

**Gustavo Miranda Martins**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA DO *HELICOBACTER  
PYLORI* À CLARITROMICINA E FLUORQUINOLONAS,  
DIRETAMENTE A PARTIR DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS, EM BELO  
HORIZONTE**

**FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE**

**2014**

**GUSTAVO MIRANDA MARTINS**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA DO *HELICOBACTER  
PYLORI* À CLARITROMICINA E FLUORQUINOLONAS,  
DIRETAMENTE A PARTIR DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS, EM BELO  
HORIZONTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, Área de Concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

**Belo Horizonte**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**2014**

Martins, Gustavo Miranda.

M386d Detecção molecular de resistência do *Helicobacter pylori* à claritromicina e fluorquinolonas, diretamente a partir de biópsias gástricas, em Belo Horizonte [manuscrito]. / Gustavo Miranda Martins. - - Belo Horizonte: 2014.

77 f.: il.

Orientador: Luiz Gonzaga Vaz Coelho.

Área de concentração: Saúde do Adulto.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Resistência Microbiana a Medicamentos. 2. *Helicobacter pylori*/efeitos de drogas. 3. Claritromicina. 4. Fluoroquinolonas. 5. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Coelho, Luiz Gonzaga Vaz. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 45

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

**Vice-Reitora:** Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

**Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Dr. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

**Pró-Reitora de Pesquisa:** Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

## **FACULDADE DE MEDICINA**

**Diretor:** Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

**Vice-Diretor:** Prof. Dr. Humberto José Alves

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

**Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:** Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

**Chefe do Departamento de Clínica Médica:** Prof. Dr. Unai Tupinambás

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO**

**Coordenadora:** Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

**Subcoordenadora:** Prof. Dr. Paulo Caramelli

**Colegiado de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto:**

**Representantes Docentes:**

Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Dra. Valéria Maria Azeredo Passos

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Dr. Paulo Caramelli

Prof. Dr. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade

## **DEDICATÓRIA**

À minha esposa Josiane, companheira em todos os momentos, que teve a sabedoria em manter a harmonia familiar durante este trabalho e propiciar-me a paz necessária aos estudos.

Ao meu querido filho João Antonio, estímulo maior de todos os meus projetos de vida.

Ao meu saudoso pai, ainda fonte de conforto e inspiração.

Ao também saudoso Professor José de Laurentys Medeiros, meu eterno e mais sábio "chefe" na gastroenterologia.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho, Professor Titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela maestria na concepção e orientação desta dissertação de mestrado.

À Profa. Dra. Luciana Dias Moretzsohn, Professora Adjunta do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG, pela criteriosa realização das endoscopias digestivas e biópsias neste estudo, além do auxílio no recrutamento dos pacientes.

Às biomédicas Karine Sampaio Lima e Bianca Della Croce V. Cota, bolsistas do laboratório de pesquisa do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pela proficiência na execução e ensinamento das técnicas moleculares.

À estaticista Maú Fernandes, pela disponibilidade e bela análise estatística do nosso trabalho.

À minha mãe Gláucia, irmãs e demais familiares, pelo apoio e motivação contínuos.

Aos pacientes que se dispuseram a participar do estudo, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

## **EPÍGRAFE**

**"Esses foram degraus para mim, eu subi por eles – para isso tive de passar por eles. Mas eles pensavam que eu queria repousar em cima deles..."**

**Friedrich Nietzsche**

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A resistência aos antimicrobianos é o principal fator associado à falha terapêutica no tratamento do *H. pylori*. Testes moleculares são úteis na detecção das mutações genéticas associadas ao desenvolvimento de resistência à claritromicina e fluorquinolonas. O conhecimento da taxa de prevalência local de resistência é importante na definição do melhor esquema terapêutico. **OBJETIVOS:** Estimar a prevalência de resistência primária do *H. pylori* à claritromicina e fluorquinolonas, empregando-se um teste molecular, em Belo Horizonte. **MÉTODOS:** Setenta e dois pacientes com sorologia positiva para *H. pylori* [65% mulheres, idade média 39 (19-73) anos], nunca tratados previamente para essa infecção, foram selecionados. Todos os pacientes submeteram-se à endoscopia digestiva com biópsias de antro e corpo e realização do teste molecular GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Alemanha) para a detecção do *H. pylori* e das mutações pontuais dos genes responsáveis pela resistência à claritromicina e fluorquinolonas. O procedimento molecular constituía-se de três etapas: extração do DNA a partir das amostras endoscópicas, amplificação multiplex com primers biotinizados e hibridização reversa. As mutações pontuais mais frequentemente envolvidas com resistência aos dois antibióticos foram avaliadas. **RESULTADOS:** Resistência à claritromicina foi detectada em 9 pacientes (12,5%) e às fluorquinolonas em 8 pacientes (11,1%). A mutação pontual A2147G foi a mais comum (77,8%) entre as cepas resistentes à claritromicina. Em 50% das cepas resistentes à fluorquinolonas, o códon mutante não pôde ser identificado. **CONCLUSÕES:** As taxas de resistência à claritromicina (12,5%) e às fluorquinolonas (11,1%), em Belo Horizonte, mostraram índices aceitáveis, sugerindo que essas drogas permanecem opções apropriadas para o tratamento de primeira e segunda linha do *H. pylori*. O teste molecular constitui uma ferramenta diagnóstica adequada para monitorar a resistência do *H. pylori* aos antibióticos.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*. Resistência microbiana a medicamentos. Claritromicina. Fluorquinolonas. Técnicas de diagnóstico molecular.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MALT	Tecido Linfóide Associado à Mucosa
IC	Intervalo de Confiança
CIM	Concentração Inibitória Mínima
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
A2146C	Mutação pontual consistindo na substituição de adenina por citosina no nucleotídeo 2146
A2146G	Mutação pontual caracterizada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 2146
A2147G	Mutação pontual consistindo na substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 2147
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IAG	Instituto Alfa de Gastroenterologia
HC	Hospital das Clínicas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EUA	Estados Unidos da América
°C	Grau Celsius
bp	<i>base pairs</i> (pares de bases)

MUT	Mutação
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
PPI	<i>Proton pump inhibitor</i>
USA	<i>United States of America</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
$\chi^2$	<i>Chi-square</i>
CLA	<i>Clarithromycin</i>
FQ	<i>Fluoroquinolone</i>
NS	<i>Not significant</i>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 2%, avaliando-se a presença dos produtos da amplificação (100 bp: 23S RNA; 145 bp: *gyrA*) ..... 22
- Figura 2 - Tira de DNA do teste GenoType HelicoDR evidenciando resistência à claritromicina pela positividade da banda MUT 3 do gene 23S ..... 23
- Figura 3 - Exemplo de resistência às fluorquinolonas pela positividade da banda MUT no códon 87 do gene *gyrA* ..... 23

## LISTA DE TABELAS

Table 1 - Prevalence of H. pylori antimicrobial resistance in the studied population .....	34
Table 2 - Association between risk factors and susceptibility or resistance to clarithromycin or Fluoroquinolones.....	35
Table 3 - Association between risk factors and susceptibility or resistance to both clarithromycin and fluoroquinolones.....	35

## SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	15
2.	OBJETIVOS.....	19
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
3.1	Características gerais do estudo.....	19
3.2	Sujeitos da pesquisa e desenho do estudo.....	20
3.2.1	Critérios de inclusão.....	20
3.2.2	Critérios de exclusão.....	20
3.3	Procedimentos.....	20
3.3.1	Endoscopia digestiva alta e biópsias gástricas.....	20
3.3.2	Teste molecular.....	21
3.4	Análise estatística.....	23
3.5	Aspectos éticos.....	24
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
5.	ARTIGO RESULTANTE DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.....	29
5.1	Abstract.....	29
5.2	Introduction.....	30
5.3	Patients and Methods.....	32
5.3.1	Patients.....	32
5.3.2	Endoscopy and Gastric Biopsies.....	32
5.3.3	Molecular Diagnostic Technique.....	32
5.3.4	Statistical Analyses.....	33
5.4	Results.....	33
5.5	Discussion.....	35
5.6	Conclusions.....	37

5.7	References.....	38
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
	APÊNDICES .....	44
	APÊNDICE 1 .....	44
	APÊNDICE 2 .....	54
	APÊNDICE 3 .....	64
	APÊNDICE 4 .....	75
	ANEXOS .....	77
	ANEXO 1 .....	77

## 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O *Helicobacter pylori* é considerado o agente etiológico principal de várias doenças gastroduodenais. O conhecimento de seu papel patogênico mudou dramaticamente a abordagem dessas condições, que passaram a ser consideradas doenças infecciosas e tratadas com antibióticos. A gastrite induzida pela infecção é frequentemente subclínica, mas pode evoluir para gastrite crônica atrófica, úlcera gástrica e/ou duodenal, adenocarcinoma gástrico e linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma MALT)<sup>1,2</sup>.

A terapia tríplice, empregando dois antibióticos - amoxicilina e claritromicina - associados a um inibidor de bomba de prótons, administrados por uma semana, tem sido recomendada como tratamento de escolha em reuniões de consenso e estudos<sup>3-6</sup>. Entretanto, estudos multicêntricos controlados e metanálises têm demonstrado eficácia decrescente nos últimos anos, com índices de erradicação inferiores a 80%<sup>7-9</sup>. A falha da erradicação pode levar ao desenvolvimento de resistência secundária e/ou cruzada e até mesmo ao aparecimento de microrganismos multirresistentes. Na ocorrência de falha ao tratamento inicial, outras associações antimicrobianas têm sido recomendadas, como o uso de levofloxacina, sais de bismuto, tetraciclina, furazolidona, metronidazol e rifabutina<sup>10-14</sup>.

A resistência bacteriana é considerada o principal fator associado ao insucesso terapêutico, especialmente aquele relacionado ao emprego da claritromicina - principal agente anti-*Helicobacter pylori* - e, mais recentemente, das fluorquinolonas. Em relação à amoxicilina, tetraciclina, sais de bismuto e furazolidona, os índices de resistência são desprezíveis e mantêm-se estáveis ao longo dos anos<sup>14,15</sup>. Os agentes nitroimidazólicos apresentam taxas de resistência primária em torno de 50% entre nós, dificultando seu emprego na prática diária<sup>16,17</sup>.

A resistência aos antimicrobianos assume relevância se sua presença ocasionar falha terapêutica. O impacto da resistência bacteriana no sucesso do tratamento de erradicação do *Helicobacter pylori* irá depender do esquema terapêutico utilizado. Metanálise e revisão de estudos clínicos conduzidos entre 1999 e 2003 revelaram algumas conclusões acerca do uso da claritromicina<sup>14,18</sup>. Foi observado que, durante a utilização do esquema tríplice com claritromicina, amoxicilina e inibidor de bomba protônica, a presença de cepas resistentes à claritromicina reduzia a eficácia terapêutica de 87,5% para apenas 18,3% (odds ratio: 24,5 IC 95%: 17,2-35,0, p<0,001)<sup>14,18</sup>. Tais

achados confirmam a grande relevância clínica em se reconhecer a presença de resistência à claritromicina ao se planejar o tratamento do *Helicobacter pylori*. Regimes terapêuticos empregando fluorquinolonas têm sido recomendados como alternativa no tratamento de segunda linha da bactéria<sup>3-5</sup>. Entretanto, a presença de resistência às fluorquinolonas também tem sido relacionada à falha no tratamento de erradicação do *Helicobacter pylori*<sup>19</sup>.

Estudos têm sido realizados para determinar a prevalência loco-regional de resistência do *Helicobacter pylori* aos antimicrobianos. Estudo europeu, multicêntrico, envolvendo 32 centros de 18 países, avaliou, entre 2008 e 2009, 2204 pacientes (1893 adultos e 311 crianças), sem tratamento prévio para *Helicobacter pylori*<sup>20</sup>. O perfil de sensibilidade à claritromicina e fluorquinolonas foi avaliado através de cultura e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos e, também, por teste molecular. Foi demonstrado que, em adultos, a taxa de resistência à claritromicina foi de 17,5% e à levofloxacina de 14,1%. Nas crianças, a resistência à claritromicina foi superior a 30% e, à levofloxacina, de 2,5%, sendo as diferenças entre adultos e crianças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Os menores índices de resistência à claritromicina foram encontrados nos países do norte europeu (resistência  $< 10\%$ ), em relação aos outros países europeus, onde a resistência a esse antibiótico foi  $> 20\%$  (exceto na Alemanha e Espanha). A principal contribuição deste estudo multicêntrico foi a constatação de um substancial aumento na resistência à claritromicina (17,5%) em comparação com o índice descrito em 1998 (9,8%) na Europa<sup>21</sup>. Foram ainda demonstrado índices crescentes de resistência à levofloxacina, confirmando estudos anteriores sobre resistência às quinolonas na última década<sup>22,23</sup>.

Estudos realizados nos Estados Unidos, empregando-se métodos microbiológicos de cultura e determinação da CIM, revelaram uma prevalência de resistência à claritromicina entre 10% e 15%, independentemente da região estudada<sup>24</sup>. No Canadá, uma revisão sistemática de estudos publicados antes do ano 2000, todos utilizando testes microbiológicos, estimou uma resistência menor que 4%<sup>25</sup>. Na América Latina, revisão sistemática de estudos conduzidos entre 1998 e 2011 demonstrou taxas sumárias de prevalência de resistência à claritromicina e fluorquinolonas de 12% e 15%, respectivamente<sup>26</sup>.

