

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO COMPARATIVO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL CLÁSSICO E MOLECULAR DE *HELICOBACTERPYLORI*: UMA ABORDAGEM INVESTIGATIVA.

Roger Luiz Rodrigues¹
Hemelly Faria Nascimento¹
Gabriela de Lima Menezes¹
Andressa Rodrigues Lopes¹
Jessica Caraiola Nevoa²
Wanessa Cristina Soares Soares¹
Silvana Barbosa Santiago³
Monica Santiago Barbosa⁴

RESUMO: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria espiralada, microaerófila, gram negativa que habita a mucosa gástrica humana. Mais de 90% da população mundial esta infectada com o micro-organismo, a presença da bactéria está associada a doenças como gastrite crônica, distúrbios de úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma gástrico; porém nem todos os indivíduos infectados apresentam patologias clinicamente significantes. Um diagnóstico eficaz é de grande necessidade no tratamento e no controle das infecções, desde modo é importante que este seja preciso, apresente alta acurácia, seja rápido e de baixo custo. Nesse cenário o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre o conhecimento no que concerne ao estudo comparativo dos exames clínicos laboratoriais clássicos e moleculares de *H. pylori*, relacionando custo, precisão e reprodutibilidade. O teste rápido da urease e o exame histológico apresentaram nível considerável de especificidade e sensibilidade, além de baixo custo. Os testes moleculares proporcionam maior especificidade e sensibilidade, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), apresenta ainda a vantagem de utilizar métodos não invasivos para obtenção da amostra. A qPCR apresenta um benefício adicional pois permite a quantificação da amostra, entretanto ambas tem como desvantagem o alto custo. Apesar do custo mais elevando, os testes moleculares, são mais promissores, pois além de serem mais rápidos, permitem identificar a presença da bactéria antes mesmo das manifestações clínicas.

PALAVRAS CHAVES: *H.pylori*. Diagnóstico clássico. PCR.

ABSTRAT: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a spiral bacteria, microaerophilic, Gram negative inhabiting the human gastric mucosa. More than 90% of the world population is infected with the microorganism, the presence of bacteria is associated with diseases such as chronic gastritis, peptic ulcer disorders, gastric cancer and gastric lymphoma; But not all infected individuals present clinically significant pathologies. Effective diagnosis is of great need in the treatment and control of infections, since so it is important that this is accurate, has high accuracy, is fast and inexpensive. In this scenario, this study aimed to carry out a

¹ Graduandos em Biomedicina, Universidade Federal de Goiás- Regional Jataí.

² Biomédica graduada pela Universidade Federal de Goiás- Regional Jataí.

³ Docente da Faculdade Alfredo Nasser

⁴ Docente Adjunto IV da Universidade Federal de Goiás.

literature review on knowledge regarding the comparative study of classical laboratory clinical and molecular *H. pylori*, linking cost, accuracy and reproducibility. The rapid urease test and histological examination showed satisfactory level of specificity and sensitivity, and low cost. Molecular tests offer higher specificity and sensitivity, PCR (Polymerase Chain Reaction), also presents the advantage of using non-invasive methods for obtaining the sample. The qPCR has an additional benefit because it allows the quantification of the sample, however both have the disadvantage of high cost. Despite the cost highest levels, molecular tests, are more promising, because in addition to being faster, identifying the presence of bacteria even before the clinical manifestations.

Key-words: *H. pylori*. Classic diagnosis. PCR.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), foi descrita por Warren e Marshall, em 1984, o micro-organismo é gram-negativo, espiralado, microaerófilo, flagelado e coloniza a região gástrica humana. *H. pylori* infecta aproximadamente 90% da população mundial sendo a causa principal de várias doenças gastrintestinais, incluindo gastrite crônica, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma gástrico, segundo a organização mundial da saúde, a bactéria classificada como carcinógeno tipo I (WHO, 2013).

O diagnóstico exato e preciso de *H. pylori* é muito importante para um tratamento rápido e eficaz no controle da infecção. Dentre os vários testes diagnósticos que podem ser utilizados no contexto clínico e laboratorial, nenhum deles apresenta índices ideais, quando utilizados separadamente, demonstrando algum tipo de desvantagem no diagnóstico, seja relacionado ao custo elevado a capacidade de ser reproduzível (CÉSAR et al., 2005; SILVA et al., 2007; MONCAYO ORTIZ et al., 2011).

