ramificações difucosiladas (Lewis b), ligados à membrana esfingolipídica ou protéica da célula, identificadas como estruturas químicas responsáveis pela ligação do *H. pylori* à mucosa gástrica (BOREN *et al.*, 1994).

Esses achados vêm sendo reforçados pela demonstração bioquímica da ligação da adesina BabA do *H. pylori* com os antígenos de grupos sanguíneos Lewis b e H1 do hospedeiro (ILVER *et al.*, 1998).

Os indivíduos dos grupos sanguíneos A e/ou B, possuem as especificidades Lewis b e H substituídos por um terminal Gal Nac e/ou Gal α 1-3, como resíduo adicional de açúcar, assim como, o fenótipo Lewis a (Le^a) com ramificações monofucosiladas isoladas, estariam livres a propriedades de ligação, sugerindo que a disponibilidade de receptores para a bactéria, pode ser reduzida nos indivíduos do grupo A e B, quando comparados com os do grupo sanguíneo O. Esses achados justificariam as evidências epidemiológicas da elevada prevalência do grupo sanguíneo O entre os pacientes com úlcera gástrica, quando comparada com indivíduos sem úlcera, em um mesmo grupo populacional (BORÉN *et al.*, 1994).

Estudos vêm sendo realizados com objetivo de prever os rumos da infecção por *H. pylori*, sua associação com doenças, envolvendo fatores como condições socioeconômicas, a transmissibilidade e provável pré-disposição à infecção.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da infecção por *H. pylori* e realizar o levantamento de variáveis epidemiológicas e de suscetibilidade relacionados à infecção bacteriana em comunidades ribeirinhas, e validar um ensaio copromolecular para diagnóstico da infecção.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar a soroprevalência da *H. pylori*, em amostras de populações ribeirinhas do médio Solimões.
- 2- Determinar a prevalência da infecção atual através da detecção de antígenos bacterianos fecais.
- 3- Traçar o perfil epidemiológico da infecção por *H. pylori* em populações ribeirinhas do médio Solimões, com relação ao nível socioeconômico, características e aspectos clínicos e condições habitacionais e de saneamento.
- 4- Caracterizar os antígenos de grupos sanguíneos ABH e Lewis relacionando com a sorologia positiva à infecção por *H. pylori*.
- 5- Verificar a prevalência de enteroparasitoses na população estudada e relacioná-la à infecção por *H. pylori*.
- 7- Detectar molecularmente a infecção bacteriana em amostras de fezes, validando o ensaio copromolecular para detecção da bactéria *H. pylori*, através da PCR, com base na genotipagem dos genes *rRNA* 16S e *Ag*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento do Estudo

O estudo realizado foi do tipo transversal, contemporâneo, analítico e observacional, em uma amostra de indivíduos ribeirinhos de Coari, sendo que o fator em estudo foi à infecção por *Helicobacter pylori* correlacionada com as variáveis tidas como de risco para aquisição da infecção.

4.2. Região Estudada

4.2.1. O município de Coari

Coari é um município brasileiro do estado do Amazonas, foi fundado em 1874, sendo a quarta cidade mais rica do norte brasileiro, a cidade está localizada no Rio Solimões entre o lago do Mamiá e o Lago de Coari, traz em sua herança e memória a força dos índios Catuxy, Jurimaus, Passes, Irijus, Jumas, Purus, Uaiupis, Uamanis e Uaupes. Economicamente era conhecida pela produção de banana, hoje se destaca pela produção de petróleo e gás natural, que ocorre em uma região denominada de Urucu. Outro fato importante é a construção do gasoduto que ligará sua província produtora ao mercado consumidor localizado em Manaus/AM (IBGE, 2012).

O município apresenta como aspectos físico-geográficos, localização 40 06'22" latitude sul e 63^o 03'21" longitude Oeste de Greenwich, apresenta uma área territorial de 57.277.90 km² está localizado (IBGE, 2012).

A população total é de 67.055 habitantes, conforme contagem feita pelo IBGE em 2007, o que a coloca na posição de quinta maior cidade do Amazonas, com 67% de população urbana e 33% rural, sendo 52, 07% de mulheres e 47, 93% de homens, com densidade demográfica de 2,69 habitantes por km² (IBGE, 2012).

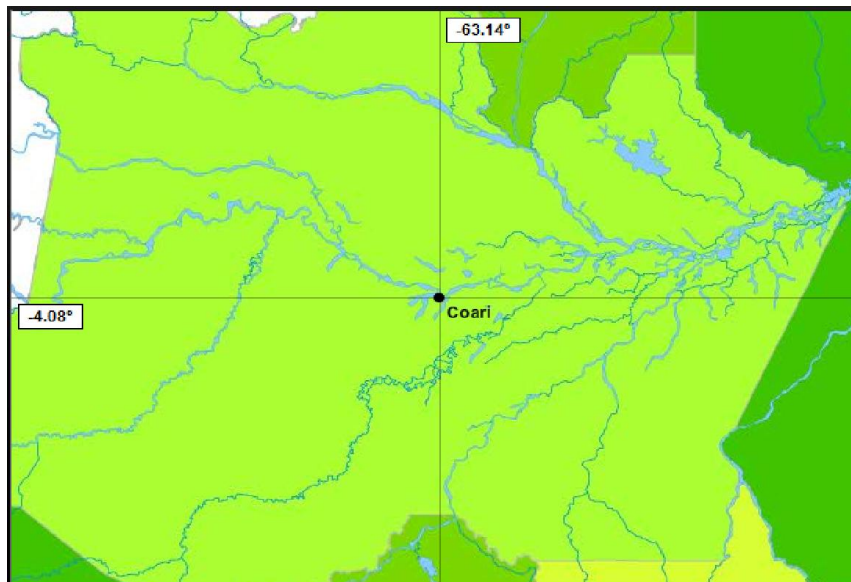


Figura 9- Mapa mostrando a localização do Estado do Amazonas. Em destaque o município de Coari

FONTE: Google Earth.

O município apresenta as seguintes taxas:

- Mortandade infantil até cinco anos de idade: 22,26 a cada mil crianças.
- Taxa de fecundidade: 6,74 filhos por mulher.
- Taxa de alfabetização: 88,63%.
- Índice de desenvolvimento humano (IDH-M): 0,703.
- Índice de desenvolvimento humano renda: 0,846.
- Índice de longevidade: 0,776.

4.3. Tamanho calculado da amostra

4.3.1. Estudo Piloto

A estratégia utilizada, para o cálculo do número de indivíduos ribeirinhos a serem estudados, foi o estabelecimento através de um estudo piloto em uma amostra aleatória de conveniência realizado na comunidade rural do Itapeuá, no município de

Coari, tendo como premissa a prevalência da infecção por *H. pylori*. Este desfecho foi necessário, pois não se têm dados representativos a cerca das comunidades ribeirinhas do município de Coari, para realização do cálculo amostral. Dessa maneira o calculo do tamanho da amostra foi estabelecido com base na estimativa da média populacional, tomando a população total do município de Coari.

4.3.2. Cálculo da Amostra

O tamanho estimado da amostra foi calculado com base na estimativa da prevalência da infecção por *H. pylori*, em uma comunidade rural e na estimativa da média populacional (μ), através da fórmula de cálculo amostral do programa EPI-INFO (referência pegar da tese de base metodológica), versão 9.0 (1998), para uma estimativa confiável da média populacional, conforme demonstrado abaixo:

$$n = \frac{[Z_{\alpha/2} * \sigma]^2}{E}$$

Onde:

n = número de indivíduos da amostra.

$Z_{\alpha/2}$ = valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado.

σ = Desvio padrão populacional da variável estudada.

E = Margem de erro ou ERRO MÁXIMO DE ESTIMATIVA. Identifica a diferença máxima entre a média amostral (X) e a verdadeira média populacional.

Assim, uma amostra significativa de pessoas a serem investigadas para o grupo populacional estudado deveria ter no mínimo 200 indivíduos.

4.4. Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi submetido, julgado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas, conforme Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) sob número 0299011500010 (**Anexo 1**).

Previamente, os indivíduos adultos, e os pais e/ou responsáveis pelos indivíduos menores, que participaram do projeto, foram informados sobre a pesquisa, de maneira acessível. Após o esclarecimento da importância deste estudo, foi solicitada a permissão e consentimento, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE), conforme rege a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, sobre aspectos éticos envolvendo a pesquisa com seres humanos, autorizando suas participações nesta pesquisa, possibilitando a coleta de material biológico para análise (**Anexo 2 e 3**).

As amostras coletadas atualmente estão sob os cuidados do Laboratório de Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Saúde & Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. Todas as medidas necessárias foram tomadas tanto para garantir o anonimato dos indivíduos participantes do projeto, quanto a relação à preservação do material coletado e seu uso de maneira ética.

4.5. Populações estudadas

Em decorrência da posição geográfica das comunidades ribeirinhas do médio Solimões, e principalmente as vias de acesso nos períodos de seca, foram selecionadas comunidades que se localizavam mais próximas à cidade de Coari e com melhores vias de acesso, dessa maneira as populações ribeirinhas estudadas foram as

residentes nas comunidades de Esperança I e II, Saubinha, Santa Maria, São José do Saúba, São Francisco, São Raimundo, Nossa Senhora do Livramento e Vila Lira.

O estudo compreendeu uma amostra de 200 indivíduos, dos quais foram coletados sangue, saliva e fezes, além da aplicação de um questionário epidemiológico empregado, com questões dirigidas à sua identificação, obtendo dados sobre as condições socioeconômicas, higiênicas, sanitárias e sintomatologia apresentada (**Anexo 4**).

4.6- Amostras Controle

Para estabelecer parâmetros correlativos, um grupo controle de indivíduos com patologias gástricas, provenientes do serviço de Endoscopia do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará, nos quais foi detectada a presença da bactéria *H. pylori*, através de sorologia e técnicas moleculares, que utilizaram amostras de biopsias gástricas, foram utilizados como controle positivos para a detecção sorológica e molecular.

Na validação do ensaio copromolecular foi utilizada, como controle a ATCC (American Type Culture Collection) 43504 de origem do INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde).

4.7. Critérios de inclusão e exclusão no estudo

Foram incluídos no estudo pacientes

- De maior idade.
- Crianças acima de 1 ano, cujo responsável concordou e autorizou sua participação e coleta.
- Que apresentaram ou não sintomas de alterações gastrointestinais.

- Que não estavam fazendo uso de antiinflamatórios não-esteróides, antagonistas, inibidores de bomba de prótons ou drogas antimicrobianas, há pelo menos 60 dias anteriores à obtenção do material.

- Não apresentavam deficiência de natureza mental.

- Assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento.

Foram excluídos do estudo

- Adultos e Crianças que apresentaram quadros clínicos graves que impossibilitou a venopulsão.

- Aqueles que não se enquadravam em todas as exigências descritas acima.

4.8. Obtenção das informações

O questionário epidemiológico constou, em sua maioria, de respostas abertas empregadas na codificação dos dados. As variáveis estudadas foram aquelas que informaram a partir do questionário características referentes aos responsáveis e as crianças sobre sua guarda, fatores associados à infecção pela *H. pylori* e dados socioeconômicos.

↳ Variáveis comuns aos indivíduos estudados

Foram variáveis relativas à identificação dos indivíduos, as condições habitacionais e sócio-econômicas da família.

I. Idade: Foi considerada a idade verbal referida pelo responsável, tanto dele como do menor (es).

II. Ocupação: Foi verificado o grau de profissionalização dos pacientes.

III. Escolaridade: o grau de instrução foi classificado de acordo com os graus de ensino cursado. *Analfabeto*, se não frequentou nem um período do sistema de ensino regular brasileiro e que não saibam ler e nem escrever. *1º grau incompleto* ou *completo* dependendo se tivessem concluído ou não o período de ensino médio. *2º grau incompleto* ou *completo* dependendo de terem ou não concluído do 2º grau. *Curso técnico*, caso tenha feito um curso profissionalizante e *universitário* caso tenham neste o curso completo ou pós-universitário.

IV. Renda familiar: Foi considerado um salário mínimo de vigência atual no Brasil, no valor de R\$ 540,00. Assim foram observados o total número de salários recebidos pelos membros da família mensalmente.

V. Distúrbios gástricos: Foi verificado se algum dos participantes e/ou familiares possuem algum tipo de distúrbio gástrico ou outra sintomatologia de importância no estudo, a verificação foi realizada pelo médico e/ou enfermeiro do projeto.

VI. Tratamento da água consumida: Foi considerada de acordo com tipo de tratamento realizado na água para o consumo. Se *filtrada*, quando houvesse a presença de um aparelho que filtrasse a água para o consumo. Se *fervida*, caso tenha sido colocada ao menos por 10 minutos em ebulição. Se *coada*, caso tenha sido utilizado um tecido para coar a água antes do consumo, *mineral* caso provenha da compra de garrafas de água mineral e/ou sem tratamento caso nenhum dos procedimentos acima tenham sido realizados.

VIII. Fonte de água: Foi considerada a procedência da água. *Encanada* caso houvesse encanamento público geral, *Poço* caso a procedência não fosse via encanamento, *Rio* caso o consumo fosse direto ou houvesse alguma estrutura que traga a água do rio até a casa, e *outros* quando não tenha sido classificada nas possibilidades anteriores.

IX. Tipo de local para despejos de dejetos: Foi classificado de acordo com o tipo de fossa. Se pertencente à rede geral de esgoto classificada de *sanitária*, e *negra* caso fosse um tipo de fossa rudimentar ou aberta.

X. Saneamento foi considerado *adequado* quando houve presença de água encanada, rede de esgoto presente na rua e a residência estivesse ligada a ela e houvesse a presença de uma fossa sanitária e *inadequado* na ausência de pelo menos uma destas variáveis.

XI. Exames Complementares: Foi um levantamento junto aos pacientes, para verificarmos se estes realizaram algum tipo de exame de material Biológico, antes do momento da pesquisa.

XII. Uso de antimicrobianos: os responsáveis serão interrogados para saber se as crianças usaram algum antimicrobiano nos últimos 60 dias antes da coleta, que pudesse interferir nos testes, ou ainda se realizaram ou estavam realizando algum tratamento para a sintomatologia apresentada

4.9. Coleta e tratamento das amostras

As amostras de material biológico foram coletadas e armazenadas de acordo com processos já estabelecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários/ISB/UFAM, Laboratório de Imunogenética/ICB/UFPA e de acordo com as normas de biossegurança determinadas pelo Ministério da Saúde.

I. Saliva: a coleta de amostras de saliva não apresentaram características invasivas ou dolorosas para os pacientes, estes receberam chumaços de algodão para serem umedecidos com saliva. Logo após o chumaço de algodão foi recolhido e

acondicionado em frasco estéril, devidamente identificado. As amostras, após a coleta, foram imediatamente acondicionadas em recipiente sob refrigeração, e transportadas para congelamento a -20°C no laboratório. Antes do uso, as amostras foram descongeladas e extraídas dos chumaços para posteriores testes.

Estas amostras foram utilizadas para verificação do estado secretor das substâncias de grupos sanguíneos ABH, que só podem ser verificados nos fluidos corporais.

