

BRUNO SQUÁRCIO FERNANDES SANCHES

**DETERMINAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA
PRIMÁRIA DO *HELICOBACTER PYLORI* À CLARITROMICINA E
FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS GÁSTRICAS OBTIDAS
POR ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA NO BRASIL**

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

BELO HORIZONTE

2016

BRUNO SQUÁRCIO FERNANDES SANCHES

**DETERMINAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA
PRIMÁRIA DO *HELICOBACTER PYLORI* À CLARITROMICINA E
FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS GÁSTRICAS OBTIDAS
POR ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA NO BRASIL**

Trabalho submetido à banca examinadora designada pelo
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2016



ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO BRUNO SQUARCIO FERNANDES SANCHES

Realizou-se, no dia 12 de julho de 2016, às 08:30 horas, Auditório do Instituto Alfa de Gastroenterologia, 2º andar do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **DETERMINAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA DO HELICOBACTER PYLORI À CLARITROMICINA E FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS GÁSTRICAS OBTIDAS POR ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA NO BRASIL**, apresentada por **BRUNO SQUARCIO FERNANDES SANCHES**, número de registro 2012732466, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho - Orientador (UFMG), Prof. Eduardo Garcia Vilela (UFMG), Profa. Maria do Carmo Friche Passos (UFMG), Prof. Antonio Frederico Novaes de Magalhães (UNICAMP), Profa. Lucia Libanez Bessa Campelo Braga (UFC).

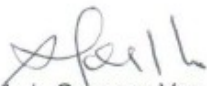
A Comissão considerou a tese:

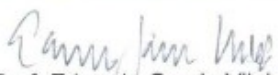
☒ Aprovada

☐ Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

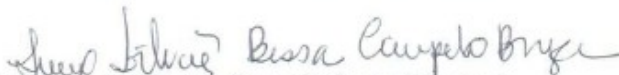
Belo Horizonte, 12 de julho de 2016.


Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Doutor)


Prof. Eduardo Garcia Vilela (Doutor)


Profa. Maria do Carmo Friche Passos (Doutor)


Prof. Antonio Frederico Novaes de Magalhães (Doutor)


Prof. Lucia Libanez Bessa Campelo Braga (Doutor)



FOLHA DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA DO HELICOBACTER PYLORI À CLARITROMICINA E FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS GÁSTRICAS OBTIDAS POR ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA NO BRASIL

BRUNO SQUARCIO FERNANDES SANCHES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO.

Aprovada em 12 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho - Orientador
UFMG

Prof. Eduardo Garcia Vilela
UFMG

Profa. Maria do Carmo Friche Passos
UFMG

Prof. Antonio Frederico Novaes de Magalhães
UNICAMP

Prof. Lucia Libanez Bessa Campelo Braga
UFC

Belo Horizonte, 12 de julho de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

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

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

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 Geral do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Prof. Dr. Unaí Tupinambás

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

Coordenadora: Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora: Profa. Dra. Suely Meireles Resende

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

Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Dr. Paulo Caramelli

Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Prof. Dra. Rosângela Teixeira

Prof. Dra. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Dra. Suely Meireles Resende

DEDICATÓRIA

À vida e suas maravilhas:
meus pais,
minha esposa,
minha filhas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Gonzaga Vaz Coelho, meu orientador, pelo acolhimento no início (Mestrado) e no recomeço (Doutorado) da Pós-Graduação. Pelas muitas oportunidades, pelos apontamentos assertivos, sobretudo pela segurança capaz de atenuar as minhas ansiedades. O tempo passará, meu reconhecimento será eterno. Para sempre, o meu Professor;

À Profa. Maria do Carmo Friche Passos, minha professora de semiologia, cujo exemplo foi determinante em minha escolha pela Gastroenterologia. Dezoito anos atrás ingressei na Iniciação Científica, no teste respiratório, por suas mãos. Com essa tese, atingimos a maioria na história de nossa convivência. Minha gratidão por ter me apresentado esse caminho;

À Profa. Luciana Dias Moretzsohn, pelo interesse e apoio integral para a inclusão dos pacientes em Belo Horizonte;

Ao Doutor Laércio Tenório Ribeiro, pelo esforço, desprendimento e parceria que permitiram concluir, sem extravio, as coletas da região Nordeste dentro do cronograma do estudo;

Aos Professores Joffre Rezende Filho, Ismael Maguilnik, Ramiro Mascarenhas e Alinne Bessa e aos Doutores Helenice Breyer e Gustavo Miranda Martins, pela atuação criteriosa no recrutamento dos pacientes nos diferentes centros de endoscopia do país.

Às biomédicas Karine Sampaio Lima e Bianca Della Croce Cota, e à farmacêutica Raíssa Passos, do laboratório de pesquisa do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pelo treinamento na execução das técnicas moleculares;

Aos acadêmicos Ana Carolina Meira, Edson Alves, Henrique Pinto, Júlia Souza e ao funcionário Osmar Reni Andrade, do teste respiratório, pela participação em diferentes etapas desse trabalho;

Às agências fomentadoras CNPq e FAPEMIG, pelos recursos que viabilizaram a realização da pesquisa;

À empresa Hain Lifescience, por disponibilizar equipamentos e materiais para o estudo genotípico;

Ao Professor Ricardo Castanheira Pimenta Figueiredo, por três conselhos preciosos. Eis aqui minha tese de Doutorado; minha primogênita já não é filha única; e quanto à felicidade, aprendi que ela não se esconde no fim, pois se multiplica no caminho.

À Dra Márcia Rejane Soares Campos, por valorizar e compreender que o serviço público pode evoluir com o estímulo à capacitação dos servidores;

À minha família, começo e finalidade de tudo; Maria Eliza e Esther, astros de meu firmamento;

À minha Graziella, pela felicidade compartilhada; por mais esse filho;

Aos pacientes, por acreditarem na capacidade da Ciência em responder a tantas perguntas;

À Vida, que silenciosamente me direciona e permite o aprendizado com pessoas tão especiais, capazes de inspirar e promover em mim as mais fascinantes transformações.

EPÍGRAFE

“Fé inalabável só o é a que pode enfrentar frente a frente a razão em todas as épocas da humanidade”.

Allan Kardec, 1864.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Além da aderência incompleta ao tratamento, o principal fator associado à falha terapêutica no tratamento de *Helicobacter pylori* (HP) é a resistência bacteriana aos antimicrobianos, adquirida principalmente por mutações genéticas. A detecção da prevalência dessas mutações é fundamental para o conhecimento das taxas de resistência bacteriana e adequação dos esquemas terapêuticos. **OBJETIVO:** Estimar a prevalência da resistência primária de HP à claritromicina e às fluorquinolonas através de um teste molecular em amostras de conveniência coletadas nas cinco regiões do Brasil. **MÉTODOS:** Foram selecionados, em seis centros de endoscopia do país, 519 pacientes com teste sorológico rápido positivo para HP (65,7% mulheres, idade média 43 [variação 19-79] anos), não tratados previamente para essa infecção. Todos os pacientes se submeteram à endoscopia digestiva com biópsias de antro e corpo e realização do teste molecular GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Alemanha) para a detecção do HP 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 e hibridização reversa. As mutações mais frequentemente associadas à resistência aos dois antibióticos foram avaliadas. **RESULTADOS:** Vinte e nove pacientes foram excluídos por ausência da infecção por HP ao teste molecular (21 casos) e ausência de banda *gyrA* (08 casos). No total, a resistência à claritromicina foi detectada em 83 amostras (16,9%) e às fluorquinolonas em 66 amostras (13,5%). Nas regiões estudadas, a resistência à claritromicina e às fluorquinolonas foi, respectivamente, de 16,6% e 2,7% na região Norte (Manaus), 14,5% e 13,7% na região Nordeste (Salvador e Maceió), 19,2% e 15,4% na região Centro-Oeste (Goiânia), 17,5% e 13,8% na região Sudeste (Belo Horizonte) e 19,1% e 16,4% na região Sul (Porto Alegre). A mutação pontual A2147G foi a mais comum (90,3%) entre as cepas resistentes à claritromicina. No grupo resistente às fluorquinolonas, as mutações não especificadas pelo método foram as mais frequentes (37,9%), seguidas da mutação D91N (34,9%). Heterogeneidade genotípica foi observada em 25,3% das amostras. A resistência dupla à claritromicina e fluorquinolonas foi encontrada em 4,3% dos casos (n=21). **CONCLUSÕES:** No Brasil, a resistência genotípica primária de HP à

claritromicina situa-se, em média, entre 15 a 20%, em faixa limítrofe para o uso empírico das terapias triplas contendo claritromicina. A resistência primária às fluoroquinolonas também se apresenta em níveis preocupantes. O teste molecular constitui uma ferramenta diagnóstica adequada e exequível para a determinação e monitoramento da resistência genotípica primária de HP aos antibióticos.

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

ABSTRACT

INTRODUCTION: In addition to the incomplete adherence to treatment, the main factor associated with therapeutic failure in the treatment of *Helicobacter pylori* (HP) is bacterial resistance to antimicrobials, mainly acquired by genetic mutations. The detection of the prevalence of these mutations is critical to the understanding of bacterial resistance rates and adequacy of treatment regimens. **OBJECTIVE:** To estimate the prevalence of HP's primary resistance to clarithromycin and fluoroquinolones through a molecular test on convenience samples collected in five regions of Brazil. **METHODS:** We selected six endoscopy centers in the country, 519 patients with positive rapid serologic test for HP (65.7% women, mean age 43 [range 19-79] years), not previously treated for this infection. All patients underwent endoscopy with biopsies of antrum and body and realization of molecular test GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Germany) for the detection of HP and point mutations of the genes responsible for resistance to clarithromycin and fluoroquinolones. The molecular procedure constituted of three steps: DNA extraction from endoscopic samples, multiplex amplification and reverse hybridization. Mutations more often associated with resistance to both antibiotics were evaluated. **RESULTS:** Twenty-nine patients were excluded for lack of infection by HP to molecular testing (21 cases) and no *gyrA* band (08 cases). In total, the resistance to clarithromycin was detected in 83 samples (16.9%) and fluoroquinolones in 66 samples (13.4%). In the regions studied, resistance to clarithromycin and fluoroquinolones was respectively 16.6% and 2.7% in the North (Manaus), 14.5% and 13.7% in the Northeast (Salvador and Maceio) 19.2% and 15.4% in the Midwest region (Goiania), 17.5% and 13.8% in the Southeast (Belo Horizonte) and 19.1% and 16.4% in the South (Porto Alegre). The point mutation A2147G was the most common (90.3%) among strains resistant to clarithromycin. In resistant to fluoroquinolones group, the mutations not specified by the method were the most common (37.8%), followed by the D91N mutation (34.8%). Genotypic heterogeneity was observed in 25.3% of samples. The double resistance to clarithromycin and fluoroquinolones was found in 4.3% of cases (n = 21). **CONCLUSION:** In Brazil, primary genotypic resistance to clarithromycin HP is situated in the borderland (15 to 20%) where clarithromycin-containing triple therapies are suggested to be empirically

used. The primary resistance to fluoroquinolones also shows growing and worrying levels. Molecular testing is an appropriate and feasible diagnostic tool for the determination and monitoring of primary genotypic resistance of HP to antibiotics.

KEYWORDS: *Helicobacter pylori*. Drug Resistance Microbial. Clarithromycin. Fluoroquinolones. Molecular Diagnostic Techniques.

ABREVIATURAS E SIGLAS

HP	<i>Helicobacter pylori</i>
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 pela substituição de adenina por citosina no nucleotídeo 2146
A2146G	Mutação pontual pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 2146
A2147G	Mutação pontual pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 2147
AAC	Tríade de nucleotídeos composta por adenina, adenina e citosina
AAT	Tríade de nucleotídeos composta por adenina, adenina e timina
ACC	Tríade de nucleotídeos composta por adenina, citosina e citosina
ACT	Tríade de nucleotídeos composta por adenina, citosina e timina
N87K (C261A ou T261A)	Mutação no códon 87 do gen <i>gyrA</i> pela substituição de citocina ou timina por adenina no nucleotídeo 261
T87I (C260T)	Mutação no códon 87 do gen <i>gyrA</i> pela substituição de citocina por timina no nucleotídeo 260

N87I (A260T) Mutação no códon 87 do gen *gyrA* pela substituição de adenina por timina no nucleotídeo 260

AAA	Tríade de nucleotídeos composta por três bases de adenina
GGT	Tríade de nucleotídeos composta por guanina, guanina e timina
TAT	Tríade de nucleotídeos composta por timina, adenina e timina
WT	<i>Wild-type</i> ou tipo selvagem
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IAG	Instituto Alfa de Gastroenterologia
HC	Hospital das Clínicas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFG	Universidade Federal de Goiás
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EUA	Estados Unidos da América
bp	<i>base pairs</i> (pares de bases)
MUT	Mutação
OR	Odds ratio
χ^2	Qui-quadrado
CLA	Claritromicina
FLQ	Fluoroquinolona

NS

Not significant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose 2% que confirmou a presença dos produtos da amplificação (100 bp: 23S RNA; 145 bp: *gyrA*) 37
2. FIGURA 2 - Tira de DNA do teste GenoType HelicoDR evidenciando resistência à claritromicina pela positividade da banda MUT3 do gene 23S 38
3. FIGURA 3 - Exemplo de resistência às fluorquinolonas pela positividade da banda MUT no códon 87 do gene *gyrA* 39
4. FIGURA 4 - Exemplo de resistência de HP às fluorquinolonas em mutação não especificada pelo teste; o gen *gyrA* está presente; ausência de bandas selvagens no códon 87, banda mutante também ausente. 40
5. FIGURA 5- Fita de DNA mostra a heterogeneidade de HP pela presença de mais de uma mutação no códon 91; presença das bandas *gyr91* MUT1 e *gyr91* MUT3 40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Determinação do número de amostras conforme variações no erro máximo permitido (variável e) na pesquisa de resistência de HP à claritromicina e às fluorquinolonas	32
TABELA 2 - Distribuição populacional pelas regiões do Brasil, segundo o IBGE (censo 2010)	33
TABELA 3 – Distribuição da coleta das amostras de conveniência conforme a distribuição da população nas regiões do país	33
TABELA 4 – Previsão inicial e coletas realizadas nos centros de pesquisa de cada região do país.	42
TABELA 5 – Total de resultados de hibridização por centro de coleta	43
TABELA 6 - Distribuição das cepas heterogêneas de HP com percentual de ocorrência dentre as amostras de cada centro	44
TABELA 7 -Resultado do perfil de resistência de HP aos antimicrobianos pelo método Genotype HelicoDR em amostra de conveniência no Brasil, por região de coleta	45

TABELA 8 - Distribuição da resistência e suscetibilidade à claritromicina e às fluorquinolonas conforme sexo e idade dos pacientes 46

TABELA 9 - Perfil das mutações no gen 23S em cada centro de coleta no Brasil 48

TABELA 10– Perfil das mutações no gen gyrA em cada centro de coleta no Brasil
49

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	21
2. OBJETIVO	30
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ESTUDO	30
3.2 . CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	31
3.3. PLANO DE COLETA	32
3.3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	34
3.3.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	34
3.4. PROCEDIMENTOS	35
3.4.1. TESTE SOROLÓGICO RÁPIDO, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA E BIÓPSIAS GÁSTRICAS	35
3.4.2. TESTE MOLECULAR	36
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3.6. ASPECTOS ÉTICOS	41
4. RESULTADOS	42
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8. ARTIGO SUBMETIDO A PERIÓDICO	67
ANEXO I	97
ANEXO II	108
ANEXO III	117
ANEXO IV	128
APÊNDICE	129

1 – REVISÃO DA LITERATURA

Helicobacter pylori (HP) é hoje reconhecido como o principal agente etiológico da úlcera péptica, com papel patogênico igualmente bem estabelecido no adenocarcinoma e linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) gástricos¹. A sua erradicação é hoje recomendada em inúmeras situações clínicas por diferentes consensos em todo o mundo²⁻⁵. Passados quase trinta anos de sua identificação inicial, permanecem lacunas no estabelecimento de uma terapêutica eficaz⁶.