No Brasil, são poucos os estudos regionais avaliando a prevalência de resistência do *Helicobacter pylori* à claritromicina. Índice de resistência primária de 16,5% foi encontrado em Recife, em

estudo que empregou métodos microbiológicos e teste molecular<sup>27</sup>. Em São Paulo, na região de Bragança Paulista, índices semelhantes de resistência primária à claritromicina (16%) foram descritos, utilizando-se cultura e determinação da CIM<sup>17</sup>. Na cidade de São Paulo, também empregando-se cultura e determinação da CIM, a taxa de resistência primária à claritromicina observada foi de apenas 8%<sup>28</sup>. Em Belo Horizonte, em 2002, estudo avaliando 203 pacientes encontrou resistência à claritromicina em 9,85% das amostras, utilizando-se teste fenotípico de cultura e determinação da CIM<sup>16</sup>. Mais recentemente, estudo de larga escala conduzido em Marília-SP, avaliando 1137 pacientes dispépticos, encontrou, através de método molecular, baixo índice de resistência à claritromicina, na ordem de 2,46%<sup>29</sup>. No Rio Grande do Sul, esse índice foi de 13%, em estudo baseado em métodos microbiológicos<sup>30</sup>.

Em relação às fluorquinolonas, apenas dois estudos regionais avaliaram a prevalência de resistência primária do *Helicobacter pylori*. Na cidade de São Paulo, a taxa de resistência estimada foi de 23%<sup>28</sup>. Por outro lado, no Rio Grande do Sul, essa taxa foi encontrada em 5,5% das amostras<sup>30</sup>. Nesses dois estudos, métodos microbiológicos de cultura e determinação da CIM foram utilizados. Cabe salientar o pequeno número de pacientes incluídos nesses trabalhos.

A investigação laboratorial da presença de resistência do *Helicobacter pylori* aos antimicrobianos pode ser realizada, de modo geral, através de duas metodologias distintas: testes fenotípicos e genotípicos. Os primeiros são representados pela cultura e determinação da CIM dos antibióticos. Além de fornecer um diagnóstico definitivo da infecção, o método permite o estudo da sensibilidade aos fármacos. No entanto, o cultivo da bactéria é raramente utilizado na prática médica diária, devido à necessidade de cuidados especiais no transporte das amostras, ao crescimento fastidioso do *Helicobacter pylori* e à necessidade de meios de cultura apropriados, na maioria das vezes indisponíveis<sup>15</sup>.

Mais recentemente, métodos moleculares (genotípicos), especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido progressivamente utilizados na detecção da bactéria e na identificação de mutações associadas ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos, podendo ser realizados diretamente a partir de biópsias gástricas endoscópicas, sem necessidade de cultura prévia do microrganismo. *Helicobacter pylori*, como outras poucas espécies bacterianas (por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*), adquire resistência por mutação genética. O mecanismo envolve mutações pontuais que são transmitidas verticalmente aos

descendentes. É importante ressaltar que ocorre resistência cruzada em cada família de antibiótico, uma vez que o mecanismo de resistência é o mesmo<sup>15</sup>. Assim, resistência à claritromicina indica resistência a todos os macrolídeos, da mesma forma que resistência à levofloxacina sinaliza resistência a outras fluorquinolonas.

Os genes envolvidos nas mutações determinantes de resistência do *Helicobacter pylori* à claritromicina e fluorquinolonas foram eficientemente identificados. Assim, resistência aos macrolídeos se deve a mutações pontuais no gene 23S rRNA, sendo que as três principais mutações descritas - A2146C, A2146G e A2147G, são responsáveis por mais de 90% dos casos de resistência<sup>18</sup>. Com a mutação, ocorre uma redução na afinidade entre ribossomos e claritromicina, gerando resistência do microrganismo ao fármaco<sup>15</sup>. As mutações do gene *gyrA*, que codifica a DNA-girase (alvo das quinolonas), são responsáveis pelo aparecimento de resistência às fluorquinolonas, sendo mais frequentemente encontradas nos códons 87 e 91<sup>15,31,32</sup>. A resistência às fluorquinolonas foi relacionada com mutações *gyrA* em 80% a 100% das cepas resistentes<sup>33-35</sup>.

Um teste molecular que combina PCR e hibridização, permitindo rápida detecção da resistência bacteriana à claritromicina e fluorquinolonas, foi recentemente desenvolvido e validado em estudos europeus<sup>36,37</sup>. Esse teste, denominado GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Alemanha), é baseado na tecnologia da tira de DNA, a qual é revestida com diferentes oligonucleotídeos específicos (probes), desenhados para reagir (hibridizar) com os alelos sensíveis (selvagens) ou mutantes do espécime que está sendo testado. Pode ser aplicado em amostras obtidas diretamente de biópsias gástricas endoscópicas ou, então, em isolados obtidos por cultura. Apresenta custo relativamente acessível e é de fácil execução em laboratórios de biologia molecular. Em estudo francês, quando comparado com o método fenotípico de cultura e teste de sensibilidade, o teste molecular apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 99% para detecção de resistência à claritromicina; para resistência à levofloxacina, a sensibilidade foi de 87% e a especificidade de 98,5%<sup>36</sup>. Nesse estudo, os valores preditivos positivos e negativos na detecção de resistência pelo GenoType HelicoDR foram de 99% e 94% para a claritromicina e de 96% e 96% para fluorquinolona. Outro resultado desse estudo foi o achado frequente de infecções mistas, em mais de 30% dos casos, quando, em um mesmo paciente, cepas sensíveis e resistentes são encontradas. Tal fato pode refletir coinfeção ou seleção de mutantes resistentes<sup>36</sup>.

Estudo posterior, realizado na Bélgica, também para avaliar a performance do GenoType HelicoDR, comparando-o com a cultura, encontrou índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do método de, respectivamente, 100%, 86,2%, 89,7% e 100% para detecção de resistência à claritromicina, assim como 82,6%, 95,1%, 90,5% e 90,7%, respectivamente, referente à fluorquinolonas<sup>37</sup>. A frequência de infecções mistas (33%) foi comparável à obtida no estudo francês prévio. Conforme explicitado, nesses dois estudos, os resultados do GenoType HelicoDR apresentaram boa concordância com aqueles encontrados nos testes fenotípicos de cultura e sensibilidade. Além disso, o trabalho francês mostrou haver concordância desse teste molecular com a genotipagem realizada por outros métodos (como PCR em tempo real). Outros métodos de genotipagem têm sido desenvolvidos para avaliar resistência do *Helicobacter pylori*, porém a maioria está restrita a centros de pesquisa e não está disponível comercialmente, além de detectar apenas resistência à claritromicina<sup>38-41</sup>.

O conhecimento da prevalência local de resistência do *Helicobacter pylori* à claritromicina e fluorquinolonas poderá orientar os clínicos na escolha dos tratamentos de primeira e segunda linha a serem empregados na erradicação da bactéria, otimizando-se a eficácia dos mesmos. A utilização de metodologia molecular, em substituição ao método convencional de cultura do microrganismo, poderá constituir ferramenta diagnóstica factível, eficaz e de custo razoável para a detecção de resistência.

## **2 - OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência de resistência primária do *Helicobacter pylori* à claritromicina e fluorquinolonas, diretamente a partir de biópsias gástricas endoscópicas, utilizando-se o teste molecular GenoType HelicoDR, em uma amostra de conveniência da população de Belo Horizonte.

## **3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **3.1 - Características gerais do estudo**

Estudo realizado no setor de endoscopia digestiva e laboratório de pesquisa do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), entre novembro de 2012 e abril de 2014.

### 3.2 - Sujeitos da pesquisa e desenho do estudo

Os pacientes foram selecionados entre aqueles que compareciam ao setor de endoscopia digestiva do Hospital das Clínicas da UFMG e com indicação de pesquisa de *Helicobacter pylori*, conforme solicitação do médico assistente, para diferentes situações clínicas.

Trata-se de estudo experimental realizado por meio de análise de amostra de conveniência (não probabilística) de 72 casos, selecionados em único centro em Belo Horizonte, sem distinção de sexo, cor, estado de saúde, classe ou grupo social, respeitados os critérios de inclusão e exclusão.

#### 3.2.1 - Critérios de inclusão:

- Adultos, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 80 anos;
- Pacientes portadores de *Helicobacter pylori*, com a presença de infecção comprovada por teste de urease e/ou histopatologia e/ou teste sorológico rápido;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), após devidamente esclarecidos dos objetivos do estudo.

#### 3.2.2 - Critérios de exclusão:

- Pacientes já previamente tratados para *Helicobacter pylori*;
- Pacientes com relato de uso de antimicrobianos nos 30 dias anteriores à realização da endoscopia;
- Pacientes submetidos previamente a cirurgia gástrica;
- Pacientes em uso de anticoagulantes impedindo a realização de biópsias gástricas.

### 3.3 - Procedimentos

#### 3.3.1 - Endoscopia digestiva alta e biópsias gástricas

Um teste sorológico rápido para a detecção do *Helicobacter pylori* (Abon Biopharm, Hangzhou, China) era realizado imediatamente antes da endoscopia digestiva alta (EDA), usando sangue capilar obtido por micropunção digital. Esse teste sorológico foi recentemente validado por nosso grupo, tendo mostrado especificidade e valor preditivo positivo elevados para a identificação de *Helicobacter pylori* em área com alta prevalência da bactéria<sup>42</sup>. Aqueles pacientes com teste

sorológico positivo e que consentiram em participar do estudo foram submetidos à EDA com realização do teste de urease e exame histopatológico (conforme rotina do serviço), coletando-se, adicionalmente, dois fragmentos do antro e dois do corpo gástrico, ao nível da grande curvatura, para o estudo molecular.

As biópsias foram realizadas utilizando-se pinças modelo Radial Jaw® (Boston Scientific, EUA), com diâmetro de abertura de 7,0 mm e adaptadas ao canal de trabalho do endoscópio (diâmetro de 2,8 mm). Os tecidos obtidos eram transferidos e imersos imediatamente (prazo máximo de 15s) em microtubos estéreis contendo RNAlater® (Ambion, Cat.#AM7020, EUA), solução estabilizadora do RNA, capaz de penetrar rapidamente no tecido para proteção do RNA, eliminando a necessidade de processamento imediato. Após conservados em geladeira a 4°C durante 24 horas, as amostras eram pesadas e congeladas a -80°C, até realização das análises moleculares. Os procedimentos de armazenamento/congelamento dos tecidos e realização dos testes moleculares foram realizados no laboratório de pesquisa do IAG do HC-UFMG.

### 3.3.2 - Teste molecular

O teste genético empregado, GenoType HelicoDR (Hain Lifescience, Alemanha) consiste de três etapas. Na primeira, representada pela extração do DNA das biópsias gástricas, é utilizado o teste QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Benelux, Holanda), previamente validado para esta finalidade (no APÊNDICE 1 estão descritos, detalhadamente, todos os procedimentos desse teste). Após a extração, procede-se à amplificação do DNA extraído através da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. A PCR é realizada utilizando-se o kit GenoType HelicoDR, ensaio molecular que permite a identificação genética do *Helicobacter pylori* e da presença de resistência à claritromicina e fluorquinolonas, pela detecção de mutações dos genes abaixo relacionados, através de amplificação com *primers* biotinilados:

- Resistência à claritromicina - gene 23S (posições 2146 e 2147, GenBank NC000921 e NC000915).
- Resistência à fluoroquinolona - gene *gyrA* (códon 87 e 91).

Com a finalidade de confirmar a qualidade da reação de amplificação, cada amostra era submetida à corrida de eletroforese em gel de agarose a 2%, que separava as moléculas

amplificadas de acordo com seu comprimento: 145 bp, que correspondem ao gene *gyrA* e 100 bp, que correspondem ao gene 23S RNA (FIGURA 1). No APÊNDICE 2 estão pormenorizadas as técnicas da PCR e da corrida de eletroforese.

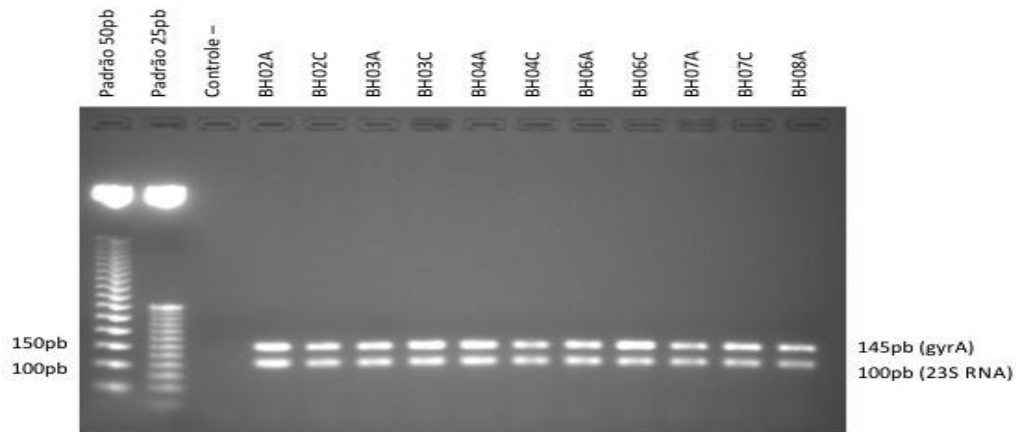


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 2%, avaliando-se presença dos produtos da amplificação (100 bp: 23S RNA; 145 bp: *gyrA*).