II. Sangue: foi coletado através de punção venosa periférica aproximadamente 3 mL de sangue de paciente, utilizando-se material estéril descartável, de uso individual. O sangue foi armazenado imediatamente em um recipiente estéril, devidamente identificado contendo heparina e/ou EDTA como anticoagulante. Estas amostras foram acondicionadas em recipiente refrigerado para o transporte. O sangue total, foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e o soro foi separado e estocado à -20°C , não foram utilizados soros hemolíticos, lipêmicos, ou ictericos. As hemácias foram mantidas à 4° para serem testadas e o restante das hemácias foram conservados em solução de glicerol (glicerolização de hemácias) e armazenado a -20°C .

III. Fezes: As amostras foram recolhidas pelos próprios indivíduos, o responsável pelo projeto explicou que a evacuação deveria ser feita em um recipiente limpo e seco e que parte das fezes deveria ser transferida para tubos coletores universais devidamente identificados, que foram cedidos pela equipe do projeto. Os recipientes para coleta das fezes foram entregues nos respectivos domicílios. As amostras foram acondicionadas em recipientes refrigerados para o transporte, e destinadas a testes parasitológicos, e de detecção molecular da bactéria *H. pylori*. Para as técnicas de detecção parasitaria as amostras foram testadas a fresco, sendo o restante congelado para extração de DNA.

4.10. Descrição das técnicas laboratoriais

4.10.1 Técnicas para identificação de infecção por *H. pylori*

4.10.1.1. Detecção sorológica de anticorpos do tipo IgG anti-*H. pylori* específicos

As amostras de plasma foram testadas para anticorpos sistêmicos do tipo IgG anti-*H. pylori* específicos através de um ensaio imunoenzimático, usando o Kit **RIDASCREEN *Helicobacter* IgG** (R-Biopharm AG, Alemanha). O teste tem caráter qualitativo, ou seja, classifica os indivíduos como positivos ou negativos de acordo com as instruções de uso recomendadas pelo fabricante. A especificidade e a sensibilidade, de acordo com a informação do fabricante, atingem níveis de 98%. A técnica foi executada como segue:

- 1- Remover da embalagem a placa de Microtitulação/ELISA e os reagentes do *Kit* e deixá-los em temperatura ambiente, no momento do uso.
- 2- Diluir a 1:10 o tampão de lavagem *SERO WP* com água destilada.
- 3- Diluir 1:50 a amostra do soro com o Tampão de amostra *SEROPP*.
- 4- Deixar o primeiro poço da placa vazio.
- 5- Pipetar no segundo poço da placa 100µl do controle Padrão IgG positivo ou amostra, que vem no *kit*.
- 6- Pipetar no terceiro poço da placa 100µl do controle Padrão IgG negativo ou amostra, que vem no *kit*.
- 7- Pipetar 100 µl das amostras nos poços seguintes.
- 8- Cobrir a placa, incubar em câmara úmida a 37°C, durante trinta minutos.
- 9- Esvaziar a placa de microtitulação e depois lavar 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem diluído.

- 10- Adicionar 100 µl de conjugado *SERO GHD* em todas as cavidades da placa, inclusive na primeira.
- 11- Cobrir a placa, incubar em câmara úmida a 37°C, durante 30 minutos.
- 12- Esvaziar a placa de microtitulação e depois lavar 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem diluído.
- 13- Adicionar 100 µl de conjugado *SEROSC* em todas as cavidades da placa, inclusive na primeira.
- 14- Cobrir a placa, incubar em câmara úmida a 37°C, durante 30 minutos.
- 15- Adicionar 100 µl de reagente bloqueador *SERO STOP* em todas as cavidades da placa, inclusive na primeira
- 16- Realizar a leitura com medição fotométrica a 450/620 nm.

A leitura da placa de microtitulação foi feita em leitor de ELISA, *THERMOPLATE*, leitor de microplaca TP-Reader R5232. A análise do resultado foi feita através da curva padrão anexa do *Kit*, com fator de correção calculado a partir do valor médio do controle padrão e seu valor prescrito, indicado na folha de dados anexa, *do Kit*.

4.10.1.2. Detecção de Antígenos Fecais para *H. pylori*

Em contraste com os ensaios sorológicos que são baseados na detecção de anticorpos, e possível permanência positiva por um longo período desde que a infecção foi adquirida, o teste rápido de detecção de antígenos fecais de *H. pylori* indica uma infecção ativa da bactéria. O teste é um ensaio imunocromatográfico de triagem para a detecção de antígenos da bactéria nas fezes, utilizando de anticorpos policlonais *anti-H. pylori*, que se ligam a bactéria caso esta esteja presente na amostra.

As amostras fecais para detecção ativa da bactéria *H. pylori*, foram testadas através de um ensaio imunoenzimático, usando o **Kit MKBIO *H. pylori*** (MK BIO GMBH, DIMA, Alemanha). O teste caracteriza-se como um método não invasivo, qualitativo, altamente sensível e específico, com níveis que atingem 96,9%. Os indivíduos são classificados como positivos ou negativos de acordo com as instruções de uso recomendadas pelo fabricante. Como segue:

- 1- Remover os cartões da embalagem no momento de usar e identificar (os cartões devem ser mantidos na posição horizontal durante o ensaio).
- 2- Com o auxílio de um palito aplicador de madeira será transferida uma pequena porção da amostra homogeneizada ao tubo coletor com diluente do kit padrão.
- 3- Agitar o tubo coletor para assegurar uma boa homogeneização.
- 4- Quebrar a extremidade do tubo para uma rápida remoção, utilizando um pedaço de papel toalha.
- 5- Segurar o tubo coletor verticalmente e despejar 2-3 gotas da solução no poço da amostra no cartão do teste.
- 6- Esperar 10 minutos e realizar a leitura.

Os resultados foram interpretados como positivo e negativo, em função do aparecimento ou não de uma linha colorida na região controle do teste.

4.11. Técnicas de identificação de grupos sanguíneos ABO e Lewis

Nos eritrócitos, os fenótipos ABO e Lewis serão identificados pelos testes de Hemaglutinação e Dot-Blot-ELISA.

Na saliva, foi utilizado somente o teste Dot-blot-ELISA. Foram empregados anticorpos monoclonais com as seguintes especificidades: anti-A, anti-B, anti-Le^a e anti-Le^b e anti-H (Fresenius Diagnóstics).

4.11.1. Hemaglutinação

É uma reação de aglutinação entre os antígenos que estão na superfície das hemácias e anticorpos específicos, que agregam-se formando grumos de células visíveis a olho nu. O teste foi feito misturando em tubos Griffith, um volume de 20µL de suspensão de hemácias à 3%, com igual volume de cada solução de anticorpos específicos, com diluição 1:16, para cada antígeno a ser detectado, A, B, H, Le^a, Le^b. As amostras foram incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente, centrifugadas a 1000rpm por 5 segundos e lidos os resultados.

4.11.2. Dot-Blot-ELISA

No soro e/ou saliva, a caracterização das referidas especificidades ABH e Lewis foram feitas baseada na técnica de Dot-Blot-ELISA, modificada de Pflug *et al.*, (1989), como segue:

- 1- Com uma micropipeta, um volume de 5µL do material a ser testado, foram aplicados em 5 pedaços de uma membrana de nitrocelulose, com dimensão aproximada de 4x7 cm, e deixou-se secar por 30 minutos a 37°C.

- 2- As áreas livres da membrana de nitrocelulose foram bloqueadas com um tampão bloqueador (0,01M Tris-HCl Salina, pH 7.4; 1% Triton X-100; 3% BSA) por 45 minutos a temperatura ambiente e com agitação mecânica.
- 3- Cada pedaço da membrana de nitrocelulose foi incubada com tampão bloqueador, usando como diluente de uma solução contendo o anticorpo secundário (anti-IgM de rato) conjugado à enzima fosfatase alcalina, na diluição de 1/1000 mL, mais o anticorpo primário, um monoclonal com especificidade e diluição apropriada (anti-A 1/50 mL; anti-B 1/100 mL; anti-H 1/10 mL; anti-Le^a 1/1000 mL e anti-Le^b 1/2000 mL).

Observação: *Esta incubação foi em uma placa de vidro coberta com uma película plástica durante 45 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente).*

- 4- Os pedaços da membrana de nitrocelulose foram lavados 6 vezes, sendo 4 lavagens com o tampão de lavagem Tris-Triton (0,01M Tris-HCl Salina pH 7.4; 0,05% Triton X-100) e 2 vezes com o tampão Tris Salina (0,01M Tris-HCl Salina pH 7.4) durante 5 minutos cada aplicando agitação mecânica para remover o anticorpo excedente.
- 5- As membranas foram incubadas em um tampão substrato (25 mL 0,25M Glicina/NaOH pH 10.4; 500µL 0,1M MgCl₂; 500µL 0,1M ZnCl₂) mais 100µL da solução substrato (50 mg 5-bromo-4-cloro-3-indolyphosphate dissolvido em 1mL de dimethylformamide) a 37°C durante aproximadamente 15 minutos até a visualização de pontos

azuis brilhantes no local da reação antígeno-anticorpo, posteriormente as membranas serão lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente para serem analisadas.

4.12. Detecção Parasitaria de Helminhos e/ou Protozoários

Nas amostras fecais foram realizados testes para detectar a presença de ovos de helmintos e cistos ou oocistos de protozoários, o método utilizado foi à técnica de sedimentação espontânea segundo LUTZ 1919, HOFFMANN, PONS E JANER 1934. Como segue:

- 1- Foram colocados cerca de 5g de fezes, coletadas de várias partes do bolo fecal, em copo descartável de 300 mL. Foi completado o volume de 50 a 60 mL de água destilada e misturou-se vigorosamente.
- 2- Preparou-se uma suspensão juntando 100 mL de água destilada.
- 3- Essa suspensão foi filtrada através de gaze dobrado 4 vezes, recolhendo-a em cálice de sedimentação de capacidade de 250 mL.
- 4- Adicionou-se água destilada, até completar aproximadamente $\frac{3}{4}$ do volume do cálice cônico. Deixou-se a suspensão em repouso no período de 12 horas.

- 5- O sobrenadante foi desprezado, e com auxílio de um canudo plástico, foi coletada uma pequena porção do sedimento na camada inferior, e depositado sobre uma lâmina de vidro.
- 6- Com auxílio de uma pipeta Paster de 1 mL foi adicionada uma gota de lugol, coberta com uma lamínula e em seguida foi analisado.
- 7- A análise foi ao microscópio, para detectar a presença de ovos, larvas e cistos ou oocistos.

Observação: *De cada amostra foram confeccionadas 5 lâminas, para leitura microscópica.*

Considerou-se positivo o encontro de qualquer estrutura parasitária, independente da quantidade, que foram anotados nos mapas de trabalho previamente preenchidos no início das atividades.

4.13. Detecção Molecular de DNA bacteriano

Além da detecção de anticorpos e antígenos para *H. pylori*, também foram aplicadas técnicas de biologia molecular, nas amostras fecais, para confirmar o diagnóstico da infecção, por detecção direta do DNA bacteriano.

4.13.1. Extração de DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi extraído utilizando o *QIAamp DNA mini Kit* (QIAGEN, ALEMANHA), a técnica foi ajustada para extração de DNA de amostras fecais. Como segue:

- 1- Separar as amostras fecais e deixar a temperatura ambiente por 10 minutos
- 2- Pesar uma alíquota de 0,5 gramas, que deverá ser acondicionada em tubos Falcon.
- 3- Acrescentar ao tubo Falcon 1,5 mL de tampão PBS e Homogeneizar.
- 4- Agitar manualmente e depois rapidamente no *Vortex*, e em seguida colocar por 15 minutos em agitador horizontal.
- 5- Centrifugar a 3.000 rpm durante 15 minutos.
- 6- Retirar 400 μ L do sobrenadante, e repassar para um eppendorf devidamente identificado. Adicionar 20 μ L de *PROTEINASE K* e 200 μ L de Tampão *ATL*, misturar no vortex, e incubar a 56^oC em banho Maria durante 2 horas.
- 7- Centrifugar a 3.000 rpm durante 1 minuto.
- 8- Adicionar 200 μ L de tampão de lise *AL* do kit, homogeneizar e incubar em banho Maria a 70^oC, durante 10 minutos.
- 9- Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
- 10- Adiciona 200 μ L de Etanol. Transferir toda a suspensão para as colunas de rotação do kit, devidamente identificadas.
- 11- Centrifuga a 8.000 rpm durante 1 minuto, e descarta o fluido inferior do eppendorf.
- 12- Acrescenta 500 μ L de tampão de lavagem *AWI*, centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm, e descarta o fluido inferior do eppendorf.

- 13- Acrescenta 500 μL de tampão de lavagem *AW2*, centrifuga por 3 minuto a 14.000 rpm, descarta o fluido inferior do eppendorf e repete o processo.
- 14- Adicionar 200 μL de tampão *AE* do kit, e deixa a temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto.
- 15- Descartar a coluna de rotação, e estocar o DNA a -20°C .

4.13.2. Análise e quantificação de DNA total

As amostras de DNA extraídas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 2 mM), e corados com brometo de editio, com a finalidade de verificar a integridade e a qualidade da amostra. A visualização foi realizada em um transiluminador ultravioleta e registrada fotograficamente. O DNA foi estocado a -20°C até sua utilização.

4.13.3. Identificação molecular da *H. pylori*

4.13.3.1. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para detecção do DNA bacteriano, foi amplificado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) um segmento gênico presente em todas as cepas de *H. pylori*.

Os pares de *primers* (oligodesoxinucleotídeos iniciadores), que foram usados para caracterização da *H. pylori* estão listados na tabela 8. O volume final das misturas de PCR foi de 25 μL , contendo 10 μM de cada primer, 1X PCR tampão, 1,0 mM de MgCl_2 , 10 mM de cada base nitrogenada, 0,3 unidades de enzima Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen, Brasil), 1 μL de DNA e água estéril.

Para detecção do DNA da bactéria foram utilizados os *primers RNAr16S* que amplificam um fragmento gênico de 1200bp do gênero *Helicobacter* e os *primers P1 e P2*, os quais amplificam um fragmento gênico de 298 pb que codifica uma proteína antigênica de 26kDa espécie específica da *H. pylori*. Somente os pacientes que amplificaram para o *primers 16S rRNA*, foram tipificados para P1 e P2.

Para detecção das linhagens virulentas da *H. pylori*, também serão realizadas PCRs, para confirmar o diagnóstico da infecção por cepas tipo I, através da detecção direta do gene *cagA*, os *primers* utilizados estão descritos na tabela 08 e as condições de PCR descritas na tabela 09.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Eppendorf, seguindo a programação descrita na tabela 09, e o produto desta amplificação foi monitorado em eletroforese de gel de agarose a 1,5% (Amresco), corado com brometo de etídio (10 µg/mL), sendo visualizados em um transiluminador ultravioleta e registrados fotograficamente.

4.14. Análise Estatística

Serão empregados testes estatísticos adequados para detectar ou não as diferenças entre as proporções amostrais entre o grupo objeto de estudo. O programa de computador utilizado será o BioEstat 3.0 (AYRES, 2007). A significância estatística será aceita ao nível de 95%.