A terapia tríplice, empregando dois antibióticos - amoxicilina e claritromicina - associados a um inibidor de bomba de prótons, administrados por 7 a 14 dias, tem sido reconhecida como eficaz em diferentes metanálises e recomendada por reuniões de consenso nacional e internacionais^{3,7-9}. Entretanto, esse esquema vem apresentando eficácia decrescente nos últimos anos, com índices de erradicação inferiores a 80% em diferentes estudos^{10,11}. A falha da erradicação pode levar ao desenvolvimento de resistência secundária e/ou cruzada e até mesmo ao aparecimento de microrganismos multirresistentes¹². Na ocorrência de falha ao tratamento inicial, outras associações antimicrobianas têm sido recomendadas, como o emprego de levofloxacina, sais de bismuto, tetraciclina, furazolidona, metronidazol e rifabutina¹³⁻¹⁷.

No passado, a falha terapêutica foi atribuída a diferentes condições, como elevada densidade bacteriana, infecções por cepas Cag-positivas e algumas deficiências imunológicas¹⁸. No entanto, essas condições mostraram-se menos importantes do que a má aderência ao tratamento e a resistência bacteriana aos antimicrobianos¹⁹.

A aderência incompleta ao tratamento, frequentemente motivada pelos efeitos adversos das medicações, é das principais causas de falha terapêutica²⁰. Contudo, obtida a aderência do paciente ao tratamento, a resistência bacteriana aos antimicrobianos constitui o principal fator associado ao insucesso¹⁴.

Em geral, a resistência bacteriana a determinado antimicrobiano pode representar uma propriedade intrínseca da espécie ou uma capacidade adquirida,

quando os microorganismos alteram o DNA nativo por mutações ou adquirem genes de resistência, quase sempre como parte do DNA de plasmídeos extracromossômicos transferidos por espécies diferentes de bactérias²¹. Como mecanismos de resistência, destacam-se a alteração de porinas na membrana celular externa que reduzem a permeabilidade ao antimicrobiano; a alteração do local-alvo de atuação do antimicrobiano com impedimento dos efeitos inibitórios ou bactericidas; o bombeamento ativo do antimicrobiano do meio intracelular para o extracelular por bombas de efluxo e o surgimento de enzimas responsáveis pela degradação do antibiótico²².

Como outras poucas espécies bacterianas (por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*), HP adquire resistência aos antibióticos por mutações cromossômicas, sem transmissão horizontal por aquisição de plasmídeos⁶. Embora sejam descritas bombas de efluxo associadas ao gen *hefA*²³, e metilação enzimática do RNA ribossômico pela expressão do gen *erm* (erythromycin resistance methylase)²⁴, o principal mecanismo de resistência de HP são mutações pontuais no DNA, transmitidas verticalmente¹¹. Na maioria dos casos, um número limitado de mutações está presente e podem ser facilmente detectadas por métodos genotípicos. O fenômeno da resistência acarreta resistência cruzada dentro da mesma classe de antimicrobiano¹². Dessa forma, resistência à claritromicina indica resistência aos outros macrolídeos, e resistência à levofloxacina sinaliza resistência às demais fluorquinolonas.

A resistência de HP aos antimicrobianos tem sido observada especialmente nos regimes com inclusão de claritromicina¹¹ – um dos principais agentes anti-HP – e, mais recentemente, das fluorquinolonas²⁵. Em relação à amoxicilina, tetraciclina, sais de bismuto e furazolidona, os índices de resistência são desprezíveis e mantêm-se estáveis ao longo dos anos^{12,17}. Os agentes nitroimidazólicos apresentam taxas de resistência primária em torno de 50% entre nós, dificultando seu emprego na prática diária^{26,27}.

A resistência aos antimicrobianos torna-se relevante quando sua presença determina falha terapêutica. Metanálise e revisão de estudos clínicos conduzidos entre 1999 e 2003 revelaram algumas conclusões acerca do uso da

claritromicina^{11,17}. 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, $p < 0,001$)¹¹. Tais achados confirmam a relevância clínica em reconhecer as cepas HP-resistentes à claritromicina na seleção do esquema terapêutico. A resistência às fluorquinolonas também tem sido relacionada à falha no tratamento de erradicação de HP²⁵.

Por esse motivo, tornam-se relevantes os estudos realizados para determinação da prevalência locorregional de resistência de HP aos antimicrobianos. Na Europa, um estudo multicêntrico abrangendo 18 países, avaliou, entre 2008 e 2009, 2204 pacientes (1893 adultos e 311 crianças) sem tratamento prévio para HP²⁸. A sensibilidade a claritromicina e fluorquinolonas foi avaliada através de cultura e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos e por teste molecular. Em adultos, a taxa média de resistência à claritromicina foi de 17,5% e à levofloxacina de 14,1%. Em crianças, a resistência à claritromicina foi superior a 30% e à levofloxacina de 2,5%. As diferenças entre adultos e crianças foram estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Nos países do norte europeu, foram encontrados os menores índices de resistência à claritromicina (inferiores a 10%) em relação aos demais países estudados, onde a resistência a esse antibiótico foi superior a 20%, com exceção de Alemanha (14,3%) e Espanha (14%). O estudo constatou aumento substancial na resistência à claritromicina (17,5%) em relação às taxas encontradas em 1998 (9,8%) na Europa. Revelou também a crescente resistência à levofloxacina, confirmando estudos anteriores sobre resistência às quinolonas na última década²⁹⁻³¹.

Nos Estados Unidos, os estudos microbiológicos de cultura e determinação da CIM revelaram resistência à claritromicina entre 10% e 15%, independentemente da região estudada³². No Canadá, uma revisão sistemática dos estudos com testes microbiológicos publicados antes do ano 2000, encontrou resistência inferior à claritromicina inferior a 4%³³. Na América Latina, uma revisão sistemática dos estudos conduzidos entre 1998 e 2011 demonstrou taxas de resistência primária à claritromicina de 12% e às fluorquinolonas de 15%³⁴.

No Brasil, existem poucos estudos regionais de avaliação da resistência primária de HP à claritromicina. No Recife, Lins *et al* encontraram resistência primária de 16,5% em estudo que empregou métodos microbiológicos e teste molecular³⁵. Na região de Bragança Paulista, Godoy *et al* revelaram índices semelhantes de resistência primária à claritromicina aos descritos em Recife (16%), utilizando cultura e determinação da CIM²⁷. Na cidade de São Paulo, também empregando cultura e determinação da CIM, Eisig *et al* observaram taxa de resistência primária à claritromicina de apenas 8%³⁶. Em Belo Horizonte, Prazeres-Magalhães *et al* encontraram resistência à claritromicina em 9,85% das amostras, utilizando teste fenotípico de cultura e determinação da CIM²⁶. Em 2013, Suzuki *et al* publicaram um grande estudo conduzido no Hospital das Clínicas de Marília-SP, que incluiu 1137 pacientes com diagnóstico de dispepsia funcional entre 2003 a 2006, e encontraram, pelo método molecular, índice de resistência à claritromicina de 2,46%³⁷.

No Rio Grande do Sul, Picoli *et al*, em estudo publicado em 2014, avaliaram 54 amostras colhidas entre 2011 e 2012, e encontraram resistência geral de 11%, utilizando método microbiológico e determinação da CIM³⁸. Esse trabalho, no entanto, não se limitou a avaliar a resistência primária de HP à claritromicina. O estudo avaliou a resistência na população geral, sem exclusão dos pacientes submetidos sem sucesso à terapia anti-HP.

Em nosso meio, a resistência de HP às fluorquinolonas foi avaliada por apenas dois estudos. Na cidade de São Paulo, a taxa de resistência primária foi estimada em 23%³⁶. No Rio Grande do Sul, a resistência foi de 5,5%, porém o estudo avaliou a resistência geral, não somente primária³⁸. Ambos os estudos empregaram métodos microbiológicos de cultura e determinação da CIM. Importante destacar que esses trabalhos incluíram pequeno número de amostras. Em São Paulo, os testes de suscetibilidade foram feitos em 39 pacientes e em Porto Alegre, em 54 amostras com cultura positiva para HP.

De modo geral, a investigação laboratorial da resistência de HP aos antimicrobianos pode ser realizada por dois diferentes métodos: testes fenotípicos e genotípicos¹¹. Os primeiros são representados por 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 HP e à necessidade de meios de cultura apropriados, na maioria das vezes indisponíveis¹¹.

Mais recentemente, métodos genotípicos (moleculares), especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido progressivamente utilizados na detecção da bactéria e identificação das mutações pontuais, principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos. Esses métodos são mais rápidos, podem ser realizados diretamente a partir de biópsias gástricas endoscópicas, tornando dispensável a cultura prévia do microrganismo, além de permitir a análise de cepas mistas, nem sempre possível com a cultura^{39,40}.

Os genes envolvidos nas mutações associadas à resistência de HP à claritromicina e fluorquinolonas foram eficientemente identificados. A claritromicina interage com a peptidil transferase no domínio V da sub unidade 23S rRNA, o que suprime a atividade dos ribossomos bacterianos e, conseqüentemente, inibe a síntese proteica¹⁹. Mutações pontuais nas posições 2146 e 2147 dos nucleotídeos do gene 23S rRNA, ao alterarem a conformação ribossômica, reduzem a afinidade com a claritromicina, acarretando resistência bacteriana à droga¹⁹. As três principais mutações descritas - A2146C, A2146G e A2147G, anteriormente descritas por A2142C, A2142G e A2143G⁴¹, – são responsáveis por mais de 90% dos casos de resistência à claritromicina observada nos países ocidentais¹¹. Recentemente, De Francesco *et al* identificaram outras mutações pontuais (A2115G, G2141A e A2144T)⁴², porém esses achados não foram confirmados por outros autores. A resistência às quinolonas ocorre por mutações pontuais na enzima DNA-girase, envolvida na replicação do DNA bacteriano¹⁹. A DNA-girase de HP compreende duas sub unidades (gyrA e gyrB) e as mutações são encontradas em uma região específica do gyrA, denominada região determinante da resistência à quinolona. Foram descritas 11 mutações compreendidas nos códons 86, 87, 88 e 91¹⁹. As mais frequentemente encontradas incidem nos códons 87 e 91^{19,43,44}, presentes em 80% a 100% dos casos de resistência⁴⁵⁻⁴⁷.

Em estudo italiano, De Francesco *et al* observaram que a resistência genotípica de HP à claritromicina reduziu a chance de sucesso da erradicação de 96,4%, obtida nas amostras sensíveis tanto ao método fenotípico quanto no genotípico, para 45% nas amostras resistentes pelos dois métodos⁴⁸.

Na Colômbia, Trespalacios relatou taxas muito baixas de erradicação de HP quando presentes as mutações no *gyrA* (7,7%), enquanto pacientes sem essa mutação alcançaram 88% de cura da infecção⁴⁹. Diante da concordância entre os métodos fenotípicos e genotípicos, a autora concluiu que as provas genotípicas podem auxiliar na seleção da terapia anti-HP, especialmente em locais com indisponibilidade de métodos de cultura e susceptibilidade.

Diferentes métodos genotípicos foram desenvolvidos para a detecção de mutações associadas à resistência¹⁹. Dentre esses métodos, merece destaque um novo teste molecular, já disponível comercialmente, validado em estudos europeus, e que combina PCR e hibridização, permitindo a rápida detecção da resistência bacteriana tanto à claritromicina quanto às fluorquinolonas^{41,50}. O teste, denominado GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Alemanha), é baseado na tecnologia da tira de DNA revestida com diferentes oligonucleotídeos específicos (probes), projetados para reagir (hibridizar) com os alelos e revelar sequências selvagens ou mutantes no espécime que está sendo testado. Pode ser aplicado em amostras obtidas diretamente de biópsias gástricas endoscópicas ou em isolados obtidos por cultura⁴¹. O custo é relativamente acessível, sendo de fácil execução em laboratórios de biologia molecular. Em estudo francês, que comparou esse teste molecular com o método fenotípico de cultura e teste de sensibilidade, constatou sensibilidade de 94% e especificidade de 99% para detecção de resistência à claritromicina; para resistência à levofloxacina, a sensibilidade encontrada foi de 87% e a especificidade de 98,5%⁴¹. 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. Ainda nesse estudo, em 33% dos casos, foram encontradas infecções mistas caracterizadas pela presença de mais de uma banda de hibridização em um mesmo paciente. Existiam combinações de cepas sensíveis

e resistentes ou duas sequências de diferentes alelos selvagens, achado que pode refletir coinfecção⁴¹.

Em 2011, um estudo realizado na Bélgica também comparou o desempenho do Genotype HelicoDR com o método de cultura e teste de sensibilidade de HP⁵⁰. Os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do GenoType HelicoDR foram, 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. A frequência de infecções mistas (33%) foi comparável à obtida no estudo francês⁴¹.

Mais recentemente, na Coreia do Sul, o método Genotype HelicoDR foi comparado à pesquisa fenotípica com determinação de CIM e posterior sequenciamento do DNA⁵¹. A sensibilidade e a especificidade do HelicoDR em determinar as mutações no gen 23s foram de 94,9% e 87%, respectivamente, e nas mutações do gyrA de 98,2% e 80%. No entanto, quando comparado à determinação da CIM, a sensibilidade e a especificidade do HelicoDR em determinar a resistência à claritromicina foi de 55% e 80%, respectivamente, e na resistência às fluorquinolonas de 74,4% e 70%. Os autores concluíram que o método é útil em detectar as mutações, mas apresenta limitação para a prática clínica em determinar a resistência bacteriana. A baixa sensibilidade de Genotype HelicoDR em detectar a resistência à claritromicina no estudo sul-coreano deveu-se à pequena proporção de amostras resistentes por mutações A2146G ou A2147G, diferentemente do padrão descrito nos países ocidentais, em que essas mutações estão presentes em mais de 90% dos casos de resistência^{11,19}. Estudos feitos no Japão também encontraram menor prevalência de mutações no gen 23S dentre as amostras claritromicina-resistentes, em taxas similares às encontradas no estudo sul-coreano (55%)⁵². Os autores sugerem que outros mecanismos de resistência sem relação com mutações pontuais no gen 23S, como a metilação de RNA, possam estar envolvidos em maior proporção na Coreia do Sul do que nos países ocidentais. Outra hipótese para explicar a baixa proporção de mutações A2142G ou A2143G nesse estudo é o possível viés de seleção, já que os pacientes foram recrutados em centros terciários do país.

No Brasil, os estudos realizados mostraram o mesmo padrão de distribuição das mutações descritas no mundo ocidental^{26,35,37}. As mutações mais frequentemente encontradas nos casos de resistência de HP à claritromicina também foram A2147G, variando de 58% a 71,4%, e A2146G, com variação entre 15% a 28,6%. Combinadas, tais mutações estavam presentes em até 90% dos casos resistentes²⁶. Até o momento, inexistem estudos nacionais sobre o padrão de distribuição das mutações do gen *gyrA*.

No trabalho francês de Cambau *et al*, os autores encontraram, nas amostras resistentes à claritromicina, concordância de kappa de 0,96 entre método Genotype HelicoDR e a genotipagem por PCR em tempo real⁴¹, técnica ainda restrita a centros de pesquisa, não disponíveis comercialmente⁵³⁻⁵⁶.