Após a realização da PCR e da eletroforese, completa-se o procedimento com a execução da hibridização reversa (metodologia encontra-se descrita no APÊNDICE 3). A hibridização ocorre sobre tiras de DNA, que tinham sido previamente revestidas com diferentes oligonucleotídeos específicos (*probes*), utilizando-se a tecnologia da tira de DNA. Para a realização da hibridização utiliza-se incubadora tipo TwinCubator (Hain Lifescience, Alemanha). Os resultados finais são obtidos pela análise das bandas positivas e negativas nas tiras de DNA. Os dados são compilados, obtendo-se os índices de resistência e sensibilidade do total da amostra à claritromicina e fluorquinolonas.

Em relação às mutações do gene 23S (indicativas de resistência à claritromicina), a presença de positividade das bandas nos *locus* MUT 1, MUT 2 ou MUT 3 corresponde à ocorrência de mutação A2146G, A2146C ou A2147G, respectivamente. A frequência de cada uma dessas mutações é calculada, levando-se em consideração o total da amostra. A FIGURA 2 ilustra um exemplo de resistência à claritromicina pela ocorrência de mutação do gene 23S na posição A2147G (MUT 3).

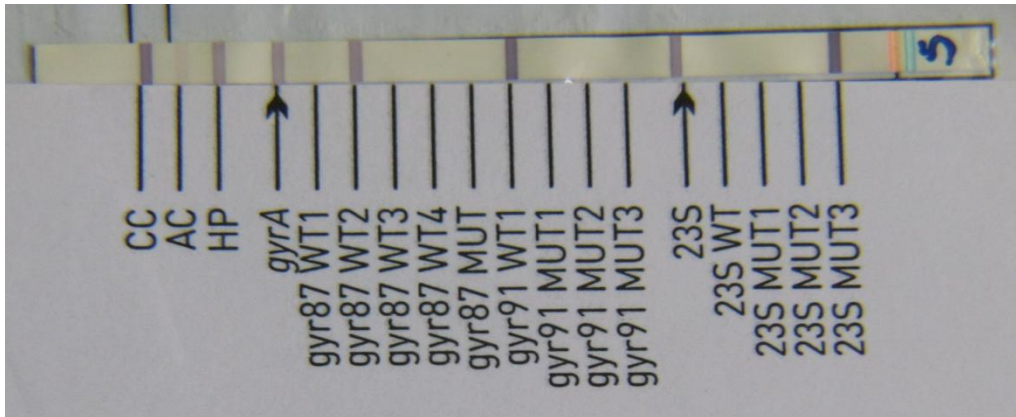


Figura 2 - Tira de DNA do teste GenoType HelicoDR evidenciando resistência à claritromicina pela positividade da banda MUT 3 do gene 23S.

As mutações no gene *gyrA* relacionam-se à ocorrência de resistência às fluorquinolonas e ocorrem principalmente nos códons 87 e 91. No entanto, algumas vezes, o códon envolvido na mutação pode não constar na tira de DNA, com ausência de positividade nos *locus gyrA* MUT 87 e *gyrA* MUT 91. Aqui, também, pela análise dos casos mutantes é obtida a distribuição das mutações mais comuns no total da amostra, assim como o percentual de mutações onde o códon implicado não pôde ser identificado. A FIGURA 3 ilustra um exemplo de resistência às fluorquinolonas pela ocorrência de mutação do gene *gyrA* no códon 87.

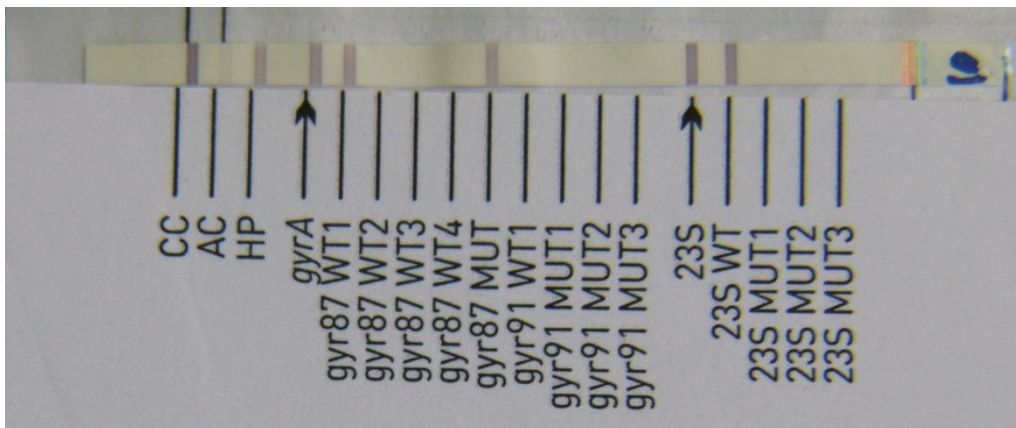


Figura 3 - Exemplo de resistência às fluorquinolonas pela positividade da banda MUT no códon 87 do gene *gyrA*.

### 3.4 - Análise estatística

Técnicas de estatística descritiva, incluindo medidas de tendência central e variabilidade, foram empregadas. Uma análise foi implementada visando avaliar os fatores de risco associados com a ocorrência de resistência à claritromicina e fluorquinolonas. O *odds ratio* e intervalo de confiança

de 95% foram usados como estimativas de risco.  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. O programa Minitab 16 foi utilizado.

### 3.5 - Aspectos éticos

O estudo atendeu a todos os preceitos recomendados em pesquisas clínicas envolvendo seres humanos, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG), em 18 de Setembro de 2012 (ANEXO 1).

## 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-25.
2. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, *et al.* Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-81.
3. Coelho LG, Maguinilk I, Zaterka S, *et al.* 3<sup>rd</sup> Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori*. *Arq Gastroenterol* 2013; 50: 81-96.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-64.
5. Lamouliatte HC, Cayla R, Megraud F, Zerbib F, Stablo M, Bouchard S, *et al.* Amoxicillin-clarithromycin-omeprazole: the best therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Acta Gastroenterol Belg.* 1993;56:A140.
6. Lind T, Megraud F, Unge P, *et al.* The MACH2 study: role of omeprazol in eradications of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology* 1999; 116: 248-53.
7. Laheij RJ, Rossum LG, Jansen JB, Straatman H, Verbeek AL. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection – a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 857-64.

8. Vakil N, Lanza F, Schwartz H, Barth J. Seven-day therapy for *Helicobacter pylori* in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 99–107.
9. Janssen MJ, Van Oijen AH, Verbeek AL, Jansen JB, De Boer WA. A systematic comparison of triple therapies for treatment of *Helicobacter pylori* infection with proton pump inhibitor/ranitidine bismuth citrate plus clarithromycin and either amoxicillin or a nitroimidazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 613–24.
10. Gisbert JP, Morena F. Systematic review and meta-analysis: levofloxacin-based rescue regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 35-44.
11. Saad RJ, Schoenfeld P, Kim HM, *et al.* Levofloxacin-based triple therapy versus bismuth-based quadruple therapy for persistent *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 488-96.
12. Perna F, Zullo A, Ricci C, *et al.* Levofloxacin-based triple therapy for *Helicobacter pylori* re-treatment: role of bacterial resistance. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 1001-5.
13. Sanches BSF, Coelho LGV, Moretzsohn LD, *et al.* Failure of *Helicobacter pylori* treatment after regimes containing clarithromycin: new practical therapeutic options. *Helicobacter* 2008; 13: 572-6.
14. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 343-57.
15. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 280-322.
16. Prazeres-Magalhães P, Queiroz DM, Campos DVB, *et al.* *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazol and clarithromycin in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2021-3.
17. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, *et al.* Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 20-5.

18. Megraud F. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84.
19. Nishizawa T, Suzuki H, Kurabayashi K, *et al.* Gatifloxacin resistance and mutations in *gyrA* after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1538-40.
20. Megraud F, Coenen S, Versporten A, *et al.* *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 2013; 62: 34-42.
21. Glupczynski F, Coenen S, Versporten A, *et al.* European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 820-3.
22. Glocker E, Stueger HP, Kist M. Quinolone resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 346-9.
23. Oleastro M, Cabral J, Ramalho PM, *et al.* Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from Portuguese children: a prospective multicentre study over a 10 year period. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2308-11.
24. Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, *et al.* Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1088-94.
25. Fallone CA. Epidemiology of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Canada. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 879-82.
26. Camargo MC, Garcia A, Riquelme A, *et al.* The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 485-95.
27. Lins AK, Lima RA, Magalhães M. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Recife, Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. *Arq Gastroenterol* 2010; 47: 379-82.

28. Eisig JN, Silva FM, Barbuti RC, *et al.* *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. *Arq Gastroenterol* 2011; 48: 261-4.
29. Suzuki RB, Lopes RAB, Lopes GAC, *et al.* Low *Helicobacter pylori* primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of São Paulo, Brazil. *BMC Gastroenterology* 2013; 13: 164.
30. Picoli SU, Mazzoleni LE, Fernández H, *et al.* Resistance to amoxicillin, clarithromycin and ciprofloxacin of *Helicobacter pylori* isolated from Southern Brazil patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56: 197-200.
31. Moore RA, Beckthold B, Wong S, *et al.* Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 107-11.
32. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, *et al.* Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3942-4.
33. Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, *et al.* Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter* 2006; 11: 441-5.
34. Kim JM, Kim JS, Kim N, *et al.* Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 965-7.
35. Nishizawa T, Suzuki A, Umezawa H, *et al.* Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 303-5.
36. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, *et al.* Evaluation of a New Test, Genotype HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3600-7.

37. Deyi VYM, Burette A, Bentatou Z, *et al.* Practical use of Genotype HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diag Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 557-60.
38. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, *et al.* Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4573-7.
39. S Chen, Li Y, Yu C. Oligonucleotide microarray: a new rapid method for screening the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* for single nucleotide polymorphisms associated with clarithromycin resistance. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 126-31.
40. Guimaraes N, Azevedo NF, Figueiredo C, *et al.* Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3089-94.
41. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, *et al.* Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1500-4.
42. Martins GM, Sanches BSF, Moretzsohn LD, *et al.* Rapid in-office *H. pylori* serologic test: an useful tool in areas with high *H. pylori* prevalence? [abstract]. In: European Helicobacter Study Group: XXVIth International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer; 2013; Madrid, Spain. *Helicobacter* 2013; 18(1): 120 [Abstract P10.07].

## 5 - ARTIGO RESULTANTE DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

### **Molecular detection of clarithromycin and fluoroquinolones resistance in *Helicobacter pylori* infection, directly applied to gastric biopsies, in an urban Brazilian population**

**Authors:** Gustavo Miranda Martins; Bruno Squárcio Fernandes Sanches; Luciana Dias Moretzsohn; Karine Sampaio Lima; Bianca Della Croce V. Cota; Luiz Gonzaga Vaz Coelho

**Institution:** Instituto Alfa de Gastroenterologia at Hospital das Clínicas of Federal University of Minas Gerais

**Corresponding author:** Gustavo Miranda Martins

Phones: (31) 9811-0069; (31) 3286-3643

e-mail: gmmartins1@yahoo.com.br

Address: Av. Cristóvão Colombo, 519/1001. CEP 30140-140. Belo Horizonte – MG

#### **ABSTRACT**

**CONTEXT:** Antimicrobial resistance is the major factor leading to eradication failure in *H. pylori* treatment. Molecular tests are useful to detect genetic mutations predictive of clarithromycin and fluoroquinolones resistance. Knowledge of the local prevalence rate of resistance is important to define the best recommended treatment. **OBJECTIVES:** To assess the prevalence of primary resistance of *H. pylori* to clarithromycin and fluoroquinolones, using a molecular test, in a Southeastern urban Brazilian population. **METHODS:** 72 *H. pylori* seropositive patients [65% female, mean age 39 (19-73) years] never treated before for this infection were studied. All patients underwent gastroscopy in addition to antrum and corpus biopsies and molecular test GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Germany) to detect *H. pylori* and point mutations in genes responsible for clarithromycin and fluoroquinolone resistance. The molecular procedure was divided into three steps: DNA extraction from biopsy samples, a multiplex amplification with biotinylated primers and a reverse hybridization. The most frequent point mutations involved in resistance to the two antibiotics were evaluated. **RESULTS:** Resistance to clarithromycin was detected in nine patients (12.5%) and to fluoroquinolones in eight patients (11.1%). The point mutation A2147G was the most common (77.8%) among resistant strains to clarithromycin. In 50% of the resistant strains to fluoroquinolones, the mutant codon couldn't be identified. **CONCLUSIONS:** The resistance rates to clarithromycin (12.5%) and fluorquinolones (11.1%) in a large urban population in the Southeast of Brazil were acceptable, suggesting that these drugs remain appropriate options to first and second-line of *H. pylori* treatment. The molecular test constitutes an adequate diagnostic tool for monitoring *H. pylori* resistance.

**HEADINGS:** *Helicobacter pylori*. Drug Resistance, Microbial. Clarithromycin. Fluoroquinolones. Molecular Diagnostic Techniques. **Support:** FAPEMIG, CNPq

**Support:** FAPEMIG, CNPq

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the main cause of several gastroduodenal diseases, which are now considered as infectious disorders and treated with antibiotics. The gastritis induced by the infection is frequently subclinical but may evolve into chronic atrophic gastritis, gastroduodenal ulcer, gastric cancer and MALT lymphoma<sup>(1,2)</sup>. Triple therapy, including amoxicillin, clarithromycin and a proton pump inhibitor (PPI) given for a week has been recommended as the treatment of choice at several consensus conferences<sup>(3-6)</sup>. Nevertheless, the efficacy of this regimen has been decreasing in the last years, with eradication rates lower than 80% in different studies<sup>(7-9)</sup>.