Tabela 8- Lista de iniciadores utilizados na detecção molecular da *H. pylori* por PCR

Região Amplificada	Designação do Primer	Sequência	Tamanho do amplicom (pb)	Referência
<i>RNAr16S</i>	<i>16SF</i>	5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3'	700	Atherton <i>et al.</i> , 1995.
	<i>16SR</i>	5'-CTCACGACACGAGCTGAC-3'		
<i>Ag</i>	<i>P1F</i>	5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3'	298	Chattopadhyay <i>et al.</i> , 2004.
	<i>P2R</i>	5'-CCTGCTGGGCATACTTCACCATG-3'		

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

Tabela 9- Tempos, temperatura e números de ciclos das reações de PCR para cada iniciador

Iniciador	<i>Etapa Inicial</i>		35 ciclos						<i>Etapa Final</i>	
	<i>Desnaturação</i>		<i>Desnaturação</i>		<i>Anelamento</i>		<i>Extensão</i>		<i>Extensão</i>	
	<i>Temp</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temp</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temp</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temp</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temp</i>	<i>Tempo</i>
			^o C	min	^o C	min	^o C	min	^o C	min
<i>16S rRNA</i>	94	5	95	1	58	1	72	1	72	10
<i>Ag</i>	94	5	95	1	58	1	72	1	72	10

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

5. RESULTADOS

Esta pesquisa analisou indivíduos residentes em comunidades ribeirinhas do município de Coari, tendo como ponto central a infecção pela bactéria *H. pylori*, que foi detectada através de três métodos de diagnóstico: A sorologia, o antígeno fecal e PCR. A sorologia foi à técnica escolhida para relacionar com os aspectos epidemiológicos referentes ao estudo.

5.1. Análise sorológica e de antígeno fecal para infecção por *H. pylori* pelos testes de ELISA

Entre os 200 indivíduos testados sorologicamente para determinar a infecção por *H. pylori*, as frequências obtidas de positividade e negatividade foram de 83,5% (167/200) e 16,5% respectivamente, e estão demonstrados na figura 10.

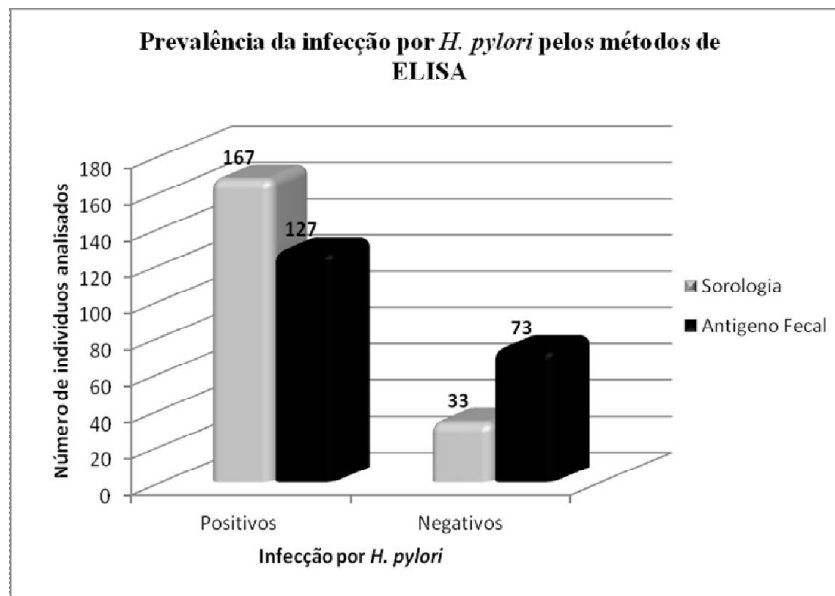


Figura 10- Prevalência da infecção por *H. pylori* pelos métodos de ELISA
 FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

Os resultados detectados pelo teste de determinação de antígenos fecais bacterianos estão demonstrados na figura 10, sendo observado um menor percentual de infecção atual, quando comparado ao método sorológico, sendo observado um número maior de indivíduos negativos para infecção (73/200) do que os obtidos pela sorologia (33/200).

As comparações da detecção pelos dois métodos de ELISA estão demonstradas na tabela 10. Observa-se que 70% (140/200) dos indivíduos analisados demonstraram concordância nos resultados dos testes aplicados, porém 30% do total da amostra (60/200) apresentaram resultados discordantes, sendo a associação positiva para sorologia e negativa para antígenos fecais bacterianos, a mais prevalente, com número total de 50 em um universo total de 60 indivíduos, não sendo encontrada significância estatística, $GL= 1$; $X^2= 0,002$; $(p)= 0,8679$.

Tabela 10- Comparação de detecção da infecção por *H. pylori* através do método ELISA Sorológico e Fecal

Testes Concordantes		n	N	%	*(p)
Sorologia	Antígeno Fecal				
+	+	117	140	70	
-	-	23			
Testes Discordantes		n	N	%	0,8679
Sorologia	Antígeno Fecal				
+	-	50	60	30	
-	+	10			
Total		200	200	100	

*n= subtotal; N= total *(p)=valor de para teste de X^2*

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

5.2. Análise epidemiológica relacionada à sorologia para *H. pylori*

5.2.1. População estudada

Os resultados obtidos nas análises do universo populacional estudado estão representados na figura 11, e revela que a população foi constituída de 200 indivíduos dos quais 110 (55%) eram crianças, na faixa etária de 0 a 17 anos, e 90 (45%) adultos na faixa etária de 18 a 78 anos. A soropositividade para *H. pylori* foi maior entre os adultos de que entre as crianças com percentuais de 93,3% (84/90) e 75,5% (83/110) respectivamente. A análise estatística revelou diferenças significativas para esta associação com $GL=1$; $X^2= 11.484$; $(p)= 0.0007$.

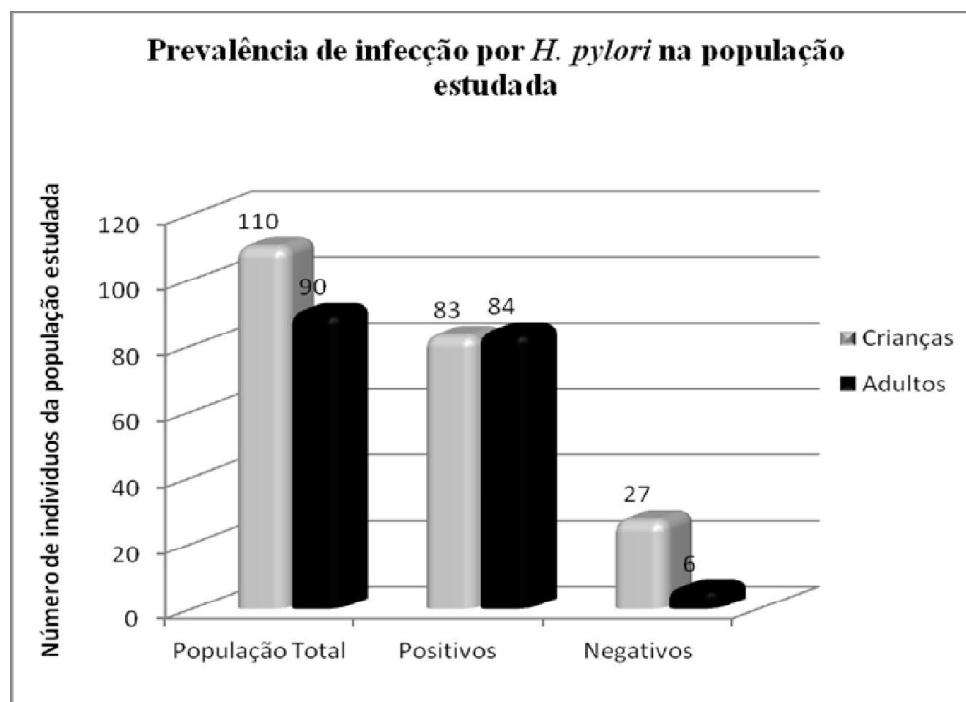


Figura 11- Prevalência da infecção por *H. pylori* na população estudada
 FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

A tabela 11 demonstra de forma característica e bem determinada à comparação da concordância e discordância obtidas para aplicação dos métodos de

ELISA na população, cujas diferenças estatisticamente foram significativas ($p=0.0028$), sendo observado um maior percentual de testes concordantes assim como discordantes entre a população infantil estudada, com percentuais de 52,7% (73/140) e 61,7% (37/60) respectivamente, sendo que houve predomínio de discordância na associação sorologia positiva e antígeno fecal negativo.

Tabela 11- Comparação da concordância e discordância nos testes de ELISA na população geral analisada

Testes Concordantes		N		n		%	
Sorologia	Antígeno Fecal	Adultos	%n	Crianças	%	Total	Amostra
+	+	63	45,0	54	38,5	117	58,5
-	-	4	2,9	19	13,6	23	11,5
Total da Amostra		67	47,9	73	52,1	140	70
Testes Discordantes		N		n		%	
Sorologia	Antígeno Fecal	Adultos	%n	Crianças	%	Total	Amostra
+	-	21	35,0%	29	48,3	50	25,0
-	+	2	3,3%	8	13,4	10	5,0
Total da Amostra		23	38,3%	37	61,7	60	30
Total da População		90	45,0	110	55,0	200	100

$GL=3$; *Teste-G (Williams)* = 14.0643; (p) = 0.0028

n= subtotal da população geral; N= total da Amostra; %n= percentual do subtotal da população geral

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

5.2.2. Sintomatologia observada

Considerando-se os 200 indivíduos analisados, quanto à sintomatologia, 69 foram classificados como sintomáticos, pois apresentavam pelo menos 03 sintomas dispépticos, enquanto que 131 foram classificados como assintomáticos, pois não apresentavam sintomas ou não atingiram o número limitante de sintomas. A associação

sintomática com a soroprevalência da infecção por *H. pylori* estão demonstradas na tabela 13, sendo observado que a infecção atinge frequências de positividade maiores entre os indivíduos assintomáticos com percentual de 64,7% (107/167), porém não revelaram estatísticas significativas.

Tabela 12- Associação de quadros sintomáticos e assintomáticos com a infecção por *H. pylori*

	Indivíduos				N	%
	Sintomáticos	%	Assintomáticos	%	Total	Total
Sorologia						
+	60	35,9	107	64,1	167	100
-	9	27,3	24	62,7	33	100
Total	69	34,5	131	65,5	200	100

$GL= 1; X^2 = 0.914; (p) = 0.3392$

N= total da Amostra;

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

Os principais sintomas clínicos mais comumente relatados pelos indivíduos sintomáticos estão representados na tabela 12, podendo ser caracterizado como o local da dor e o tipo de alteração apresentada.

Baseados nas informações dos pacientes e exames físicos primários, realizados pelo médico e/ou enfermeiro que participaram do projeto, a sintomatologia mais frequentemente relatadas foram: Dor epigástrica 81,2% (52/64), dor abdominal 73,4% (47/64) e Pirose 62,5% (40/64), sendo observado que a infecção atingiu uma porcentagem de 100% nos indivíduos que apresentavam dor gástrica centralizada.

Tabela 13- Principais sintomas apresentados pela população estudada associados à soroprevalência de infecção por *H. pylori*

Sintomas	NT	%	Hp +	%
Anorexia	26	40,6	21	80,8
Apática	22	34,4	20	91,0
Dor abdominal	47	73,4	41	87,2
Diarreia	38	59,4	34	89,5
Dor epigástrica	52	81,2	44	84,6
Dor gástrica	3	4,7	3	100
Náuseas/Vômito	39	61,0	34	87,2
Emagrecimento	39	61,0	36	92,3
Pirose	40	62,5	35	87,5
Plenitude gástrica	38	59,4	34	89,5
Tumoração palpável	21	32,8	20	95,2

NT= número total de indivíduos; Hp= *H. pylori*

FONTE: GUIMARÃES J., 2012

5.2.3. Variáveis epidemiológicas analisadas

A análise referente aos fatores causais da infecção por *H. pylori* na população investigada estão apresentadas na tabela 14, entre as variáveis estudadas e as categorias expostas inclui-se: Sexo, idade, estrutura da moradia, número de indivíduos por cômodo, canalização da água, tratamento da água de consumo, esgoto sanitário e renda familiar.

Quando comparados os sexos feminino e masculino, foi observado que houve um predomínio de indivíduos do sexo feminino com 134/200 representantes. Quando associada à infecção por *H. pylori* e a variável sexo, diferenças significativas não foram encontradas.

Em relação à idade constataram-se diferenças estatisticamente significativas quando associadas com a infecção, sendo observado um maior percentual de adultos infectados 93,3% (84/90). No entanto o número de crianças na população geral, na faixa etária de 0-17 anos, tenha apresentado um maior com 110/200 indivíduos.

A análise das condições de moradia da população ribeirinha evidenciou que a maioria das casas são estruturadas em madeira 162/200; que a aglomeração familiar com indicativo de mais que quatro indivíduos por cômodo, foram observada em 136 dos 200 indivíduos e que 138/200 indivíduos não apresentam água canalizada. Porém diferenças significativas não foram encontradas para estas associações e a infecção por *H. pylori*, embora tenha sido observando taxas elevadas de positividade a infecção bacteriana para todas estas variáveis, com taxas de 84,6%, 84,5% e 80,4%, respectivamente.

Tabela 14- Análise das variáveis epidemiológicas associadas à infecção por *H. pylori* mediante o teste sorológico

Variável	Hp Positivo		Hp Negativo		NT	Estatística
	n	%NT	n	%NT		
Sexo						
Masculino	49	74,2	17	25,8	66	$X^2 = 5.166$
Feminino	118	88,1	16	11,9	134	(<i>p</i>) = 0.0230
Total	167	83,5	33	16,5	200	
Idade						
0 -17	83	75,4	27	24,6	110	$X^2 = 10.223$
18-78	84	93,3	6	6,7	90	(<i>p</i>) = 0.0014
Total	167	83,5	33	16,5	200	
Estrutura da Moradia						
Madeira	137	84,6	25	15,4	162	Teste G de
Tijolos	8	57,1	6	42,9	14	Williams=
Palha	14	87,5	2	12,5	16	7.8930
Taipa	8	100	-	-	8	(<i>p</i>) = 0.0483
Total	167	83,5	33	16,5	200	
Número de indivíduos por cômodo da casa						
1-3	52	81,2	12	18,8	64	$X^2 = 0.346$
≥ 4	115	84,5	21	15,5	136	(<i>p</i>) = 0.7011
Total	167	83,5	33	16,5	200	
Água: Canalização						
Interna						
Sim	56	90,3	6	9,7	62	$X^2 = 3.036$
Não	111	80,4	27	19,6	138	(<i>p</i>) = 0.1244
Total	167	83,5	33	16,5	200	
Tratamento da água de consumo						
Sim	14	32,5	29	67,5	43	Teste G de
Não	153	97,4	4	2,6	157	Williams=
Total	167	83,5	33	16,5	200	0,3397 (<i>p</i>) = 0.7742
Esgoto sanitário: Canalizado e fossa séptica						
Sim	4	19,0	17	81,0	21	Teste G de
Não	163	91,0	16	9,0	179	Williams=
Total	167	83,5	33	16,5	200	48,4618 (<i>p</i>) = <0.0001
Renda Familiar						
≤ 1 salário mínimo	132	81,7	25	18,3	157	$X^2 = 0.604$
≥ 1 salário mínimo	35	87,3	8	12,7	43	(<i>p</i>) = 0.4371
Total	167	83,5	33	16,5	200	

Hp= *Helicobacter pylori*

FONTE: GUIMARÃES J., 2012

Em relação ao tratamento da água de consumo, 97,4% da população que relatou não tratar a água, demonstrou-se soropositiva à infecção por *H. pylori*, porém não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas, assim como para a variável socioeconômica renda familiar, embora tenha sido constatado que 78,5% (157/200) tenham renda inferior ou igual a um salário mínimo, e apresentem taxa de infecção elevada.