Considerando o impacto da resistência primária de HP como fator de falência terapêutica nos regimes de erradicação, o IV Consenso de Maastricht recomendou o abandono da terapia tripla contendo claritromicina, sem teste prévio de susceptibilidade, em regiões com taxa de resistência a esse antimicrobiano superior a 15% a 20%⁴. As fluorquinolonas deveriam ser reservadas para os casos de retratamento ou empregadas nas regiões de alta resistência primária à claritromicina⁴. Todavia, o sucesso das quinolonas também diminui diante da resistência bacteriana. Portanto, o conhecimento da prevalência local da resistência de HP à claritromicina e às fluorquinolonas poderá orientar os clínicos na escolha dos tratamentos de erradicação de primeira e segunda linha.

Estudos moleculares realizados no Brasil demonstraram, em até 90% dos casos, a presença das mutações A2147G e A2146G nas amostras de HP resistentes à claritromicina, em distribuição semelhante à encontrada em outros países ocidentais. Tais mutações são passíveis de detecção pelo método Genotype HelicoDR, validado por estudos europeus que observaram resultados concordantes com os testes fenotípicos.

A utilização da metodologia molecular, em substituição ao método convencional de cultura do microrganismo, poderá constituir ferramenta diagnóstica factível, eficaz e de custo razoável para a detecção da resistência de HP.

2 - OBJETIVOS

Primários: avaliar a prevalência da resistência genotípica primária de HP à claritromicina e às fluorquinolonas no Brasil, em amostra por conveniência, através do teste molecular GenoType HelicoDR diretamente a partir de biópsias gástricas endoscópicas.

Secundários: avaliar a resistência bacteriana dupla a ambos os antimicrobianos testados; pesquisar a correlação entre sexo e idade e resistência bacteriana; descrever as mutações mais frequentemente encontradas; avaliar a ocorrência de heterogeneidade genotípica e heterorresistência de HP em nosso meio.

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - Características gerais do estudo

Trata-se de estudo multicêntrico, cujo centro coordenador é o Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (Belo Horizonte). As coletas das amostras foram realizadas nos seguintes centros: Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (Belo Horizonte), Hospital das Clínicas da UFRGS (Porto Alegre), Hospital Geral Roberto Santos (Salvador), Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da UFAL (Maceió), Hospital das Clínicas da UFG (Goiânia) e Fundação Hospital Adriano Jorge (Manaus). As coletas em Belo Horizonte ocorreram entre novembro de 2012 e março de 2015 e nos demais centros, entre maio de 2013 e março de 2015.

As análises moleculares foram realizadas nos Laboratórios de Pesquisa do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG.

3.2 – Cálculo do tamanho da amostra

A fórmula para cálculo do tamanho da amostra nesse tipo de estudo é⁵⁷:

$$N = \frac{\sigma^2 \cdot p \cdot q}{e^2}$$

Em que N é o tamanho da amostra, σ ao quadrado é o nível de confiança escolhido expresso em desvio-padrão, p é o percentual em que o fenômeno foi observado, q é (1- p) e "e" é o erro máximo permitido.

Essa fórmula é utilizada para populações infinitas, superiores a 100.000 elementos, como no presente trabalho.

Considerando o nível de confiança de 95%, teremos σ de 1,96.

A resistência primária à claritromicina em nosso meio foi estimada em 14%, representando a média encontrada nos estudos de Belo Horizonte²⁶ (2002), Bragança Paulista²⁷ (2003), Recife³⁵ (2010), São Paulo³⁶ (2011). À época do cálculo do tamanho da amostra, os estudos de Marília³⁷ (2013) e Porto Alegre³⁸ (2014) ainda não haviam sido publicados.

A resistência primária de HP à levofloxacina foi baseada no único estudo em nosso meio à época do início do projeto que havia encontrado 23% de resistência na cidade de São Paulo³⁵.

Foram feitas simulações com preenchimento da fórmula supracitada de diferentes níveis de "e" (erro máximo permitido) para a resistência às fluorquinolonas antes de estabelecer o tamanho da amostra (tabela 1).

TABELA 1 - Determinação do número de amostras conforme variações no erro máximo permitido (variável e) na pesquisa de resistência de HP à claritromicina e às fluoroquinolonas

	Claritromicina	Fluoroquinolonas	Fluoroquinolonas	Fluoroquinolonas
σ	95% = 1,96	95% = 1,96	95% = 1,96	95% = 1,96
p	14% = 0,14	23% = 0,23	23% = 0,23	23% = 0,23
q (1 - p)	86% = 0,86	77% = 0,77	77% = 0,77	77% = 0,77
e	3% = 0,03	5% = 0,05	4% = 0,04	3% = 0,03
N	514	272	425	756

N = tamanho da amostra; σ = nível de confiança (em desvio-padrão); p = percentual de observação do fenômeno; q = 1- p; e = erro máximo permitido

Definido o nível de confiança de 95%, verifica-se que 514 amostras atendem aos cálculos tanto para estudo da resistência primária de *HP* à claritromicina, quanto à levofloxacina. Com essa amostragem, a análise da resistência à claritromicina admitirá erro máximo de 3% e, para a resistência às fluoroquinolonas, o erro será inferior a 4%.

3.3 – Plano de coleta

Segundo o mais recente censo brasileiro, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010⁵⁸, a população brasileira está distribuída conforme a tabela 2.

TABELA 2 - Distribuição populacional pelas regiões do Brasil, segundo o Instituto

Brasileiro de Geografia e Estatística (censo 2010⁵⁸)		
Regiões do país	População	% da população em relação ao país
Norte	15.865.678	8%
Nordeste	53.078.137	28%
Centro-Oeste	14.050.340	7%
Sudeste	80.353.724	43%
Sul	27.384.815	14%
Brasil	190.732.694	100%

Para refletir a composição relativa de cada região do país, o planejamento na coleta das amostras de conveniência procurou aproximar-se da distribuição populacional, conforme a tabela 3.

TABELA 3 – Distribuição da coleta das amostras de conveniência conforme a distribuição da população nas regiões do país

Regiões do país	Proporção populacional	Número de amostras a serem coletas por região
Norte	8%	41
Nordeste	28%	144
Centro-Oeste	7%	36
Sudeste	43%	221
Sul	14%	72
Brasil	100%	514

Em cada região do país foi selecionado um centro pesquisador para as coletas endoscópicas, com exceção do Nordeste, representado por Maceió e Salvador, devido ao grande número de amostras na região e ao atraso nas coletas em Salvador por quebra dos aparelhos de endoscopia do hospital participante.

Em cada centro, os pacientes foram selecionados entre aqueles que compareciam ao setor de propedêutica para a realização do exame de endoscopia

digestiva alta e com indicação de pesquisa de HP por solicitação do médico assistente para diferentes situações clínicas.

O estudo utilizou amostra de conveniência (não probabilística) selecionada em seis centros de endoscopia do Brasil, respeitados os critérios de inclusão e exclusão.

3.3.1 - Critérios de inclusão:

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

3.3.2 - Critérios de exclusão:

- Pacientes já previamente tratados para HP;
- 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.

3.4 - Procedimentos

3.4.1 – Teste sorológico rápido, endoscopia digestiva alta e biópsias gástricas

Um teste sorológico rápido (Abon Biopharm, Hangzhou, China) para detecção da infecção por HP foi realizado imediatamente antes da endoscopia digestiva alta (EDA), usando sangue capilar obtido por micropunção digital. Esse teste sorológico, recentemente validado por nosso grupo, mostrou especificidade e valor preditivo positivo elevados para a identificação de HP em área com alta prevalência da bactéria⁵⁹. Os pacientes com teste sorológico positivo e concordantes em participar do estudo foram submetidos à EDA com realização de teste de urease e exame histopatológico, conforme pedido do médico assistente, e coleta adicional de dois fragmentos do antro e dois do corpo gástrico, na 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 em prazo máximo de 15 segundos 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.

As amostras coletadas em Belo Horizonte, após conservadas em geladeira a 4°C durante 24 horas, eram pesadas e congeladas a - 80°C, até realização das análises moleculares. O material coletado nos outros centros era conservado em geladeira a 4°C até a data de envio ao laboratório do IAG do HC/UFGM, no prazo máximo de 15 dias. Essas amostras eram transportadas por via postal em caixa de isopor com gelo seco para proteção e estabilidade da temperatura interna do recipiente. Uma vez recebidas pelo laboratório, eram pesadas e mantidas a - 80°C, até a etapa do procedimento molecular, realizado no laboratório de pesquisa do IAG do HC-UFGM.

3.4.2 - Teste molecular

O teste genético empregado, GenoType HelicoDR (Hain Lifescience, Alemanha) consiste em três etapas. A primeira, representada pela extração do DNA

das biópsias gástricas, utiliza o teste QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Benelux, Holanda), previamente validado para essa extração (no ANEXO I estão detalhados todos os procedimentos do 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 HP 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).

Durante o desenvolvimento do presente estudo, as primeiras amostras coletadas em Belo Horizonte foram analisadas e utilizadas para implantação e padronização do método GenoType HelicoDR em nosso meio, constituindo objeto de dissertação de mestrado recentemente aprovada⁶⁰. Nessa etapa dos trabalhos, para confirmar a qualidade da reação de amplificação, as amostras foram submetidas à corrida de eletroforese em gel de agarose a 2%, que separou as moléculas amplificadas de acordo com seu comprimento: 145 bp, correspondentes ao gene *gyrA* e 100 bp, referentes ao gene 23S RNA. A corrida de eletroforese confirmou, assim, a amplificação do material pelos *primers* biotinilados do kit GenoType HelicoDR. (FIGURA 1).

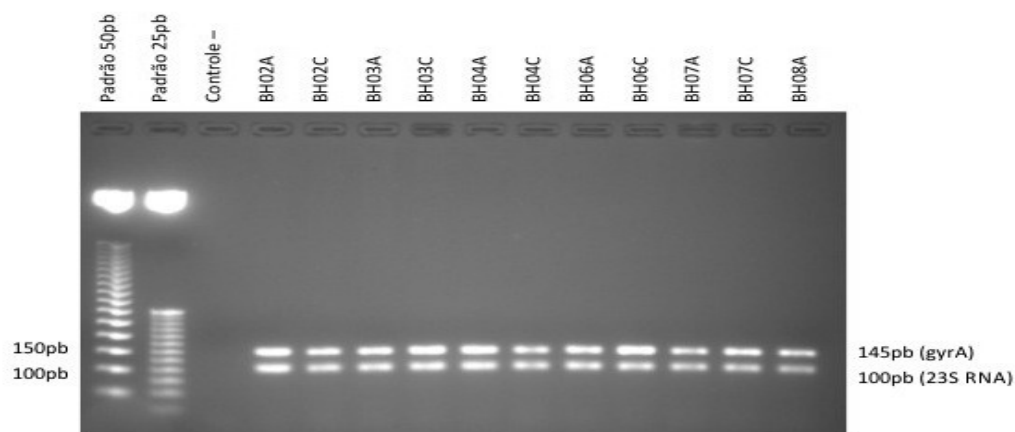


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose 2% que confirmou a presença dos produtos da amplificação (100 bp: 23S RNA; 145 bp *gyrA*).

No ANEXO II, estão pormenorizadas as técnicas da PCR e da corrida de eletroforese.

Após a realização da PCR, o procedimento é concluído com a execução da hibridização reversa (metodologia descrita no ANEXO III). A hibridização ocorre sobre tiras de DNA previamente revestidas com diferentes oligonucleotídeos específicos (*probes*). 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 às 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 foi calculada, A FIGURA 2 ilustra um exemplo de resistência à claritromicina pela ocorrência de mutação do gene 23S na posição A2147G (MUT 3).

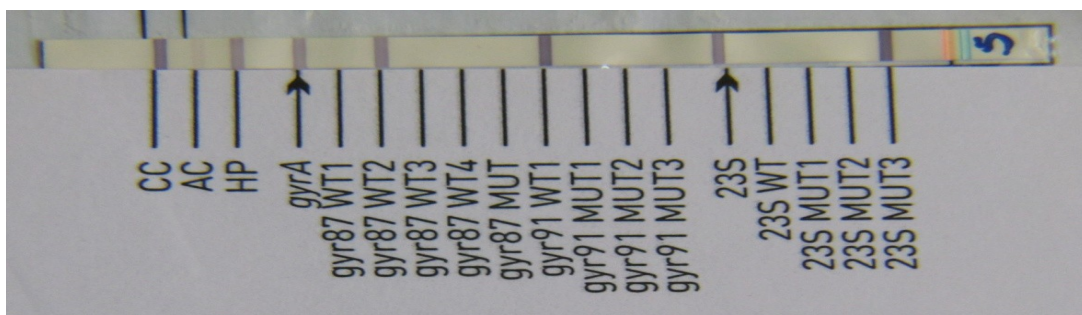


FIGURA 2 - Tira de DNA do teste GenoType HelicoDR evidenciando resistência à claritromicina pela positividade da banda MUT 3 do gene 23S.

As mutações no gene *gyrA* relacionam-se à ocorrência de resistência às fluorquinolonas e ocorrem principalmente nos códons 87 e 91. Devido ao polimorfismo do códon 87 (nucleotídeos 259, 260 e 261), os probes na fita de DNA do método GenoType HelicoDR incluem 04 tipos selvagens nesse códon, correspondentes às combinações de bases AAC, AAT, ACC, ACT⁴¹. Essas sequências selvagens indicam a inclusão do aminoácido asparagina na etapa da síntese proteica. A banda mutante *gyr87* MUT da fita de DNA sinaliza a presença dos nucleotídeos AAA no espécime testado, mutação conhecida por N87K, a mais comumente encontrada no códon 87 mutante^{41,61}. Essa mutação acarreta a substituição de asparagina por lisina. São descritas outras mutações no códon 87, como a chamada T87I (substituição pontual de citosina por timina no nucleotídeo 260 – C260T) e N87I (substituição pontual de adenina por timina no nucleotídeo 260 – A260T), apesar de não constarem na fita do teste Genotype HelicoDR por serem menos frequentemente observadas no estudo que originou o método⁴¹. A banda *gyr91* WT (wild-type ou tipo selvagem) da fita de DNA corresponde à sequência selvagem denominada D91, composta pelos nucleotídeos GAT, que determinam a inclusão de um ácido aspártico na etapa da tradução proteica. As bandas MUT1, MUT2 e MUT3 no códon 91 correspondem aos mutantes D91N (sequência AAT com substituição de ácido aspártico por asparagina), D91G (sequência GGT com substituição de ácido aspártico por glicina) e D91Y (sequência TAT com substituição de ácido aspártico por tirosina), respectivamente⁶². A FIGURA 3 ilustra um exemplo

de resistência às fluorquinolonas pela ocorrência de mutação do gene *gyrA* no códon 87 (mutação N87K).

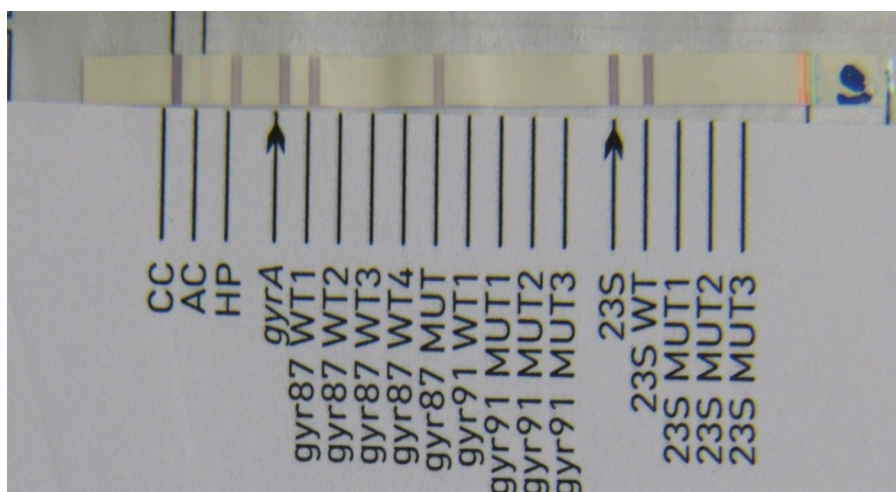


FIGURA 3 - Exemplo de resistência às fluorquinolonas pela positividade da banda MUT no códon 87 do gene *gyrA*.