Um diagnóstico ideal deve atender quatro princípios, sendo eles, acurácia, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Desta maneira o diagnóstico ideal para detecção por *H. pylori* deve apresentar precisão, ausência de falso-positivos e falso-negativos, ser reprodutivo, além de ter um custo acessível (FLORES, 2005).

A infecção por *H. pylori* é considerada um problema de saúde pública, o diagnóstico preciso é de suma importância para prevenção, bem como para a conduta terapêutica das patologias ocasionadas por esse micro-organismo. Mediante o exposto, o presente trabalho objetivou contribuir para o estudo comparativo entre os métodos clássicos e moleculares de identificação de *H. pylori*.

2. MÉTODOS

Tratou-se de um estudo de natureza bibliográfica e documental, o levantamento de dados foi realizado através de consultas a livros e periódicos, bem como artigos científicos oriundos das bases de dados indexadas: Scientific Electronic Library Online - SciELO, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde - LILACS, Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line - MEDLINE. Quanto à pesquisa dos dados, foram usadas as terminologias cadastradas nos Descritivos em Ciências da Saúde (DeCS) gerados pela Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Padronizados a partir do *MeSH - Medical Subject Headings da U.S. National Library of Medicine (NLM)*, que admite o uso de terminologia comum em Português, Inglês e Espanhol.

Os grupos de palavras-chave empregadas para busca nas bases de dados foram: *H. pylori*, Diagnóstico Laboratorial Clássico; Diagnóstico Molecular. Os critérios de inclusão foram pesquisas e evidências que abordassem o diagnóstico clinicolaboratorial de *H. pylori*, sendo excluídos os estudos não pertinentes ao diagnóstico clínico laboratorial clássico e molecular de *H. pylori*.

REFERENCIAL TEÓRICO

No contexto clínico e laboratorial de detecção da presença e da infecção por *H. pylori*, a forma como a amostra do tecido para diagnóstico é obtida do paciente distingue os métodos em invasivos e não-invasivos. Os invasivos são aqueles em que há a necessidade de realização de biópsia gástrica retirando uma parte do tecido gástrico, os não-invasivos são os métodos em que não há a necessidade de realização de biópsias nos pacientes, podendo ser utilizados como amostras os alimentos, a respiração, saliva, placa dental ou fezes (MONCAYO ORTIZ et al., 2011; ARISMEND-MORILLO et al., 2011).

O Teste Rápido de Urease (TRU), caracterizado como um teste diagnóstico invasivo é um dos testes mais comumente utilizado em contexto laboratorial e clínico devido a sua facilidade, agilidade e baixo custo para identificar *H. pylori*, o exame, pode ser realizado no próprio local de extração da biópsia. O diagnóstico baseia-se na mudança de cor do tecido da biópsia gástrica de amarelo/alaranjado para vermelho quando mergulhado em solução de uréia, confirmando, desta forma, a positividade ou, na ausência da mudança de cor, a negatividade da amostra. A alteração de cor ocorre devido a mudança do pH, resultante da produção de amônia e bicarbonato, ocasionada pela hidrólise da uréia, essa reação é

catalisada pela urease presente na bactéria (GUIMARÃES et al., 2008, RAMIS et al., 2012; POURAKBARI et al, 2013).

O teste histológico (TH), caracterizado como um teste diagnóstico de caráter invasivo, usado conjuntamente com o TRU é a combinação mais comum no diagnóstico realizado em clínicas e laboratórios. Ele fundamenta-se na observação da presença ou ausência da bactéria vista ao microscópio óptico, por meio do corte histológico. O material é preparado pelo método de rotina em preparados histológicos com fixação em formaldeído e parafina e corado com Hematoxilina-Eosina (HE) e/ou modificado de Giemsa, seguido por cortes finos em micrótomo para posterior observação (RAMIS et al., 2012; POURAKBARI et al, 2013).