Por outro lado quando da associação da presença ou não de esgoto sanitário e fossa séptica e a soropositividade à infecção, diferenças significativas foram encontradas, e demonstram um predomínio de indivíduos infectados que não possuem esgoto sanitário, com percentual de 91% (163/179).

5.3. Análise dos antígenos de grupos sanguíneos relacionados à sorologia

A analisada da distribuição dos fenótipos dos grupos sanguíneos ABO e Lewis, assim como o estado secretor ABH na população estudada relacionadas à infecção esta apresentada na tabela 15. Verificou-se a prevalência do fenótipo A Le (a+b+) e estado secretor de substância ABH na população estudada, assim como entre os indivíduos soropositivos para a infecção.

As frequências observadas na população foram: 47,9 % de indivíduos do grupo sanguíneo A positivos para infecção, 74,2% de indivíduos do grupo sanguíneo Lewis (a+b+) e 95,2% de indivíduos positivos para infecção secretores de substâncias, embora não tenham sido observadas diferenças significativas na associação destes fenótipos com a infecção bacteriana.

Tabela 15- Prevalência dos grupos sanguíneos ABH e Lewis entre os indivíduos estudados

Fenótipos Eritrocitários	Indivíduos				Total	*p
	Hp+	%	Hp -	%		
ABO						
O	26	15,6	12	36,4	38	$X^2 = 11.230$ (p) = 0.0105
A	80	47,9	9	27,3	89	
B	35	21,0	4	12,1	39	
AB	26	15,5	8	24,2	34	
Total	167	100	33	100	200	
Lewis						
Le (a+b-)	3	1,8	3	9,0	6	Teste G de Williams= 5,7280 (p) = 0.1530
Le (a-b+)	23	13,8	7	21,2	30	
Le (a+b+)	124	74,2	19	57,6	143	
Le (a- b-)	17	10,2	4	12,2	21	
Total	167	100	33	100	200	
Estado secretor						
S	159	95,2	27	81,8	186	Teste G de Williams= 5,5215 (p) = 0.0188
NS	8	4,8	6	18,2	14	
Total	167	100	33	100	200	

Hp = *Helicobacter pylori*

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

5.4. Análise do enteroparasitismo associados à infecção por *H. pylori*

A prevalência de parasitismo associada à infecção bacteriana está demonstrada na tabela 16, e evidência um elevado percentual de indivíduos enteroparasitados na população geral analisada com porcentagem de 71,5 % (143/200), assim como para o quadro associativo com a infecção por *H. pylori*, que apresentou uma frequência de 71,25%, embora a associação estatística para estas variáveis não tenha sido significativa.

Tabela 16- Associação entre a infecção por *H. pylori* e os quadros de enteroparasitismo na população analisada

	Enteroparasitismo				N	%
	Positivo	%	Negativo	%	Total	Total
Sorologia						
Positiva	119	71,25	48	28,75	167	100
Negativa	24	72,73	9	27,27	33	100
Total	143	71,5	57	28,5	200	100

GL= 1; $X^2= 0,029$; (p)= 0,9680

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

O grau de parasitismo associado aos quadros de infecção bacteriana estão representados na figura 12, e demonstram que entre os quadros de enteroparasitismo predominou o diagnóstico de poliparasitismo (parasitismo por diferentes espécies) com um número de indivíduos total de 94/200, assim como entre os positivos para *H. pylori* poliparasitados com número de 77/167 indivíduos.

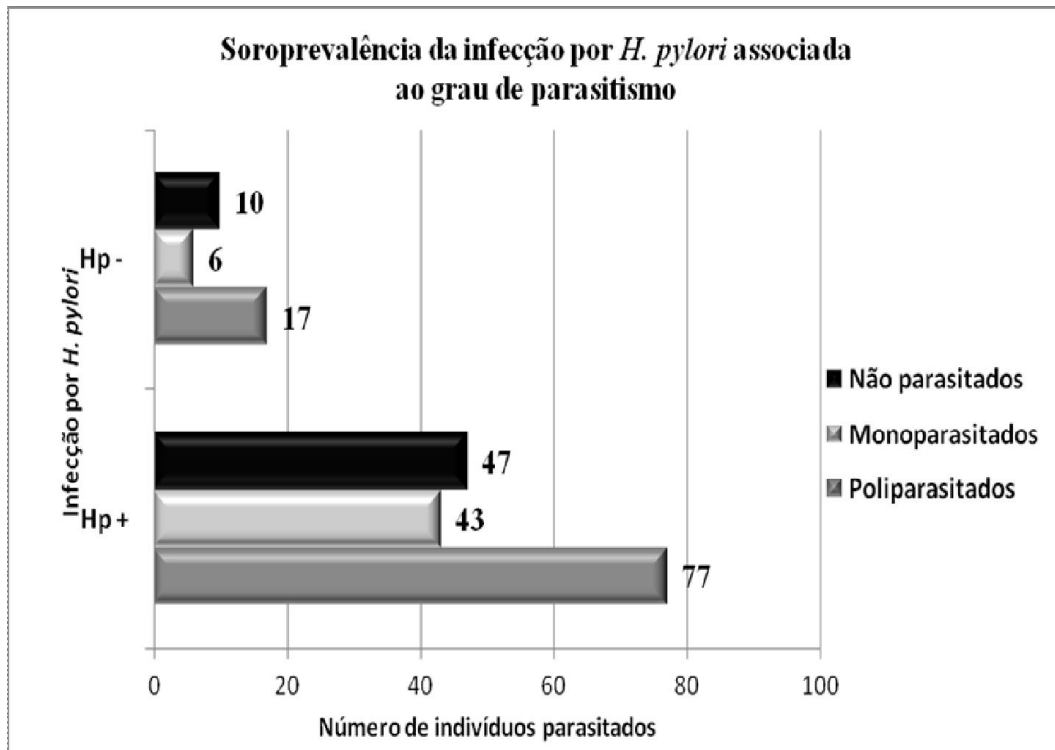


Figura 12- Soroprevalência da infecção por *H. pylori* associada ao grau de parasitismo na população estudada

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

A prevalência das espécies encontradas na população analisada está representada na figura 13, e demonstra claramente que entre os helmintos, os mais prevalentes foram: *Ascaris lumbricoides* 38,5%, *Trichiura trichiura* 35% e *Ancilostomideos* com 22,5%.

Entre os protozoários as espécies que apresentaram maior percentual foram *Endolimax nana* com 18,5% e *Entamoeba coli* com 17%.

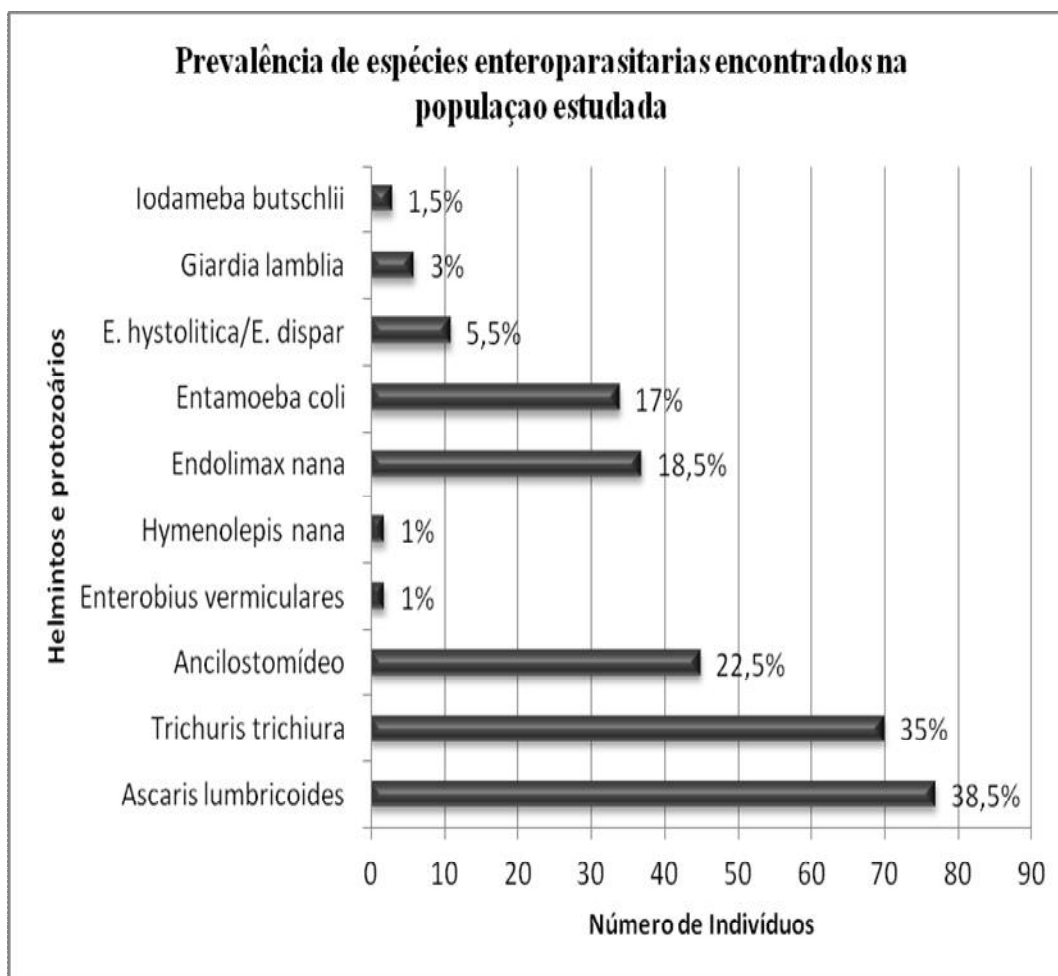


Figura 13- Prevalência de espécies enteroparasitárias encontradas na população estudada

FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

5.5. Detecção molecular da bactéria *H. pylori* nas amostras de fezes

Para estabelecer a amplificação dos fragmentos esperados, sem inespecificidade, foi necessário realizar ajustes em vários parâmetros do protocolo inicial para sua reprodução, os principais ajustes realizados consistiram: Concentração de DNA, número de ciclos do programa de amplificação e temperatura. As modificações e valores representados no quadro abaixo.

Ciclagem Inicial

94° 1 minuto
 63° 1 minuto
 72° 2 minutos

} 30 ciclos

- ▶ Temperatura de desnaturação inicial = 94° 5' minutos
- ▶ Aumento da temperatura de 58°C para 63°C
- ▶ Aumento do MgCl₂ para 3mM
- ▶ Diminuição de 40 ciclo para 30.
- ▶ Ciclo de temperatura de extensão final= 72° 7' minutos

Após estes ajustes os resultados da PCR com os iniciadores para o *gene RNAr16S* e *p1p2* mostraram resultado satisfatório, amplificando e classificando o gênero *Helicobacter ssp* e a espécie específica presente nas amostras analisadas.

5.5.1. Detecção de *Helicobacter ssp* pelo gene *RNAr16S*

No processo de ajuste e melhoramento da PCR, utilizando-se uma diluição de 1:4 de DNA genômico extraído das amostras fecais. A caracterização por PCR para o gene *RNAr 16S*, que amplifica um fragmento de 700 pb, e que identifica o *Helicobacter* gênero-específico, estão apresentados nas figura 14 e 15. Neste estudo para a validação dos iniciadores utilizados no ensaio copromolecular, foi realizada a PCR convencional e os resultados comparados às técnicas de ELISA.

O padrão de positividade pode ser observado nas figuras 14 e 15. Porém os resultados obtidos para esta caracterização não foram utilizados para diagnóstico específico da infecção por *H. pylori*, uma vez que detecta o gênero e não a espécie. O diagnóstico espécie específico foi realizado com base na detecção do gene *Ag*.

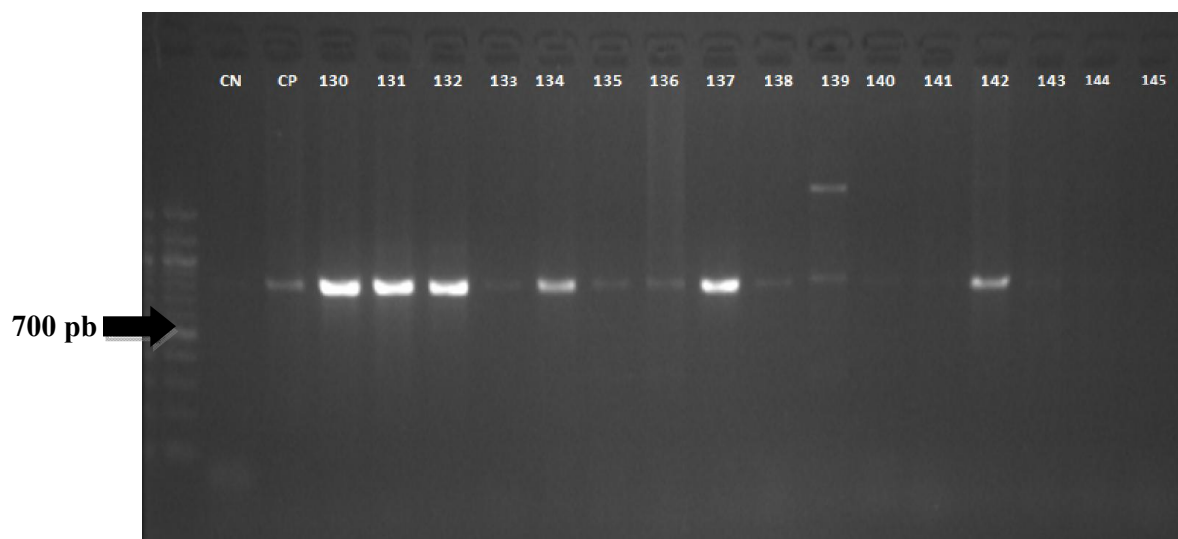


Figura 14- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S. Canaleta 1= Ledder padrão de peso molecular (100 pb, Promega); Canaleta CN= controle negativo; Canaleta CP= controle negativo; Canaletas de Amostras 130, 131,132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 142= **positivas** (banda de 700 pb); Canaletas de Amostras 133, 140, 141, 143, 144, 145= **negativas** (banda de 700 pb);
 FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

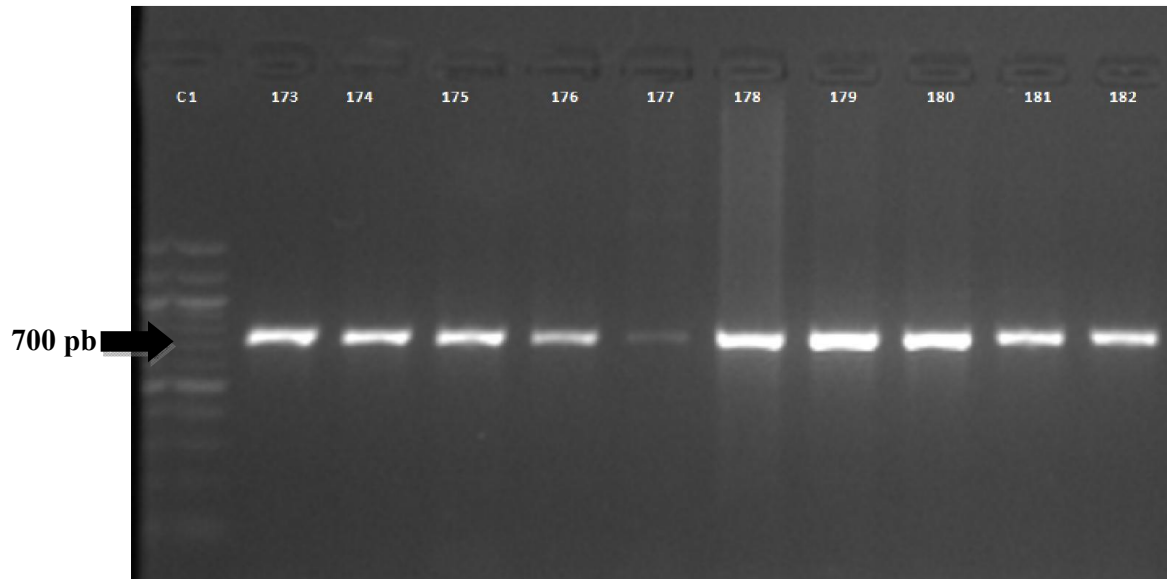


Figura 15- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o RNAr 16S. Canaleta C1= Ledder padrão de peso molecular (100 pb, Promega); Canaletas de Amostras 173, 174, 175, 176, 177,178, 179, 180, 181, 182 **positivas** (banda de 700 pb);
 FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

5.5.2- Detecção de *Helicobacter pylori* pelo gene *Ag*

Com o propósito de estabelecer um diagnóstico específico e confiável, a determinação copromolecular para detecção espécie-específica, foi realizada após os ajustes de PCR, através da amplificação de um fragmento de 298pb do gene *Ag*, utilizando os iniciadores *p1* e *p2* que permitem identificar a *H. pylori*. Os resultados da PCR podem ser vistos nas figuras 16 e 17.