Antibiotic resistance is relevant if it leads to treatment failure. In *H. pylori* management, antimicrobial resistance is considered to be the major factor leading to eradication failure. The clinical impact of clarithromycin resistance is serious, since the efficacy decreases 70% if the strain is resistant in the context of PPI-clarithromycin-amoxicillin treatment<sup>(10,11)</sup>. The use of 10-day PPI-levofloxacin-amoxicillin has been recommended as an alternative second-line treatment<sup>(3,4)</sup>. However, the acquisition of resistance may jeopardise its efficacy. Indeed, resistance to fluoroquinolones was also shown to be correlated to treatment failure of *H. pylori*<sup>(12)</sup>.

Studies have been performed to determine the prevalence of *H. pylori* resistance to antibiotics. A multicentre study, which evaluated 2204 patients from 18 European countries, never treated before for *H. pylori*, was conducted in 2008 to 2009 to assess the antibacterial resistance rates of *H. pylori* in Europe<sup>(13)</sup>. In this study, in adults, the resistance rate of *H. pylori* was 17.5% for clarithromycin and 14.1% for levofloxacin; being resident in Central or Southern Europe versus in Northern Europe was considered a risk factor associated with resistance. The main contributions of this survey were to show an important increase in clarithromycin resistance compared to the rate observed in 1998 (9.8%) in Europe and the progressive emergence of levofloxacin resistance in *H. pylori*<sup>(14)</sup>.

Apart from Europe, the prevalence of clarithromycin has reached 10-15% in the USA regardless of the region<sup>(15)</sup>. In Canada, a systematic review of the studies performed before the year 2000 estimated resistance to this antibiotic to be less than 4%<sup>(16)</sup>. In Latin America, a systematic review

of studies reporting on samples collected between 1998 and 2011 demonstrated that the overall summary prevalences of antimicrobial primary resistance to clarithromycin was 12% and to fluoroquinolones 15%; resistance prevalence varied significantly by country, but not by year of sample collection<sup>(17)</sup>.

There are few regional studies in Brazil evaluating the prevalence of *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones. Primary resistance to clarithromycin of 16.5% was found in Recife-PE<sup>(18)</sup> whereas in Belo Horizonte-MG was observed a value of 9.85%<sup>(19)</sup>. In the state of São Paulo, *H. pylori* clarithromycin resistance presented prevalences varying from 2.46%<sup>(20)</sup> to 16%<sup>(21)</sup>. In the state of Rio Grande do Sul, this prevalence was estimated to be 13%<sup>(22)</sup>. Concerning fluoroquinolones, an *H. pylori* resistance rate as high as 23% was reported in São Paulo capital<sup>(23)</sup> whereas in the state of Rio Grande do Sul it was observed in only 5.5% of samples<sup>(22)</sup>.

Assessment of *H. pylori in vitro* susceptibility to antibiotics can be performed by standard microbiological techniques. However, culture and susceptibility testing are rarely done due to particular requirements for the transport of biopsy specimens, besides the slow growth of *H. pylori* and its demand for appropriate culture conditions, scarcely available in a routine medical practice<sup>(24)</sup>.

*H. pylori* resistance is essentially due to chromosomal mutations, and for the most part, a limited number of point mutations are present, which can be easily detected with molecular tests<sup>(24)</sup>. Such tests have been developed recently and allows the molecular detection of *H. pylori* and the genetic mutations predictive of resistance to clarithromycin (mutations in 23S-rRNA gene in positions 2146 and 2147) and to fluoroquinolones (mutations in *gyrA* gene, especially at codons 87 and 91)<sup>(11,24-26)</sup>. The numeration is from genome sequencing of NC000921 and NC000915. The molecular test GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Germany), which can be directly applied to gastric biopsies or in isolates obtained from culture, was evaluated in some European studies and was efficient at detecting mutations related to antibiotic resistance in *H. pylori*<sup>(27,28)</sup>.

The aim of this study was to assess the prevalence of clarithromycin and fluoroquinolones primary resistance in *H. pylori* directly from gastric biopsy specimens, using the molecular test GenoType HelicoDR, in a Southeastern urban Brazilian population.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

From October 2012 through July 2013, 72 patients resident in Belo Horizonte, a large city in the Southeast of Brazil, who had consecutively undergone diagnostic endoscopy with research of *H. pylori* due to abdominal symptoms, were enrolled in this study. Patients were selected from the Instituto Alfa de Gastroenterologia at Hospital das Clínicas of Federal University of Minas Gerais and had never been treated before for *H. pylori* infection. All of them were *H. pylori* positive by a rapid serological test (Abon Biopharm, Hangzhou, China) performed immediately before the endoscopy and previously validated among us<sup>(29)</sup>. Written informed consent was obtained prior to entering the study. The protocol was approved by the Ethical Committee in Human Research at the Federal University of Minas Gerais.

### **Endoscopy and Gastric Biopsies**

Four gastric biopsies (two from the antrum, two from de corpus) were taken using Radial Jaw™ 4 large capacity biopsy forceps (Boston Scientific, USA), which provides large tissue specimens for sample handling. The biopsies were immediately transferred to and immersed into microtubes containing RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Cat.#AM7020, USA), a solution that rapidly permeates the tissue to stabilize and protect cellular RNA. RNeasy Lysis Buffer minimizes the need to immediately process tissue samples. After an overnight period in the refrigerator at 4°C, the samples were weighted and finally frozen at -80°C until the execution of molecular studies.

### **Molecular Diagnostic Technique**

The molecular test GenoType HelicoDR was divided into three steps. Initially it was performed the DNA extraction from biopsy samples using the already validated QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Benelux, The Netherlands). The next step was represented by a multiplex amplification with biotinylated primers. In order to check the amplification reaction, each sample was applied directly to a 2% agarose gel electrophoresis, which separated the biomolecules by length: 145 bp (*gyrA*) and 100 bp (23S RNA). The last phase of the molecular test was a reverse hybridization, that was performed using a specific incubator. The hybridization took place on strips that had been coated at the Hain Lifescience factory with different specific oligonucleotides (DNA

probes) using the DNA strip technology. The probes were designed to hybridize with the sequences of the wild-type alleles or the mutated alleles in the tested sample. Results concerning *H. pylori* detection and susceptibility to clarithromycin and to fluoroquinolones were obtained by the analysis of the positive and negative bands in DNA strips. The most frequent mutations involved in resistance to the two antibiotics were also evaluated.

### Statistical Analyses

Techniques of descriptive statistics including measures of central tendency and variability were employed. An analysis was carried out to assess the risk factors associated with resistance to clarithromycin and fluoroquinolones. The odds ratio (OR) and the 95% confidence interval were used as estimates of the risk.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The Minitab 16 program was used.

## RESULTS

Seventy-two patients were included in this study. The age range was 19 to 73 years and mean age, 39 years. Forty-seven (65%) were females and 25 (35%), males. Most common endoscopy findings were gastritis (63.9%), gastric or duodenal ulcer (22.2%), erosive esophagitis (12.5%) and gastric cancer (1.4%).  $\chi^2$  test showed that gastritis was more common among women than men ( $p=0.042$ ).

Resistance to clarithromycin was detected in 9 samples (12.5%). The most common 23S gene mutation was A2147G, presented in seven (77.8%) of the resistant strains, which predominated in relation to the mutation A2146G, observed in two (22.2%) of the resistant strains. The point mutation A2146C was not found. The results of *H. pylori* antimicrobial resistance are presented in Table 1.

In 6 (66.7%) of the clarithromycin-resistant cases, mixed *H. pylori* populations were found, combining both susceptible and resistant strains at the same sample. It could reflect coinfecting cases or selection of resistant mutants.

A mutated *gyrA* genotype, leading to fluoroquinolones resistance, was observed in 8 samples (11.1%): three (37.5%) harboring mutation at codon 91, one (12.5%) with a mutation at codon 87 and 4 cases (50%) with no mutant codon identified.

Resistance to the two classes of antibacterial agents at the same sample was found in only two cases (2.8%). On the other hand, as a whole, 79.2% of the strains did not show any resistance to the drugs tested.

There was no risk factor associated with resistance to clarithromycin or fluoroquinolones, nor to the two agents, among the studied variables (age, gender, endoscopy findings). The results of these analyses are presented in Tables 2 and 3.

**Table 1.** Prevalence of *H. pylori* antimicrobial resistance in the studied population

Feature	Estimated value	95% Confidence Interval
CLA susceptibility	87,5%	77.9 to 93.3%
CLA resistance	12.5%	6.7 to 22.1%
FQ susceptibility	88.9%	79.6 to 94.3%
FQ resistance	11.1%	5.7 to 20.4%
CLA & FQ susceptibility	79.2%	68.4 to 86.9%
CLA & FQ resistance	2.8%	0.8 to 9.6%

CLA, clarithromycin; FQ, fluoroquinolone

**Table 2.** Association between risk factors and susceptibility or resistance to clarithromycin or fluoroquinolones

Variable	CLA & FQ susceptibility	CLA & FQ resistance
Age	OR = 2.32 (NS)	p = 1.00* (NS)
Gender	OR = 1.60 (NS)	p = 0.54* (NS)
Gastritis	OR = 0.21 (NS)	OR = 0.56 (NS)
Ulcers	OR = 2.17 (NS)	OR = 3.67 (NS)
Esophagitis	p = 0.108* (NS)	p = 1.00* (NS)

CLA, clarithromycin; FQ, fluoroquinolone; OR, odds ratio; NS, not significant; \* Fisher's exact test

$\alpha=0.05$

**Table 3.** Association between risk factors and susceptibility or resistance to both clarithromycin and fluoroquinolones

CLA, clarithromycin; FQ, fluoroquinolone; OR, odds ratio; NS, not significant; \* Fisher's exact

Variable	Clarithromycin		Fluoroquinolones	
	CLA susceptibility	CLA resistance	FQ susceptibility	FQ resistance
Age	OR=1.09 (NS)	OR=0.91 (NS)	p=0.185* (NS)	p=0.185*(NS)
Gender	OR=2.01 (NS)	OR=0.50 (NS)	OR=1.68 (NS)	OR=0.59 (NS)
Gastritis	OR=0.46 (NS)	OR=2.15 (NS)	OR=0.22 (NS)	OR= 4.49 (NS)
Ulcers	OR=1.00 (NS)	OR=1.00 (NS)	OR=2.14 (NS)	OR=0.46 (NS)
Esophagitis	p=0.343* (NS)	p=0.343* (NS)	p=0.589* (NS)	p=0.589* (NS)

test

$\alpha=0.05$

## DISCUSSION

This monocentric study analysed a convenience sample of *H. pylori* infected patients to assess the rate of primary resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in a Brazilian Southeast city. Clarithromycin and fluoroquinolones are important drugs to treat *H. pylori* infection and resistance to them has been clearly associated with eradication failure<sup>(11)</sup>. Because standard

susceptibility techniques are rarely done, the results obtained with the molecular methodology could be useful to review the strategies of antibiotic therapy.

Clarithromycin resistance is correlated with 23S rRNA mutations (A2146G, A2146C, or A2147G) in more than 90% of the clarithromycin-resistant strains<sup>(11)</sup>. In addition, fluoroquinolone resistance has been related to *gyrA* gene mutations at positions 87 and 91 in 80 to 100% of the fluoroquinolone-resistant strains<sup>(30-32)</sup>. In our study, the GenoType HelicoDR test presented as a rapid and feasible method to detect such mutations directly from gastric biopsies specimens.

The resistance rate to clarithromycin encountered by us (12.5%) was close to those previously found in other Brazilian regional surveys<sup>(18,19,21-23)</sup>. Such rate was also almost similar to that demonstrated for Latin America in a recent published systematic review<sup>(17)</sup> and lower than those detected in several Central and Southern European countries<sup>(13)</sup>.

The distribution of mutations involved in resistance to clarithromycin was comparable to the results of some European and Brazilian previous reports, being the point mutation A2147G the most frequent<sup>(18,27,28)</sup>. The overall frequency of mixed *H. pylori* populations (66.7%) at the same sample was higher than that established in some regional European studies<sup>(27,28)</sup>.

Resistance to fluoroquinolones was detected in 11.1% of samples. Our results are in an intermediate level between those previously verified in two regional Brazilian studies<sup>(22,23)</sup> and are close to the recently found in Europe<sup>(13)</sup> and reviewed in Latin America<sup>(17)</sup>. A mutant codon wasn't identified in 50% of the fluoroquinolone-resistant cases. This rate is higher than that mentioned in a French survey<sup>(27)</sup>. In these cases, former studies using sequencing showed a mutation in *gyrA* gene that was not specifically present on the DNA strip of the test. The reasons for this high occurrence of distinct mutations leading to fluoroquinolones resistance in the studied population are still unknown. Finally, resistance to both clarithromycin and fluoroquinolones at the same sample was uncommon (2.8%).

Similar to most of the studies performed to determine the prevalence of *H. pylori* resistance to antibiotics, the data we summarized have some disadvantages, especially regarding the number and representativeness of the strains tested. Patients were recruited in a single specialized medical

center and may not be representative of the appropriate target population. Moreover, a not random sampling doesn't allow steady conclusions to be drawn for the general population.

## **CONCLUSIONS**

The resistance rates to clarithromycin (12.5%) and fluorquinolones (11.1%) in a large population in the Southeast of Brazil were acceptable, suggesting that these drugs remain appropriated options to first and second line of *H. pylori* treatment. The molecular test GenoType HelicoDR constitutes an adequate diagnostic tool for monitoring *H. pylori* resistance. Our study emphasizes the need of national surveys to evaluate and monitor *H. pylori* resistance to antibiotics, in order to optimize the effectiveness of anti-*H. pylori* treatment.

