

Amanda Luisa Machado Matthies

Biomédica. Instrutora de Laboratório de Ensaios Biológicos
Centro Universitário Católica de Santa Catarina, Joinville, SC.

Yana Picinin Sandri Lissarassa

Biomédica. Docente da Escola de Saúde
Centro Universitário Católica de Santa Catarina, Joinville, SC.

Rafael Dutra de Armas

Biólogo. Docente da Escola de Saúde
Centro Universitário Católica de Santa Catarina, Joinville, SC.

RESUMO

A presença da bactéria *Helicobacter pylori* no estômago é causa comum de infecção gástrica em humanos, estando relacionado ao desenvolvimento de gastrite crônica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma do Tecido Linfóide Associado à Mucosa (MALT). Os métodos atualmente conhecidos para identificação de colonização por *H. pylori* são divididos em invasivos (realizados através de biópsia coletada por Endoscopia Digestiva Alta) e não invasivos (utilizadas amostras de ar exalado, sangue, urina, fezes, saliva ou placa dental). No Brasil, a principal escolha é a combinação entre exame histopatológico e Teste Rápido de Urease, ambos invasivos. Entretanto, limitações sugerem uma busca por novas abordagens. Sendo assim, este trabalho objetivou descrever a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase na detecção e caracterização de *H. pylori*, comparando com os principais métodos atualmente utilizados. Para tanto, realizou-se uma revisão integrativa através de materiais de caráter científico, publicados entre 2000 e 2022, nos idiomas português, inglês e espanhol. Logo, tem-se que a técnica de PCR pode ser promissora por apresentar resultados mais precisos e garantir um maior número de informações em um único exame. Esta já amplamente utilizada por pesquisadores, apresenta resultados positivos visto sua flexibilidade, índices elevados de sensibilidade e especificidade, permitir o uso de amostras invasivas ou não, detectar genes de patogenicidade e resistência antimicrobiana, além da capacidade em identificar a presença da bactéria em pequenas quantidades. Estas aplicações podem ainda serem melhor avaliadas na prática, alcançando diagnósticos mais precisos e completos, favorecendo o bom prognóstico do paciente.

Palavras-chave: Gastrite crônica; Úlcera péptica; Teste Rápido de Urease; Histopatológico; Teste Respiratório com Uréia Marcada com Carbono.

INTRODUÇÃO

A presença da bactéria *Helicobacter pylori* no estômago é reconhecida como causa comum de infecção gástrica em humanos, frequentemente assintomática e latente por longo período, podendo permanecer colonizando a mucosa estomacal durante décadas. A forma de transmissão mais comum é através de água contaminada, principalmente em locais com déficit de saneamento. Sendo assim, dados epidemiológicos apontam que a prevalência de infecção por *H. pylori* é maior em países em desenvolvimento (com piores condições de moradia e decadente acesso ao ensino), tornando-se um problema de saúde pública por ser fator de risco para o desenvolvimento de gastrite crônica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma do Tecido Linfóide Associado à Mucosa (MALT). Ainda, há correlação entre a presença da bactéria e anemia ferropriva, deficiência de vitamina B12 e trombocitopenia idiopática (DORE; GRAHAM, 2022; GAMA, 2018; POLK; JR, 2010; SILVA et al., 2011; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017; UOTANI; GRAHAM, 2015; WENG et al., 2021).

A capacidade de ocasionar algum tipo de patologia está relacionada, além de fatores próprios do indivíduo, à composição genômica de *H. pylori*: a presença de determinados genes caracteriza maior grau de patogenicidade. Sugere-se que estes, além do crescente nível de resistência aos antimicrobianos utilizados, colaborem para que o Esquema Tríplice Convencional, tratamento mais comum em todo o mundo, apresente índice de erradicação da bactéria de aproximadamente 80% (GAMA, 2018; SILVA et al., 2011).

Nesse contexto, tem-se que os métodos diagnósticos convencionais não são capazes de detectar a presença de genes responsáveis por tais adaptações, apenas a presença da bactéria e danos epiteliais. Assim, em caso de não erradicação, são utilizados tratamentos secundários que podem prejudicar a microbiota do paciente, prolongar a terapia e aumentar o risco do desenvolvimento de patologias gástricas (NEVOA et al., 2017; PINTO; ALVES; FRASCO, 2019).