Mutações sem correspondência nos probes da fita do GenoType HelicoDR podem ser identificadas. Nesses casos, apesar de identificar o gen *gyrA*, o teste não reconhece *locus* selvagens ou mutantes nas bandas relacionadas aos códons 87 e 91, como demonstrado na FIGURA 4. Na maioria desses casos, estão presentes mutações nos códons 86, 87 (distinta da N87K) ou 88⁴¹. O teste, portanto, pode detectar um espectro de mutações e não somente aquelas especificadas na fita de DNA. Também no códon 91 foram descritas outras mutações que não constam nos probes da fita do HelicoDR, como a mutação D91H⁶¹.

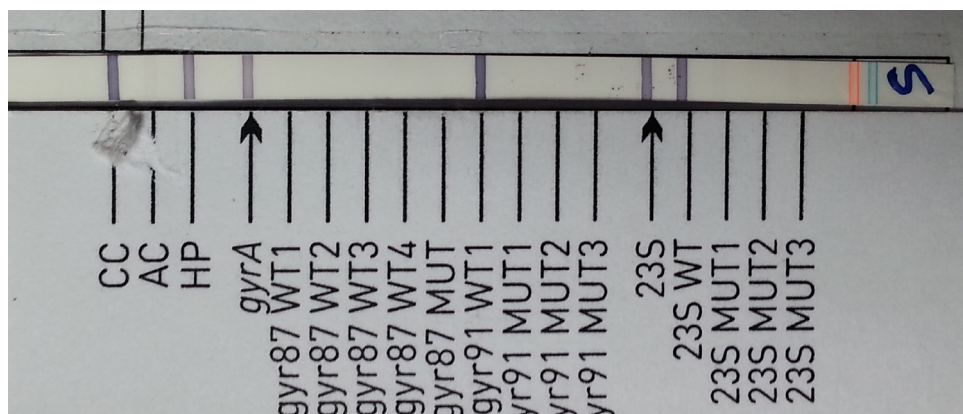


FIGURA 4 - Exemplo de resistência de HP às fluorquinolonas por mutação não especificada pelo teste; a banda do gen *gyrA* está presente, assim como a banda do *gyr91*WT; ausência de bandas selvagens ou bandas mutantes no códon 87.

O surgimento de bandas múltiplas dentro de um mesmo códon indica a amplificação de, pelo menos, dois alelos durante a PCR e podem corresponder a cepas heterogêneas de HP com diferentes alelos selvagens, heterorresistência nos casos de um alelo selvagem e outro mutante, ou infecção por mais de uma cepa. Nesses casos, o teste expressa a coexistência de banda selvagem e outra mutante em um mesmo códon, ou duas diferentes bandas selvagens ou duas mutações dentro do mesmo códon (FIGURA 5).

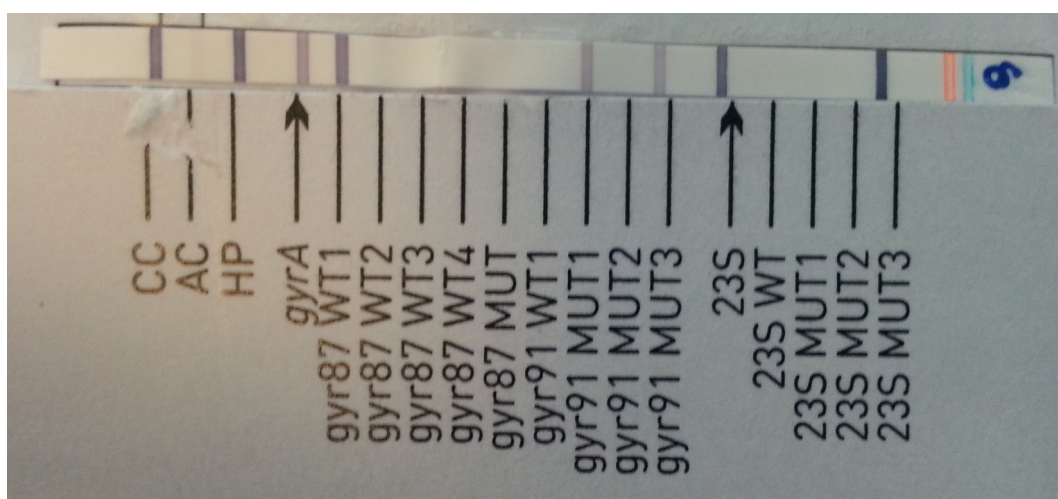


FIGURA 5 – Fita de DNA mostra a heterogeneidade de HP pela presença de mais de uma mutação no códon 91: presença das bandas *gyr91* MUT1 e *gyr91* MUT 3.

Feitas as análises das tiras de DNA para identificar a frequência de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos. Nos casos mutantes, foram registradas as mutações mais comuns, assim como o percentual de mutações não identificadas pelo teste. Os casos de cepas mistas foram registrados para estudo da frequência.

3.5 - Análise estatística

Foram empregadas técnicas de estatística descritiva, incluindo medidas de tendência central e variabilidade. Para avaliar a associação entre a resistência aos antimicrobianos e sexo foi utilizado o teste Exato de Fisher. Na associação entre resistência bacteriana e idade, utilizou-se o teste T-Student. Na comparação dos resultados de resistência entre as regiões foi realizado o teste Exato de Fisher. O *odds ratio* e intervalo de confiança de 95% foram usados como estimativas de risco e reconhecida a significância estatística se $p < 0.05$. Para os cálculos estatísticos, foi utilizada a versão 22.0 do programa SPSS (Statistical Package for the Social Science).

3.6 - Aspectos éticos

O estudo atendeu aos 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 IV) e pelos comitês de ética em pesquisa de cada um dos demais centros de coleta, devidamente registrados na plataforma Brasil (nº 05004712.0.1001.5149).

4 - RESULTADOS

Todas as amostras foram colhidas e encaminhadas ao laboratório de pesquisa do IAG do HC/UFG. Nos centros de Belo Horizonte, Manaus e Porto Alegre, pelo grande volume do serviço de endoscopia e facilidade de inclusão de pacientes, foram coletadas amostras adicionais àquelas originalmente previstas para serem usadas em caso de resultado negativo de HP pelo método molecular, evidenciando falha da triagem sorológica.

Concluída a etapa da coleta, a divisão por região encontra-se conforme a tabela 4.

TABELA 4 – Previsão inicial e coletas realizadas nos centros de pesquisa de cada região do país

Regiões do Brasil	Previsão inicial	Centros de coleta por regiões do Brasil	Coletas realizadas por centro
Norte	41	Manaus	42
Nordeste	144	Salvador	18
		Maceió	124
Centro-Oeste	36	Goiânia	36
Sudeste	221	Belo Horizonte	225
Sul	72	Porto Alegre	74
Total	514		519

Do total de 519 amostras, foram excluídas 29, sendo 21 por resultado negativo de HP ao método de hibridização (2 em Salvador, 1 em Maceió, 8 em Belo Horizonte, 5 em Manaus e 5 em Goiânia) e 8 casos por ausência de banda *gyrA* na fita de DNA (05 casos em Goiânia, 01 em Manaus, 01 em Maceió e 01 em Porto Alegre).

Com as exclusões, foram analisadas 490 amostras. A distribuição por sexo e idade (média; mínima e máxima) por centro encontram-se na tabela 5.

TABELA 5 – Distribuição por sexo (percentual de sexo feminino) e idade (média; mínima e máxima) dos pacientes por centro de coleta

Região	Centros de coleta	Distribuição por sexo (% sexo feminino)	Distribuição por idade (média, mínima e máxima)
Norte	Manaus	22 F / 14 M	41,4
(total: 36)	(total: 36)	(61,1%)	(21-71)
Nordeste	Salvador	5 F / 11 M	50,3
	(total: 16)	(31,2%)	(31-73)
	Maceió	84 F / 38 M	36,0
	(total: 122)	(68,8%)	(18-75)
(total: 138)		89 F / 49 M	37,7
		(64,5%)	(18-75)
Centro-Oeste	Goiânia	13 F / 13 M	41,3
(total: 26)	(total: 26)	(50%)	(21-65)
Sudeste	Belo Horizonte	145 F / 72 M	40,6
(total: 217)	(total: 217)	(66,8%)	(19-76)
Sul	Porto Alegre	45 F / 28 M	58
(total: 73)	(total:73)	(61,6%)	(23-79)
Brasil		314 F / 176 M	42,4
(total: 490)		(64,1%)	(18-79)

F = feminino; M = masculino

Em 124 pacientes (25,3%), foram observadas mais de uma banda de hibridização nos gens pesquisados, sendo 61 no 23S, 74 sobre o gyrA, e 11 em ambos os genes, caracterizando cepas heterogêneas.

A tabela 6 mostra a distribuição das cepas heterogêneas de HP entre os centros de coleta.

TABELA 6 - Distribuição das cepas heterogêneas de HP com percentual de ocorrência dentre as amostras de cada centro

Região	Centros de coleta	Heterogeneidade no gen 23S	Heterogeneidade no gen gyrA	Heterogeneidade em ambos os genes
Norte	Manaus	6	3	-
(total: 36)	(total: 36)	(16,6%)	(8,3%)	
Nordeste	Salvador	- -	2	-
	(total: 16)			
	Maceió	17	15	3
	(total: 122)			
(total: 138)		17	17	3
		(12,3%)	(12,3%)	(2,1%)
Centro-Oeste	Goiânia	3	4	1
(total: 26)	(total: 26)	(11,5%)	(15,4%)	(3,8%)
Sudeste	Belo Horizonte	29	28	3
(total: 217)	(total: 217)	(13,3%)	(12,9%)	(1,4%)
Sul	Porto Alegre	6	22	4
(total: 73)	(total: 73)	(8,2%)	(30,1%)	(5,4%)
Brasil		61	74	11
(total: 490)		(12,4%)	(15,1%)	(2,2%)

No total, a resistência de HP aos antimicrobianos foi registrada em 128/490 pacientes (26,1%). Em 21 pacientes, existiam mutações nos dois genes. A tabela 7 resume os resultados da hibridização e o perfil de resistência em cada centro de coleta.

TABELA 7 – Resultado do perfil de resistência de HP aos antimicrobianos pelo método Genotype HelicoDR em amostra de conveniência no Brasil, por região de coleta

Região	Centro de coleta	Resist CLA	Resist FLQ	Resist Dupla
Norte (total: 36)	Manaus	6 (16,6%)	1 (2,7%)	1 (2,7%)
Nordeste (total: 138)	Salvador (total: 16)	Salvador: -	Salvador: 4	Salvador: -
	Maceió (total: 122)	Maceió: 20	Maceió: 15	Maceió: 4
		20 (14,5%)	19 (13,8%)	4 (2,9%)
Centro-Oeste (total: 26)	Goiânia	5 (19,2%)	4 (15,4%)	2 (7,6%)
Sudeste (total: 217)	Belo Horizonte	38 (17,5%)	30 (13,8%)	10 (4,6%)
Sul (total: 73)	Porto Alegre	14 (19,1%)	12 (16,4%)	4 (5,5%)
		83	66	21
Brasil		(16,9%)	(13,5%)	(4,3%)

A análise univariada (TABELA 8) revelou maior prevalência de resistência à claritromicina em mulheres do que em homens, com diferença estatisticamente significativa (OR 2,291; IC 95%: 1,310 – 4,007; p=0,003). Na resistência às

fluorquinolonas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição entre os sexos ($p=0,073$).

TABELA 8 - Distribuição da resistência e suscetibilidade à claritromicina e às fluorquinolonas conforme sexo e idade dos pacientes

	Resistência à claritromicina			Resistência às fluorquinolonas		
	Neg	Pos	Valor <i>p</i>	Neg	Pos	Valor <i>p</i>
Sexo						
Feminino	79,3%	20,7%	0,003*	84,4%	15,6%	0,073*
Masculino	89,8%	10,2%		90,3%	9,7%	
Total	83,1%	16,9%		86,5%	13,5%	
Idade						
Média	42,8	42,4	0,796**	44,7	42,1	0,176**
Desvio padrão	14,7	14,3		14,4	14,3	

Neg = negativo; Pos = positivo; * pelo teste Exato de Fischer; ** pelo teste T de Student

Em relação à idade, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à média, desvio-padrão e mediana entre os pacientes com cepas sensíveis e resistentes à claritromicina ($p=0,796$) e às fluorquinolonas ($p=0,176$).

Apesar de não ter sido objetivo do trabalho, considerando o desenho do estudo, o cálculo de tamanho de amostra e as amostras de conveniência, a análise estatística não encontrou diferenças entre os centros de coleta quanto às proporções de resistência e susceptibilidade de HP ($p > 0,05$). Comparados os resultados das regiões Sul-Sudeste (Porto Alegre e Belo Horizonte) com Norte-

Nordeste (Manaus, Maceió e Salvador), também não se observaram diferenças estatisticamente significativas quanto às taxas de resistência e susceptibilidade de HP.

O perfil de resistência foi detalhado nos casos de heterogeneidade de HP. Dentre os 11 casos de heterogeneidade envolvendo ambos os genes (23S e gyrA), todos eram resistentes a claritromicina. Já que não existem polimorfismos no gen 23S selvagem (WT), a heterogeneidade nesse gen traduz necessariamente a presença de um mutante. A resistência à fluorquinolona foi encontrada em 7/11 dessas amostras com heterogeneidade em ambos os genes. Analisados os 61 casos de heterogeneidade exclusivamente no gen 23S, todos (100%) eram resistentes a claritromicina e 13/61 (21,3%), às fluorquinolonas. Nas 74 amostras com bandas múltiplas exclusivamente no gyrA, 18/74 (24,3%) eram resistentes a claritromicina e 32/74 (43,2%) a fluorquinolonas.

Dentre as 83 amostras resistentes a claritromicina, 62/83 (74,7%) exibiam heterogeneidade no gen 23S, 48/83 (57,8%) no gyr A e 11/83 (13,2%) em ambos os genes. Considerando as 66 amostras resistentes a fluorquinolonas, 46/66 (69,7%) apresentaram heterogeneidade no gyrA, 15/66 (22,7%) no gen 23S e 7 (10,6%) em ambos os genes.

A heterorresistência (banda selvagem e banda mutante no mesmo códon avaliado) foi encontrada em 61/83 (73,5%) das amostras resistentes a claritromicina e em 34/66 (51,5%) das amostras resistentes a fluorquinolonas.

Em 25 pacientes, foram encontradas mutações não especificadas pelo método Genotype HelicoDR, representando 37,9% (25/66) das amostras resistentes às fluorquinolonas. Houve ausência das banda selvagem e mutante no códon 87 em 19 pacientes, no códon 91 em 08 casos e ambos os códons em 02 casos. Feita a análise por centro de coleta, 03 amostras eram oriundas de Porto Alegre, 01 de Salvador, 07 de Maceió, 13 de Belo Horizonte e 1 de Goiânia. Em seis pacientes, havia resistência tanto à claritromicina, quanto às fluorquinolonas, mas o gen envolvido na mutação não especificada foi apenas o gyrA.

A tabela 9 detalha as mutações encontradas no gen 23S em cada região de coleta.