## REFERENCES

1. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102: 1808-25.
2. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, *et al*. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-81.
3. Coelho LG, Maguinilk I, Zaterka S, Parente JM, Passos MC, Moraes-Filho JPP. 3<sup>rd</sup> Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori*. *Arq Gastroenterol*. 2013; 50: 81-96.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, *et al*. Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-64.
5. Lamouliatte HC, Cayla R, Megraud F, Zerbib F, Stablo M, Bouchard S, *et al*. Amoxicillin-clarithromycin-omeprazole: the best therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Acta Gastroenterol Belg*. 1993;56:A140.
6. Lind T, Megraud F, Unge P, Bayerdorffer E, O'Morain C, Spiller R, *et al*. The MACH2 study: role of omeprazol in eradications of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology* 1999; 116: 248-53.
7. Laheij RJ, Rossum LG, Jansen JB, Straatman H, Verbeek AL. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection – a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; 13: 857–64.
8. Vakil N, Lanza F, Schwartz H, Barth J. Seven-day therapy for *Helicobacter pylori* in the United States. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20: 99–107.
9. Janssen MJ, Van Oijen AH, Verbeek AL, Jansen JB, De Boer WA. A systematic comparison of triple therapies for treatment of *Helicobacter pylori* infection with proton pump inhibitor/ranitidine bismuth citrate plus clarithromycin and either amoxicillin or a nitroimidazole. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001; 15: 613–24.

10. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 26: 343-57.
11. Megraud F. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84.
12. Nishizawa T, Suzuki H, Kurabayashi K, Masaoka T, Muraoka H, Mori M, *et al*. Gatifloxacin resistance and mutations in *gyrA* after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 1538-40.
13. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, *et al*. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 2013; 62: 34-42.
14. Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20: 820-3.
15. Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, *et al*. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 1088-94.
16. Fallone CA. Epidemiology of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Canada. *Can J Gastroenterol*. 2000; 14: 879-82.
17. Camargo MC, Garcia A, Riquelme A, Otero W, Camargo CA, Hernandez-Garcia T, *et al*. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *Am J Gastroenterol*. 2014; 109: 485-95.
18. Lins AK, Lima RA, Magalhães M. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Recife, Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. *Arq Gastroenterol*. 2010; 47: 379-82.

19. Magalhães PP, Queiroz DM, Barbosa DV, Rocha GA, Mendes EN, Santos A, *et al.* *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazol and clarithromycin in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 2021-3.
20. Suzuki RB, Lopes RA, Lopes GA, Ho TH, Sperança MA. Low *Helicobacter pylori* primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of São Paulo, Brazil. *BMC Gastroenterol.* 2013; 13: 164.
21. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvenuto YH, Vitiello L, Miranda MC, Mendonça S, *et al.* Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol.* 2003; 3: 20-5.
22. Picoli SU, Mazzoleni LE, Fernández H, De Bona LR, Neuhauss E, Longo L, *et al.* Resistance to amoxicillin, clarithromycin and ciprofloxacin of *Helicobacter pylori* isolated from Southern Brazil patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56: 197-200.
23. Eisig JN, Silva FM, Barbuti RC, Navarro-Rodrigues T, Moraes-Filho JPP, Pedrazzoli Jr J. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. *Arq Gastroenterol.* 2011; 48: 261-4.
24. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 280-322.
25. Moore RA, Beckthold B, Wong S, Kureishi A, Bryan LE. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 107-11.
26. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit JC, Soussy CJ. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low and high-level fluorquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3942-4.
27. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, *et al.* Evaluation of a new test, Genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 3600-7.

28. Deyi VY, Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y, Bontems P, Lepage P, *et al.* Practical use of Genotype HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2011; 70: 557-60.
29. Martins GM, Sanches BSF, Moretzsohn LD, Coelho LG. Rapid in-office *H. pylori* serologic test: an useful tool in areas with high *H. pylori* prevalence? [abstract]. In: European Helicobacter Study Group: XXVIth International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer; 2013; Madrid, Spain. *Helicobacter* 2013; 18(1): 120 [Abstract P10.07].
30. Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, Glupczynski Y. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter* 2006; 11: 441-5.
31. Kim JM, Kim JS, Kim N, Jung HC, Song IS. Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 965-7.
32. Nishizawa T, Suzuki H, Umezawa A, Muraoka H, Iwasaki E, Masaoka T, *et al.* Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 303-5.

## 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de resistência do *Helicobacter pylori* aos antimicrobianos influencia a eficácia dos regimes terapêuticos de primeira ou segunda linha, que geralmente empregam claritromicina ou fluorquinolonas, respectivamente. O conhecimento e a monitorização da prevalência local de resistência a esses antibióticos permitirão o aprimoramento das estratégias terapêuticas, podendo-se alcançar melhores índices de erradicação.

Os testes fenotípicos de cultura do *Helicobacter pylori* e determinação da CIM dos antibióticos são raramente utilizados em nosso meio. Assim, métodos moleculares validados e acurados tornam-se ferramentas valiosas na avaliação da presença de resistência aos antimicrobianos. Kits de alguns desses testes estão disponíveis comercialmente. Utilizamos, em nosso estudo, o teste alemão GenoType HelicoDR, fácil de ser executado por pessoal treinado e que demanda infraestrutura habitualmente disponível nos laboratórios de biologia molecular (à exceção da incubadora específica para hibridização). O custo aproximado do teste, que foi 45 dólares por paciente (contabilizando-se apenas os gastos com materiais), foi considerado razoável. Os resultados já podem estar disponíveis após dois dias da chegada das amostras ao laboratório.

O presente estudo avaliou uma amostra de conveniência de um único centro em Belo Horizonte. Os dados obtidos não podem ser extrapolados para a população em geral. Estudos nacionais, empregando tamanhos de amostra apropriados, representativos da população, são necessários. Nosso grupo iniciou, concomitante ao atual trabalho, estudo para estimar a prevalência de resistência à claritromicina e fluorquinolonas nas cinco regiões do Brasil, obtendo-se uma média nacional, com a previsão de coletar 540 amostras. O teste molecular GenoType HelicoDR mostra-se oportuno em estudos com esse desenho, pois é possível centralizar sua execução em um laboratório de biologia molecular de um único centro, o qual passa a receber, regularmente, as biópsias endoscópicas coletadas em cada cidade participante, desde que armazenadas em solução de RNAlater e mantidas refrigeradas a 4° C.

Finalmente, gostaria de concluir expressando meu contentamento em fazer esta tese de mestrado. Pesquisei e trabalhei com satisfação. O tema escolhido, em conjunto com meu orientador, tem sido foco de meu interesse desde a graduação, enquanto bolsista de iniciação científica. Ao mesmo tempo em que desenvolvia o trabalho científico, as disciplinas por mim cursadas na pós-

graduação garantiam-me novos conhecimentos técnicos e amadurecimento em pesquisa. O fim desse trabalho cria grande motivação para que eu continue a pesquisar e iniciar um projeto maior, em nível de doutorado, inclusive com possibilidade de realizar parte do estudo no exterior, indo no encalço das várias ideias que me surgem à mente.

**APÊNDICE 1**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas**

**LABORATÓRIO DE PESQUISA****PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**

**TAREFA: 001 POP.HELICO. LABORATÓRIO DE PESQUISA – IAG – HC:**

**EXTRAÇÃO DO DNA DAS BIÓPSIAS GÁSTRICAS**

**APLICAÇÃO: LABORATÓRIO DE PESQUISA DO IAG**

**CONTROLE DE APROVAÇÃO E RESUMO DE REVISÃO**

<b>Nº Revisão</b>	<b>Nº de Páginas</b>	<b>Histórico de Alteração</b>
01/2013	11	Padronizado
<b>Elaboração</b>	<b>Verificação</b>	<b>Aprovação</b>
Karine Sampaio Lima	Gustavo Miranda Martins	Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
Data: 26 / 04 / 2013	Data: 16 / 05 / 2013	Data: 18 / 05 / 2013

**OBJETIVO**

Este protocolo tem como objetivo a padronização local da metodologia de extração do DNA das amostras gástricas obtidas por biópsia, através do QIAamp DNA Minikit® (Qiagen, Benelux, Holanda), para posterior reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, conforme kit GenoType HelicoDR.

## MATERIAIS GERAIS

- RNAlater®
- Criotubos e CrioRacks
- Tubos eppendorf, pipetas e ponteiras
- Refrigerador e Freezer -80°C
- Kit de extração QIAamp DNA Minikit® (Qiagen, Benelux, Holanda)
- Equipamentos de proteção individual (EPI)
- Nanodrop

## EXTRAÇÃO DO DNA COM UTILIZAÇÃO DO QIAamp DNA Minikit®

Direcionado à purificação do DNA total (genômico, mitocondrial e viral) a partir de tecidos.

- O DNA deverá ser extraído das amostras de tecido através do QIAamp DNA Minikit® (Qiagen, Benelux, Holanda). Este kit é designado para rápida extração e purificação de DNA total a partir de tecido.

### Materiais não fornecidos no kit

- Tubos eppendorf 1,5-2,0 ml
- Ponteiras 100 µl, 200 µl e micropipetas
- Ponteiras com Filtro de 10 µl e 20 µl
- Balança analítica
- Placa Petri, bisturi n3/4 e lâminas
- Cronometro
- Centrifuga 8-14mil rpm p/ tubos 2ml
- Vórtex e MiniSpin
- Bloco Térmico 56°C
- Bloco Térmico 70°C
- Etanol (96–100%)

### Componentes do Kit

QIAamp DNA Kits Catalog no.	Mini (50) 51304	Mini (250) 51306
Number of preps	50	250
QIAamp Mini Spin Columns	50	250
Collection Tubes (2 ml)	150	750
Buffer AL*	12 ml	54 ml
Buffer ATL	10 ml	50 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml	95 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml	66 ml
Buffer AE	22 ml	110 ml
QIAGEN® Protease	–	–
Protease Solvent†	–	–
Proteinase K	1.25 ml	6 ml

- Phosphate-buffered saline (PBS)
- RNase A (100 mg/ml)

### **Armazenamento**

Colunas de centrifugação do QIAamp DNA Mini Kit e tampões podem ser armazenadas à temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 ano sem qualquer modificação de desempenho.

### **Preparo dos Reagentes e Armazenamento**

#### **Proteinase - solução (2-8°C ou -20°C)**

A solução de proteinase K pronto-para-uso do QIAamp DNA Mini Kit dissolvida em tampão de armazenamento é estável durante 1 ano armazenada à temperatura ambiente. Para prolongar o tempo de uso da Proteinase K, armazenar a 2-8°C.

#### **Tampão AL (armazenar à temperatura ambiente, 15-25 °C)**

Misture o Tampão AL cuidadosamente por agitação antes do uso.

O Tampão AL é estável durante 1 ano quando armazenado à temperatura ambiente.

#### **Tampão AW1 (armazenar à temperatura ambiente, 15-25 °C)**

O Tampão AW1 é fornecido como um concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicionar a quantidade adequada de etanol (96%-100%), como indicado na embalagem.

Estável durante 1 ano quando armazenado fechado à temperatura ambiente.

#### **Tampão AW2 (armazenar à temperatura ambiente, 15-25 °C)**

O Tampão AW2 é fornecido como um concentrado. Antes do uso, adicionar a quantidade adequada de etanol (96%-100%) ao tampão AW2 concentrado, tal como indicado na embalagem.

Estável durante 1 ano quando armazenado fechado à temperatura ambiente.

## **Quantidade de Amostra**

Quantidade de amostra:

- 2 biópsias gástricas de antro = 25 mg\*
- 2 biópsias gástricas de corpo = 25 mg\*

\* A soma das biópsias gástricas de cada região do estômago, coletadas por pinça Radial Jaw, possuem aproximadamente 25 mg.

→ Aferir o peso das amostras em balança antes do armazenamento em freezer ou depois de congeladas antes do protocolo. Independente do momento em que serão aferidas, remover o excesso de líquido e atentar para a formação de cristais de RNA later, para evitar erros na pesagem.

## **Pontos importantes antes de iniciar**

- Todos os passos de centrifugação são realizados à temperatura ambiente (15-25 ° C).
- Evitar congelamento e descongelamento repetidos de amostras armazenadas, uma vez que isso reduz o tamanho do DNA.
- Incluir digestão com RNase.
- Equilibrar a amostra até à temperatura ambiente (15-25 ° C).
- Aquecer dois banhos de água ou de blocos de aquecimento: um a 56°C e um a 70°C.
- Equilibrar o Tampão AE ou água destilada à temperatura ambiente para a eluição.
- Verificar se Buffers AW1 e AW2 foram preparados de acordo com as instruções.
- Se formar precipitado no Tampão ATL ou AL, dissolva-o por incubação a 56°C com leve agitação.