Cada metodologia diagnóstica apresenta suas respectivas taxas de especificidade, sensibilidade e acurácia, caracterizando vantagens e desvantagens. Discute-se qual método (ou associação deles) seria o ideal, objetivando, principalmente, evitar resultados falso negativos. Alguns fatores como baixa densidade populacional da bactéria, uso de inibidores de bomba de prótons ou antibióticos e o próprio dano em extensas áreas de metaplasia estomacal podem mascarar a presença do agente. Todos esses fatores associados levam à busca por técnicas cada vez melhores, sugerindo uma possível mudança na abordagem convencional (NEVOA et al., 2017; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

Dessa forma, busca-se demonstrar a importância da utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção e caracterização de *H. pylori*, facilitando sua identificação e podendo auxiliar no tratamento,

almejando contribuir de forma significativa para a prevenção de desordens gástricas severas.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do trabalho realizou-se uma revisão integrativa a respeito dos métodos diagnósticos da bactéria *H. pylori*. Foram utilizados materiais de caráter científico, disponíveis de forma *online*. Estes foram acessados em três bases de dados, sendo elas: *Scientific Electronic Library Online* (SciElo), Google Acadêmico e *PubMed Central* (PMC). Optou-se por selecionar artigos publicados entre 2000 e 2022, nos idiomas português, inglês e espanhol. Foram utilizadas palavras chaves, de forma isolada, como *Helicobacter pylori*, gene *vacA*, gene *iceA*, gene *oipA*, gene *cagA*, antibioticoterapia e microbiota, Teste Rápido de Urease, Teste Respiratório com Uréia marcada com Carbono, exame histopatológico para *H. pylori*, diagnóstico molecular para *H. pylori* e Esquema Tríplice Convencional.

RESULTADOS

Chegando ao ambiente estomacal, movendo-se através de flagelos, *H. pylori* penetra a mucosa gástrica e adere-se ao epitélio através de receptores e adesinas, entretanto sem invadi-lo. Essa penetração é possível devido a síntese de lipases e proteases que degradam a camada mucoide, facilitando sua progressão. Ainda, a síntese da enzima urease promove a hidrólise da ureia fisiológica em amônia e bicarbonato, reduzindo o pH do meio. Após a colonização, o hospedeiro passa a desenvolver respostas inflamatória e imunológica. Fagócitos geram radicais livres em resposta às substâncias pró-inflamatórias e produtos da parede bacteriana, que reagem com o DNA humano induzindo danos oxidativos e alterações da expressão de proto oncogenes (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

Este microrganismo é classificado como carcinógeno tipo I desde 1994, tendo seu diagnóstico e tratamento fortemente recomendados, uma vez que sua identificação e erradicação reduzem significativamente o risco de desordens severas: Shan, Iyer e Moss (2021) concluíram que a probabilidade de desenvolver carcinoma gástrico em até 15 anos após o diagnóstico é 39% inferior para os indivíduos que realizaram o tratamento adequado. Além disso, Ma et. al (2012) identificou que aproximadamente 89% de todos os casos de câncer gástrico estão relacionados à presença de *H. pylori*. Esses fatos revelam, ainda mais, a necessidade por um diagnóstico eficiente (DADASHZADEH; PEPPELENBOSCH; ADAMU, 2017; HEMMATINEZHAD; MOMTAZ; RAHIMI, 2016; POLK; JR, 2010; SILVA et al., 2010; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017; VARGAS et al., 2019; WENG et al., 2021).

Em casos de pacientes infectados por *H. pylori* o diagnóstico confiável é crucial. Além disso, a necessidade de realização de novas biópsias e procedimentos endoscópicos adicionais torna-se oneroso para médicos e pacientes. Para a escolha de um método diagnóstico deve-se levar em consideração fatores como acurácia, custo benefício e disponibilidade de testes e insumos (LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014). Se tratando desta bactéria, entretanto, ainda não existe consenso sobre o método considerado padrão ouro, embora desde o descobrimento de *H. pylori* diversas metodologias já estiveram em pesquisa e outras foram introduzidas à prática (CHUNG et al., 2014; DORE; GRAHAM, 2022; NEVOA et al., 2017; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

A bactéria em questão pode ser identificada em amostras de sangue, saliva, placa dental, fezes, urina, ar exalado e biópsia gástrica. Um dos principais órgãos infectados é o estômago, especialmente o antro. A colonização desencadeia uma resposta inflamatória imune e local, caracterizada pela infiltração de neutrófilos, monócitos e linfócitos – gerando a produção de anticorpos. Dessa forma, amostras de sangue tornam-se uma opção para diagnóstico. A água contaminada, principal meio de contaminação, torna possível a avaliação de saliva como uma forma de diagnóstico. Além disso, a regurgitação do suco gástrico devido a vômito e refluxo – comuns em pacientes com distúrbios gástricos – também se tornam uma fonte de recontaminação local. Ojeda-Moreno et al. (2021) inclusive destaca a alta correlação entre presença de *H. pylori* no estômago e na cavidade oral, demonstrando a importância de medidas de higiene. Além disso, a eliminação da bactéria através de fezes e urina incluem estas duas amostras como fonte de avaliação. O ar exalado pode ainda ser adicionado à lista, embora a bactéria não seja diretamente colonizadora do pulmão (OTOYA-MORENO et al., 2021; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

Nesse contexto, as técnicas atualmente empregadas para diagnóstico são divididas em invasivas e não invasivas. No primeiro grupo estão inclusos o Teste Rápido de Urease (TRU), exame histopatológico, cultura, imunohistoquímica, Técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e PCR. Nestes, há investigação da presença do microrganismo através da produção de urease, alterações teciduais, crescimento em cultura, produção de antígenos específicos, identificação de anticorpos e de material genético, respectivamente (GAMA, 2018; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017; VARGAS et al., 2019).