Os estudos genéticos moleculares utilizam uma variedade de técnicas para analisar os ácidos nucleicos (DNA e RNA). Dentre estas técnicas se destacam a técnica de hibridização e técnicas de amplificação de alvos-específicos (MOLINA; TOBO, 2004).

Na área das doenças infecciosas, a detecção rápida de microrganismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis, se tornou possível através das técnicas de biologia molecular resultando um grande avanço na área da medicina. A disponibilidade dos métodos moleculares tornou possível a determinação de resistência antimicrobiana, monitoramento de doenças através da quantificação do microrganismo e determinação do genótipo de espécies (LINSOTT, 2002; MOLINA; TOBO, 2004).

A bactéria *H. pylori* expressa alguns genes que estão relacionados diretamente com a sua ação patogênica no organismo do hospedeiro como o gene: *ureA*, *vacA*, *cagA*, *iceA*, dentre outros genes. Estes genes quando expressos são chamados de fatores de virulência e a comprovação de sua existência, além de provar a presença da bactéria, também mostra o seu nível de virulência e agressividade. O método de diagnóstico por (Reação em Cadeia da Polimerase), apresenta-se como um poderoso método para identificação do genoma da bactéria na busca por estes genes. A PCR pode ser utilizada em amostras obtidas de modo invasivo provenientes da biópsia gástrica e não-invasivo proveniente, por exemplo, de salivas e placas dentais (RASMUSSEN et al., 2012; ASHOUR et al., 2013; ESSAWI et al., 2013; LUSCENTI; GATTI, 2008).

A PCR tradicional no diagnóstico de *H. pylori*, é um método que consiste em três etapas: isolamento e extração do DNA bacteriano, por meio de reagentes que causam lise celular; amplificação da região desejada do genoma com oligonucleotídeos; visualização e

análise da amplificação gênica com o uso de eletroforese em gel de agarose 2%. A amplificação exata da região desejada é obtida com o uso de oligonucleotídeos também específicos que podem ser obtidos diretamente da biblioteca de genomas (LUSCENTI; GATTI, 2008).

A PCR em Tempo Real (qPCR) é uma variação da técnica de PCR, esta se difere da PCR tradicional principalmente pela agilidade do resultado no processo e pela utilização de marcadores (fluorocromos e sondas) para visualização do produto amplificado. O aumento da velocidade no diagnóstico se deve pela emissão de fluorescência pelo fluorocromo, que permite a detecção e visualização do produto de amplificação em uma única etapa. Para esta detecção, um microespectrofluorímetro é associado ao termociclador. Na qPCR não é necessária a manipulação do produto pós PCR sendo dispensada a visualização destes em gel de agarose, a visualização e identificação do produto amplificado é possível pela análise das curvas na Temperatura de Fusão (TM), evitando contaminações (SILVA et al., 2007).

Os testes sorológicos são utilizados para medir a quantidade de anticorpos IgG, IgA e IgM específicos para *H. pylori* que estão presentes no organismo do paciente. A presença de quantidades significativas destes anticorpos representa a existência da infecção. O teste é realizado utilizando amostra sanguínea, o soro é utilizado na realização de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (CAETANO et al., 2008; SILVA et al., 2010; POURAKBARI et al., 2013).

Outro teste utilizado na detecção de *H. pylori* é a cultura, neste método, uma amostra da biópsia do tecido gástrico é cultivada “in vitro”. De acordo com Arismendi-Morillo et al., 2011, primeiramente a cultura deve ser realizada em dois meios distintos contendo ágar brucella enriquecidos com sangue de ovelha a 5%, o primeiro seletivo com adição de antibióticos e o segundo não-seletivo, ambos incubados em ambiente microaerófilo por, aproximadamente, 7 dias. Este é um método lento e sua principal vantagem é a capacidade de determinar a susceptibilidade e resistência aos antimicrobianos.

A qualidade dos testes apresentados para identificar a presença de *H. pylori* é garantida pela capacidade deles em distinguir um resultado verdadeiramente positivo ou verdadeiro negativo de um falso positivo ou falso negativo. Ele deve possuir considerável especificidade e sensibilidade e deve estar aliada a características como baixo custo, fácil realização, uso de equipamentos e técnicas rotineiras e ter boa aceitação pelo paciente (CAETANO et al., 2008).