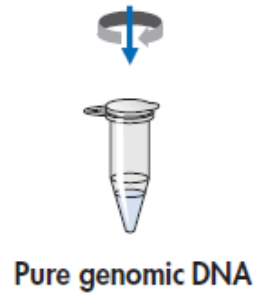
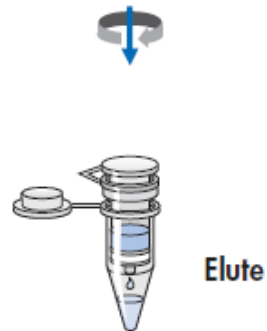
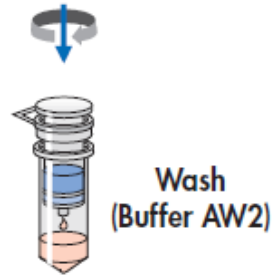
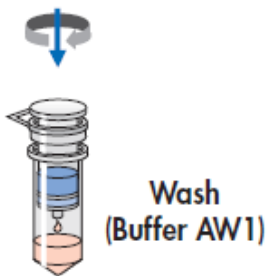
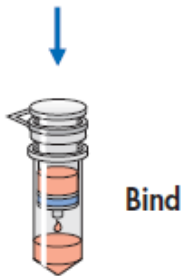
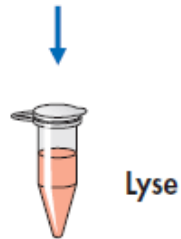
## **Procedimento**

1. Retirar as amostras do armazenamento e fragmentá-las individualmente em placa Petri estéril com auxílio de bisturi e adição de 40 µl de Tampão ATL. É importante cortar os tecidos em pequenos pedaços para reduzir o tempo de lise.  
Obs. Opcionalmente, pode-se fragmentar o tecido com nitrogénio líquido: transferir o material para tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e prosseguir normalmente.
2. Transferir cada amostra para tubo de microcentrífuga de 1,5 ou 2 ml, e adicionar mais 150 µl de Tampão ATL. Recomenda-se adicionar a Proteinase K logo após do Buffer ATL.
3. Adicionar 20 µl de Proteinase K, agitar em vórtex durante 15s e incubar por 2:30h a 56°C até que o tecido seja completamente lisado. Obs: durante incubação, agitar em vórtex 2-3 vezes a cada hora para homogeneizar a amostra.
4. Centrifugar rapidamente a amostra para remover gotas de dentro da tampa.
5. (OPCIONAL) Adicionar 4 µl de RNase A (100 mg/ml), misturar em vórtex durante 15s, incubar durante 2 min à temperatura ambiente.
6. Adicionar 200µl de Tampão AL (caso forme bolinhas brancas, isso não irá interferir na reação).
7. Misturar em vórtex durante 15s até formar uma solução homogênea. E incubar a 70°C durante 10 min. Centrifugar rapidamente a amostra.
8. Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) e misturar em vórtex durante 15s. Centrifugar rapidamente a amostra.
9. Cuidadosamente, aplicar a amostra (incluindo o precipitado) na coluna de centrifugação QIAamp, em tubo de 2 ml (fornecido), sem molhar o anel.
10. Fechar a tampa e centrifugar a 8000 rpm por 1 min. (Fechar cada coluna de centrifugação para evitar a formação de aerossol durante a centrifugação)
11. Colocar a coluna de centrifugação QIAamp (Filtro) num tubo limpo de 2 ml (fornecido), e rejeitar o tubo contendo o filtrado (tubo de coleta). Obs: Caso a solução não passe completamente através da membrana, centrifugar novamente a uma velocidade maior até toda a solução for filtrada, ou seja, até que a coluna esteja vazia.
12. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 µl de tampão AW1 sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar a 8000 rpm por 1 min.

13. Colocar a coluna em um tubo limpo de 2 ml (fornecido) e descartar o tubo coletor contendo o filtrado
14. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500  $\mu$ l de tampão AW2 sem molhar a borda. Fechar o tampão e centrifugar a 14000 rpm durante 3 min.
15. Colocar a coluna em um novo tubo de 1,5 ml (não fornecido) e descartar o tubo coletor. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min para secar a membrana por completo.
16. Colocar a coluna em um tubo limpo de 1,5 ml (não fornecido) e descartar o tubo coletor.
17. Abrir cuidadosamente a coluna de centrifugação e adicionar 200  $\mu$ l de Tampão AE, incubar por 1 min em temperatura ambiente. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min.
18. Colocar a coluna em um tubo limpo de 1,5 ml (não fornecido) e descartar o tubo coletor.
19. Abrir cuidadosamente a coluna de centrifugação e adicionar 200  $\mu$ l de Tampão AE, incubar por 5 min em TA. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min.
20. Descartar a coluna de centrifugação e armazenar o tubo coletor contendo a amostra a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para armazenamento a longo prazo.

### QIAamp Spin Procedure

Sample



## **QUANTIFICAÇÃO DO DNA EM NANODROP**

- Para isolar DNA puro, a etapa de purificação com RNase é necessária.
- O rendimento de DNA é determinado a partir da concentração do DNA do eluato, aferido pela absorbância em 260nm.
- A pureza é determinada pelo calculo da razão da absorbância em 260nm para absorbância em 280nm, sendo que o DNA puro possui uma razão A260/A280 de 1,7-2,0.
- Medir a absorbância a 260 e 280 nm, as leituras de absorbância a 260 nm deverão situar-se entre 0,1 e 1,0. A diluição da amostra deve ser ajustada em conformidade.
- Utilizar tampão de eluição para diluir as amostras e para calibrar o espectrofotômetro.
- O rendimento do DNA depende tanto da quantidade quanto do tipo de tecido processado. 25 mg de tecido renderão aproximadamente 10-30 µg de DNA em 400 µl de água (25-75 ng/µl), com uma razão A260/A280 de 1,7-1,9.

### **Procedimento de Quantificação**

- Quantificar as amostras imediatamente após a extração do DNA ou retirá-las do freezer - 20°C e descongelar em gelo a -4°C.
- Abrir programa Nanodrop e na opção ácidos nucleicos, especificar em "Type" a quantificação de DNA.
- Estabelecer o “Branco” utilizando o mesmo buffer onde as amostras foram ressuspensas ou diluídas. Aplicar no pedestal inferior 2 µl da solução “Branca”, fechar o pedestal e clicar em “Blank”.
  - Para cada ciclo de quantificação recomenda-se uma leitura com o “Branco” como sendo uma amostra (a leitura não pode variar acima de 0.04 A (10mm de absorbância)). Se der acima, repita o processo até abaixar a margem.
  - Caso a leitura das amostras ultrapasse 30 min., recomenda-se realizar leitura do “Branco”.
- Homogeneizar com os dedos a amostra delicadamente com batidinhas no fundo do tubo antes de retirar 2 µl para leitura.
- Limpar as duas extremidades do pedestal com lenço de papel limpo e macio; e quantificar as amostras. Aplicar no pedestal inferior 2 µl para cada amostra, fechar o pedestal e clicar em “Measure”.
  - Entre cada quantificação deve-se limpar o leitor nas duas extremidades do pedestal com lenço de papel macio.

- Salvar os dados gerados – “Reports” ou “My Data”.
- Ao terminar a leitura coloque as amostras originais de volta no freezer -20°C envolvidas por Parafilm.

### **Limpeza do Pedestal**

- Aplicar 3-5 µl de água deionizada e abaixe o pedestal, deixe por 2-3 min.
- Limpar o leitor nas duas extremidades com lenço de papel macio.

Obs 1: Descontaminação poderá ser realizada com 0,5% de hipoclorito de sódio (diluição 1:10 da solução comercial). Em seguida, aplicar 3-5 µl de água deionizada, conforme protocolo.

Obs 2: Para a quantificação espectrofotométrica, qualquer substância com absorvância no mesmo comprimento de onda da substância de interesse tende a superestimar o valor. DNA e RNA possuem pico de absorvância em 260nm, sendo assim, caso não trate seu DNA extraído com RNase, o valor tende a considerar ambos e a relação 260/280 apresenta um valor superior a 1.8 (o mesmo é válido para amostras de RNA que devem ser tratadas com DNase).

**SIGLAS**

DNA = Ácido desoxirribonucleico

PCR = Reação em cadeia da polimerase

EPI = Equipamentos de proteção individual

PBS = Phosphate-buffered saline

**REGISTROS GERADOS**

NA

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Bula do QIAamp DNA Minikit® (QIAGEN Benelux, Holanda)

**ANEXOS**

NA

**APÊNDICE 2**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas**

**LABORATÓRIO DE PESQUISA**

<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>
<b>TAREFA: 002 POP.HELICO. LABORATÓRIO DE PESQUISA – IAG – HC: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE</b>
<b>APLICAÇÃO: LABORATÓRIO DE PESQUISA DO IAG</b>

<b>CONTROLE DE APROVAÇÃO E RESUMO DE REVISÃO</b>		
<b>Nº Revisão</b>	<b>Nº de Páginas</b>	<b>Histórico de Alteração</b>
00/2013	10	Emissão Inicial
<b>Elaboração</b>	<b>Verificação</b>	<b>Aprovação</b>
Karine Sampaio Lima	Gustavo Miranda Martins	Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
Assinatura	Assinatura	Assinatura
Data: 15 / 05 / 2013	Data: 24 / 05 / 2013	Data: 30 / 05 / 2013

**OBJETIVO**

Este protocolo objetiva a padronização local da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, do DNA extraído das biópsias gástricas obtido com QIAamp DNA MiniKit, para posterior genotipagem conforme kit GenoType HelicoDR.

**MATERIAL REQUERIDO**

- Refrigerador e Freezer -80°C
- Pipetas de 10, 50, 100, 200 e 1000 µl

- Ponteiros estéreis com filtro de 200 e 1000µl e sem filtro de 200µl
- Tubos de PCR, DNase e RNase free
- Centrífuga
- Termociclador
- Timer
- Água para biologia molecular/ultrapura
- PCR máster Mix
- *Hot start Taq DNA Polymerase*
- Kit GenoType HelicoDR  
(Hain Life Science)
- Material para Gel de agarose 2%
- Hipoclorito de sódio e álcool 70%
- Equipamentos de proteção individual(EPI)

## **REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

A PCR será realizada conforme o kit GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Alemanha), um ensaio molecular genético para identificação da resistência do *H. pylori* às fluorquinolonas e claritromicina, a partir de cultura de células e/ou biópsias, através da detecção das mutações abaixo, por amplificação multiplex com *primers* biotinilados:

- Resistencia à fluoroquinolona - mutação no gene *gyrA* (códon 87 e 91).
- Resistencia à claritromicina - mutação no gene 23S (posições 2146 e 2147, GenBank NC000915 e NC000921).

### **Armazenamento e Precauções**

- Armazenar *Primer Nucleotide Mix* (PNM) à 2-8°C isolado de qualquer fonte de contaminação de DNA. Se armazenar mais que 4 semanas, guardar a -20°C.
- Para evitar recongelamentos, preparar alíquotas do PNM.
- Armazenar todos os outros componentes do kit a 2-8°C.

- Não usar os reagentes após o prazo de validade.
- É essencial que todos os reagentes e materiais usados para extração e amplificação de DNA sejam livres de DNases.
- Preparar o mix de amplificação em uma área livre de DNA.
- Uso preferencial de água ultrapura mantida em refrigerador em alíquotas.
- A amostra de DNA deve ser adicionada em área separada.
- É recomendado usar enzima Hot start DNA Polimerase.

### **Controle para PCR**

- Controle negativo (minus-template PCR/controle de contaminação): Todos os componentes da PCR + 5 µL de H<sub>2</sub>O ao invés de DNA. Este irá verificar se os reagentes da PCR estão contaminados com DNA genômico.

### **Procedimento**

- Higienizar bancadas, fluxo laminar e pipetas com hipoclorito de sódio => água destilada => álcool 70%.
- Usar ponteiras com filtro e DNase, RNase free.
- Usar luvas e aventais exclusivos para cada área de trabalho (pré-PCR, adição da amostras, pós-PCR, hibridização).
- Utilizar aventais descartáveis na área de pré-PCR.
- Usar pipetas e ponteiras exclusivas para cada área de trabalho.
- Separar todos os materiais (exceto reagentes) para preparo do Mix para PCR, em capela de fluxo laminar para esterilização UV, conforme protocolo de uso do equipamento.  
(Racks e tubos 0,2 e 1,5 ml; ponteiras com filtro de 200 e 1000µl e sem filtro de 200µl; pipetas)

Obs.: Priorizar o uso de água ultra pura, de preferência em alíquotas para evitar contaminação. Entretanto, em caso de contaminações, como opção pode-se utilizar água para injeção - WFI (por sua característica de uso único).

### A) Preparo do Mix pré-PCR

- Determinar o número de amostras a serem amplificadas (nº de amostras + controles).
- Preparar o Mix PCR (pipetar todos os reagentes, exceto DNA, em tubos de 1,5 ou 2 ml).

<b>Mix PCR para cada Reação*</b>			
<b>Reagente</b>	<b>Pipetagem/ tubo</b>	<b>x 20 (18 amostras + controle)</b>	<b>x 38 (36 amostras + controle)</b>
10x PCR buffer para HotStar taq (enzima contém 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	100 µl	190 µl
25mM MgCl <sub>2</sub> **	2 µl	40 µl	76 µl
PNM (fornecido) ***	35 µl	700 µl	1.330 µl
H <sub>2</sub> O livre de nucleases	3 µl	60 µl	114 µl
HotStar taq (1U)	0,2 µl	4 µl	7,6 µl
<b>Total</b>	<b>45,2 µL</b>	<b>904 µl</b>	<b>1.717,6 µl</b>
	<b>Pipetar 45,2 µl em cada tubo</b>		

\*Procedimento padronizado conforme kit GenoType HelicoDR.

\*\*Concentração final de MgCl<sub>2</sub> neste mix é de 2.5mM.

\*\*\*PNM HelicoDR contém *primers* específicos + nucleotídeos (dntps) + Dye

- Homogeneizar o Mix sem vortexar e pipetar 45,2 µL em cada um dos tubos eppendorf 0,2.