No procedimento invasivo para coleta da amostra, conhecido como Endoscopia Digestiva Alta (EDA), o paciente é sedado e através de um endoscópio é possível capturar imagens do sistema digestivo alto (esôfago, estômago e duodeno) e amostras do tecido e muco que recobrem o estômago. Recomenda-se a obtenção de cinco a seis biópsias de três locais distintos durante o exame, visto a distribuição não homogênea da bactéria na região gástrica (GAMA, 2018; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014).

Já dentre os não invasivos (ou minimamente invasivos) estão o Teste Respiratório com Uréia Marcada com Carbono (UBT), testes sorológicos

(detecção de anticorpos IgG anti-HP), teste rápido e teste de antígeno fecal HpSA (TAF). São utilizadas amostras de ar exalado, sangue, urina, fezes, saliva ou placa dental (GAMA, 2018; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017; VARGAS et al., 2019).

A cultura é um método que implica em transporte adequado de amostra, tempo elevado de cultivo e dificuldades por se tratar de uma bactéria fastidiosa. A imunohistoquímica é mais utilizada em estudos de doenças neoplásicas e identificação de oncogenes. Ainda, a técnica de FISH apresenta como principal limitação o custo empregado. Já os testes sorológicos necessitam de validação local (devido a variabilidade de cepas) e não diferem infecções ativas ou prévias. O TAF igualmente necessita validação, não difere bactérias mortas e pode apresentar falso negativo em baixa colonização. Testes rápidos em geral podem ser pouco sensíveis e específicos. Desta forma, estes não são atualmente usuais na rotina clínica (GAMA, 2018; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014; LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014; MENEZES et al., 2015; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

O IV Consenso Brasileiro sobre infecção por *H. pylori* sugeriu como primeira escolha o UBT. Porém, esta não é uma realidade no Brasil devido às restrições de autoridades em adquirir o substrato necessário, logo, este não é fornecido no serviço público (GAMA, 2018). Neste teste o paciente ingere uma solução de uréia contendo carbono marcado (C14 radioativo ou C13 não radioativo). Estando o indivíduo infectado, *H. pylori* degrada a uréia em amônia e gás carbônico. Este gás marcado difunde-se pelos vasos sanguíneos, é liberado para os pulmões e exalado no ar, podendo ser medido de 10 a 30 minutos após ingestão através de equipamento similar a um bafômetro. O resultado é comparado a amostra de ar exalado antes da ingestão da solução (BARBOSA; SCHINONNI, 2011; COELHO et al., 2018; GAMA, 2018; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014; LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017; VARGAS et al., 2019).

A sensibilidade e especificidade do UBT são superiores a 95%. Uma vantagem encontrada é que a distribuição irregular da bactéria não interfere no resultado do teste. Entretanto, pode produzir falso negativo em terapias supressoras de urease. Resultados falso positivos também podem ocorrer devido à presença de outras bactérias ureásicas (*Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*), que podem ser colonizadores gástricos na presença de acloridria. O isótopo C13 pode ser usado com segurança em crianças e gestantes, porém apresenta custo elevado. O C14, mais barato, requer o uso em departamento de medicina nuclear licenciado para armazenamento e descarte de reagentes radioativos (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014).

No Brasil, atualmente, o método mais empregado é a associação entre TRU e exame histopatológico (NEVOA et al., 2017; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017). O TRU é realizado a partir da coleta de material da mucosa gástrica. Este é depositado em um frasco contendo ureia e indicador de pH. Visto que *H. pylori* é uma bactéria produtora da enzima urease, em caso de teste positivo, a uréia é hidrolisada formando gás carbônico e amônia, elevando o pH e alterando a cor da solução de amarelo para tons de vermelho.

Esse processo ocorre em até 24 horas (GAMA, 2018; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014; LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014; NEVOA et al., 2017; OTOYA-MORENO et al., 2021; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017). É um teste simples, rápido e preciso: apresenta especificidade em torno de 95% e sensibilidade de 85 a 95%. Ainda, vários kits estão disponíveis no mercado, baseados em papel, gel ou líquido (CHUNG et al., 2014; LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014).