Os resultados da PCR com os iniciadores *p1* e *p2* indicaram uma prevalência molecular de infecção de 56,7% (113/200) na população geral estudada, tabela 17.

A comparação da prevalência da infecção por *H. pylori*, obtidas através dos três diferentes métodos de detecção, estão demonstradas na tabela 17. Entre as frequências demonstradas observa-se que a PCR foi o método com menor número de indivíduos positivos (113/200), embora apresente os maiores índices de sensibilidade 79% e especificidades 100%. Por outro lado o método de detecção de antígenos fecais evidenciou o maior número de indivíduos negativos com taxas de 36,5% (73/200).

Tabela 17- Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* nos testes sorológico, fecal e copromolecular p1p2

	Indivíduo				Estatística			
	Positivo	%	Negativo	%	Ntotal	*p	Sensibilidade	Especificidade
Teste								
Sorologia	167	83,5	33	16,5			55,85%	63,23%
Antígeno Fecal	127	63,5	73	36,5	200	<0.0001	61,8%	72,4%
PCR	113	56,5	87	43,5			79,9%	100%

GL= 2; $X^2 = 35.992$;

FONTE: GUIMARÃES J.; 2012

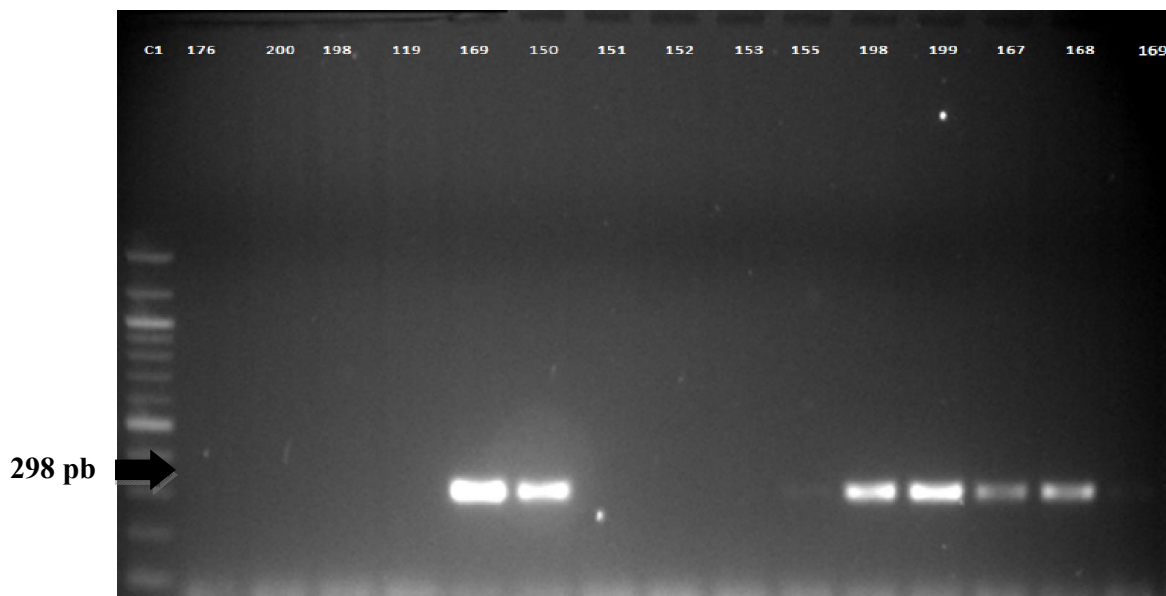


Figura 16- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o Ag, através dos primers p1 e p2. Canaleta C1= ledder padrão de peso molecular (100pb, Promega); Canaletas de amostras 176, 200, 196, 150, 152, 153, 155, 169 **negativas**. Canaletas de amostras 169, 150, 198, 199, 167, 168 **positivas** banda de 298 pb)
 FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

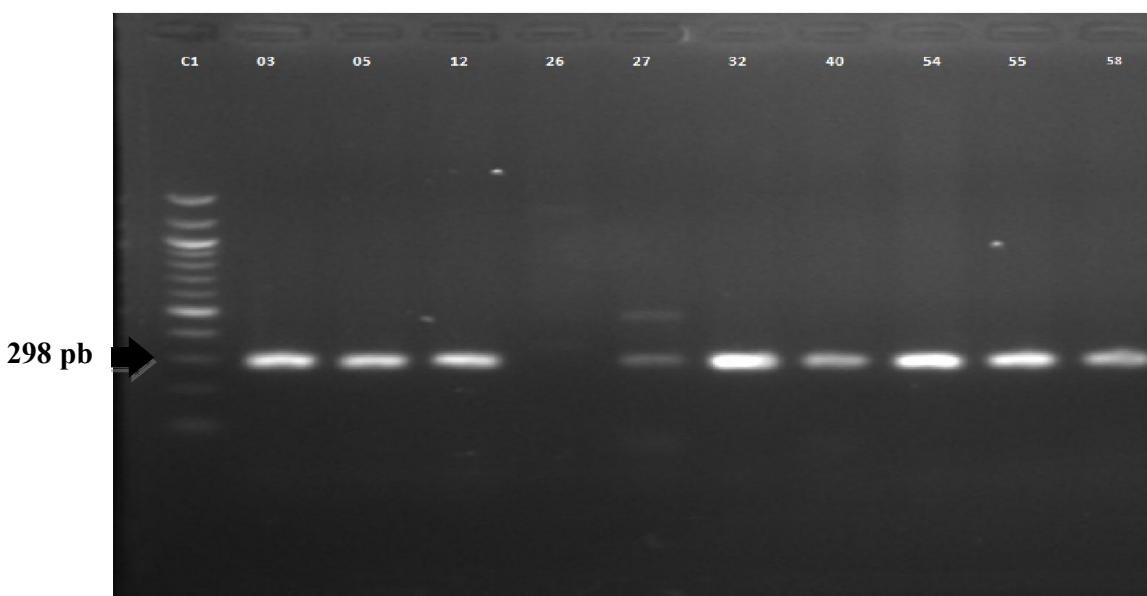


Figura 17- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica o Ag, através dos primers p1 e p2. Canaleta C1= ledder padrão de peso molecular (100pb, Promega); Canaletas de amostras 01, 03, 05, 12, 27, 32, 40, 54, 55, 58 **positivas**. Canaletas de amostra 26 **negativa** (banda de 298 pb)
 FONTE: GUIMARÃES J., 2012.

Para confirmação dos resultados obtidos analisou-se a similaridade e a discrepância entre as técnicas de detecção, tabela 18, que demonstra os quadros de concordância e discordância, observados entre os quatro testes para detecção da infecção bacteriana. Entre os parâmetros expostos foi observado que 46,5% da população apresentaram concordância para os quatro tipos de detecção, enquanto 63,5% apresentaram discordância entre os métodos.

Tabela 18- Comparação da concordância e discordância entre os testes de ELISA e PCR

Testes Concordantes					
Sorologia	Antígeno Fecal	PCR 16S	PCR p1p2	N	%
				Total	Amostra
+	+	+	+	75	37,5
-	-	-	-	18	9,0
Total da Amostra				93	46,5
Testes Discordantes					
Sorologia	Antígeno Fecal	PCR 16S	PCR p1p2	N	%
				Total	Amostra
+	+	+	-	15	7,5
+	+	-	+	23	11,5
+	+	-	-	9	4,5
+	-	+	+	8	4,0
+	-	+	-	7	3,5
+	-	-	+	6	3,0
+	-	-	-	29	14,5
Total da Amostra				97	48,5
-	+	+	+	5	2,5
-	+	+	-	2	1,0
-	+	-	+	1	0,5
-	+	-	-	2	1,0
Total da Amostra				10	5,0
Total da População				200	100

FONTE: GUIMARÃES J.; 2012

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos epidemiológicos têm sido realizados com a finalidade de verificar a prevalência da infecção por *H. pylori* em diferentes regiões do país, porém no norte do Brasil, especificamente no estado do Amazonas, não temos relatos de pesquisas a respeito da bactéria *Helicobacter pylori*. Dessa maneira, este estudo além de pioneiro, pois se concentrou em populações ribeirinhas amazônicas, evidenciou uma elevada taxa de infecção tanto nos testes de ELISA, quanto na análise copromolecular, e são concomitantes com relatos literários de estudos realizados no estado do Pará com médias de soroprevalência de 75% para a população adulta e 80% para a população infantil, na faixa etária de 01 a 12 anos (SAGICA, 2000; AGUIAR, 2000; MARTINS, 2001).

Os resultados pareados dos testes de ELISA revelaram que embora a infecção tenha sido mais elevada entre os adultos, as diferenças significativas obtidas para a associação da infecção e a faixa etária, demonstra que as crianças na faixa etária de 1 a 17 anos, foram mais susceptíveis à infecção, e estão de acordo com dados na literatura que mostram que na infância ocorre um rápido aumento das taxas de infecção, predominantemente nos dez primeiros anos de vida (GUIMARÃES, 2003). Embora não se possa relacionar diretamente o risco aumentado de infecção nesta faixa etária, uma vez que a maioria dos indivíduos estudados eram crianças.

Os testes sorológicos, apesar de terem sido descritos logo após a descoberta da *H. pylori*, ainda se encontram em desenvolvimento. Neste estudo optou-se pelo método ELISA devido a sua simplicidade de execução e baixo custo. No entanto os desempenhos dos testes de ELISA podem variar, fato claramente observado neste estudo, uma vez que foram detectadas discrepâncias nos resultados comparativos entre

os testes sorológicos e de antígeno fecal, em um total de 30% da amostra, sendo que a maioria das discordâncias foram observadas nas crianças, este achado pode em parte se explicado, pelo fato destes pacientes possivelmente ainda não produziram anticorpos contra a bactéria, suficientes para serem detectados sorologicamente.

Tem sido descrito que o teste ELISA nas fezes apresenta sensibilidade e especificidade mais elevadas em comparação aos testes sorológicos (BRADEN, 2001; KABIR, 2001; YAÑEZ, 2000), esta situação foi claramente estabelecida nesta pesquisa, uma vez que foram observados, um maior número de indivíduos negativos para a infecção bacteriana. A possível explicação para estes resultados concentra-se no fato, dos testes de antígeno fecal, determinarem a infecção ativa no indivíduo, enquanto que o sorológico detecta anticorpos circulantes que podem ser oriundo de uma infecção prévia não atual.

Quanto à sintomatologia, atualmente existem muitas evidências de que o *H. pylori* está diretamente envolvido na patogênese de alterações gástricas (MORRIS & NICHOLSON, 1987), uma vez que o estudo selecionou indivíduos que apresentam ou não sintomas associados a distúrbios dispépticos, os resultados obtidos para esta associação não demonstraram uma correlação clínica direta; fato explicado pois embora a infecção bacteriana seja considerada uma infecção crônica, ela apresenta um longo período assintomático e potencialmente grave.

A relação da prevalência da infecção associada aos indicadores sócio-econômicos têm sido descrita em vários estudos epidemiológicos (KODAIRA *et al* 2002; EVERHART, 2000; AL-MOAGE *et al*, 1990). Neste estudo também fica clara a associação destes fatores contextuais, decorrentes do baixo padrão socioeconômico, com a presença da soropositividade. Neste sentido, as análises das variáveis epidemiológicas

que poderiam estar contribuindo para à infecção, demonstraram que em um ambiente onde a higiene é precária e as condições de saneamento não são favoráveis, as taxas de infecção são mais elevadas. Dessa maneira nos resultados obtidos para a associação da infecção com estas variáveis reforçam este fato, pois as comunidades ribeirinhas amazônicas apresentam em maior expressividade estas características ambientais e sócio-econômicas.

A relação estatística significativa encontrada na relação idade/infecção bacteriana, foi similar a estudos que demonstrado que a aquisição do patógeno ocorre nos 10 primeiros anos de vida (TORRES *et al.*, 2000; KODAIRA *et al.*, 2002).

As diferenças significativas obtidas para a variável esgoto sanitário evidenciam que embora o mecanismo exato de transmissão do *H.pylori*, ainda seja desconhecido, estes resultados sugerem que nesta população, a via fecal-oral seja a rota de transmissão mais viável, pois estudos relatam que em populações com pouca infraestrutura, esta seja a possível rota de transmissão (CELLINI *et al.*, 1999, THOMAS *et al.*, 1992). Nestas populações o depósito de excretas é feito tanto em fossa aberta, quanto em fossa asséptica, que possivelmente podem contaminar a água ou poços perfurados em locais inadequados (SHAHAMAT *et al.*, 1993), e uma vez que as populações ribeirinhas são em sua maioria servidas por água não canalizada (138/200) e consomem água não tratada (157/200), estes fatores podem, nesta população, contribuir para um risco aumentado de infecção.

Particularmente na infância, um forte fator de aquisição da doença está relacionado com a alta densidade de habitantes na moradia e a interligação entre os que convivem na mesma casa e dividem o mesmo quarto facilita a transmissão da bactéria (GOODMAN *et al.*, 1996; GRAHAM *et al.*, 1991; MENDALL *et al.*, 1992;

MITCHELL *et al.*, 1992; PEREZ-PEREZ *et al.*, 1990) . Estes estudos também sugerem que os membros da família compartilham uma predisposição genética à infecção pela bactéria e que os familiares são expostos a uma fonte comum de infecção, e que esta transmissão dentro de um grupo familiar é facilitado entre os membros da família por causa do contato interpessoal íntimo. Os dados encontrados no presente estudo, mostram que as crianças cuja relação individuo/cômodo seja superior a 4, apresentam maior soroprevalência para a infecção, o que caracteriza principalmente a população de baixo nível sócio econômico onde o número de moradores é maior, convivendo em espaços pequenos e assim estabelecendo-se conglomerados humanos favorecendo a transmissão pessoa-pessoa. Neste sentido, obviamente, foi encontrada relação entre a renda familiar e a prevalência da bactéria, já que esta característica é um excelente indicador de condição sócio-econômica (GRAHAM *et al.*, 1991).