O padrão ouro para o diagnóstico de *H. pylori* é o uso combinado do TRU com o histológico, seguindo o princípio de que o uso combinado de pelo menos dois testes é necessário para um diagnóstico mais eficaz e preciso, oferecendo um maior nível de acurácia para oA utilização de forma combinada do TRU com o histológico é apreciada por apresentar um resultado satisfatório de sensibilidade e especificidade, além de apresentar baixo custo em relação a outro teste preciso como a PCR. Além destes fatos, o histológico apresenta grande aceitação no diagnóstico clínico pelo fato dele possibilitar ao médico saber o grau de comprometimento que se encontra o epitélio gástrico. Um problema a ser evitado na TRU e que pode alterar o resultado é a utilização anterior ao teste de medicamentos como: inibidores da bomba de prótons, antagonistas do receptor-H2, antibióticos ou compostos com bismuto. Outro aspecto negativo relacionado ao TRU é o fato de que outras bactérias que habitam o mesmo ambiente que a *H. pylori*, também sintetizam ureia aumentando a quantidade de laudos falso-positivos laudo (RAMIS et al., 2012; MONCAYO-ORTIZ et al., 2011).

A PCR é apreciada devido a sua alta capacidade de sensibilidade e especificidade. Porém, ela possui a desvantagem do elevado risco de contaminação da amostra, resultado da amplificação indesejada de outras sequências gênicas presentes na local de manipulação das amostras (contaminantes), interferindo desta maneira na especificidade do método. Por isso, é importante eliminar todos os possíveis contaminantes da área de trabalho. O problema de contaminação pode ser minimizado com a utilização da PCR em Tempo Real que não precisa do manuseio constante da amostra. Outra vantagem da PCR em Tempo Real é a possibilidade de avaliar a eficácia dos antibióticos através do estudo dos genes de resistência bacterianos. Uma desvantagem inerente à técnica é a presença dos inibidores de PCR que afetam diretamente o resultado do teste e podem estar presentes tanto na amostra quanto nos reagentes usados na coleta ou no preparo da PCR. Exemplos de inibidores que afetam o diagnóstico de *H. pylori* são grupamentos heme presente no sangue total, bilirrubina, bile e sais. Outro fator é a sensibilidade da *Taq* DNA-polimerase a uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, como: proteinase K, ureia, detergentes (SDS), heparina, fenol, acetato de sódio, EDTA e isotiocianato de guanidina (ROSSETTI, 2006; SILVA et al., 2007; CESAR et al., 2005).

A busca por um teste diagnóstico cada vez menos invasivo e que traga, portanto, menos desconforto ao paciente também é alcançado na PCR, podendo ser utilizada placa dental ou até mesmo a saliva. A utilização dos métodos moleculares na rotina laboratorial ainda permanece restrita devido ao alto preço e complexidade quando comparada ao TRU e ao

histológico. Outra possibilidade de métodos menos invasivos e com resultados satisfatórios é o Teste Imunohistoquímico ou Sorológico, porém apresenta a desvantagem de detectar antígenos presente no organismo do paciente, sem que o mesmo apresente infecção ativa, visto que estes antígenos demoram um tempo para ser eliminado do organismo do paciente (RASMUSSEM et al., 2012).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma o diagnóstico rápido e preciso da infecção por *H. pylori* é de extrema relevância para um tratamento eficaz das patologias decorrentes desta infecção. As técnicas moleculares estarão sendo utilizadas com mais frequência no decorrer dos tempos e vem contribuir com as técnicas tradicionais, proporcionando diagnósticos cada vez mais precisos e em curto prazo de tempo. Assim, podemos ressaltar que o diagnóstico molecular é um campo em franco avanço científico e tecnológico, no qual novas técnicas moleculares estão em desenvolvimento para o diagnóstico de bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

ABRANTE, L.; REYES, N.; ALEXANDRA GARCÍA-AMADO, M.; SUÁREZ, P.; ROMERO, R.; MICHELÁNGELI, F.; CONTRERAS, M. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* por PCR em jugo gástrico y biopsias gastroesofágicas de pacientes dispépticos. **Invest. Clin.**, n. 53, p.168-177, 2012.