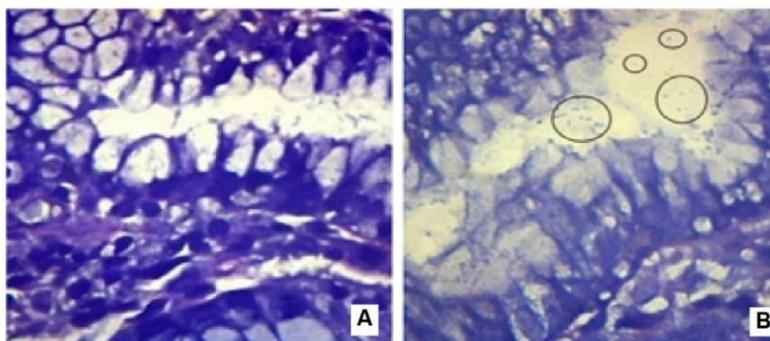
Todavia, o tamanho da biópsia, tempo e temperatura de leitura, distribuição irregular da bactéria na mucosa e uso de medicamentos podem influenciar no resultado, gerando um falso negativo. É necessário aproximadamente o mínimo de 10^5 UFC/amostra (Unidades Formadoras de Colônia) para que o resultado seja positivo e, caso o paciente faça uso de um Inibidor de Bomba de Prótons (IBP), bismuto ou antibiótico até ao menos duas semanas anteriores ao exame, o TRU pode sofrer influência visto a redução de produção de urease (CHUNG et al., 2014). Ainda, a presença de metaplasia intestinal também pode gerar resultado falso negativo e a infecção por outros microrganismos produtores de urease (*Proteus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.*) pode gerar resultado falso positivo caso presentes em grande quantidade (LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014; MATOS et al., 2020; NEVOA et al., 2017; UOTANI; GRAHAM, 2015). Em acompanhamento da terapêutica, tem-se que um teste TRU negativo não deve ser utilizado como critério de cura de forma isolada, visto que o uso recente de medicamentos, o desenvolvimento de metaplasia intestinal e a redução da carga bacteriana (não eliminação) podem negativar o teste mas não representar a cura (UOTANI; GRAHAM, 2015).

O histopatológico, também realizado a partir da coleta de biópsia, permite identificar o microrganismo principalmente pelas técnicas Warthin-Starry (a base de prata), método de Giemsa modificado ou coloração Hematoxilina-Eosina (HE) (COELHO et al., 2018; LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014). As diretrizes atuais sugerem que se faça o uso de 2 técnicas de coloração diferentes: preferencialmente HE para avaliar a inflamação e coloração de Giemsa para detectar a bactéria. Outros métodos (azul de toluidina, laranja de acridina, McMullen, Genta, Dieterle e Romanowski) são utilizados para fins de pesquisa (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014). A sensibilidade e especificidade são superiores a 95% (COELHO et al., 2018; MATOS et al., 2020; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

A grande vantagem do histopatológico é a possibilidade de avaliar o tipo, intensidade e extensão da inflamação através da presença de atrofia, metaplasia e displasia do epitélio gástrico, tendo valor prognóstico importante e fornecendo informações críticas (BARBOSA; SCHINONNI, 2011; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014). Porém, o exame conta com a experiência do patologista, a coleta em local adequado, distribuição desigual do microrganismo na mucosa e pode ser influenciado pelo uso de medicamentos como IBP (COELHO et al., 2018; MATOS et al., 2020; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017). Em um corte histológico, *H. pylori* aparece como um bacilo curvo ou em espiral na superfície epitelial, na camada de muco e dentro de

glândulas gástricas. Em locais de epitélio afetado, principalmente com presença de sangramento, sua localização dificulta o diagnóstico e pode levar a falhas (Figura 1) (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014).

Figura 1 – Exame histopatológico para *Helicobacter pylori* em mucosa gástrica, com técnica de coloração Giemsa, visualizado em aumento de 4.000x no microscópio óptico.



A – Mucosa gástrica normal, sem presença de *H. pylori*.
B – Mucosa gástrica com gastrite atrófica acometida pela presença de *H. pylori* (circulada), bactéria espiralada e Gram negativa.

Fonte: Centro de Anatomia Patológica e Imunohistoquímica (CAPI), 2019.

Em estudo comparou-se 108 amostras (incluindo mucosa normal, gastrite, úlceras, metaplasia e adenocarcinoma) obtidas por biópsia. Através da histologia (coloração por HE), 42,8% apresentaram resultado positivo para a bactéria. Através da técnica de PCR, 61,2% positivaram utilizando o par de primers que amplifica a região do gene ureA. As maiores discrepâncias foram evidenciadas em casos de úlcera, metaplasia e adenocarcinoma, nos quais há grande comprometimento epitelial (CÉSAR et al., 2005).

Visto as limitações e desvantagens dos diagnósticos usuais, a proposta de utilização de testes moleculares baseia-se na ideia de que estes podem fornecer informações mais precisas, possivelmente sendo estendido para finalidades como quantificação bacteriana, detecção de resistência e fatores de virulência. Os testes moleculares baseiam-se, principalmente, na PCR. É uma ferramenta biotecnológica útil no diagnóstico de microrganismos de difícil cultivo. É possível utilizar *primers* (iniciadores) para detectar e amplificar fragmentos específicos do DNA da bactéria em amostras como biópsia, saliva, urina, fezes ou sangue, gerando milhares de cópias do fragmento desejado (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014; NEVOA et al., 2017; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017; VARGAS et al., 2019).