Entre os fatores genéticos de importância para um risco maior de infecção por *H. pylori* estão os antígenos de grupos sanguíneos ABH e Lewis (BORÉN *et al.*, 1993; ILVER *et al.*, 1998). A maioria das bactérias *H. pylori* permanecem livres no meio gástrico. Contudo, uma parte desta população ataca a mucosa gástrica e pode esporadicamente inclusive entrar e sobreviver dentro das células epiteliais gástricas, desempenhando uma função vital na manutenção da infecção (KIRSCHNER & BLASER, 1995). Sendo que vários estudos tem consistentemente demonstrado que a *H. pylori* utiliza adesinas do tipo lectinas, chamada Bab A, presentes na sua superfície, para ligar-se aos receptores de grupos sanguíneos na camada de muco e na superfície das células epiteliais (LELWALA-GURUGE *et al.*, 1993; WADSTROM *et al.*, 1997).

Alkout *et al.* (1997) demonstraram que a fucose, determinante dos antígenos H e Le^b representa um importante receptor expresso na mucosa

gastroduodenal aos quais adere o *H. pylori* e os fenótipos O e Le(a-b+) expressam uma grande quantidade destes antígenos fucosilados em comparação com outros grupos, logo a sua expressão elevada seria relevante na relação entre este grupo sanguíneo e a infecção por *H. pylori*. Neste estudo, a distribuição dos fenótipos Lewis e Estado Secretor ABH não mostraram diferenças significativas entre os indivíduos analisados. Contudo, foi detectada uma forte associação entre o grupo sanguíneo Lewis ab/estado secretor e a infecção causada pelo *H. pylori*, o que é reforçada pelos dados obtidos de outros estudos, como o de Lin *et al.* (1998) que constataram uma elevada frequência da infecção entre os indivíduos com estes fenótipo, em pacientes acometidos com doenças gastroduodenais, estas observações apoiam a hipótese de que as pessoas do tipo sanguíneo Lewis b possuem maior susceptibilidade a infecção por *H. pylori*, uma vez que a bactéria utilizaria este marcador molecular como provável sítio de adesão a mucosa gástrica (MATOS *et al.*, 2002).

As enteroparasitoses humanas se revestem de importância devido à sua ampla distribuição e seus efeitos nutricionais e imunológicos sobre o hospedeiro. Por outro lado, acredita-se que a infecção pelo *H. pylori* possa ter um possível efeito protetor contra outros patógenos gastrointestinais, que produzem diarreia. Foi observado que o *H. pylori* está associado com a proliferação de células da mucosa gástrica que secretam IgA e produz peptídeos antibacterianos, para os quais ela própria é resistente, mas que pode matar outras bactérias que entram no estômago (PÜTSEP *et al.*, 1999).

Levando em conta tais considerações, este estudo examinou os efeitos concorrentes de enteroparasitoses e a infecção por *H. pylori*, visto que em populações ribeirinhas a infecção por parasitas intestinais é particularmente comum na infância (SANTOS *et al.*, 2011). Foi observada que 71,25 dos indivíduos infectados pelo *H.*

pylori também apresentavam enteroparasitoses. A importância de tal achado é clara, uma vez que precárias condições socioeconômicas em relação ao saneamento mostram estar associados com específicos tipos de doenças nos países em desenvolvimento. Se estas diferenças refletem apenas a pobreza ou podem de alguma maneira ser influenciadas pelo *H. pylori* não está claro, pois diferenças significativas não foram observadas na associação.

A infecção pela *H. pylori* na população estudada foi diagnosticada por três métodos diferentes: O Sorológico, o Antígeno Fecal e PCR. Os resultados indicam que a PCR detectou um menor percentual de soropositividade quando comparados aos testes de ELISA. Este fato pode ser explicado em parte, pois a PCR utilizou DNA genômico extraído das fezes, sendo utilizado da amostra total do bolo fecal, apenas 0,5 gramas da qual foi extraído o DNA, o que possivelmente pode ter diminuído as taxas de densidade bacteriana na amostra. Contudo a taxa de 56,5% de positividade obtida através do ensaio copromolecular, evidência que o método de extração padronizado e utilizado é altamente eficiente na remoção de inibidores da PCR (MAPSTONE et al, 1993; OLIVEIRA et, al, 1994).

Outro fator que poderia explicar a menor detecção da infecção pela PCR, é o fato da *H. pylori* não ser um patógeno intestinal, logo é esperado pequenas taxas de densidade bacteriana nas amostras fecais, além do fato é que através da PCR o DNA do microorganismo pode ser detectado mesmo quando há pouca quantidade de células, o que não necessariamente implica que há vitalidade celular, dessa maneira o status da infecção poderia influenciar a densidade microbiana encontrada nas fezes (KABIR, 2001). Vale ressaltar que, os testes empregados neste estudo e correlacionados com a PCR de fezes, foram há muito tempo padronizados e são utilizados na prática clínica e

laboratorial com grande frequência para tanto, por outro lado a PCR nas fezes e um teste praticamente recente mas com grandes vantagens, é uma nova técnica de diagnóstico que vem se dispondo a serviço da identificação deste microorganismo.

Através da PCR efetuadas no estudo, 03 jogos de iniciadores foram utilizados. As reações com iniciadores p1/p2 são baseadas na sequencia de DNA de uma proteína espécie-específica presente em todas as cepas de *Helicobacter pylori* e que não hibridizam com outras bactérias entéricas presentes, evidenciando a validação do ensaio copromolecular utilizando estes iniciadores para uma rápida, sensível e específica detecção deste patógeno.

A possibilidade de se fazer a avaliação da presença do microorganismo por métodos moleculares permite também a investigação de segmentos de genes de grande importância na detecção da virulência bacteriana, uma vez que seu genoma é conhecido. Além disso, a validação do ensaio copromolecular permitirá o desenvolvimento de novas aplicações de diagnóstico moleculares em amostras fecais. Uma vez que este microorganismo esta associado ao desenvolvimento de doenças prevalentes em nossa população, e de grande interesse se realizar um diagnóstico fidedigno, principalente em populações que não dispõem de um sistema de saúde adequado, para que se possa definir esquemas de prevenção, tratamento e erradicação da infecção.

7. CONCLUSÕES

- A infecção pela bactéria *H. pylori* na população ribeirinhas estudada atingiu freqüências elevadas em todos os métodos de diagnóstico.
- Associação estatisticamente significativa obtida entre a presença da infecção e a faixa etária, implica em aprofundar a abordagem para prevenção desta infecção nas crianças da região.
- O levantamento dos sintomas clínicos presentes na população analisada demonstrou uma relação direta com a presença da *H. pylori*.
- Associação estatisticamente significativa entre a infecção e o sexo, com prevalência de indivíduos do sexo feminino.
- Influência significativa entre a ausência do esgoto sanitário e o acometimento da infecção na amostra analisada.
- Elevada expressão dos fenótipos A Leab e estado secretor de substâncias ABH, entre os indivíduos soropositivos a infecção, reforça a hipótese de que a ligação da bactéria é mediada por estes antígenos destes grupos sanguíneos.
- Índices de enteroparasitismo elevado entre as amostras soropositivas para a infecção bacteriana.
- A detecção copromolecular demonstrou ser uma ferramenta importante na detecção da infecção bacteriana, possibilitando nestas populações a aplicação de um teste de elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicada na detecção precoce do patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.C.F. **Correlação da expressividade dos antígenos ABH e Lewis com a gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas da mucosa gástrica.** Tese de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, EMBRAPA 2001. 113p.

ALKOUT, A.M., BLACKWELL, C.C., WEIR, D.M., POXTON, I.R., ELTON, R.A., LUMAN, W., PALMER, K. Isolation of a cell surface component of *Helicobacter pylori* that binds H type 2, Lewis^a, and Lewis^b antigens. **Gastroenterology**.112:1179-1187, 1997.

ALM, R.A., LING, L.S., MOIR, D.T., KING, B.L., BROWN, E.D., DOIG, P.C., SMITH, D.R., NOOMAN, B., DEJONGE, B.L., MILLS, D.M., IVES, C. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 397, n.6715, p. 176-80, 1999.

AL-MOAGE, M.A., EVANS, D.G., ABDULGHANI, M.E., EVANS, DJ-Jr., MALATY, H.M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Saudita Arabian, and comparison of those with and without upper gastrointestinal symptoms. **Am J. Gastroenterol** **85**: 994-8, 1990.

APPELMEK, B.,SIMOONS-SMIT, I., NEGRINI, R., MORAN, A., ASAPINALL, G.O , FORTE, J., DE VRIES, T., QUAN, H., VERBOOM, T., MAASKANT J.J., GHIARA, P., KUIPERS, E.J., BLOEMEN, E., TADEMA, T.M., TOWNSEND, R., TYAGARAJAN, K., CROTHERS, J.J., JR. MONTEIRO, M.A., SAVIO, A., DE GRAAFF. J. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. **Infect.Immun.** 1996; 64: 2031-2040.

AXON, A.T., BARDHAN, K., CROWE, J.P., BEATTIE, A.D., THOMPSON, R. P., SMITH, P.M., HOLLANDERS, F.D., BARON, J.H., LYNCH, D.A., DIXON, M.F., GILLON, K.R. Randomised double blind controlled study of recurrence of gastric ulcer after treatment for eradication of *Helicobacter pylori* infection. **BMJ**, v.314, n. 7080, p.565-8, 1997.

AYRES,M., AYRES JR.M., AYRES, D.L., SANTOS, A. S. **Bio Estat 2.0**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas . Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2000.

BALFOUR, A. A haemagregarine of mammals and some notes on trypanosomiasis in the anglo egyptian sudan. **J. Trop. Med. Hyg**, **9**: 81-92, 1906.

BELL, G.D.; POWELL, K.U.; BURRIDGE, S.M.; HARRISON, G.; RAMEH, B.; WEIL, J.; GANT, P.W.; JONES, P.H.; TROWELL, J.E. – Reinfection or recrudescence after apparently successful eradication of *Helicobacter pylori* infection: implications for treatment of patients with duodenal ulcer disease. **Quart. J. med.**, **86**:375-82, 1993.

BJORKHOLM, B & SALAMA, N.R. Genomics of *Helicobacter* 2003. **Helicobacter**, v.8, p.1-7, 2003.

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **J Infect Dis**, **161**: 626-633, 1990.

BLASER, M.J. & ATHERTON, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 113, n.3, p. 321-333, 2004.

BODE, G., MAUCH, F., MALFERTHEINER, P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* v.111: 483-490, 1993.

BODE, G.; MALFERTHEINER, P.; NILIUS, M.; LEBNHARDT, G.; DITSCHUNEIR, H. – Ultrastructural localization of urease in outer membrane and periplasm of *Campylobacter pylori*. **J. Clin. Pathol.**, **42**:778-9, 1989.

BORÉN, T., NORMARK, S., FALK, P. *Helicobacter pylori* molecular basis for host recognition and bacterial adherence. **Trends in Microbiol**, **2 (70)**: 221-228, 1994.

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

BRADEN, B., TEUBER, G., DIETRICH, C.F., CASPARY, W.F., LEMBCKE, B. Comparison of new faecal antigen test with ¹³C-urea breath test for detection *Helicobacter pylori* infection and monitoring eradication treatment: prospective clinical evaluation. **BMJ**, **320 (7228)**: 148, 2000.

BROWN, K. E., PEURA, D. A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterol Clin North Am**. V.22, p. 105-15, 1993.

BROWN, L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiologic Reviews**, **22 (2)**: 283-97, 2000.

BUNN, J.E.G., THOMAS, J.E., HARDING, M., WEAVER, L.T. Supplemental water in early infancy: a risk factor for *Helicobacter pylori*? *European Helicobacter pylori Study Group*. 0th International workshop. 1997 p. A37.

CADRANEL et al. Detection of *Helicobacter pylori* infection in children with a standardized and simplified ¹³C urea breath test. **J Pediatr Gastroenterol Nut.** v. 27, p. 275-80, 1998.

CARVALHO, A. S.T. Úlcera péptica. **J. Pediatria**, **76(2)**: 127-134, 2000.

CAVE, D.R. How is *Helicobacter pylori* transmitted? **Gastroenterol**. 1997; 113: S14

CAVE, D.R.; HOFFMAN, J.S. – Management of *Helicobacter pylori* infection in ulcer disease. **Hosp. Pract.**, **31(1)**:63-75, 1996.

CENSINI, S., LANGE, C., XIANG, Z., CRABTREE, J.E., GUIARA, P., BORODOVSKY, M., RAPUOLLI, R., COVACCI, A. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **93**: 14648-14653, 1996.

CHAN, W.Y., HUI, P.K., LEUNG, K.M., CHOW, J., KWORK, F. Coccid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol*, v102, p. 503-507, 1994.

CELLINI, L., DAINELLI, B., ANGELUCCI, D., GROSSI, L., DI BARTOLOMEO, S., DI CAMPLI, E., MARZIO, L. Evidence for an oral - faecal transmission of *Helicobacter pylori* infection in an experimental murine model. *AMPS*, 107: 477-484, 1999.

CLAYTON CL, KLEANTHOUS H, COATES PJ, MORGAN DD, TABAQCHALI S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.*, 30: 192-200, 1992.

CLAYTON CL, KLEANTHOUS H, MORGAN, DD, PUCKEY L, TABAQCHALI S. Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.*, 31: 1420-25, 1993.

COELHO, L.G.V.; PASSOS, M.C.F.; CHAUSSON, Y.; CASTRO, F.J.; VIEIRA, W.L.S.; FRANCO, J.M.M.; MORETZSOHN, L.D.; ANDRADE, A.M.; GUEDES, L.M.; MIRANDA, S.C.; MACIEL, C.D.; FERNANDES, M.L.M.; YAZAKI, F.R.; SOUZA, E.M.M.; CASTRO, L.P. – Factors involved in reinfection by *H. pylori* in Brazil. *GUT* **37(suppl 1)**:A 71, 1995.

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

COVACCI, A., TELFORD, J., GIUDICE, G., PARSONNET, J., RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, **284**: 1328-1333, 1999.

DOENGES, J. L. Spirochetes in the gastric glands of macacus Rhesus and of man without related disease. *Arch Pathol*, 27: 469-472, 1939.

DRUMM, B.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J.; SHERMAN, P.M. – Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.*, **322**:359-63, 1990.

DUNN, B.E., COHEN, H., BLASER, M.J. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 720-741, 1997.

EATON, K.A.; MORGAN, D.R.; KRAKOWKA, S. – *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect. immun.*, **57**:1119, 1989.

EVANS, J.R., EVANS, D.G. *Helicobacter pylori* CagA: Analysis of sequence diversity

inrelation to phosphorylation motifs and implications for the role of CagA as a virulence factor. **Helicobacter**, v.6, n.1, p. 7-15, 1999.