ARISMENDI-MORILLO, G.; HERNÁNDEZ, I.; MENGUAL, E.; FUENMAYOR, A.; ROMERO, G.; LIZARZÁBAL, M. Comparison of three methods based on endoscopic gastric biopsies for diagnosis of *Helicobacter pylori* active infection in a clinical setting. **Arq. Gastroenterol**, v. 48, n. 3, p. 190-194, jul/set. 2011.

CAETANO, A.; FELIX, V.N.; COIMBRA, F.T.V.; GANC, A.J. *Helicobacter pylori* e doença péptica. Estudo comparativo de métodos diagnósticos. **Arq. Gastroenterológico**, v.45, n. 3, p.255 -257, jul-set.2008.

CÉSAR, A.G.C.; CURY, P.M.; PAYÃO, S.L.M.; LIBEROTE, P.R.; SILVA, A.E. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter Pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 12-16, 2005.

FLORES, R.E.; A Medicina Baseada em Evidências e o Diagnóstico Laboratorial. **NewsLab**, ed.73, p. 92-103, 2005.

LUSCENTI, R.S.; GATTI, L.L. Diagnóstico molecular da infecção pelo *Helicobacter pylori* em mucosa gástrica. **Revista Paraense de Medicina**, v.22, p. 21-26, jan-mar.2008.

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

MONCAYO ORTIZ, J.I.; ÁLVAREZ ALDANA, A.; SANTACRUZ IBARRA, J.J.; SANTACOLOMA OSORIO, M.; ARTURIO ARIAS, B.L.; GIRALDO MARTÍNES, L.; ÁNGEL PINZÓN, A. Evaluación de diferentes pruebas para el diagnóstico de *h. pylori*. **Investigaciones Andina**, n. 23, v. 13, p. 297-311, jul.2011.

POURAKBARI, B.; GHAZI, M.; MAHMOUDI, S.; MAMISH, S.; AZHDARKOSH, H.; NAJAFI, M.; KAZEMI, B.; SALAVATI, A.; MIRSALEHIAN, A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, jul.2013.

RAMIS, I.B.; MORAES, E.P. de; MÁRCIA, S.F.; MENDOZA-SASSI, R.; RODRIGUES, O.; JULIANO, C.R.V.; SCAINI, C.J.; SILVA, P.E.A. da. Evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 903-908, jun.2012.

RASMUSSEN, L.T.; LABIO, R.W. de; GATTI, L.L.; SILVA, L.C da; VALDEIR, F.Q.; SMITH M.A.C.; PAYÃO, S.L.M.P. *Helicobacter pylori* detection in gastric biopsies, saliva and plaque dental of Brazilian dyspeptic patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.105, p.326-330, mai.2010.

RASMUSSEN, L.T.; LABIO, R.W. de; NETO, A.C.; SILVA, L.C.; QUEIROZ, V.F.; SMITH, M.A.C.; PAYÃO. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies, saliva and plaques of dyspeptic patients from Marília, São Paulo, Brazil: presence of *vacA* and *cagA* genes. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.18, p. 180-187, 2012.

ROSSETTI, M. L. **Doenças infecciosas: diagnóstico molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUPARELIA, J. R.; SODAGAR, N. R.; PATEL, J. S.; PANDYA, H. B.; SINGH, N. R., NAIK, K. B.; PRAJAPATI, H. B. Comparison of Conventional Diagnostic Modalities with PCR for Detection of *Helicobacter Pylori* Infection in Symptomatic Patients. **Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Researches Asian J. Med. Pharm. Res.**3(4), p. 105-110, 2013.

SILVA, F.M.; RAMOS, J.; PELERITO, A.; MONTEIRO, L. O potencial da PCR em tempo real no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*. **Revista Lusitana de Ciências e Tecnologia da Saúde**, v.4, n.1, p. 89-99, 2007.

SILVA, J.M.K. da; VILLARES, C.A.; MONTEIRO, M.S.; COLAÚTO, C.; SANTOS, A.F. dos; MATTAR, R. Validation of a rapid stool antigen test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.5, n. 3, p.125-128, mai-jun. 2010.