No caso do *H. pylori*, a amostra é coletada e analisada a fresco, congelada ou fixada em parafina. O material genético da bactéria é extraído através da lise de células presentes na amostra e posterior purificação do DNA (separação dos restos celulares e proteínas). Assim, pode-se realizar a

síntese enzimática de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos (HAAS; TORRES, 2016; NEVOA et al., 2017).

Através desta técnica pode-se detectar microrganismos mesmo em pequenas quantidades: seu limite de detecção gira em torno de 0,02 pg de DNA de *H. pylori* - o que corresponde a apenas 10 organismos (CHUNG et al., 2014; COELHO et al., 2018; MENEZES et al., 2015). As amostras biológicas utilizadas podem ser de tecido gástrico mas também de fontes não invasivas – fator extremamente positivo quando se pensa em diagnóstico menos agressivo (LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014). É um teste sensível, específico, ágil e reprodutível (GAMA, 2018).

A tecnologia da PCR é extremamente flexível, permitindo modificações que garantem seu emprego em uma diversidade de amostras. Além disso, derivações dessa técnica – como PCR multiplex e PCR quantitativo (qPCR) – possibilitam ainda um maior número de aplicações e maior eficiência de acordo com o objetivo desejado (HAAS; TORRES, 2016).

Comumente, a identificação acontece através da amplificação das regiões 16S rRNA e do gene ureA. O primeiro amplifica fragmentos de aproximadamente 150 pares de bases (PB), enquanto o segundo em torno de 400 PB. O gene ureA é importante por conferir à bactéria a capacidade de produção de urease, já o 16S rRNA é uma região conservada do DNA procariótico, permitindo sua identificação (NEVOA et al., 2017). Em estudo realizado por Nevoa et al. (2017), 77,64% das amostras positivaram quando o gene analisado por PCR foi o 16S rRNA (HpX/HpX1), enquanto 82,35% amplificaram quando se considerou o gene ureA (H5/H6). Comparado ao TRU, apenas 17,64% das amostras apresentaram resultado positivo.

A sensibilidade da PCR depende de alguns fatores, dentre eles a qualidade e quantidade da extração do DNA, condições adequadas de reação, desenho de primers e regiões a serem amplificadas. Já a especificidade está muito mais relacionada a região selecionada e exclusividade do microrganismo em questão. Regiões com altas taxas de mutação, por exemplo, devem ser evitadas, uma vez que se aumenta o risco de ampliações inespecíficas (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2007).

Buscando o proveito máximo deste tipo de diagnóstico, torna-se conveniente também a escolha por uma qPCR. Já distribuída mundialmente, a diferença desta técnica está relacionada principalmente a quantificação do material genético alvo. O uso de sondas (fluoróforos intercalados a primers específicos para regiões em que se deseja amplificar) permite que ocorra emissão de fluorescência quando este conjunto se ligar ao DNA alvo (clivagem). O termociclador acoplado a um sistema óptico é capaz de detectar através do comprimento de onda a sonda fluorescente e quantificá-la de acordo com sua intensidade à medida que os ciclos progridem. É possível, através desse processo, identificar e ter dimensão da carga do microrganismo presente. A emissão de fluorescência e sua quantificação torna-se mais sensível quando comparado a um resultado obtido em gel de

agarose, através da PCR convencional (HAAS; TORRES, 2016; LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

A metodologia quantitativa pode ser útil no monitoramento da terapêutica. A presença de formas cócoides (dormentes e não suscetíveis à ação antibiótica, que requer proliferação ativa), o possível não alcance do antimicrobiano em todas as regiões estomacais, os próprios fatores de virulência e resistência a antibióticos, adesão do paciente e secreção de ácido gástrico (antimicrobianos tem seu efeito reduzido em pH baixo) podem ter relevância clínica devido ao potencial de reativação da bactéria após sua terapia. A carga da bactéria pode sofrer redução, apresentando resultado negativo em outros tipos de testes empregados, sem necessariamente ter sido eliminada por completo. Neste caso a qPCR, por ser sensível, pode ser capaz de detectar uma quantidade mínima da bactéria – contribuindo também com o diagnóstico precoce (FRANCESCO et al., 2012).