EVERHART, J.E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, 29 (3): 559-78, 2000.

FIEDOREK, S.C.; MALATY, H.M.; EVANS, D.L.; PUMPHREY, C.L.; CASTEEL, H.B.; EVANS JR., D.J.; GRAHAM, D.Y. – Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. **Pediatrics**, 88(3):578-82, 1991.

FOX, J.G., BECK, P. DANGLER, C. A. Concurrente enterichelminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med*, v.6, p. 536-42, 2000.

FOX, J.G.; BATCHELDER, M.; MARINI, R.; YAN, L.; HANDT, L.; LI,.; SHAMES, B.; HAYWARD, A.; CAMPBELL, J.; MURPHY, J.C. – *Helicobacter pylori* – induced gastritis in the domestic cat. **Infect. Immun.**, 63:2674-81, 1995.

FRIEDMAN, L. S, PETERSON, W. L. Úlceras Péptica e distúrbios relacionados. In: **Medicina Interna**. Harrison, T.R. (ed.). Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 1998, 1699-1721.

FUKUDA, K., KUROKI, T., TAJIMA, Y., TSUNEOKA, N., KITAJIMA, T., MATSUZAKI, S., FURUI, J., KANEMATSU, T. Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology inpatients with and without hepatobiliary cancer. **Carcinogenesis**, v.23, p. 1927-31, 2002.

GARCIA-VALLVE, S., JANSSEN, P.J., OUZOUNIS, C.A. Genetic variation between *Helicobacter pylori* strains: gene acquisition or loss? **Trends Microbiology**, cv. 10, n.10, p.445-447, 2002.

GILL, H.H.; DESAI, H.G. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disorders in India: lessons from epidemiology. **J. Clin. Gastroenterol.**, 16:6-9, 1993.

GISBERT, J.P., BLANCO, M., CRUZADO, A.I., PAJARES, J.M. *Helicobacter pylori* infection, gastric metaplasia in the duodenum and the relationship with ulcer recurrence. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, Londres, v.12, n12, p.1295-8, 2000.

GOLLNER, M. A., PINHO, M. S., SOUZA, J. A J. *Helicobacter pylori*: sua participação nos processos inflamatórios e neoplásicos gástricos. **A C Gastro**, 13: 12-16, 1997.

GOODMAN, K.J. , CORREA, P., TENGANA, A H.J., RAMIREZ, H., DELANY, J.P., GUERRERO PEPINOSA, O ., LOPEZ QUINONES, M., COLLAZOS PARRA,T. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* 1996; Aug1; 144(3): 290-299.

GOODWIN C. S, WORSLEY B.W. The *Helicobacter* Genus: The current History of *H. pylori* and taxonomy of current species. In: Goodwin C.S, Worsley B.W, eds.

- Helicobacter pylori* biology and clinical practice. **Boca raton: CRC Press**, 1-13, 1993.
- GOODWIN C. S., ARMSTRONG J. A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). **Eur J Clin Microbiol infect Dis**, **9**: 1-13, 1990.
- GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; MARSHALL, B. J. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, n. 4, p. 353-365, 1986.
- GOODWIN, S.; ARMSTRONG, J.; BRONSDON, M.; SLY, L. – Is *Campylobacter pylori* a zoonosis? (Letter). **Lancet**, **2**:968, 1988.
- GOOSEN C, THERON J, NTSALA M, MAREE FF, OLCKERS A, BOTHA SJ, LASTOVICA AJ, VAN DER MERWE SW. Evaluation of a novel heminested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of *H. pylori* in saliva and dental plaque. **J Clin Microbiol**, v.40, p. 205–209. 2002.
- GORMALY, S. M., KIERCE, B.M., DALY, L.E., DURIN, L.T. Gastric metaplasia and duodenal ulcer disease in children infected by *Helicobacter pylori*. **Gut**. 39, p. 513-517, 1996.
- 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 socio-economic status. **Gastroenterology**. **100**: 495-501, 1991.
- 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. **Preventive Medicine**, **23**: 712-716, 1994
- GRAHAM, D.Y.; KLEIN, P.D.; OPEKUN, A.R.; BOUTOON, T.W. – Effect of age on the frequency of active *Campylobacter pylori* infection diagnosed by the 13C-urea breath test in normal subjects and patients with peptic ulcer disease. **J. Infect Dis.**, **157**:777-80, 1988a.
- GREISEN K., LOEFFELHOLZ, M., PUROHIT, A., LEONG, D. PCR primers and probes for the 16S ribosomal RNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology** v.32, p.335–5,1994.
- GUIMARÃES, J. **O sorodiagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* associado aos antígenos de grupos sanguíneos ABO e Lewis em uma amostra infantil de Belém-Pará.** 1999. Trabalho de conclusão de curso. Belém, Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Biológicas, 1999. 55p.
- HANCOCK, R.E., ALM, R., BINA, J., TRUST, T. *Helicobacter pylori*: a surprisingly conserved bacterium. **Nature Biotechnolo**, v.16, n.3, p.216-217, 1998.
- HAZELL, S.L.; EVANS, D.J.; GRAHAM, D.Y. – *Helicobacter pylori* catalase. **J. Gen. Micrbiol.**, **137**:57-61, 1991.

HECZKO, U., SMITH, V.C., MELOCHE, M., BUCHAN, A.M.J., FINLAY, B. Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. **Microbes and Infection**, v.2,p.1669-1676, 2000.

HENRY, S., ORIOL, R., SAMUELSSON, B. Lewis Histo-blood group system and associated secretory phenotypes. **Vox Sang**, **69**: 1669-182, 1995.

HO, S.A., HOYLE, J.A., LEWIS, F.A., SECKER, A.D., CROSS, D., MAPSTONE, N.P., DIXON, M.F. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. **J Clin Microbiol** 29:2543-2549. 1991.

HULTEN, K., ENDROTH, H. , NYSTROM,T., ENGSTRAND, L. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swidish water. **J. Appl. Microbiol.** 1998; 85: 282-286.

HUSSON, M.O., ROLLAND, C., GOTTRAND, F., GUIMBER, D., KALACH, N., SPYCKERELLE, C., LENAERTS, C., GANGA-ZANDZOU, P.S. Evaluation of a *Helicobacter pylori* stool antigen test for the diagnosis and follow-up of infections in children. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **19 (10)**: 787-789, 2000.

ILVER, D, ARNQVIST, A, ÖGREN, J, FRICK, I. M, KERSULYTE, D, INCECIK, E.T, BERG, D.E, COVACCI, A, ENGSTRAND, L, BORÉN, T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo- blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279: 373-76, 1998.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia Basica*. 4a edicao. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 244p, 1999.

KABIR S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J Med Microbiol*, v. 50, p. 1021-1029, 2001.

KELLY, S.M.; PITCHER, M.C.; FARMERY, S.M.; GIBSON, G.R. – Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* 107:1671-4, 1994.

KIRSCHNER, D.E. & BLASER, M.J. The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. **J Theor Biol**, 176: 281-290, 1995.

KLEIN, P.D.; GRAHAM, D.Y.; GAILLOUR, A.; OPEKUN, A.R.; O'BRIAN SMITH, E. – Water source as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in peruvian children. *Lancet*, 337:1503-6, 1991.

KODAIRA, M. S., ESCOBAR, A.M.U., GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Rev. Saúde Pública*, 36 (3): 356-369, 2002.

KONTUREK, J. W. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J. Physiol. Pharmacol.* v. 54, suppl. 3, p. 23-41, 2003.

LANGENBERG, W.; RAUWS, E.A.; OUDBIER, J.H.; TYTGAT, G.N.J. – Patient to patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. *J. Infect. Dis.*, 161:507-11, 1990.

LELWALA-GURUGE, JJ., ASCENCIO, F., LJUNGH, A., WADSTRON, T. Rapid detection and characterization of sialic acid-specific lectins of *Helicobacter pylori*. *APMIS.*, 1: 695-702, 1993. .

LI, C., HA T., FERGUSON, DA JR., CHI, D.S., ZHAO, R., PATEL, N.R., KRISHNASWAMY, G. A newly developed PCR assay of *H.pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 41:2142-2149. 1996.

LIM, L.L., HO KY, H.O., SALTO-TELLEZ, M. Effect of biopsies on sensitivity and specificity of ultra-rapid uréase test for detection of *Helicobacter pylori* infection: a prospective evaluation. *World J Gastroenterol.*, Beijing, v.10, n. 13., p. 1907-10, fev.2004.

MAPSTONE, N.P.; LYNCH, D.A. F.; LEWIS, F.A.; AXON, A.T.; TOMPKINS, D.S.; DIXON, M.F.; QUIRKE, P – Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J. Clin. Pathol.*, 46:540-3, 1993.

MARSHALL B.J. *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Gastroenteology*, v.89:S116-s128, 1994.

MARSHALL, B.J. & WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The lancet*, in: 1273-1275, 1983.

MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clinical Medicine*, v.02, n.02, p.147-152, 2002.

MARSHALL, B.J., ARMSTRONG, J.A., MCGECHIE D.B., GLANCY R.J. Attempt to fulfil koch's postulates for *Campylobacter pylori*. *Med J Aut*, 142: 436-440, 1985.

MARSHALL, B.J.; BARRET, L.J.; PRAKASH, C.; McCALLUM, R.W.; GUERRANT, R.L. – Urease protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, v.99, p.697-702, 1990.

MARSHALL, B.J.; GOODWIN,C.S.; WARREN, J.R.; MURRAY, R.; BLINCOW, E.D.; BLACKBURN, S.J.; PHILLIPHS, M.; WATERS, T.E.; SANDERSON, C.R. – Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*, v.2:1437-42, 1988.

MARTINS, L. C. **Soroprevalência de anticorpos contra antígeno CagA da *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica.** Tese de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, EMBRAPA 2001. 84p.

MARTINS, L. C., CORVELO, T. C. O, OTI, H. T., BARILE, K. A S. Soroprevalência de anticorpos contra antígeno CagA do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica na região Norte do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35 (4): 307-310, 2002.

MATOS, L. C., CINTRA, J. R., SANCHES, F. B., SILVA, R. C. M. A., RUIZ, M. A., MOREIRA, H. W. ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the *Helicobacter pylori* bacillus. **Revista Paulista de Medicina**, v.120 (2): 55-58, 2002.

MENDALL, M. A , GOGGIN, P.M., MOLINEAUX, N. Childhood conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. **Lancet**,339: 896-897, 1992.

MÉGRAUD, F. – Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.*, 31(suppl. 215):57-62, 1996.

MÉGRAUD, F. Transmission of *Helicobacter pylori*: fecal-oral versus oral-oral route. **Aliment Pharmacol Ther**, 9 (2): 85-91, 1995.

MITCHELL, H.M., LI, Y.Y., HU, P.J., LIV, Q., CHEN, M., DU, G. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J. Infec Diseases**,166: 149-53, 1992.

MOBLEY, H. L. T. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. **Gastroenterology**, 113: S21-S28, 1997.

MORRIS, A.J.; NICHOLSON, G.I. – Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. **Am. J. Gastroenterol.**, v.82, p.192-9, 1987.

MOURA, S.A.B.; GERBI, M.; MEDEIROS, A.M.C.; SOUTO, M.F.; EMILIANO, G.B.G. Identificação de *Helicobacter pylori* na saliva e biofilme dental. **Int. J. Of Dent.**, Recife, 3(2): 349-352 jul/dez, 2004.

MURAKAMI, M.; YOO, J.K.; TERAMURA, S.; YANAMOTO, K.; SAITA, H.; MATUO, K.; ASADA, T; KITA, T. – Generation of ammonia and mucosal lesion formation following hydrolysis of urea by urease in the rat stomach. **J. Clin. Gastroenterol.**, v.12, p.5104-9, 1990.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Campylobacter* e *Helicobacter*. In: *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2006. Cap. 33, p. 339-347.

NGUYEN, A.M.H.; ENGAstrand, L.; GENTA, R.M.; GRAHAM, D.Y.; EL ZAATARI, F.A.K. – Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.783-7, 1993.

ODERBA, G., RAPA, A., MARINELLO, D., RONCHI, B., ZAVALLONE, A. Usefulness of *Helicobacter pylori* stool antigen test to monitor response to eradication treatment in children. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.15 (2), p.203-206, 2001.

ODERDA, G.; VAIRA, D.; AINLEY, C.; HOLTON, J.; OSBORN, J.; ALTARE, F.; ANSALDI, N. – Eightenn month follow up of *Helicobacter pylori* positive children treated with amoxicillin and tinidazole. **GUT**, v.33:p.1328-30, 1992.

OGATA, S. K. et al . Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children and adolescents. São Paulo **Med. J.**, São Paulo, v. 119, n. 2, 2001.

OLIVEIRA, A. M., QUEIROZ, D. M. M., ROCHA, G. A., MENDES, E. N. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **Am. J. Gastroenterology**, 89 (12): 2201-2204, 1994.

OLMOS, J. A, RIOS, H., HIGA, R. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Argentina: results of a nationwide epidemiologic study. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 31 (1): 33-37, 2000.

ORIOLO, R. Molecular basis for Lewis α (1,3/1,4) fucosyltransferase gene deficiency (fut 3)found in lewis negative indonesian pedigrees. **J. Biol. Chem.**. 269: 20987-20994, 1994.

ORIOLO, R., LE PENDU, J., MOLLICONE, R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and Related Antigens. **Vox Sang**, 51: 161-171, 1986.

PARSONS, C.L.; STAUFFER, C.; MULHOLLAND, S.G.; GRIFFITH, D.P. – Effect of ammonium and bacterial adherence to bladder transitional epithelium. **J. Urol.**, 132:365-6, 1987.

PATCHETT, S.; BEATTIE, S.; LEEN, E.; KEANE, C.; O'MORAIN, C. – *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer recurrence. **Am. J. Gastroenterol.**, 87(1):24-7, 1992.

PATEL, P., MENDALL, M.A., KHULUSI, S., NORTHFIELD, T. C., STRACHAN, D.P. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. **BMJ**, 309 (6962): 1119-1123, 1994.

PEREZ-PEREZ, G.L., BODHIDATTA, L., TAYLOR, D., WONGSRICHANALAI, J., BASE, W., DUNN, B. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Thailand. **J. Infect Dis.**, 161: 1237-1241, 1990.

PÜTSEP, K., BRÄNDÉN, C-I., BOMAN, H.G., NORMARK, S. Antibacterial peptide from *H. pylori*. **Nature**. 48:1-3, 1998.

PYTKO-POLONCZYK, J.; KONTRUREK, S.J.; KARCZEWSKA, E.; BIELANSKI, W. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. **J. Physiol. Pharmacol.**, 47:2142-2149, 1996.

PORTORREAL, A.; KAWAKAMI, E. Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 39, n. 3, 2002.

RAVEL, R. Doenças infecciosas bacterianas. In: **Laboratório Clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p171.

RAYMOND, J., SAUVESTRE, C., KALACH, N., BERGERET, M., DUPONT, C. Immunoblotting and serology for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **19**: 118-121, 2000.

REPLOGUE, M.L., GLASER, S.L., HIATT, R.A., PARSONNET, J. Biologic Sex as a risk factor for H. pylori infection in healthy young adults. **Am J Epidemiol**, **142**: 856-863, 1995. revisão. **RBAC**. v. 39, n. 1, p. 9-13, 2007.