### B) Adição das amostras e controles

- No ambiente de trabalho de DNA, retirar as amostras do freezer -20°C e deixe 2 min à temperatura ambiente.
- Centrifugar levemente e homogeneizar vagarosamente a amostra para que garanta a presença do DNA ao pipetar.
- Pipetar 5 µl de DNA (20-100 ng DNA) de cada amostra no respectivo tubo.

Obs.: Diluir amostras com concentração >100 ng DNA.

$$\text{Fórmula: } C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

- Pipetar 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O como amostra no respectivo tubo controle (-).
- Homogeneizar material e centrifugar levemente.

### C) Programação da Termociclagem

Programa PCR HelicoDR			
Etapa	Função	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	95°C	15 min.
2 (10x)	Desnaturação	95°C	30 seg.
	Anelamento	58°C	2 min.
3 (25x)	Desnaturação	95°C	25 seg.
	Anelamento	53°C	40 seg.
	Extensão	70°C	40 seg.
4	Extensão Final	70°C	8 min.
		4°C	$\infty$

- Armazenar material amplificado a -20°C.

### ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% (Opcional)

#### Equipamentos necessários

- Balança semi-analítica
- Microondas
- Cubas de eletroforese
- Pipetas de 5, 10, e 20 $\mu$ l
- Transiluminador UV

### **Kits e reagentes**

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| • Agarose  | Água hospitalar estéril ou destilada |
| • Tampão TAE 1x  | Brometo de etídeo                    |
| • Água MilliQ ou ultrapura   | Amostras de DNA                      |
| • Água hospitalar estéril ou destilada<br>(livre de DNase e RNase) | Padrão 50b                           |

### **Demais materiais**

- Papel alumínio
- Frascos de vidro
- *Filme plástico*
- Parafilm
- Ponteiras e tubos eppendorf

### **Limpeza dos materiais**

- Lavar frascos e cuba de eletroforese antes do uso com água estéril e depois MilliQ.
- Encher cuba com água sem molhar os pólos de condução de energia.
- Lavar bandeja de corrida e pente com água estéril e depois MilliQ.
- Remover excesso de líquido em papel absorvente.
- Utilizar ponteiras e tubos livres de DNase.

### **Preparo do TAE 1x**

- TAE 10x = Colocar em frasco limpo de 1L, 900 ml de água MilliQ + 100 ml de TAE 10x.
- TAE 50x = Colocar em frasco limpo de 1L, 980 ml de água MilliQ + 20 ml de TAE 50x.

### Preparo do Gel a 2% de Agarose

- Calibrar a balança na bancada.
- Para cuba de: 15x15: Pesar 4g de Agarose em papel alumínio para 200 ml de TAE 1x.
- Colocar 100 ml de TAE 1x em um frasco de vidro e adicionar agarose pesada aos poucos, homogeneizando, completar para 200 ml.
- Cobrir a boca do frasco com filme plástico e orifício para ventilação.
- Aquecer em microondas por 1min., 30sg., 30sg., 20sg., homogeneizando a cada intervalo até que dissolva toda a agarose (líquido deve ficar incolor e ferver ao homogeneizar).
- Adicionar 10µl de brometo de etídeo à solução de gel de agarose preparada (usar corante fluorescente na concentração final de 0,5µg/ml).
- *Brometo de etídeo = concentração inicial 10mg/ml.*

$$\text{Fórmula: } C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

*C<sub>i</sub> = concentração inicial*

*V<sub>i</sub> = volume inicial*

*C<sub>f</sub> = concentração final*

*V<sub>f</sub> = volume final*

*Ou seja:*

$$10.000 \mu\text{g} (C_i) \times V_i = 0.5 \mu\text{g} (C_f) \times 200 \text{ ml} (V_f)$$

$$= 100/10.000 = 0,01 \text{ ml, que é igual a } 10 \text{ ml}$$

- Homogeneizar e trocar as luvas após uso do brometo de etídeo.
- Esperar esfriar o gel até ficar gelatinoso/morno (ao toque do frasco).

### Corrida de eletroforese

- Colocar a bandeja (cama) de corrida na cuba e adicionar as canaletas de alumínio e os pentes de acordo com a quantidade de amostras. Amostras de DNA migram do preto (polo -) para o vermelho (polo +).
- Verificar calibração da cuba com bolha de nivelamento fornecida.
- Adicionar o gel na bandeja lentamente e verificar se não houve formação de bolhas. Caso apareçam bolhas, empurre-as para o canto com a ponta de uma ponteira.
- Aguardar aprox. 30 min para solidificação do gel.

- Enquanto isso, preparar as amostras e padrão em tubo 0,2 ml ou parafilm.
- Depois do gel bem solidificado, adicionar um pouco do TAE 1x sobre o gel para ajudar a remover o pente da bandeja. Com muito cuidado retire o pente e depois as canaletas.
- Obs.: Certificar-se de que o pente está limpo, sem restos de agarose. Cuidado para não deformar os pocinhos!
- Encher a cuba até cobrir o gel com 0,5 cm de tampão TAE 1x (utilizar o mesmo buffer e concentração utilizados para fazer o gel)
- Aplicar o padrão, amostras e controle, previamente preparados (usar ponteiros 0,5-10 µl).  
Cuidado para não tocar na cama e nem na superfície dos poços do gel!

<b>Padrão 50bp DNA Step Ladder</b>	<b>Controle -</b>	<b>Amostras</b>
1 µl Tampão Dye		
2 µl Água ultrapura	5 µl Amostra (-)	5 µl Amostra
3 µl Padrão		
6 µl	5 µl	5 µl

*Tampão Dye = Concentração inicial [6x]*

*Para utilizar a [1x], basta pipetar conforme o quadro para volume final de 6 µl.*

*Padrão de peso molecular = Concentração inicial de 0,34 µg/µl = 340 ng/µl.*

*A quantidade ideal dos padrões para o gel é de 1µg de DNA.*

*Assim, 340ng x 3 = 1020ng = aprox. 1µg. Portanto, para esta rotina, pipetar 3 µl do padrão.*

- Correr a 90-110v, amperagem automática, por 20 min., passar para 110-120v por mais aproximadamente 60min., até que a banda esteja na posição de leitura.  
Verificar a temperatura da cuba, não pode super aquecer! Observar corrida!
- Desligar cuba antes de remover o gel.

- Retirar gel e analisar as bandas formadas em Transiluminador UV.
- Fotografar o gel para registro.

### **Interpretação**

- Observar separação das bandas de peso molecular.
- Verificar controle negativo.
- Avaliar a presença dos amplicons em estudo: 145 bp (gyrA), 100 bp (23S RNA).

### **Limpeza dos materiais depois do procedimento**

- Enxaguar frascos e cuba de eletroforese com água estéril ou destilada e depois MilliQ.
- Bandeja de corrida e pente lavar com água estéril e depois MilliQ.
- Vestígios de agarose solidificadas no frasco ou na cuba, remover com água destilada quente.

### **Outras observações**

- A agarose-1000 comporta-se de maneira diferente da agarose convencional. É indicada para separar com resolução fragmentos de até 1000pb (quanto maior a porcentagem do gel, maior a resolução. Nesse caso, se necessário pode-se aumentar o tempo de corrida para separar melhor as bandas).

**SIGLAS**

PCR = Reação em cadeia da polimerase

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EPI = Equipamento de proteção individual

RNA = Ácido ribonucleico

PNM = *Primer Nucleotide Mix*

TA = Temperatura ambiente

AC = *Amplification control (kit)*

**REGISTROS GERADOS**

NA

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Bula do Teste molecular GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Alemanha)

**ANEXOS**

NA

**APÊNDICE 3**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas**



**INSTITUTO ALFA DE  
GASTROENTEROLOGIA  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UFMG**

**LABORATÓRIO DE PESQUISA****PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**

**TAREFA: 003 POP.HELICO. LABORATÓRIO DE PESQUISA – IAG – HC:**

**HIBRIDIZAÇÃO**

**APLICAÇÃO: LABORATÓRIO DE PESQUISA DO IAG**

**CONTROLE DE APROVAÇÃO E RESUMO DE REVISÃO**

<b>Nº Revisão</b>	<b>Nº de Páginas</b>	<b>Histórico de Alteração</b>
00/2013	11	Emissão Inicial
<b>Elaboração</b>	<b>Verificação</b>	<b>Aprovação</b>
Karine Sampaio Lima	Gustavo Miranda Martins	Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
<b>Assinatura</b>	<b>Assinatura</b>	<b>Assinatura</b>
Data: 10 / 09 / 2013	Data: 24 / 09 / 2013	Data: 30 / 09 / 2013

**OBJETIVO**

Este protocolo tem como objetivo a padronização local da metodologia de hibridização das amostras amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, provenientes de biópsias gástricas, conforme kit GenoType HelicoDR.

**MATERIAL REQUERIDO**

- Amostras amplificadas
- Refrigerador e Freezer -20°C
- Banho - Maria
- Incubadora TwinCubator
- Kit GenoType HelicoDR
- H<sub>2</sub>O destilada
- Hipoclorito de sódio 2%
- Álcool 70%
- Tubos Falcon DNase e RNase Free de 15 e 50 ml/ Racks
- Pipetas de 20 a 1000 µl
- Ponteiras estéreis com filtro de 200 e 1000 µl
- Caneta em gel
- Pinças estéreis
- Cronômetro
- Papel absorvente
- Papel alumínio
- Descarte com hipoclorito de sódio 2%
- Cubas para higienização das placas
- Equipamentos de proteção individual (EPI)

### Armazenamento e Precauções

Produto	Temperatura de Armazenamento	Precauções	Temperatura de trabalho
Tiras/fitas de membrana revestida com sondas específicas	2-8°C	-	TA
<i>Primer Nucleotide Mix (PNM)</i> <i>(utilizado apenas na PCR das amostras)</i>	2-8°C. Armazenar a longo prazo a -20°C.	Utilizar alíquotas do PNM para evitar recongelamentos.	TA
Solução de desnaturação (DEN)	2-8°C	Contém < 2% de NaOH, irritante aos olhos e pele.	TA
Tampão de Hibridização (HYB)	2-8°C	-	37-45°C
Solução de lavagem (STR)	2-8°C	-	37-45°C
Solução de Enxague (RIN)	2-8°C	-	TA
Conjugado Concentrado (CON-C)	2-8°C	-	-
Conjugado Tampão (CON-D)	2-8°C	Reagente opaco.	TA
Substrato concentrado (SUB-C)	2-8°C	Contém dimetil sulfóxido, irritante à pele.	-
Substrato Tampão (SUB-D)	2-8°C	-	TA

- Não usar os reagentes com precipitação ou após o prazo de validade.
- É essencial que todos os reagentes e materiais usados para extração e amplificação de DNA sejam livres de DNases.

**Controle de Qualidade** - Para validar a performance correta do teste e o funcionamento apropriado dos reagentes, cada fita contém 4 zonas de controle:

- **Zona de controle do conjugado (Co):** verifica a ligação do conjugado à fita e sua reação cromogênica;
- **Zona de controle de amplificação (AC):** verifica a reação de amplificação;
- **Duas zonas de controle do *Locus*:** verificam a sensibilidade ideal da reação de cada gene *loci* testado.

### **Desnaturação química dos produtos de amplificação e reação de hibridização:**

#### **Preparo do material**

- Pré-aquecer banho-maria à 45°C e TwinCubator à 45°C (máximo tolerado +/- 1°C), conforme programação P1S do equipamento.
- Pré-aquecer HYB e STR em banho-maria a 45°C até obter uma solução homogênea.
- Aquecer à temperatura ambiente os demais reagentes, exceto CON-C e SUB-C.
- Os reagentes não devem conter precipitados (CON-D é opaco). Misturar se necessário.
- Diluir o conjugado concentrado (CON-C, laranja) e substrato concentrado (SUB-C, amarelo) 1:100 com buffer respectivo nas quantidades necessárias. (*Durante procedimento*)
- Preparar alíquotas dos reagentes em tubo Falcon 50 ml para evitar qualquer contaminação.

**Obs:** No caso de repetir o procedimento no mesmo dia, não há necessidade de aquecer novamente as soluções. Entretanto, caso as soluções sejam refrigeradas, deve-se aquecer novamente.

#### **Metodologia**

1. Separar amostras e controle negativo que serão utilizados. Homogeneizar antes do uso. São 12 poços por placa do kit.
2. Aplicar 20 µL da solução de desnaturação (DEN, azul) no canto de cada poço.
  - A cada aplicação na placa sair com a ponteira por baixo e contornar em direção ao descarte para evitar qualquer contaminação. Isso aplica a todos os outros processos de pipetagem ou remoção de reagente.