Limitações apresentadas para o teste molecular incluem o custo elevado e condições específicas para execução, além de também sofrer influência devido ao local de coleta – embora sua alta sensibilidade minimize esse fator. Em seu início, era restrito a laboratórios de referência e profissionais extremamente capacitados. Atualmente, seu acesso já é muito mais comum na rotina clínica e o custo benefício do exame é um fator a ser considerado (COELHO et al., 2018; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014; NEVOA et al., 2017; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

Outra limitação apresentada pela técnica molecular em questão é a amplificação não somente de células viáveis, mas também daquelas injuriadas ou mortas. Tornou-se necessário, portanto, o desenvolvimento de uma solução para este problema. Logo, o Propídio Monoazida (PMA), derivado do iodeto de propídio, é um intercalante de DNA capaz de penetrar apenas em células não viáveis, impedindo que o DNA destas seja amplificado pela técnica da PCR. Essa substância se liga covalentemente à dupla fita de DNA a partir da exposição à luz com um determinado comprimento de onda (SALGADO; CASTRO, 2015).

Em estudo, Salgado, Castro (2015) analisaram a presença de *Campylobacter* spp. (pertencente à mesma ordem de *H. pylori*) em carcaças de frango de corte congeladas e resfriadas. Notou-se que utilizando a metodologia de qPCR com PMA o número de amostras positivas foi inferior ao teste em que o intercalante não foi utilizado. Esse resultado levou os pesquisadores a concluir que, dentre as amostras positivadas sem uso de PMA, algumas apresentavam células de *Campylobacter* spp. não mais viáveis – provavelmente inativas após a morte e processamento da carne. Desta forma, utilizando o intercalante em questão, é possível alcançar a diferenciação entre microrganismos viáveis ou não.

Ainda, a PCR permite a realização de genotipagem para diferenciação de cepas, identificação de genes de interesse como fatores de patogenicidade e aqueles relacionados à susceptibilidade a antimicrobianos. Sendo assim, pode ser fator essencial ao diagnóstico e ainda colaborar com o tratamento (CHUNG et al., 2014; COELHO et al., 2018; DADASHZADEH;

PEPPELENBOSCH; ADAMU, 2017; MENEZES et al., 2015; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017).

Quando se trata de genotipagem e variação genética, esta bactéria apresenta genes que codificam fatores de patogenicidade intimamente relacionados à maior agressividade durante sua permanência no hospedeiro (MENEZES et al., 2015). O gene *cagA* (*cytotoxin associated gene A*), encontrado em alta frequência, aumenta o risco de desenvolver câncer gástrico por estar relacionado a estimulação de elevada produção de citocinas por parte do hospedeiro, resultando em aumento de resposta inflamatória (GAMA, 2018; MENEZES et al., 2015; POLK; JR, 2010; TEIXEIRA; SOUZA; ROCHA, 2017). O gene *iceA* (*induced by contact with epithelium*) codifica a proteína IceA, produzida quando há o contato da bactéria com o epitélio gástrico, estando ligada ao aumento de interleucina 8 (DADASHZADEH; PEPPELENBOSCH; ADAMU, 2017). O gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin*), presente em todas as cepas, codificador da proteína VacA, é responsável por induzir vacuolização em células epiteliais (SILVA et al., 2010). Ainda, o gene *oipA* (*outer inflammatory protein*) é responsável também pela regulação de citocinas pró-inflamatórias e da aderência da bactéria às células epiteliais gástricas (POLK; JR, 2010).

A espécie *H. pylori* é, portanto, geneticamente heterogênea, o que sugere uma falta de clonalidade. Isso pode ser causado por processos de deleção, inserção ou rearranjos do DNA como consequência de adaptações da bactéria às condições do local colonizado, respostas do sistema imunológico do hospedeiro ou de tratamentos aos quais este foi submetido. Logo, cada indivíduo infectado pode apresentar uma cepa distinta, com variações inclusive nos fatores de patogenicidade. Esse fato, além de estar relacionado aos graus de severidade, também dificulta a escolha de um tratamento específico e eficaz (BARBOSA; SCHINONNI, 2011). Dessa forma, a genotipagem visando a descrição dos fatores de patogenicidade é considerada uma das melhores abordagens para o estudo e diagnóstico de isolados de *H. pylori* (HEMMATINEZHAD; MOMTAZ; RAHIMI, 2016).

Em estudo realizado por Hemmatinezhad, Momtaz, Rahmi (2016), de 550 amostras de alimentos prontos para consumo analisados através de técnica molecular, 74 (13,45%) apresentaram resultado positivo para *H. pylori*, sendo 15 combinações de genótipos diferentes encontradas ao investigar a presença de *vacA*, *cagA*, *iceA* e *oipA*. O gene *vacA* foi o mais prevalente encontrado, seguido pelo *cagA*. Já em estudo realizado por Silva et al. (2010), também através de método molecular, o gene *cagA* foi encontrado em 92,3% das amostras de pacientes com gastrite crônica, e 65,4% apresentaram resultado positivo para a variante *iceA1*. Tais descobertas são possíveis, apenas, através da PCR. Fatores de virulência são apontados como marcadores prognósticos de fracasso ou sucesso da terapia, sendo essencial serem avaliados antes do início da mesma, garantindo um regime personalizado para obtenção de taxas mais altas de cura (SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009).