TABELA 9 - Perfil das mutações no gen 23S em cada centro de coleta no Brasil

Região	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Brasil
Centro	Manaus	Salvador	Maceió	Goiânia	BH	Porto Alegre
Mutação						
Não espec*	-	-	-	-	-	-
MUT1	-	-	3	2	8	14
MUT2	-	-	1	-	1	3
MUT3	6	-	18	5	32	75
MUT2 + MUT3	-	-	1	-	1	2
MUT1 + MUT3	-	-	1	2	3	6
MUT1 + MUT2 + MUT3	-	-	-	-	-	1
Total de mutações	6	-	24	9	45	101

*: Mutação não especificada pelo método Genotype HelicoDR, BH: Belo Horizonte.

A tabela 10 apresenta a distribuição das mutações no gen *gyrA* por região de coleta.

TABELA 10 - Perfil das mutações no gen *gyrA* em cada centro de coleta no Brasil

Região		Norte	Nordeste		Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Brasil
Centro		Manaus	Salvador	Maceió	Goiânia	BH	Porto Alegre	
87	Total	1	2	8	1	14	4	30
mutante								
	Não espec*	-	1	5	1	10	2	19
	Gyr87 MUT	1	1	3	-	4	2	11
91	Total	-	3	8	2	20	10	43
mutante								
	Não espec *	-	-	2	-	4	2	8
	MUT1	-	3	4	2	9	5	23
	MUT2	-	-	2	-	7	3	12
	MUT3	-	1	-	1	4	3	9
MUT1 + MUT3		-	1	-	1	-	2	4
MUT1 + MUT2		-	-	-	-	3	1	4
MUT1+MUT2+MUT3						1		1
Códons		-	1	1	-	3	2	7
87 + 91								
mutantes								
Total de mutações		1	5	16	3	34	14	73

*: Mutação não especificada pelo método Genotype HelicoDR; BH: Belo Horizonte.

5 – DISCUSSÃO

Os testes fenotípicos de cultura do *HP* e determinação da CIM dos antibióticos enfrentam por razões logísticas dificuldades de realização rotineira na prática diária. Por isso, métodos moleculares validados e acurados tornam-se ferramentas valiosas na avaliação da resistência aos antimicrobianos^{41,50,63}. Foi utilizado 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 método já está disponível comercialmente em alguns países pelo custo aproximado de 45 dólares americanos por paciente, contabilizando-se apenas os gastos com materiais, e os resultados podem ser obtidos em dois dias. 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, que passa a receber regularmente as biópsias endoscópicas coletadas em cada cidade participante, desde que armazenadas em solução de RNeasy® e mantidas refrigeradas a 4° C por até 15 dias.

Durante o desenvolvimento desse trabalho, na fase de padronização da metodologia, foi feita a corrida em gel de agarose para confirmar a amplificação do material pelos primers do kit. Os resultados na agarose confirmaram a banda positiva de controle de amplificação nas fitas de DNA.

Outra banda de interesse é a de detecção molecular da presença de HP. A especificidade dessa banda foi avaliada em testes que utilizaram DNA extraído de 20 outras espécies de *Helicobacter*⁴¹. Embora a hibridização tenha ocorrido em alguns probes, principalmente os relacionados ao gen 23S, em nenhuma das outras espécies de *Helicobacter* houve hibridização no probe de controle para HP, com exceção de *Helicobacter acinonychis*, incapaz de causar a infecção em seres humanos.

Foram excluídas 29 amostras, perfazendo 5,6% do total coletado. Em 21 amostras (4%) não houve detecção de HP, sugerindo resultado falso-positivo da

triagem com o teste sorológico rápido. Em oito amostras (1,5%), houve ausência de detecção do gen *gyrA*, sobretudo em Goiânia, impedindo o prosseguimento da análise das fitas. Nesses casos, apesar da ausência da banda *gyrA*, houve surgimento das bandas de controle de amplificação, conjugação e HP, o que sugere tratar-se de uma nova mutação não identificada pelo método empregado. A ausência do *gyrA* e das bandas selvagem ou mutante nos códons 87 e 91 impediu a leitura do teste nesses 08 casos, que foram excluídos da análise final. O pequeno quantitativo de amostras excluídas (5,6%) não comprometeu o objetivo do estudo.

Em geral, as amostras por conveniência apresentam limitações na extrapolação dos dados para a população geral por representarem amostras não-probabilísticas⁶⁴. Na área da saúde, entretanto, as amostras por conveniência são comumente utilizadas e muitas vezes constituem a única maneira de estudar determinado problema⁶⁵. Considerando o universo da população brasileira, a amostra por conveniência nesse estudo tornou exequível a avaliação em âmbito nacional, dentro do prazo proposto e com recursos limitados. Para tentar reduzir o viés de seleção, foi feita a distribuição proporcional das amostras pelas regiões do país e selecionados serviços públicos de referência de endoscopia digestiva alta nas cidades participantes.

No Brasil, foi encontrada resistência genotípica primária média de HP à claritromicina de 16,9% e às fluorquinolonas de 13,5%. Os resultados são comparáveis às taxas de resistência primária à claritromicina encontradas na Argentina (14%) e Colômbia (18%) e mais elevadas que a encontrada em estudo de metanálise na América Latina (12%)³⁴. A resistência às fluorquinolonas encontrada em nosso trabalho (13,5%) é semelhante à encontrada na América Latina (15%), embora a maioria dos estudos incluídos na metanálise latinoamericana tenha empregado a metodologia fenotípica de cultura. Não constituiu objetivo desse trabalho comparar as proporções de resistência e susceptibilidade de HP nas diversas regiões do país, o que implicaria outro desenho de estudo. No entanto, a análise comparada dos resultados entre os centros não revelou diferenças estatisticamente significativas nas taxas de resistência de HP entre as regiões estudadas. Na região Norte, as baixas taxas de resistência encontradas podem ser

justificadas pelo reduzido número de amostras coletadas nesse centro. Outros estudos poderão avaliar as diferenças regionais na resistência de HP no Brasil.

A heterogeneidade das cepas foi observada em 25,3% de nossas amostras, ao passo que Cambau *et al* encontraram 33% na França, semelhante à taxa descrita por Deyi *et al* na Bélgica^{41,50}. Tais achados podem representar cepas heterogêneas de HP (um alelo selvagem e outro mutante) ou infecção por mais de uma cepa (infecções mistas). Noguchi *et al*, utilizando PCR e sequenciamento de DNA, observaram maior falha terapêutica anti-HP nos pacientes infectados por cepas mistas de resistência e susceptibilidade à claritromicina⁶⁶.

No presente trabalho, foi observada heterorresistência, pela mistura de bandas selvagens e resistentes em um mesmo gen, em 61/83 casos resistentes à claritromicina (73,5%) e 34/66 das amostras resistentes às fluorquinolonas (51,5%). Em estudo italiano, a heterorresistência foi encontrada em 76,3% das amostras resistentes à claritromicina⁴⁸. Na Andaluzia, foi detectada heteroresistência à clarithromycin em 51,3% e às fluoroquinolones em 50% das amostras⁶⁷. No Recife, Lins *et al* encontraram resultados semelhantes aos nossos, com 77,8% de heteroresistência à clarithromicina³⁵, corroborando o achado desse perfil genotípico em nosso meio.

Elevadas taxas de resistência de HP às fluorquinolonas foram encontradas nas amostras com heterogeneidade no *gyrA* (43,2%), sugerindo a relação entre o polimorfismo revelado pelas múltiplas bandas e o desenvolvimento de mutações, como a representação espectral de cepas totalmente selvagens, que se tornam heterogêneas pela mutação em um único alelo e, por fim, homogeneamente mutantes, originando uma cepa distinta, que pode coexistir com a cepa original. Essa mistura de cepas parece se associar a maior densidade bacteriana e risco aumentado de metaplasia intestinal antral⁶⁸.

De Francesco *et al* compararam o método genotípico por PCR em tempo real com o método fenotípico de cultura e determinação de CIM na pesquisa à resistência de HP à claritromicina na Itália⁴⁸. Os autores encontraram diferenças de 30% entre os dois métodos, que foram atribuídas a alterações genotípicas sem expressão no fenótipo, resistência fenotípica por mutações pontuais não

pesquisadas, ou outros mecanismos genéticos responsáveis pela resistência bacteriana, como bombas de efluxo associadas ao gen *hefA*²³ e metilação de RNA²⁴. Porém, a discordância observada ocorreu principalmente nas amostras heterorresistentes (misto de resistência e susceptibilidade na mesma amostra). Excluídas as amostras com heterorressistência, a concordância entre os dois métodos foi de 91,3%. As diferenças encontradas entre nosso trabalho e aqueles que utilizaram métodos fenotípicos de cultura e determinação de MIC podem estar associadas à elevada heterorresistência observada em nossas amostras. Recentemente, em Porto Alegre, Picoli *et al* encontraram 11% (6/54 amostras) de resistência geral à claritromicina, sem exclusão dos pacientes previamente submetidos, sem sucesso, a tratamento anti-HP. Foi utilizado o método fenotípico de cultura e determinação da CIM³⁸. Nesse mesmo centro, o presente trabalho constatou 19,1% de resistência primária à claritromicina, com heterorresistência em 10/14 amostras resistentes à claritromicina (71%). Considerando que ambos os trabalhos coletaram amostras no mesmo centro, a semelhança no tamanho da amostra (54 amostras no estudo de Picoli *et al* e 73 amostras em nossa pesquisa), e a proximidade da época da coleta, as diferenças na resistência à claritromicina entre os dois trabalhos podem ser atribuídas à heterorresistência local (71%), principal responsável pela discordância entre os métodos genotípicos e fenotípicos, segundo De Francesco *et al*⁴⁸. Dentre as seis amostras resistentes à claritromicina, Picoli *et al* observaram três amostras com maior perfil de resistência (MIC acima de 256 µg/mL), sugerindo resistência secundária por utilização prévia de macrolídeo nesses pacientes. Com a exclusão dessas amostras, a resistência primária à claritromicina em Porto Alegre, pelo método fenotípico, seria de 5,8% (3/51 amostras). Com a exclusão das cepas heterorresistentes à claritromicina que coletamos em Porto Alegre, encontramos 6,3% de resistência primária local (4/63), índice semelhante à taxa corrigida do estudo de Picoli, o que reforça o papel da heterorresistência nas diferenças metodológicas.

Utilizando o método fenotípico de cultura e determinação de MIC, a resistência primária de HP à claritromicina encontrada em Belo Horizonte foi de 9,9% (2002)²⁶, em Bragança Paulista de 16% (2003)²⁷ e na cidade de São Paulo foi 8% (2011)³⁶. O presente trabalho, empregando o método genotípico, encontrou

17,5% de resistência à claritromicina em Belo Horizonte. Além da diferença metodológica, a taxa mais elevada encontrada por nós pode ser atribuída à elevação da resistência ao longo do período compreendido entre 2002 e 2013, como descrito por Prazeres-Magalhães *et al* que observaram resistência de 4.4% em 1996, 7.6% em 1997, 10.0% em 1998, 12.1% in 1999 e 19.05% em 2000²⁶.

Em Marília, os autores encontraram resistência à claritromicina muito reduzida (2,5%), em 12/488 das amostras analisadas por PCR e concluíram que a taxa local apresenta índices semelhantes aos descritos em países desenvolvidos³⁷. No entanto, esses resultados divergem substancialmente de outros trabalhos realizados em cidades da mesma região, como Bragança Paulista (16%)²⁷ e a cidade de São Paulo (8%)³⁶, que, diferentemente do trabalho realizado em Marília, empregaram testes fenotípicos de cultura e determinação de MIC.

Quanto à resistência às fluorquinolonas, Eisig *et al*³⁶ encontraram taxa de 23% na cidade de São Paulo e Picoli *et al*³⁸, 5,5% em Porto Alegre. Ambos os trabalhos empregaram método fenotípico de cultura de determinação de MIC. Em Belo Horizonte, representante da região Sudeste em nosso trabalho, encontramos 13,8% de resistência às fluorquinolonas e 16,4% em Porto Alegre. As diferenças podem ser atribuídas ao tamanho da amostra e à diferença na metodologia.

No Recife, em 2010, empregando método genotípico, Lins *et al* encontraram 16% de resistência primária à claritromicina³⁵. No somatório das amostras de Salvador e Maceió, encontramos 14,5% de resistência à claritromicina, taxa muito semelhante à descrita no Recife, o que reforça a hipótese de que as variações na taxa de resistência primária encontrada no Brasil devem-se às diferenças metodológicas entre os trabalhos.

O presente trabalho constatou maior prevalência de resistência primária à claritromicina nas mulheres em relação aos homens, com diferença estatisticamente significativa. Esse achado também foi relatado por outros autores^{63,69}. Na Itália, durante um período de 15 anos, foi observado aumento de três vezes na resistência primária de HP à claritromicina entre as mulheres, enquanto nos homens a resistência se manteve estável⁷⁰. Especula-se que a resistência cruzada pelo uso prévio dos macrolídeos possa ter relação com a maior resistência de HP à

claritromicina entre as mulheres, já que a população feminina em geral consome mais antibióticos do que a masculina⁷¹.

Em nosso estudo, nas amostras resistentes à claritromicina, houve predomínio da mutação A2147G (90,3%). Esse perfil de predominância das cepas mutantes se assemelha ao encontrado por Cambau *et al* que registraram, dentre as cepas resistentes à claritromicina, 83,5% da mutação A2147G⁴¹. Na Bélgica, a mutação A2147G esteve presente em 80% dos casos de resistência a claritromicina⁵⁰. Na resistência às fluorquinolonas, as mutações mais frequentemente encontradas em nosso meio foram aquelas não especificadas pelo método (37,9%), seguidas da D91N (34,9%). Na França, também predominaram as mutações não especificadas (31,6%), seguidas da mutação D91N (28,3%)⁴¹. No trabalho belga, houve predomínio da mutação N87K (54%), seguida do tipo D91N (33%)⁵⁰, diferentemente do padrão encontrado no Brasil.

No trabalho de Lins *et al*, no Recife, a mutação A2147G foi a mais observada nos casos de resistência à claritromicina (71,4%), seguida da mutação A2146G (28,6%)³⁵. O estudo pernambucano incluiu 27 amostras resistentes. Na região de Marília, Suzuki *et al*, embora com amostragem restrita a apenas 12 casos resistentes, também observaram o predomínio da mutação A2147G (58%) dentre as amostras resistentes à claritromicina³⁷. A mutação A2146G esteve presente em 25% dos casos resistentes. No estudo realizado em Belo Horizonte em 2002, 90% das amostras resistentes à claritromicina apresentavam mutações no gen 23S, sendo 60% de mutações A2147G, 15% de A2146G e 15% de ambas²⁶. Os resultados encontrados no presente trabalho reforçam as conclusões das pesquisas regionais realizadas no Brasil que encontraram predomínio da mutação A2147G dentre as amostras de HP resistentes à claritromicina.

A presença da mutação A2147G parece ser a principal preditora de falha terapêutica nos regimes à base de claritromicina, justamente a mutação que predominou em nossa amostragem. De Francesco *et al* obtiveram menores taxas de erradicação de HP (30,7%) nas cepas com a mutação A2147G do que as observadas quando estão presentes as mutações A2146G e A2146C (57,1%)⁴⁸. Resultados de análises de regressão logística relacionaram a falência terapêutica

anti-HP à presença da mutação A2147G ou à resistência fenotípica com determinação de CIM⁴⁸. Outros trabalhos também têm sugerido que as mutações A2146C e A2146G exercem papel secundário na resistência fenotípica, com menor importância clínica^{56,72-74}. Da mesma forma, a mutação N87K, observada em 16,6% das amostras resistentes às fluorquinolonas em nosso estudo, parece conferir maior resistência às fluorquinolonas do que a D91N⁷⁵, encontrada em 34,9%.