RICCI, C., HOTLTON, J., VAIRA, D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Invasive and non Invasive tests, **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 21, n.2, p. 299-313, 2007.

RIEGG, J.S., DUNN E.B., BLASER M.J.- Microbiology and pathogenesis of *Helicobacter pylori*. **Inf. of the Gast. Tract, capther 39**: 535-550, 1995.

ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; OLIVEIRA, A.M.; MOURA, S.B.; SILVA, R.J. – Studies in abattoir workers and pigs (letter). **Am. J. Gastroenterol.**, **87(10)**:1525, 1992.

ROCHA, G.A.; ROCHA, A. M. C., QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; NOGUEIRA, A.M.M.F.; CARVALHO, A. S.T., Validation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti cagA antibodies in children with *Helicobacter pylori* infection. **J. Pediatric Gastroenterol.****33(4)**: 515-517, 2001.

SAGICA, F.E.S. **Perfil imuno-histoquímico da mucosa gástrica no desenvolvimento do câncer gástrico**. Tese de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, EMBRAPA 2000. 120p.

SAITO, N., KONISHI, K., SATO, F., KATO, M., TAKEDA, H., SUGIYAMA, T., ASAKA, M. Plural transformation process from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. **J of infection**, v.46, p. 49-55, 2003.

SALOMON, H. Uber das spirillum des sangetier magens und sein verhalten zuden belegzelle. **Zentrabl hyg umwentmed**, **19**: 433-442, 1896.

SANTOS, F.S. Prevalência de enteroparasitismo em crianças de comunidades ribeirinhas. **Rev Pan-Amaz Saúde**. 1(4):23-28, 2010.

SCHONITZER D. Relations of blood groups to disease. **Biol. Soc. Hematolo. Hemat. suppl. Special**, **67**: 68. 1997.

SHAHAMAT, M., MAI, U., PASZKO-KOLVA, C. Use of auto radiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl. Environ. Microbio*, 59: 1231-1235. 1993.

SHIMOYAMA, T., CRABTREE, J.E. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *GUT*, 43: S2-5S, 1998.

SHMUELY, H., PASSARO, D., FIGER, A., NIV, Y., PITLIK, S., SAMRA, Z., KOREN, R., YABAV J., Relationship between *Helicobacter pylori* CagA status and colorectal cancer. *The Amer. Jour. of Gastroent*, 96:12,2001.

SOUSA, M. B., LUZ, L. P., MOREIRA, D. M., BACHA, O. M., CHULTZ, R. G., EDELWEISS, M. I. Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças avaliadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. *Arq Gastroenterol*, 38 (2): 132-137, 2001.

SUERBAUM, S & ACTMAN, M. Evolution of *Helicobacter pylori*: The role of recombination. *Trends Microbiology*, v. 7, n.5, p.182-184, 1999.

SUERBAUM, S & MICHETTI, A. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. v. 347, n.15, p.1174-1186, 2002.

SZULMAN, A E. The ABH Blood Groups and Developmental Biology. *Academic press New York*, 14:127. 1980.

THOMAS, J.E., GIBSON, G.R., DARBOL, M.K., DALE, A., WEAVER, L. T. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet*, 340: 1194-1195. 1992.

TELFORD, J. L., COVACCI, A., RAPPUOLI, R., GHIARA, P. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Current Opinion in Immunology*, 9: 498-503, 1997.

TELFORD, J. L., GHIARA, P., DELL-URCO, M., COMANDUCCI, M., BURRONI, D., BUGNOLI, M., TECCE, M. F., CENSINI, S., COVACCI, A., XIANG, Z., PAPINI, E., MONTECUCCO, C., PARENTE, L., RAPPUOLI, R. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its Key Role in Gastric Disease. *J. Exp. Med.*, 179: 1653-1658, 1994.

THOMAS, J.E.; GIBSON, G.R.; DARBOE, M.K.; DALE, A.; WEAVER, L.T.– Isolation of *Helicobacter pylori* from human feces. *Lancet*, 340:1194-5, 1992.

THOME, J. A.; FETT-CONTE, A. C.; CORDEIRO, J. A. Avaliação morfológica e imuno-histoquímica de linfomas gástricos primários. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, 2005.

TOMB, J.F., WHITE, O., KERLAVAGE, A.R., CLAYTON, R.E., SUTTON, G.G., KETCHUM, K.A., KLENK, H.P. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, v.7, n.388, p. 539-547, 1997.

TORRES, J., PEREZ-PEREZ, G., GOODMAM, K. J., ATHERTON, J. C., GOLD, B. D., HARRIS, P. R., GARZA, A. M., GUARNER, J., MUÑOS, O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archive of Medical Research**, **31**: 431- 469, 2000.

VAIRA, D.; D'ANASTASIO, C.; HOLTON, J.; DOUSETT, J.F.; LONDEI, M.; BERTONI, F.; BELTRANDI, E.; GRAUENFELS, P.; SALMON, P.R.; GANDOLFI, L. – Campylobacter pylori in abattoir workers: is it a zoonosis? **Lancet**, **2**:725-6, 1988.

YAÑEZ, P., GARZA, A.M., PÉREZ-PÉREZ, G., CABRERA, L., MUÑOZ, O., TORRES, J. Comparison of invasive and noninvasive methods for the diagnosis and evaluation of eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archives of Medical Research** v.31:p.415-421, 2000.

WADSTRON, T., HIRMO, S., NILSSON, B. Biochemical aspects of *H. pylori* adhesion. **J Physiol Pharmacol.**, 48: 325-331, 1997.

WILCOX, M. H., DENT, T. H. S., HUNTER, O. J., GRAY, J. J., BROWN, D. F. J., WIGHT, D.G.D., WRAIGHT, E. P. Accuracy of serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection – a comparison of eight kits. **J Clin Pathol.** **49**: 373-376, 1996.

WILLIAMS, A.P., POUNDER, M.A. *Helicobacter pylori*: From the benign to the malignant. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.94, n.11, p.115-165, nov. 1999.

WIRTH, H., YANG, M.Q., KARITA, M., BLASER, M. Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis X and Lewis Y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status. **Infect. Immun.** 1996 ;64: 4598-4605.

WISLA-DERAMBURE, N., MICHAUD, L., ATEGBO, S., PASCAL, V., GANGA-ZANDZOU, S., TURK, D., GOTTRAND, F. Familial and community environmental risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, **35**: 58-63, 2001.

WOTHERSPOON, A. C., DOGLIONI, C., DISS, T.C. Regression of primary low-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiol. Lett.**;144: 29-32, 1993.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0299.0.115.000-10, intitulado: **“ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA BACTÉRIA HELIOBACTER PYLORI EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS AMAZÔNICAS E O DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO COPROMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO”**, tendo como Pesquisadora Responsável Jocilene Guimarães Silva.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 15 de setembro 2010.

Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro
Coordenador CEP/UFAM



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIDISCIPLINAR DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOCTORADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA A SAÚDE.

TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: “ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA BACTÉRIA *Helicobacter pylori* EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS AMAZÔNICAS E A VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO COPROMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO”.

Eu (NOME), _____ Pai () Mãe () ou responsável () pelo menor (NOME) _____ morador da localidade _____, declaro ter recebido esclarecimentos sobre o projeto aqui referido e concordo em participar/ou que o menor _____ participe do mesmo, doando sangue, saliva e fezes para os estudos laboratoriais e fornecendo informações que constarão em uma ficha clínico – epidemiológica – terapêutica, os quais só poderão ser utilizados em relatórios e publicações científicas. Declaro ainda ter sido plenamente esclarecido sobre o conteúdo do projeto acima citado e que aceito que o menor acima citado participe, concordando com o presente termo:

Esta pesquisa tem como objetivo estudar em famílias da nossa região a presença de contaminação por um micróbio (bactéria *Helicobacter pylori*) que é responsável por ocasionar doenças no estômago, além de estudar uma possível relação entre os tipos de grupos sanguíneos dos indivíduos com a infecção e desenvolver um método para diagnóstico nas fezes. Nesta infecção, um diagnóstico no início da contaminação poderia diminuir o risco de evolução para uma doença mais grave, no estômago, principalmente em relação às crianças na fase adulta. Para tanto, é necessário que seja coletado dos participantes do estudo amostras de sangue/ saliva e fezes da criança, além do responsável responder um questionário para esclarecer melhor as informações sobre as condições sócio-econômicas e os possíveis meios de contaminação entre os participantes. Com essa finalidade prestamos os seguintes esclarecimentos:

- 1- Serão realizados exames de sangue e saliva para pesquisar o tipo de grupo sanguíneo. A presença da infecção pelo micróbio será feita no sangue e nas fezes, na qual também será pesquisada a presença de vermes.
- 2- A pesquisa oferece risco mínimo para quem participa, a coleta de sangue será realizada por profissional treinado, e a coleta de saliva com o mínimo de desconforto. Não havendo outra forma de coleta do material.
- 3- Os exames realizados pela pesquisa serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do participante para sua realização.

4- Os resultados dos exames realizados pela pesquisa serão usados como dados da pesquisa, omitindo-se a identidade do participante.

5- O material coletado para pesquisa será usado exclusivamente para este fim, assim como o questionário respondido pelo responsável, caso sobre material coletado, este será descartado seguindo as normas de segurança.

6- Somente o pesquisador responsável ficará sabendo da participação e se for necessário, autoridades de saúde poderão ser informados para tomar medidas que beneficiem o participante da pesquisa ou outras pessoas.

7- O trabalho mostrará apenas os resultados e nunca o nome ou outra informação que identifique o menor. Todas as informações sobre este estudo estarão sempre à minha disposição.

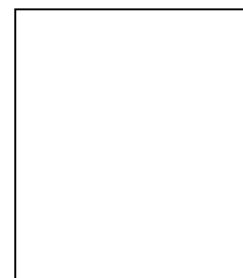
8- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá se retirar dela no momento que desejar, sem qualquer prejuízo pessoal.

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo do mesmo. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito que o menor participe da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

_____, _____ de _____ de _____

Assinatura do responsável pelo paciente: _____

Responsável pela pesquisa: _____



Polegar Direito



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIDISCIPLINAR DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOCTORADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA A SAÚDE.

TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: “ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA BACTÉRIA *Helicobacter pylori* EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS AMAZÔNICAS E A VALIDACÇÃO DE UM ENSAIO COPROMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO.”

Eu (NOME) _____

morador da localidade _____, declaro ter recebido esclarecimentos sobre o projeto aqui referido e concordo em participar do mesmo, doando sangue, saliva e fezes para os estudos laboratoriais e fornecendo informações que constarão em uma ficha clínico – epidemiológica – terapêutica, os quais só poderão ser utilizados em relatórios e publicações científicas. Declaro ainda ter sido plenamente esclarecido sobre o conteúdo do projeto acima citado e que aceito participar, concordando com o presente termo:

Esta pesquisa tem como objetivo estudar em famílias da nossa região a presença de contaminação por um micróbio (bactéria *Helicobacter pylori*) que é responsável por ocasionar doenças no estômago, além de estudar uma possível relação entre os tipos de grupos sanguíneos dos indivíduos com a infecção e desenvolver um método para diagnóstico nas fezes.

Nesta infecção, um diagnóstico no início da contaminação poderia diminuir o risco de evolução para uma doença mais grave, no estômago. Para tanto, é necessário que seja coletado dos participantes do estudo amostras de sangue, saliva e fezes, além de responder um questionário para esclarecer melhor as informações sobre as condições sócio-econômicas e os possíveis meios de contaminação entre os participantes." Com essa finalidade prestamos os seguintes esclarecimentos:

- 1- Serão realizados exames de sangue e saliva para pesquisar o tipo de grupo sanguíneo. A presença da infecção pelo micróbio será feita no sangue e nas fezes, na qual também será pesquisada a presença de vermes.
- 2- A pesquisa oferece risco mínimo para quem participa, a coleta de sangue será realizada por profissional treinado, e a coleta de saliva com o mínimo de desconforto. Não havendo outra forma de coleta do material.
- 3- Os exames realizados pela pesquisa serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do participante para sua realização.
- 4- Os resultados dos exames realizados pela pesquisa serão usados como dados da pesquisa, omitindo-se a identidade do participante.
- 5- O material coletado para pesquisa será usado exclusivamente para este fim, assim como o questionário respondido, caso sobre material coletado, este será descartado seguindo as normas de segurança.

6- Somente o pesquisador responsável ficará sabendo da participação e se for necessário, autoridades de saúde poderão ser informados para tomar medidas que beneficiem o participante da pesquisa ou outras pessoas.

7- O trabalho mostrará apenas os resultados e nunca o meu nome ou outra informação que me identifique. Todas as informações sobre este estudo estarão sempre à minha disposição.

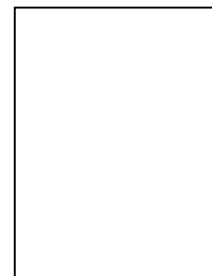
8- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá se retirar dela no momento que desejar, sem qualquer prejuízo pessoal.

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

_____, ____ de ____ de ____

Assinatura do paciente: _____

Responsável pela pesquisa: _____



Polegar Direito

ANEXO IV



UFAM
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIDISCIPLINAR DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA A SAÚDE.

Projeto: “ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA BACTÉRIA *Helicobacter pylori* EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS AMAZÔNICAS E A VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO COPROMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO”.

NÚMERO DO REGISTRO DO PACIENTE: _____

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Idade: _____
 Sexo: () Masculino () Feminino Cor: _____ Naturalidade: _____
 Peso: _____ Altura: _____ Escolaridade: _____
 Residência atual: _____ Tempo de residência: _____

II- QUEIXA PRINCIPAL: _____

III – SINTOMATOLOGIA (REFERIR HÁ QUANTO TEMPO):

	SIM	NÃO
1- Apática	()	()
2- Dor epigástrica	()	()
3 – Anorexia	()	()
4 – Emagrecimento	()	()
5 - Náuseas/vômito	()	()
6 – Diarréia	()	()
7- Pirose	()	()
8- Cólicas abdominais	()	()
9- Plenitude gástrica	()	()
10- Tumoração palpável	()	()
11- Outros sintomas	_____	

IV – DADOS FAMILIARES:

➤ **RENDA MENSAL:** _____

➤ **PATOLOGIAS GASTROABDOMINAIS OBSERVADAS NA FAMÍLIA:** _____

➤ **CASOS CÂNCER:** SIM () NÃO () QUAL TIPO: _____

➤ **ÁLCOOL** () **FUMO** () **DROGAS** ()

V- CONDIÇÕES HABITACIONAIS E SANITÁRIAS

➤ Abastecimento de água	Encanada ()	Poço ()	Rio ()	Outros ()
➤ Condições do Tratamento de água	Filtrada ()	Fervida ()	Hipoclorito ()	Não Tratada ()
➤ Despejo dos Dejetos	Fossa Negra ()	Fossa Sanitária ()		
➤ Saneamento	Ótimo ()	Razoável ()	Péssimo ()	
➤ Tipo de Moradia	Alvenaria ()	Madeira ()		
➤ N° de pessoas na casa _____	N° cômodos _____	N° de irmãos _____		

VI - EXAMES REALIZADOS (RESULTADOS DIGNÓSTICOS DE NOTA):**VII- TRATAMENTOS REALIZADOS: (COM MAIS DE 60 DIAS)**

Responsável pela coleta: _____