Consequências da falha terapêutica incluem complicações clínicas relacionadas a persistência do microrganismo e exposição exagerada a altas doses de antimicrobianos, gerando custos extras ao sistema de saúde e aumento da resistência a antibióticos. Existem *guidelines* para auxiliar na escolha do melhor tratamento, mas estes mesmos incluem avisos sobre a possível falha na terapia (SHAH; IYER; MOSS, 2021).

Atualmente, a PCR vem sendo utilizada apenas como método de detecção, mas pensando em todos os fatores citados, sua utilização pode ir muito além. A opção por uma PCR multiplex pode fornecer diversas informações em um único exame (CHUNG et al., 2014). Nesta técnica, diferentes regiões do DNA podem ser amplificadas ao mesmo tempo, no mesmo tubo, utilizando mais de um par de primers simultaneamente. Assim pode-se reduzir custos e tempo, além da necessidade de uma quantidade menor de ácido nucleico para o diagnóstico – o que por vezes, pode ser fator limitante (HAAS; TORRES, 2016; MENEZES et al., 2015).

Em estudo, Chung et al. (2014), além de identificar indivíduos positivos para *H. pylori*, a PCR multiplex apontou que 20% apresentaram alguma mutação de rRNA 23S associado à resistência à Claritromicina, antibiótico mais empregado na clínica. *H. pylori*, assim como algumas outras bactérias, adquire resistência por mutação, fato que permite essa identificação através de testes moleculares (LOPES; VALE; OLEASTRO, 2014).

Utilizando as sondas propostas na qPCR, existem equipamentos capazes de identificar e quantificar até 8 fluoróforos distintos, com diferentes espectros, permitindo a realização em conjunto da PCR multiplex. Assim, seria possível além de identificar e quantificar com maior sensibilidade a presença da bactéria, detectar outros genes envolvidos na resistência antimicrobiana e na patogenicidade, sem sobreposição de bandas como poderia ocorrer na PCR convencional. Esse fato torna o método também mais específico (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

A utilização de amostras não invasivas através da PCR também é uma possibilidade. Embora existam poucas pesquisas que abordem esse ponto, o uso de outras amostras, como sangue e fezes, sem necessitar de uma EDA, é um item que merece destaque e espaço em estudos experimentais. Esse fato pode ser ainda mais significativo considerando o diagnóstico infantil (MENEZES et al., 2015). Recomendações para crianças com suspeita da infecção sugerem que se tente ao máximo evitar exames invasivos, principalmente devido ao desconforto e a sedação necessária. Através da qPCR multiplex é possível a obtenção de mais informações e mais certas, evitando a maior exposição da criança a técnicas invasivas (MATOS et al., 2020).

Em suma, o quadro 1 apresenta um comparativo entre os principais métodos empregados para diagnóstico de *H. pylori* e a PCR:

Quadro 1 – Comparativo entre principais métodos empregados para diagnóstico de *H. pylori* e a PCR.

Características	Métodos para diagnóstico de <i>Helicobacter pylori</i>			
	TRU ¹	Exame Histopatológico	PCR ²	UBT ³
Vantagens	<p>Simplex; Rápido; Preciso; Vários kits disponíveis; Detecta a presença de infecção ativa.</p>	<p>Possibilita avaliar o tipo, intensidade e extensão do dano epitelial, caso haja.</p>	<p>Maior sensibilidade; Possibilita uso de maior tipo de amostras; Reprodutível; Não depende da presença da bactéria viva; Permite genotipagem; Permite quantificação.</p>	<p>Não sofre influência da distribuição desigual da bactéria; Pode ser usado em segurança para crianças e gestantes.</p>
Desvantagens	<p>Influência do tamanho da biópsia e local de coleta; Influência medicamentosa; Influência da integridade do epitélio gástrico; Contaminação</p>	<p>Dependente da experiência do patologista; Influência do tamanho da biópsia, local de coleta e integridade epitelial; Influência medicamentosa.</p>	<p>Influência do tamanho da biópsia e local de coleta; Custo mais elevado; Equipamentos específicos; Amplificação de microrganismos não vivos.</p>	<p>Influência medicamentosa; Interferência de bactérias ureásicas; Não disponível no serviço público brasileiro.</p>

¹ Teste Rápido de Urease; ² Reação em Cadeia da Polimerase; ³ Teste Respiratório com Uréia Marcada com Carbono.

Fonte: Os autores, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aprimorar o conhecimento a respeito de microrganismos a nível molecular auxilia o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento, evitando um maior número de infecções e complicações. A técnica de PCR pode ser benéfica nesse quesito, uma vez que pode alcançar altos índices de sensibilidade e especificidade, permitir o uso de amostras não invasivas, detectar também genes de patogenicidade e resistência antimicrobiana, além de possivelmente identificar a presença da bactéria mesmo em pequenas quantidades. As técnicas de qPCR e multiplex ainda permitem o uso de sondas (tornando-a mais sensível e específica) e a

identificação de diversas informações em um único exame, respectivamente. Ainda que as técnicas moleculares apresentem custo mais elevado, os benefícios tanto para a clínica quanto para o paciente podem tornar-se compensatórios, tornando a metodologia molecular destaque entre as demais disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, J. A.; SCHINONNI, M. I. *Helicobacter pylori*: associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 254, 2011.