No Brasil, até o momento, não existiam estudos moleculares com informações sobre o perfil de distribuição das mutações no gen *gyrA*. Na Colômbia, Trespacios empregou a técnica de PCR e sequenciamento de DNA para estudar a prevalência primária da resistência de HP às fluorquinolonas⁴⁹. As principais mutações implicadas foram N87I, presente em 47,2%, D91N, com frequência de 30,1%, e N87K, em 13,2%. A proporção de mutação N87K encontrada na Colômbia (13,2%) foi semelhante à encontrada no presente trabalho (11/66; 16,6%). A mutação D91N, observada no Brasil em 34,9% (23/66) das amostras também se assemelha à registrada na Colômbia (30,1%).

De maneira geral, as principais mutações associadas às fluorquinolonas são D91N (29,7%), seguida de D91G (29,1%) e N87K (14,9%)⁶². No entanto, as mutações associadas à resistência são transmitidas localmente, determinando diferenças de prevalência de uma região para outra. Garcia *et al* encontraram diferenças estatisticamente significativas nas mutações do *gyrA* na França⁶². Enquanto em Paris, a frequência da mutação T87I foi de 43,3%, em Poitiers ocorreu em 14,9% ($p = 0.002$). Em nosso trabalho, 37,9% das amostras resistentes às fluorquinolonas apresentaram mutações não reconhecidas pelo método (ausência de bandas selvagens e mutantes nos códon 87 e 91), podendo representar a mutação N87I, encontrada na Colômbia em 47,2% das amostras⁴⁹. Esse resultado reforça as observações sobre as variações regionais no padrão das mutações do gen *gyrA*, sendo necessários novos estudos para mapeamento das mutações regionais.

No presente trabalho, nos casos de resistência às fluorquinolonas, observamos 21,9% de mutações múltiplas (códon 87 e 91 ou mais de uma mutação no códon 91) e nos casos de resistência a claritromicina, 8,9% de múltiplas

mutações. Os resultados reproduzem os achados de Deyi *et al* que registraram, respectivamente, 25% e 12%⁵⁰. Em nosso trabalho, a resistência dupla a ambos os antibióticos foi incomum (4,3%), como encontrado na África do Sul (2,5%)⁶³, Hong Kong (3,7%)⁷⁶, Itália (1,6%)⁷⁷ e Espanha (4%)⁶⁷.

Apesar de não haver correlação absoluta entre a resistência de HP identificada aos métodos fenotípicos e genotípicos e a falha terapêutica observada na prática clínica⁴⁷, o insucesso do tratamento relaciona-se sobretudo à resistência antimicrobiana por mutações pontuais nos genes 23S e *gyrA*¹⁹, ainda que outros mecanismos genéticos tenham sido descritos^{23,24}. Mesmo que as mutações não apresentem expressão fenotípica, possivelmente superestimando as taxas de resistência observadas na prática^{48,49}, a presença do gen mutante sinaliza o desenvolvimento de resistência molecular que poderá comprometer os resultados do tratamento. Nesse cenário, a disseminação do emprego de metodologia acessível aqui descrita, ao fornecer dados precisos quanto à prevalência de resistência antimicrobiana tanto a nível individual quanto à determinada população, pelo menos naqueles antibióticos cuja resistência é causada por mutações conhecidas, ganha relevância na seleção dos esquemas anti-HP e obtenção de maior chance de cura da infecção. Além disso, constitui ferramenta robusta no monitoramento do desenvolvimento de resistência antimicrobiana na população.

6 – CONCLUSÕES

Foi observada resistência genotípica primária de HP à claritromicina de 16,9% e às fluorquinolonas de 13,5%, sendo respectivamente 16,6% e 2,7% na região Norte, 14,5% e 13,7% na região Nordeste, 19,2% e 15,4% na região Centro-Oeste, 17,5% e 13,8% na região Sudeste e 19,1% e 16,4% na região Sul.

Resistência bacteriana dupla a ambos aos antimicrobianos é incomum, sendo em média de 4,3% no Brasil e 2,7% na região Norte, 2,9% na região Nordeste, 7,6% na região Centro-Oeste, 4,6% na região Sudeste e 5,5% na região Sul.

Foi encontrado maior associação de resistência à claritromicina entre as mulheres em relação aos homens. Esse padrão não foi observado na resistência às fluorquinolonas.

Em relação à idade, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à média, desvio-padrão e mediana entre os pacientes com cepas sensíveis e resistentes.

Nos casos de resistência à claritromicina houve predomínio da mutação A2147G. Nas amostras resistentes às fluorquinolonas, a principal mutação não pôde ser especificada pelo teste, sugerindo a participação de outras mutações não previstas nas fitas do teste.

A heterogeneidade de bandas foi observada em 25,3% das amostras. A heterorresistência ocorreu em 73,5% das amostras resistentes à claritromicina e 51,5% das resistentes à fluorquinolonas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chey WD, Wong BC, Practice Parameters Committee of the American College of G. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol. 2007;102(8):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(6):772-81.
3. Coelho LG, Maguinilk I, Zaterka S, Parente JM, do Carmo Friche Passos M, Moraes-Filho JP. 3rd Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori*. Arq Gastroenterol. 2013;50(2):81-96.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut. 2012;61(5):646-64.
5. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, et al. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(10):1587-600.
6. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 2007;20(2):280-322.
7. Unge P. Review of *Helicobacter pylori* eradication regimens. Scand J Gastroenterol Suppl. 1996;215:74-81.
8. Buzas GM, Jozan J. [Eradication of *Helicobacter pylori* infection in Europe: a meta-analysis based on congress abstracts, 1997-2002]. Orv Hetil. 2004;145(40):2035-41.
9. Gisbert JP, Gonzalez L, Calvet X, Garcia N, Lopez T, Roque M, et al. Proton pump inhibitor, clarithromycin and either amoxycillin or nitroimidazole: a meta-analysis of eradication of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther. 2000;14(10):1319-28.
10. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut. 2010;59(8):1143-53.
11. Megraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut. 2004;53(9):1374-84.

12. Debets-Ossenkopp YJ, Herscheid AJ, Pot RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Vandenbroucke-Grauls CM. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxycillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43(4):511-5.
13. Gisbert JP, Morena F. Systematic review and meta-analysis: levofloxacin-based rescue regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(1):35-44.
14. Saad RJ, Schoenfeld P, Kim HM, Chey WD. Levofloxacin-based triple therapy versus bismuth-based quadruple therapy for persistent *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(3):488-96.
15. Perna F, Zullo A, Ricci C, Hassan C, Morini S, Vaira D. Levofloxacin-based triple therapy for *Helicobacter pylori* re-treatment: role of bacterial resistance. *Dig Liver Dis.* 2007;39(11):1001-5.
16. Sanches B, Coelho L, Moretzsohn L, Vieira G, Jr. Failure of *Helicobacter pylori* treatment after regimes containing clarithromycin: new practical therapeutic options. *Helicobacter.* 2008;13(6):572-6.
17. 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(3):343-57.
18. Megraud F, Lamouliatte H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(11):1333-43.
19. Megraud F, Benejat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. Molecular approaches to identify *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(3):577-96.
20. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. *J Gastrointest Liver Dis.* 2011;20(3):299-304.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [homepage na internet]. Resistência microbiana - Mecanismos e impacto clínico [acesso em 26 jun 2015]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm.
22. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48 Suppl 1:87-102.

23. Zhang Z, Liu ZQ, Zheng PY, Tang FA, Yang PC. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol. 2010;16(10):1279-84.
24. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(7):1267-72.
25. 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(4):1538-40.
26. Prazeres Magalhaes P, De Magalhaes Queiroz DM, Campos Barbosa DV, Aguiar Rocha G, Nogueira Mendes E, Santos A, et al. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(6):2021-3.
27. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L, Miranda Mde C, Mendonca S, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterol. 2003;3:20.
28. 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(1):34-42.
29. 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(11):820-3.
30. Glocker E, Stueger HP, Kist M. Quinolone resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Germany. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(1):346-9.
31. Oleastro M, Cabral J, Ramalho PM, Lemos PS, Paixao E, Benoliel J, 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(10):2308-11.
32. 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(6):1088-94.
33. Fallone CA. Epidemiology of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Canada. Can J Gastroenterol. 2000;14(10):879-82.

34. 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(4):485-95.
35. Lins AK, Lima RA, Magalhaes M. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Recife, Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(4):379-82.
36. Eisig JN, Silva FM, Barbuti RC, Navarro-Rodriguez T, Moraes-Filho JP, Pedrazzoli Jr J. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. *Arq Gastroenterol*. 2011;48(4):261-4.
37. Suzuki RB, Lopes RA, da Camara Lopes GA, Hung Ho T, Speranca MA. Low *Helicobacter pylori* primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of Sao Paulo, Brazil. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:164.
38. Picoli SU, Mazzoleni LE, Fernandez 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(3):197-200.
39. Gunn MC, Stephens JC, Stewart JD, Rathbone BJ. Detection and typing of the virulence determinants *cagA* and *vacA* of *Helicobacter pylori* directly from biopsy DNA: are in vitro strains representative of in vivo strains? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10(8):683-7.
40. Park CY, Kwak M, Gutierrez O, Graham DY, Yamaoka Y. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3336-8.
41. 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(11):3600-7.
42. De Francesco V, Zullo A, Giorgio F, Saracino I, Zaccaro C, Hassan C, et al. Change of point mutations in *Helicobacter pylori* rRNA associated with clarithromycin resistance in Italy. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 3):453-7.
43. 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(1):107-11.

44. 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 fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(12):3942-4.
45. 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(5):441-5.
46. 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(5):965-7.
47. 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(2):303-5.
48. De Francesco V, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F, Perna F, Hassan C, et al. Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(2):327-32.
49. Trespalcios Rangel AA. Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos e implicaciones en las terapias de erradicación. Bogotá. Tesis [Doctorado en Ciencias Biológicas] – Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana; 2011.
50. Miendje Deyi VY, Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y, Bontems P, Lepage P, et al. Practical use of GenoType(R) HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(4):557-60.
51. Lee JW, Kim N, Nam RH, Park JH, Choi YJ, Kim JM, et al. GenoType HelicoDR test in the determination of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(9):1058-67.
52. Yamade M, Sugimoto M, Uotani T, Nishino M, Kodaira C, Furuta T. Resistance of *Helicobacter pylori* to quinolones and clarithromycin assessed by genetic testing in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(9):1457-61.
53. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, 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(10):4573-7.
54. Chen S, 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(1):126-31.
55. Guimaraes N, Azevedo NF, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ. 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(9):3089-94.
56. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, 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(5):1500-4.
57. Levin J. Estatística Aplicada às Ciências Humanas. 2. ed. São Paulo: Harbra; 1987.
58. Estatística IBGE [homepage na internet]. Censo Demográfico 2010. [acesso em 15 mai 2015]. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default_sinopse.shtm.
59. Martins GMS, Sanches BSF, Moretzsohn LD, Coelho LGV. Rapid in-office *H. pylori* serologic test: an useful tool in areas with high *H. pylori* prevalence? [abstract]. *Helicobacter* 2013; 18(1): 120.
60. Martins GM, Sanches BSF, Moretzsohn LD, Lima KS, Cota BDC, Coelho LGV. Molecular detection of clarithromycin and fluoroquinolones resistance in *Helicobacter pylori* infection, directly applied to gastric biopsies, in an urban brazilian population. *Arq Gastroenterol*. 2016; 53(2):113-7.
61. Wueppenhorst N, Stueger HP, Kist M, Glocker EO. High secondary resistance to quinolones in German *Helicobacter pylori* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2013;68(7):1562-6.
62. Garcia M, Raymond J, Garnier M, Cremniter J, Burucoa C. Distribution of spontaneous gyrA mutations in 97 fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* isolates collected in France. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(1):550-1.
63. Tanih NF, Ndip RN. Molecular Detection of Antibiotic Resistance in South African Isolates of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Res Pract. 2013;259-65.
64. Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. Jornal Vascular Brasileiro. 2011;10:275-8.

65. Guimarães PRB. Métodos Quantitativos Estatísticos. 1 ed. Curitiba: IESDE Brasil; 2008.
66. Noguchi N, Rimbara E, Kato A, Tanaka A, Tokunaga K, Kawai T, et al. Detection of mixed clarithromycin-resistant and -susceptible *Helicobacter pylori* using nested PCR and direct sequencing of DNA extracted from faeces. J Med Microbiol. 2007;56(Pt 9):1174-80.
67. Navarro-Jarabo JM, Fernandez-Sanchez F, Fernandez-Moreno N, Hervás-Molina AJ, Casado-Caballero F, Puente-Gutierrez JJ, et al. Prevalence of Primary Resistance of *Helicobacter pylori* to Clarithromycin and Levofloxacin in Southern Spain. Digestion. 2015;92(2):78-82.
68. Sheu SM, Sheu BS, Lu CC, Yang HB, Wu JJ. Mixed infections of *Helicobacter pylori*: tissue tropism and histological significance. Clin Microbiol Infect. 2009;15(3):253-9.
69. De Francesco V, Giorgio F, Ierardi E, Zotti M, Neri M, Milano A, et al. Primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: the Multicentric Italian Clarithromycin Resistance Observational (MICRO) study. J Gastrointest Liver Dis. 2011;20(3):235-9.
70. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O, et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. J Antimicrob Chemother. 2007;59(4):783-5.
71. Nicolini P, Nascimento JW, Greco KV, de Menezes FG. Factors related to prescriptions of antibiotics in a public pharmacy in the Western region of the city of Sao Paulo. Cien Saude Colet. 2008;13 Suppl:689-96.
72. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Gut. 2002;50(3):285-9.
73. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG, et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. J Antimicrob Chemother. 1997;40(2):283-6.
74. Hwang TJ, Kim N, Kim HB, Lee BH, Nam RH, Park JH, et al. Change in antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea. J Clin Gastroenterol. 2010;44(8):536-43.
75. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: role of mutations at position 87 and 91 of GyrA on the level of

resistance and identification of a resistance conferring mutation in GyrB. *Helicobacter*. 2012;17(1):36-42.

76. Hung KH, Sheu BS, Chang WL, Wu HM, Liu CC, Wu JJ. Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter*. 2009;14(1):61-5.
77. Zullo A, Perna F, Hassan C, Ricci C, Saracino I, Morini S, et al. Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated in northern and central Italy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25(12):1429-34.

8 - ARTIGO SUBMETIDO A PERIÓDICO

Manuscript submission-ESPS Manuscript NO: 27171

submission@wjgnet.com <submission@wjgnet.com>
Para: bsquarcio@gmail.com

14 de maio de 2016 17:14

Dear Dr. Sanches,

Thank you for submitting your manuscript to our peer reviewed, online and open access journal; the details of your submission are listed below.

Journal: World Journal of Gastroenterology

ESPS Manuscript NO: 27171

Title: Detection of Helicobacter pylori resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: a national survey

Author Name: Bruno Squarcio Sanches

Received Date: 2016-05-15 04:14:20

You may track the progress of your manuscript(s) online through the Express Submission and Peer-review System (ESPS) by clicking on the following link: <http://www.wjgnet.com/esps/trackmanuscript.aspx> and inputting your registered e-mail: bsquarcio@gmail.com and user password: jair491 under the "Author Track Manuscripts" heading.

Please keep a copy of your manuscript when you submit it to the journal. It is not our practice to send the unaccepted manuscript(s) back, although we will issue a notice of the decision to publish to the concerned authors. All articles received are subject to peer review, which normally involves 3 experts in the relevant field who are external to the Baishideng Publishing Group (BPG) and invited to participate in the peer review process. The decision for acceptance is made only when at least 1 or 2 of the expert reviewers recommend the article for publication; otherwise, the article will be rejected. The peer reviewers are acknowledged at the end of each issue.