3. Adicionar à solução 20  $\mu$ L da amostra amplificada, homogeneizar com pipeta e incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
  - Sempre aplicar o controle negativo no último poço da placa.
4. Enquanto isso, retirar as fitas usando pinças estéreis pela extremidade do marcador colorido, sem ultrapassar este limite, e colocá-las em papel limpo. Numerar as fitas com caneta gel abaixo deste marcador colorido e identificar respectivamente as amostras no mapa de resultados.
5. Adicionar a cada poço 1mL do buffer de hibridização pré-aquecido (HYB, verde) e homogeneizar gentilmente a placa até a cor ficar homogênea.
  - Muito cuidado para não derramar reagente e/ou espirrar nos poços vizinhos.
6. Cuidadosamente, coletar cada tira e posicionar a cada poço.
  - As fitas devem ser cobertas completamente pela solução e o lado revestido (identificado pelo marcador colorido) deve ficar voltado para cima. Usando pinças estéreis ou ponteiros, desvirar as fitas que ficaram ao contrário quando imersas na solução. Limpar as pinças após cada uso para evitar contaminação.
7. Coloque a placa (extremidade com marcação “bolinha” para cima) na incubadora Twincubator e incubar por 30 min a 45°C, conforme programação P1S do equipamento.
  - Fechar a tampa e apertar a tecla “Play” (luz fica verde).
  - Ao término, o aparelho irá apitar, apertar “seta” (→) e depois “Stop”.
  - *Hibridização → entre amplicons de fita simples marcados com biotina e sondas (probes) ligadas à membrana presente na fita.*
8. Remover a placa do equipamento, aspirar com auxílio de pipeta de 1 ml o buffer de hibridização por completo e descartar. Utilizar uma ponteira para cada amostra.
9. Adicionar 1mL da solução de lavagem (STR, vermelho) a cada fita e incubar por 15 min a 45°C no Twincubator.
10. Enquanto isso, diluir o conjugado concentrado (CON-C, laranja) e substrato concentrado (SUB-C, amarelo) 1:100 com buffer respectivo, em volume necessário para os 12 poços da placa (Para cada fita, adicionar 10  $\mu$ L do concentrado a 1mL do respectivo buffer).

- CON-C com CON-D (diluir antes de cada uso)
  - Em um tubo Falcon de 15 ml, preencher 12 ml do CON-D e adicionar 120 µl do CON-C.
  - Homogeneizar e levar à temperatura ambiente.
  - SUB-C com SUB-D (diluição estável por 4 semanas armazenado à TA e protegido da luz)
  - Em um tubo Falcon de 15 ml, preencher 12 ml do SUB-D e adicionar 120 µl do SUB-C.
  - Homogeneizar e envolver tubo em papel alumínio.
  - Manter à temperatura ambiente protegido da luz até o uso.
11. Retirar a placa do TwinCubator e remover completamente a solução de lavagem.
- Despejar toda a solução de lavagem de uma só vez em um descarte e remover todo fluido excedente virando a placa delicadamente em papel absorvente. Isso aplica a todos os outros processos de lavagem.
  - Trabalhar em temperatura ambiente no TwinCubator desse passo em diante.
12. Lavar cada poço com 1 mL de solução de enxague (RIN) por 1 min no TwinCubator. Remover completamente a solução de enxague.
13. Adicionar 1 mL de conjugado diluído (estreptavidina-fosfatase alcalina (AP)) em cada fita e incubar por 30 min no TwinCubator. Remover completamente a solução.
14. Lavar 2x cada poço com 1 mL de solução de enxague (RIN) por 1 min no TwinCubator. Remover completamente a solução de enxague.
15. Lavar cada poço com 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada por 1 min no TwinCubator. Remover completamente a H<sub>2</sub>O destilada.
16. Adicionar 1mL de substrato diluído a cada fita e incubar 5 min no TwinCubator protegido de luz e sem vibração.
- Ao final do tempo, caso a banda esteja muito clara, permanecer por mais tempo. Não exceder no tempo, pois pode levar a um aumento da marcação do background (reações inespecíficas) e pode interferir nos resultados.
  - Altas concentrações de DNA podem gerar sinal forte e rápido, assim, logo que surgir a banda, deve-se interromper incubação com substrato para evitar reação cruzada.
17. Lavar duas vezes cada poço com 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada por 1 min no TwinCubator. Remover completamente a H<sub>2</sub>O destilada.

18. Com pinça, remover as fitas ainda umedecidas da placa e aplicá-las no mapa de resultados respectivamente.
19. Cobrir as fitas com fita durex e interpretar os resultados com a régua de avaliação (fornecida no kit).

### **Higienização das placas e pinças**

As placas são reutilizáveis, desta forma, higienizá-las após o uso junto com as pinças utilizadas conforme segue abaixo:

**Pisseta/Cuba 1** – Incubar por 5 min. em hipoclorito de sódio 2%.

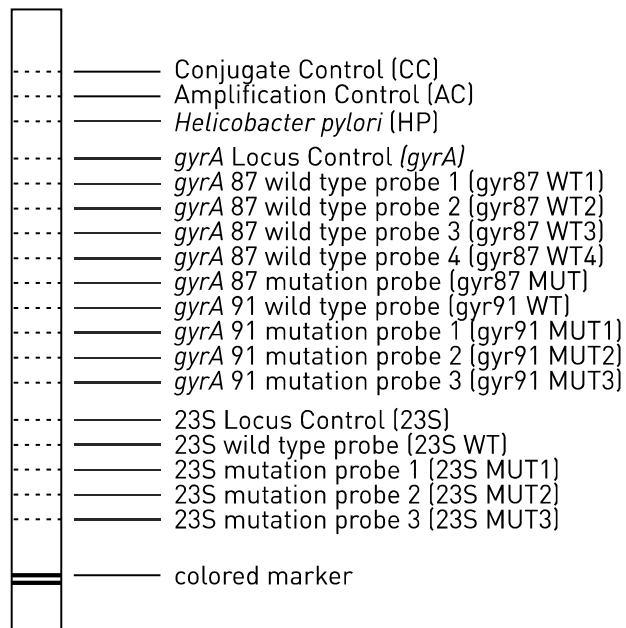
**Pisseta/Cuba 2** – Enxaguar com água destilada ou MilliQ.

**Pisseta/Cuba 3** – Enxaguar com álcool 70%.

**Obs:** Substituir o líquido das respectivas cubas para cada pinça higienizada.

### **Interpretação dos resultados**

- Os resultados são analisados de acordo com as bandas observadas nas fitas e interpretadas de acordo com as instruções do fabricante.
  1. Alinhar as bandas CC e AC das tiras avaliadas com as respectivas linhas na folha. Por motivos técnicos a distância entre as sondas nas fitas podem variar.
  2. Alinhar a régua de avaliação com as bandas de controle do *Locus*.
  3. Determinar a resistência e anotar na respectiva coluna. Nem todas as bandas da fita devem mostrar o mesmo nível de sinal. Cada fita tem um total de 18 zonas de reação.



### Controle de Conjugado (CC)

Uma linha deve ser formada, documentando a eficiência da ligação com conjugado e reação com substrato.

### Controle da Amplificação (AC)

Quando o teste é realizado de forma correta, um aplicom de controle ligará a área de controle de amplificação. Caso essa banda apareça, erros durante a reação de amplificação podem ser excluídos.

No caso de um resultado positivo, o sinal dessa área poderá ser fraco ou mesmo desaparecer por completo. Isso se deve à competição de reações individuais durante a amplificação. Nesse caso, entretanto, a reação foi realizada corretamente e o teste não precisará ser repetido.

A falta de uma banda AC, no caso de um resultado negativo, indica falhas durante a amplificação. Nesse caso a respectiva amostra deverá ser repetida.

### *Helicobacter pylori* (HP)

Essa área documenta a presença de *H. pylori*. A intensidade da banda varia de acordo com a concentração inicial de DNA.

### Controle do Locus

A zona de controle do locus detecta a região específica do gene para seu respectivo locus e deve sempre marcar positivo quando a zona HP foi documentada como positiva (presença de *H. pylori*).

Se nenhuma das sondas de controle de locus, ou seu respectivo wild type ou a sonda de mutação de 1 dos 2 genes examinados forem marcados, o teste não poderá ser avaliado.

### Bandas Wild Type

Essas bandas abrangem as áreas mais importantes de resistência dos respectivos genes.

Quando 1 das 4 sondas do gyrA, juntamente com gyr91 WT e 23S WT, marcam positivamente, não há mutações detectáveis nessas regiões examinadas. Dessa forma, a fita testada é sensível a ambos antibióticos.

No caso de mutação, o amplicon não ligará à sonda wild type correspondente. Resultados nas 2 posições do gene gyrA deverão ser combinados para chegar à uma conclusão sobre a possível resistência a fluoroquinolonas. Se nenhuma das 4 bandas gyr 87 WT ou gyr 91 WT marcar positivamente, é indicativo de resistência a fluoroquinolona. Se a banda 23S for negativa, a resistência a claritromicina é indicada.

Qualquer padrão que desviar do WT indica presença de resistência.

Apenas as bandas cuja intensidade sejam tão ou mais fortes que AC devem ser consideradas.

### Casos Especiais

1. Existe a possibilidade de a espécime testada conter uma cepa heterogênea. Caso isso ocorra, uma das sondas mutantes como as bandas WT deverão aparecer.

2. Existe a possibilidade da espécime testada conter mais de uma cepa de *H. pylori*. Se uma das cepas conter mutação, a banda de mutação juntamente com seu WT deverão aparecer.

### Solução de Problemas

- Sinal fraco ou ausência de sinal (incluindo zona de controle de conjugado):
  - Temperatura do ambiente muito baixa ou reagentes não equilibrados à temperatura ambiente;
  - Falta ou pouca quantidade de CON-C e/ou SUB-C.
- Sinal fraco ou ausência de sinal (exceto pela zona de controle do conjugado):
  - Qualidade ou quantidade do DNA extraído. Avaliar amplicos no gel de agarose 2%. No caso do amplicon não ser visível, realizar nova extração e amplificação do DNA;
  - Temperatura de incubação alta.
- Marcação não-homogênea:
  - Fitas não foram completamente imersas durante as etapas de incubação;
  - Placa não foi movimentada propriamente.
- Cor do background alta:
  - CON-C e/ou SUB-C muito concentrados;
  - Etapas de lavagem não foram bem realizadas;
  - Soluções de lavagem muito frias.
- Resultados inesperados:
  - Temperatura de incubação errada;
  - Buffer de hibridização e/ou solução de lavagem não foram pré-aquecidos ou homogeneizados;
  - Contaminação de DNA extraído ou contaminação dos agentes de amplificação;
  - Contaminação dos wells vizinhos durante a adição do buffer de hibridização;
  - Pouco DNA na reação de amplificação;
  - Mutação silenciosa na região da sonda.

**SIGLAS**

TA = Temperatura ambiente

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PBS = Phosphate-buffered saline

EPI = Equipamento de proteção individual

DNA = Ácido desoxirribonucleico

RNA = Ácido ribonucleico

PNM = *Primer Nucleotide Mix*

**REGISTROS GERADOS**

NA

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Bula do Teste molecular GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Alemanha)

**ANEXOS**

NA

## APÊNDICE 4

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Detecção molecular de resistência do *Helicobacter pylori* à claritromicina e fluorquinolonas, diretamente a partir de biópsias gástricas, em Belo Horizonte

Seu médico lhe solicitou uma endoscopia digestiva alta para avaliar seus sintomas. Estamos convidando-o(a) a participar de um estudo para investigar a resistência da bactéria *Helicobacter pylori*, que é encontrada no estômago de muitos indivíduos, a dois tipos de antibióticos frequentemente usados para sua eliminação.

Hoje em dia, está reconhecido o papel do *Helicobacter pylori* como causa de úlceras no estômago e duodeno, além de gastrite e outras doenças. A erradicação dessa bactéria exige o emprego de antibióticos. No entanto, em todo o mundo, têm sido observadas dificuldades em eliminar essa bactéria e a principal causa disso é a sua resistência aos antibióticos que são usados. O conhecimento do perfil de resistência em nosso país poderá indicar se os medicamentos atualmente receitados são boas opções de tratamento ou devem ser modificados.

Se você concordar em participar dessa pesquisa, durante o exame de endoscopia digestiva alta serão colhidas biópsias para o estudo da bactéria.

Nas biópsias do estômago, são retiradas pequenas amostras de tecido durante a endoscopia. Esse procedimento não causa dor ou complicações e constitui rotina durante a endoscopia para avaliar a presença de alterações na mucosa do estômago e, também, para diagnosticar a presença do *Helicobacter pylori* no estômago. Caso seja confirmada a infecção pela bactéria nesse material, as amostras de tecido do estômago que foram coletadas serão analisadas em laboratório para definirmos se a bactéria é resistente ou sensível aos antibióticos testados.

Os resultados da pesquisa serão disponibilizados para seu médico, que poderá utilizar as informações para melhor orientar o seu caso.

O trabalho pretende estudar 72 portadores de infecção por *Helicobacter pylori* que nunca se submeteram a tratamentos anteriores contra a bactéria. A coleta será feita em Belo Horizonte. Esse estudo já foi analisado e aprovado pelos comitês local e nacional de ética em pesquisa.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a garantia de que seus dados individuais serão confidenciais e de que você não será identificado quando os resultados deste estudo forem apresentados em congressos médicos ou publicados em revistas científicas.

O pesquisador responsável por este estudo é o Dr. Gustavo Miranda Martins, médico, CRMMG 32490, que estará à disposição no telefone (31) 9811-0069, ou no endereço Avenida

Prof. Alfredo Balena, 110, 2<sup>o</sup> andar (Instituto Alfa de Gastroenterologia) - bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG.

Avalie estas informações, faça ao médico as perguntas que desejar e, após ter certeza de ter entendido o que lhe foi explicado, se estiver de acordo, dê seu consentimento, assinando ao final deste formulário.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que li este consentimento e entendi o que me foi explicado e que concordo voluntariamente em participar do estudo.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_.

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável

**ANEXO 1 - Aprovação do COEP**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Projeto: CAAE – 05004712.0.1001.5149**

**Interessado(a): Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de setembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado **"Detecção molecular da infecção por H. pylori e sua susceptibilidade à claritromicina e fluoroquinolonas, a partir de fragmentos obtidos por biópsia gástrica, no Brasil"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**