CÉSAR, A. C. G. et al. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 12–16, 2005.

CHUNG, W. C. et al. Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR using tissue samples in rapid urease test in the detection of *Helicobacter pylori* infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 21, p. 6547–6553, 2014.

COELHO, L. G. V. et al. IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* Infection. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, n. 2, p. 97–121, 2018.

DADASHZADEH, K.; PEPPELENBOSCH, M. P.; ADAMU, A. I. *Helicobacter pylori* pathogenicity factors related to gastric cancer. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2017.

DORE, M. P.; GRAHAM, D. Y. Modern approach to the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 55, n. S1, p. S14–S21, 2022.

FRANCESCO, V. DE et al. *Helicobacter pylori* therapy: Present and future. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 3, n. 4, p. 68, 2012.

GAMA, M. C. F. DE L. R. Tratamento da infecção pelo *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes. **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2018.

GARZA-GONZÁLEZ, E. et al. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment and methods to detect eradication. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 6, p. 1438–1449, 2014.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica De Medicina Veterinária**, v. 26, p. 1679–7353, 2016.

HEMMATINEZHAD, B.; MOMTAZ, H.; RAHIMI, E. *VacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA*

genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* isolated from various types of ready to eat foods. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2016.

LADEIRA, P. R. S. DE; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa em Tempo Real. **Rev Med (São Paulo)**, v. 90, n. 1, p. 47–51, 2011.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 335–342, 2003.

LOPES, A. I.; VALE, F. F.; OLEASTRO, M. *Helicobacter pylori* infection - Recent developments in diagnosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 28, p. 9299–9313, 2014.

MATOS, I. A. et al. *Helicobacter pylori* infection in children. **BMJ Paediatrics Open**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2020.

MENEZES, G. DE L. et al. Aplicações da Biologia Molecular no diagnóstico de *Helicobacter pylori*: revisão da literatura. **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 01, n. 01, p. 132–140, 2015.

NEVOA, J. C. et al. Molecular technique for detection and identification of *Helicobacter pylori* in clinical specimens: a comparison with the classical diagnostic method. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 1, p. 13–19, 2017.

OLIVEIRA, M. C. D. S. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**, p. 43, 2007.

OTOYA-MORENO, G. et al. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y manejo de la infección por *Helicobacter pylori* en enfermedades gastroduodenales en el Seguro Social de Salud del Perú (EsSalud). v. 41, n. 3, p. 191–200, 2021.

PINTO, C. S.; ALVES, P.; FRASCO, J. Efeito dos probióticos na erradicação do *Helicobacter pylori*: uma revisão baseada na evidência. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 35, n. 5, p. 392–400, 2019.

POLK, D. B.; JR, R. M. P. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, n. 6, p. 403–414, 2010.

SALGADO, A. G.; CASTRO, A. Detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas e congeladas por PCR em tempo real associada a propídio monoazida (PMA). **Universidade Federal de Minas Gerais**, p. 1–54, 2015.

SHAH, S. C.; IYER, P. G.; MOSS, S. F. M. Clinical practice update on the

management of refractory *Helicobacter pylori* infection: expert review. **Gastroenterology**, v. 160, n. 5, p. 1831–1841, 2021.

SILVA, M. R. et al. Genotipagem do *Helicobacter pylori* no carcinoma gástrico e gastrite crônica. **Jornal Português de Gastroenterologia**, v. 18, p. 213–218, 2010.

SILVA, M. R. et al. Genotipagem do *Helicobacter pylori* no carcinoma gástrico e gastrite crônica. **Jornal Português de Gastroenterologia**, v. 18, p. 218–225, 2011.

SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradications therapy. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 57, n. 1, p. 45–56, 2009.

TEIXEIRA, T. F.; SOUZA, I. K. F.; ROCHA, R. D. R. *Helicobacter pylori*: infecção, diagnóstico laboratorial e tratamento. **Revista Interdisciplinar PUC Minas**, v. 6, n. 12, p. 481–504, 2017.

UOTANI, T.; GRAHAM, D. Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the Rapid Urease Test. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2015.

VARGAS, L. J. et al. Métodos diagnósticos para detecção da infecção pelo *H. pylori*: revisão sistemática. **Pará Research Medical Journal**, v. 3, n. 2, p. 2–7, 2019.

WENG, C. Y. et al. *Helicobacter pylori* eradication: exploring its impacts on the gastric mucosa. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 31, p. 5152–5170, 2021.