One of the primary tasks of the BPG is to publish high-quality original papers on a priority basis. For basic and clinical research papers that are based on research supported by important projects or foundations and are of great significance (garnering at least two Grade B classifications or above from the reviewers), the peer review, editing and publishing process will be completed within 4 to 8 weeks, with the publishing fees partially waived.

BPG practices an open access and peer review publishing model. Our goals are to maximize the benefits of peer review for our readers, authors, peer reviewers and editors by providing an open internet-based platform that supports the productive exchange of information regarding the research findings published in our journals, as well as presents the latest scientific knowledge to the public. Our journals cover a wide range of topics, including anesthesiology, biochemistry and molecular biology, cardiology, critical care medicine, dentistry and stomatology, dermatology, diabetes, experimental medicine, gastroenterology and hepatology, hematology, immunology, infectious diseases, medical genetics, medical imaging, methodology, nephrology, neurology, obstetrics and gynecology, oncology, ophthalmology, orthopedics, otorhinolaryngology, pediatrics, pharmacology, psychiatry, respirology, rheumatology, surgery, translational medicine, transplantation, urology and virology.

If you have any questions, please feel free to contact us via e-mail at: esps@wjgnet.com or online at the Help Desk: <http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx> or by telephone at: 0086-10-8538-1892.

Best regards,

Lian-Sheng Ma, President and Company Editor-in-Chief

Baishideng Publishing Group Inc

8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588-3144, USA

Telephone: [+1-925-223-8242](tel:+1-925-223-8242)

Fax: [+1-925-223-8243](tel:+1-925-223-8243)

E-mail: l.s.ma@wjgnet.com

Help desk: <http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx>

<http://www.wjgnet.com>

Name of Journal: *World Journal of Gastroenterology*

ESPS Manuscript NO: 27171

Manuscript Type: ORIGINAL ARTICLE

Observational Study

Detection of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: A national survey

Sanches BS *et al.* *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil

Bruno Squarcio Sanches, Gustavo Miranda Martins, Karine Lima, Bianca Cota, Luciana Dias Moretzsohn, Laercio Tenorio Ribeiro, Helenice P Breyer, Ismael Maguilnik, Aline Bessa Maia, Joffre Rezende-Filho, Ana Carolina Meira, Henrique Pinto, Edson Alves, Ramiro Mascarenhas, Raissa Passos, Julia Duarte de Souza, Osmar Reni Trindade, Luiz Gonzaga Coelho

Bruno Squarcio Sanches, Gustavo Miranda Martins, Karine Lima, Bianca Cota, Luciana Dias Moretzsohn, Ana Carolina Meira, Henrique Pinto, Edson Alves, Raissa Passos, Julia Duarte de Souza, Osmar Reni Trindade, Luiz Gonzaga Coelho, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil

Laercio Tenorio Ribeiro, Unigastro e Clínica Santa Fé, Maceió, Alagoas 57055-230, Brazil

Helenice Pankowski Breyer, Ismael Maguilnik, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil

Aline Bessa Maia, Fundação Hospital Adriano Jorge, Manaus 69065-001, Brazil

Joffre Rezende-Filho, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 74605-020, Brazil

Ramiro Mascarenhas, Hospital Geral Roberto Santos, Salvador 41180-780, Brazil

Author contributions: Sanches BS and Coelho LG contributed to the conception and design of the study; Martins GM, Moretzsohn LD, Ribeiro LT, Breyer HP, Maguilnik I, Maia AB, Rezende-Filho J, Mascarenhas R, Meira AC, Pinto HA, Alves EJ, and Trindade OR contributed to the collection of biopsies; Lima KS, Cota BD, Sanches BS, and Passos R performed the DNA extraction; Lima KS performed the DNA amplification; Cota BD and Souza JD performed the reverse hybridization; Sanches BS interpreted and analyzed the data; Sanches BS and Coelho LG wrote the paper.

Supported by Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Institutional review board statement: This study was approved by the Human Research Ethical Committee of the Federal University of Minas Gerais and the Ethical Committees of the other centers (Protocol in Brazil Platform nº 05004712.0.1001.5149), Brazil.

Informed consent statement: All the treatment procedures were performed after obtaining written informed consent from the patients.

Conflict-of-interest statement: The authors have no conflict of interest to declare.

Data sharing statement: No additional data are available.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Correspondence to: Luiz Gonzaga Vaz Coelho, PhD, Professor of Medicine, Department of Internal Medicine, Head of Alfa Institute of Gastroenterology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil. lcoelho22@gmail.com

Telephone: +55-31-32224641

Fax: +55-31-32262886

Abstract

AIM: To evaluate bacterial resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil using molecular methods.

METHODS: The primary antibiotic resistance rates of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) were determined from November 2012 to March 2015 in the Southern, South-Eastern, Northern, North-Eastern, and Central-Western regions of Brazil. Four hundred ninety *H. pylori* patients [66% female, mean age 43 years (range: 18-79)] who had never been previously treated for this infection were enrolled. All patients underwent gastroscopy with antrum and corpus biopsies and molecular testing using GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Germany). This test was performed to detect the presence of *H. pylori* and to identify point mutations in the genes responsible for clarithromycin and fluoroquinolone resistance. The molecular procedure was divided into three steps: DNA extraction from the biopsies, multiplex amplification, and reverse hybridization.

RESULTS: Clarithromycin resistance was found in 83 (16.9%) patients, and fluoroquinolone resistance was found in 66 (13.5%) patients. There was no statistical difference in resistance to either clarithromycin or fluoroquinolones ($P = 0.55$ and $P = 0.06$, respectively) among the different regions of Brazil. Dual resistance to clarithromycin and fluoroquinolones was found in 4.3% (21/490) of patients. The A2147G mutation was present in 90.4% (75/83), A2146G in 16.9% (14/83) and A2146C in 3.6% (3/83) of clarithromycin-resistant patients. In 10.8% (9/83) of clarithromycin-resistant samples, more than 01 mutation in the 23S rRNA gene was noticed. In fluoroquinolone-resistant samples, 37.9% (25/66) showed mutations not specified by the GenoType HelicoDR test. D91N mutation was observed in 34.8% (23/66), D91G in 18.1% (12/66),

N87K in 16.6% (11/66) and D91Y in 13.6% (9/66) of cases. Among fluoroquinolone-resistant samples, 37.9% (25/66) showed mutations not specified by the GenoType HelicoDR test.

CONCLUSION: The *H. pylori* clarithromycin resistance rate in Brazil is at the borderline (15%-20%) for applying the standard triple therapy. The fluoroquinolone resistance rate (13.5%) is equally concerning.

Key words: *Helicobacter pylori*; Microbial drug resistance; Clarithromycin; Fluoroquinolones; Molecular diagnostic techniques

© **The Author(s) 2016.** Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Antibiotic resistance is the main cause of failure in the treatment of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection. Using molecular methods, this study investigated bacterial resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in 490 adult patients recruited from five regions in Brazil. These patients had never been previously treated for *H. pylori* infection. Clarithromycin and fluoroquinolone resistance was found in 16.9% and 13.5% of patients, respectively. Resistance to both drugs was found in 4.3% of patients. The mean primary *H. pylori* clarithromycin resistance rate in Brazil is at the borderline for applying the standard triple therapy, and the primary fluoroquinolone resistance rate is concerning.

Sanches BS, Martins GM, Lima KS, Cota BD, Moretzsohn LD, Ribeiro LT, Breyer HP, Maguilnik I, Maia AB, Rezende-Filho J, Meira ACG, Pinto HA, Alves EJ, Mascarenhas R, Passos R, Souza JD, Trindade OR, Coelho LGV. Detection of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: A national survey. *World J Gastroenterol* 2016; In press

INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is the main etiologic agent of peptic ulcer and is recognized as the most important risk factor for adenocarcinoma and lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)^[1]. Triple therapy, in which a combination of two antibiotics (amoxicillin and clarithromycin) and a proton pump inhibitor (PPI) is administered for 7 to 14 days, has been demonstrated to be an effective *H. pylori* infection treatment in different meta-analyses and has been recommended in national and international consensus meetings^[2-5]. This regimen has, however, exhibited decreased effectiveness in recent years, with eradication rates lower than 80%, as reported in different studies^[6,7].

Although factors including the lack of compliance, lifestyle habits such as smoking, Cag-negative strains, CYP2C19 genetic polymorphisms, altered immunity, and elevated bacterial load may all contribute to therapy failure, the main factor that causes therapy failure is bacterial resistance, especially to clarithromycin, metronidazole, and fluoroquinolones^[8,9]. Similar to other bacterial species (*e.g.*, *Mycobacterium tuberculosis*), *H. pylori* acquires antibiotic resistance by chromosomal mutations, not by acquiring plasmids^[10]. Although drug efflux proteins can contribute to the natural insensitivity to antibiotics and emerging antibiotic resistance, the main mechanism that contributes to *H. pylori* resistance is vertically transmitted point mutations in the DNA^[9-12].

Clarithromycin interacts with the peptidyl transferase in domain V of the 23S rRNA subunit, an interaction that suppresses bacterial ribosome activity and inhibits protein synthesis^[9]. Point mutations at positions 2146 and 2147, formerly known as 2142 and 2143 (the numeration is from genome sequencing of GenBank NC000921 - J99 and NC000915 - HP 26695)^[13], of the 23S rRNA gene have been shown to lead to a modification in ribosome conformation, which consequently reduces clarithromycin affinity and leads to bacterial resistance to the drug^[9]. Three major point mutations in

the 23S rRNA gene have been described to be responsible for over 90% of clarithromycin resistance cases observed in occidental countries^[7]. These are A2146C (point mutation at position 2146 by substitution of adenine for cytosine), A2146G (point mutation at position 2146 by substitution of adenine for guanine), and A2147G (point mutation at position 2147 by substitution of adenine for guanine). Quinolone resistance on the other hand develops following point mutations in the DNA-gyrase enzyme involved in bacterial DNA replication^[9]. *H. pylori* DNA gyrase comprises two subunits (gyrA and gyrB), and the mutations are found in a specific region of the *gyrA* gene called the quinolone resistance-determining region. Eleven mutations have been described, and these occur in codons 86, 87, 88, and 91^[9]. The most frequently encountered mutations occur in codons 87 and 91^[9,14,15], and these have been shown to be present in 80% to 100% of antibiotic resistance cases^[16-18].

H. pylori antimicrobial resistance can be investigated in the laboratory by phenotypic and genotypic methods^[7]. Bacterial culture and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic are characteristics of the phenotypic method. In addition to providing a definite diagnosis of the infection, the phenotypic method also allows for drug sensitivity to be determined. Bacteria are, however, rarely cultured in medical practices due to the special care required in the transport of samples, the fastidious growth nature of *H. pylori*, and the need for appropriate culture media, which are most often unavailable^[7].

Genotypic methods such as PCR, on the other hand, are increasingly used for bacterial detection and identification of point mutations^[9]. European studies have recently validated a new molecular test that combines PCR and hybridization, allowing for the rapid detection of bacterial resistance to both clarithromycin and fluoroquinolones^[13,19]. This novel GenoType HelicoDR (Hain Life Science, Germany) test involves a DNA strip coated with different specific primers (probes) designed to hybridize with the wild-type allele or reveal mutant sequences^[13]. This method is faster

than the phenotypic method and can be performed directly from endoscopic gastric biopsies, making the prior culture of the microorganism unnecessary^[9].

Taking into consideration that primary resistance to *H. pylori* is a major factor for treatment failure in first-line *H. pylori* regimens, the Maastricht IV *H. pylori* Consensus Report recommends that the (PPI) clarithromycin-containing triple therapy, without prior susceptibility testing, should be abandoned when the clarithromycin resistance rate in the region is over 15-20%^[4]. Fluoroquinolones should be reserved for cases of retreatment or employed in high primary clarithromycin resistance areas^[4]. However, the success of quinolones also decreases when there is bacterial resistance. It is important for clinicians to know the local prevalences of *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones so that they can select the most appropriate *H. pylori* regime in first- and second-line eradication treatments. Therefore, the aim of this study was to assess the prevalence of primary *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in a large Brazilian population using the molecular GenoType HelicoDR test on gastric biopsy specimens.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A multicenter study including the Southern (Porto Alegre, RS, Brazil), South-Eastern (Belo Horizonte, MG, Brazil), Northern (Manaus, AM, Brazil), North-Eastern (Salvador, BA and Maceio, AL, Brazil), and Central-Western (Goiania, GO, Brazil) regions of Brazil was designed. The recruitment of participants was proportional to the populations of the regions. A common protocol was adopted after approval by the Human Research Ethical Committee at all participant centers, and written consent was obtained prior to entering the study. From November 2012 through March 2015, enrolled patients never previously treated for *H. pylori* infection were submitted to

diagnostic endoscopy and tested for *H. pylori* infection due to abdominal symptoms. All participants tested positive for *H. pylori* by a previously validated rapid serological test (Abon Biopharm, Hangzhou, China) performed immediately before the endoscopy^[20].

Endoscopy and gastric biopsies

Four gastric biopsies (two from the antrum and two from the corpus) were taken during the endoscopy and were immediately immersed in micro-tubes containing RNeasy® (Ambion, Cat. # AM7020, United States), a solution that promotes immediate RNA stabilization and protection, thereby minimizing the need to immediately process the tissue samples. The samples were kept in a refrigerator at 4 °C before they were sent to the central laboratory of the study in Belo Horizonte where they were weighed and then frozen at -80 °C until the molecular tests were performed.

Molecular diagnostic technique

The molecular test GenoType HelicoDR was designed to identify the mutations A2146C, A2146G, and A2147G in the 23S rRNA gene and N87K, D91N, D91G, and D91Y in the *gyrA* gene. The test was divided into three steps: DNA extraction from the biopsy samples using the validated QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Benelux, The Netherlands), multiplex amplification with biotinylated primers, and reverse hybridization using a specific incubator according to the manufacturer's instructions. The hybridization was performed on strips prepared at the Hain Lifescience factory that were coated with different specific oligonucleotides (DNA probes) using DNA strip technology.

Results regarding *H. pylori* detection and susceptibility to clarithromycin and fluoroquinolones were obtained by analyzing the positive and negative bands on the DNA strips. The most frequent mutations involved in resistance to the two antibiotics were also evaluated.

Statistical analyses

Descriptive statistics techniques, including central tendency and variability measures, were employed. The association between resistance/susceptibility to antimicrobials and the gender of the patients was evaluated using Fisher's Exact Test, and the association between resistance and age was evaluated, using Student's *t*-test. Resistance rates between regions were compared using Fisher's exact test. The odds ratios and 95% confidence intervals (CI) were used as risk estimates, and statistical significance was recognized at $P < 0.05$. The 22.0 version of IBM SPSS Statistics was used for the statistical calculations.

RESULTS

Five hundred nineteen patients were initially recruited for this study. Twenty-nine of them were subsequently excluded due to either the absence of *H. pylori* in the hybridization method (21 cases: 3 from the North-Eastern, 8 from the South-Eastern, 5 from the Northern, and 5 from the Central-Western regions) or the absence of a *gyrA* band (8 cases: 5 from the Central-Western, 1 from the Northern, 1 from the North-Eastern, and 1 from the Southern regions). The distribution of the remaining 490 patients according to gender, region, and age is shown in Table 1.

Clarithromycin and fluoroquinolone resistance were observed in 83 (16.9%; 95%CI: 13.7%-20.6%) and 66 (13.5%; 95%CI: 10.6%-16.8%) patients, respectively.

Among the different centers, the rates of resistance ranged from 14.5% to 19.2% for clarithromycin and from 2.7% to 16.4% for fluoroquinolones. The differences were however not statistically significant for either the resistance ratios or *H. pylori* susceptibility ($P = 0.55$ and $P = 0.06$, respectively). Table 2 shows the results of general antibiotics resistance in each evaluated region.

More than one hybridization band (characterizing heterogeneous strains) was observed in the genes of 124 patients (25.3%): 11 patients for both the 23S and *gyrA* genes, 61 patients for the 23S gene, and 74 patients for the *gyrA* gene.

Resistance to clarithromycin was statistically significantly higher in women than in men (OR = 2.3; 95%CI: 1.3–4.0; $p = 0.003$). No statistically significant differences in fluoroquinolones resistance were found in the distribution between genders ($p = 0.073$).

In relation to age, no statistically significant differences were identified between patients with strains sensitive and resistant to clarithromycin ($P = 0.796$) and to fluoroquinolones ($P = 0.176$).

Among the 83 clarithromycin-resistant samples, 74.7% (62/83) exhibited heterogeneity in the 23S rRNA gene, 57.8% (48/83) in the *gyrA* gene, and 13.2% (11/83) in both genes. Among the 66 fluoroquinolone-resistant samples, 69.7% (46/66) exhibited heterogeneity in the *gyrA* gene, 22.7% (15/66) in the 23S rRNA gene, and 10.6% (7/66) in both genes.

Heteroresistance (wild-type band and mutant band in the same studied codon) was identified in 73.5% (61/83) of the clarithromycin-resistant samples and in 51.5% (34/66) of the fluoroquinolone-resistant samples.

In 37.9% (25/66) of patients whose samples were resistant to fluoroquinolones, mutations that were not specified by the GenoType HelicoDR test were found. There

was an absence of both wild-type and mutant bands in codon 87 for 19 patients, as well as in codon 91 for 8 patients. Among these, 2 patients also exhibited the absence of bands in codon 87. After analyzing the above data by sampling region, 3 samples were from the South, 8 were from the North-Eastern, 13 were from the Southeast, and 1 was from the Central-Western. Six patients exhibited both clarithromycin and fluoroquinolone resistance. However, only the *gyrA* gene was involved in the non-specified mutation.

The most common mutation in the 23S rRNA gene was A2147G, present in 90.4% (75/83) of clarithromycin-resistant patients. The second most common mutation in the gene was A2146G, present in 16.9% (14/83) of mutations, and the third most common mutation was A2146C, present in 3.6% (3/83) clarithromycin-resistant patients (Table 3). In 10.8% (9/83) of clarithromycin-resistant samples, more than one mutation in the 23S rRNA gene was found, which might indicate cases of co-infection or two different mutations in the same strain. Among fluoroquinolone-resistant samples, 37.9% (25/66) showed mutations not specified by the GenoType HelicoDR test. The D91N mutation was observed in 34.8% (23/66) of cases, D91G in 18.1% (12/66), N87K in 16.6% (11/66), and D91Y in 13.6% (9/66). In 24.2% (16/66) of the resistant cases, there was more than one mutation involved; 13.6% (9/66) of resistant cases had more than one mutation in codon 91, and 10.6% (7/66) of cases had mutations in both codons 87 and 91 (Table 4).

Resistance to both antimicrobials in the same sample was found in 4.3% (21/490) of the cases. On the other hand, 73.9% (362/490) of the samples did not show resistance to any of the drugs tested.

DISCUSSION

Despite the knowledge accumulated regarding *H. pylori* infection, the therapeutic arsenal remains limited to a few drugs, and the eradication rates of the classic triple therapy have exhibited a downward trend in the Western world^[6,7,21]. Following proper adherence to the treatment, *H. pylori* resistance to antimicrobials is the main factor associated with treatment failure^[7]. For this reason, knowing the local profile of *H. pylori* resistance may help in the selection of antimicrobials to optimize treatment for eradication.

Because the phenotypic methods present logistical difficulties for use in routine daily practice, validated and accurate molecular methods have become valuable tools in the evaluation of resistance to antimicrobials^[13,21,22]. In this study, we used the easy to perform GenoType HelicoDR test. The equipment for carrying out this test is usually already available in molecular biology laboratories^[18]. Comparative studies carried out in different countries, including Brazil, reported agreement above 90% between the phenotypic and genotypic methods^[13,19,22-24].

This is the first study conducted in Brazil in which *H. pylori* genotypic resistance to clarithromycin and fluoroquinolones was evaluated in different regions of the country. The rate of resistance to clarithromycin found in our study (16.9%) is high but is still acceptable for the empirical use of clarithromycin-based regimens. The resistance rate to fluoroquinolones (13.5%) is also a concern for its use in empirical second-line regimens for eradicating *H. pylori*. The finding that women had a higher prevalence of primary resistance to clarithromycin in our study corroborates the values reported in other studies^[25,26]. There is speculation that cross-resistance caused by previous use of macrolides may be related to the higher *H. pylori* clarithromycin resistance rate among women, as women generally consume more antibiotics than men^[27]. Considering the high rates of metronidazole resistance observed in Brazil^[28,29] our findings suggest that the association of this agent with clarithromycin or fluoroquinolones could promote reduction in the *H. pylori* eradication rates.

Despite not being the objective of the study, considering the study design, sample size calculation, and convenience samples, the study found no statistically significant differences between the various collection centers regarding the resistance ratios and *H. pylori* susceptibility ($P > 0.05$) to clarithromycin and fluoroquinolones in the huge Brazilian territory. However, specially designed studies for this purpose are still required.

In Brazil, only unicentric studies have been conducted to evaluate the primary resistance to anti-*H. pylori* agents, with varying results. Primary resistance rates to clarithromycin have ranged from 8% to 16% in South-Eastern Brazil using phenotypic methods^[28,29]. A study carried out in North-Eastern Brazil reported a primary resistance rate of 16.5% using phenotypic and genotypic methods^[23]. The primary resistance rate to fluoroquinolones has ranged from 11% (genotypic method)^[30] to 23% (phenotypic method) in South-Eastern Brazil^[31]. The differences between the rates found in previous unicentric studies and in the present work may be attributed to differences in sample size, presence of heteroresistance^[32], and overall differences in the history of previous antimicrobial consumption in the studied regions^[33].

In clarithromycin-resistant samples, the A2147G mutation (90.35%) was prevalent, as was found in previous Brazilian studies^[23,28] and in studies in other countries, such as France (83.5%)^[13] and Belgium (80%)^[19]. Among the 13.5% (66/490) fluoroquinolone-resistant samples studied, 37.9% (25/66) presented a mutant codon that could not be identified by the GenoType HelicoDR method, and the D91N mutation was found in 34.8% (23/66) of samples.

Although there are no molecular studies with information on the distribution profile of *gyrA* gene mutations in Brazil, a recent Colombian study identified the following as major mutations: N87I (47.2%), D91N (30.1%), and N87K (13.2%)^[34]. It can be speculated that the 37.9% of fluoroquinolone-resistant samples that were not specified by the method used in this study may represent the N87I mutation, which was

predominant in the Colombian study and is not detected in the GenoType HelicoDR test. The proportions of the D91N and N87K mutations found in this study are similar to those observed in Colombia. Such findings reinforce the need for studies to investigate the regional variations in the mutation pattern of the *gyrA* gene. In samples with *gyrA* heterogeneity (mixture of wild-type and/or mutant bands), a high resistance rate (43.2%) was found, and it is likely that this polymorphism may represent different stages in the development of mutations^[35].

Our study also identified the occurrence of multiple mutations for fluoroquinolones and clarithromycin. We observed multiple mutations for fluoroquinolones in 21.9% of samples (codons 87 and 91 or more than one mutation in codon 91), which are essentially the result of a variety of point mutations in several loci of the *gyrA* gene. The presence of multiple mutations in the 23S rRNA gene for clarithromycin was found in 8.9% of the samples. Similar results were also reported in Belgium, where multiple mutations were found in 25% of samples for fluoroquinolones and 12% for clarithromycin^[19]. Finally, simultaneous resistance to both antibiotics was unusual (4.3%) in our study, similar to what was reported in South Africa (2.5%)^[22], Hong Kong (3.7%)^[36], Italy (1.6%)^[37], and Spain (4%)^[38].

In conclusion, the mean primary *H. pylori* clarithromycin resistance rate in Brazil is situated at the borderline (15%-20%) for applying the standard triple therapy. The primary fluoroquinolone resistance rate is also of growing concern. The genotypic method used is available, fast, and offers acceptable transportation conditions, and it can be used for continuous surveillance for the proper selection of drugs for anti-*H. pylori* therapy in different regions.

COMMENTS

Background

The therapeutic regimen anti- *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has exhibited a decreased effectiveness in recent years. *H. pylori* resistance to antimicrobial is the main factor associated with treatment failure. It is important for clinicians to know the local prevalences of *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones to select the most appropriate *H. pylori* regime in first- and second-line eradication treatments.

Research frontiers

The main mechanism that contributes to *H. pylori* resistance is vertically transmitted point mutations in the DNA. This study assessed the prevalence of primary *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in a large Brazilian population by using the molecular test.

Innovations and breakthrough

The genotypic method is faster than the phenotypic method and can be performed directly from endoscopic gastric biopsies, making the prior culture of the micro-organism unnecessary. The set-up for carrying out this test is usually already available in molecular biology laboratories.

Applications

The rate of resistance to clarithromycin discovered in our study (16.9%) indicates a high, but is still acceptable for the empirical use of clarithromycin-based regimens. Resistance to fluoroquinolone (13.5%) also reveals a concern for its use in empirical second-line regimens in eradicating *H. pylori*. The genotypic method used is achievable, fast, offers acceptable transportation conditions, and can be used as continuous

surveillance for the proper selection of drugs for anti-*H. pylori* therapy in different regions.

Peer-review

H. pylori treatment failure is due to resistance of many isolates to antibiotics used for eradication. Due to this it is important to know the local profile of *H. pylori* resistance, which may help to select optimal treatment. The methodology is sound and clear and the manuscript is well written. On the basis of the results this genotyping method used in this study could be recommended for the proper selection for anti-*H. pylori* therapy. This study is valuable from the practical point of view. It increases the knowledge about local *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones.

REFERENCES

- 1 **Chey WD**, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 1808-1825 [PMID: 17608775 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01393.x]
- 2 **Malfertheiner P**, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; **56**: 772-781 [PMID: 17170018 DOI: 10.1136/gut.2006.101634]
- 3 **Coelho LG**, Maguinilk I, Zaterka S, Parente JM, do Carmo Friche Passos M, Moraes-Filho JP. 3rd Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori*. *Arq Gastroenterol* 2013; **50**: [PMID: 23748591 DOI: 10.1590/S0004-28032013005000001]
- 4 **Malfertheiner P**, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; **61**: 646-664 [PMID: 22491499 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302084]
- 5 **Fock KM**, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, Lam SK, Xiao SD, Tan HJ, Wu CY, Jung HC, Hoang BH, Kachintorn U, Goh KL, Chiba T, Rani AA. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; **24**: 1587-1600 [PMID: 19788600 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.05982.x]
- 6 **Graham DY**, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 2010; **59**: 1143-1153 [PMID: 20525969 DOI: 10.1136/gut.2009.192757]
- 7 **Mégraud F**. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; **53**: 1374-1384 [PMID: 15306603 DOI: 10.1136/gut.2003.022111]

- 8 **Mégraud F**, Lamouliatte H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; **17**: 1333-1343 [PMID: 12786627 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2003.01592.x]
- 9 **Mégraud F**, Bénéjat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. Molecular Approaches to Identify *Helicobacter pylori* Antimicrobial Resistance. *Gastroenterol Clin North Am* 2015; **44**: 577-596 [PMID: 26314669 DOI: 10.1016/j.gtc.2015.05.002]
- 10 **Mégraud F**, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 280-322 [PMID: 17428887 DOI: 10.1128/CMR.00033-06]
- 11 **Zhang Z**, Liu ZQ, Zheng PY, Tang FA, Yang PC. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2010; **16**: 1279-1284 [PMID: 20222174 DOI: 10.3748/wjg.v16.i10.1279]
- 12 **Leclercq R**, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1267-1272 [PMID: 1929280 DOI: 10.1128/AAC.35.7.1267]
- 13 **Cambau E**, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy CJ, Delchier JC, Megraud F. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3600-3607 [PMID: 19759218 DOI: 10.1128/JCM.00744-09]
- 14 **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**: 107-111 [PMID: 7695290 DOI: 10.1128/AAC.39.1.107]
- 15 **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 fluoroquinolone re-

sistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3942-3944 [PMID: 14638505 DOI: 10.1128/AAC.47.12.3942-3944.2003]

16 **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**: 441-445 [PMID: 16961806 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2006.00436.x]

17 **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**: 965-967 [PMID: 16159928 DOI: 10.1093/jac/dki334]

18 **Nishizawa T**, Suzuki H, Umezawa A, Muraoka H, Iwasaki E, Masaoka T, Kobayashi I, Hibi T. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 303-305 [PMID: 17122023 DOI: 10.1128/JCM.01997-06]

19 **Miendje Deyi VY**, Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y, Bontems P, Lepage P, Reynders M. Practical use of GenoType® HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 557-560 [PMID: 21696906 DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.05.002]

20 **Martins GM**, Sanches BSF, Moretzsohn LD, Coelho LGV. Rapid in-office *H. pylori* serologic test: an useful tool in areas with high *H. pylori* prevalence? *Helicobacter* 2013; **18**: 120

21 **Lee JW**, Kim N, Nam RH, Park JH, Choi YJ, Kim JM, Kim JS, Jung HC. GenoType HelicoDR test in the determination of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea. *Scand J Gastroenterol* 2014; **49**: 1058-1067 [PMID: 24957849 DOI: 10.3109/00365521.2014.894117]

- 22 **Tanih NF**, Ndip RN. Molecular Detection of Antibiotic Resistance in South African Isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Res Pract* 2013; **2013**: 259457 [PMID: 23710166 DOI: 10.1155/2013/259457]
- 23 **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**: 379-382 [PMID: 21225149 DOI: 10.1590/S0004-28032010000400011]
- 24 **Garcia GT**, Aranda KR, Gonçalves ME, Cardoso SR, Iriya K, Silva NP, Scaletsky IC. High prevalence of clarithromycin resistance and *cagA*, *vacA*, *iceA2*, and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian children. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4266-4268 [PMID: 20826649 DOI: 10.1128/JCM.01034-10]
- 25 **De Francesco V**, Giorgio F, Ierardi E, Zotti M, Neri M, Milano A, Varasano V, Lizza F, Suraci E, Marmo R, Marone A, Manta R, Mirante VG, de Matthaeis M, Pedroni A, Manes G, Pallotta S, Usai P, Liggi M, Gatto G, Peri V, Sacco R, Bresci G, Monica F, Hassan C, Zullo A. Primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: the Multicentric Italian Clarithromycin Resistance Observational (MICRO) study. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; **20**: 235-239 [PMID: 21961089]
- 26 **De Francesco V**, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O, Stoppino G, Cea U, Pace A, Zotti M, Morini S, Panella C, Ierardi E. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 783-785 [PMID: 17329269 DOI: 10.1093/jac/dkm005]
- 27 **Nicolini P**, Nascimento JW, Greco KV, de Menezes FG. [Factors related to prescriptions of antibiotics in a public pharmacy in the Western region of the city of São Paulo]. *Cien Saude Colet* 2008; **13 Suppl**: 689-696 [PMID: 21936173 DOI: 10.1590/S1413-81232008000700018]

- 28 **Prazeres Magalhães P**, De Magalhães Queiroz DM, Campos Barbosa DV, Aguiar Rocha G, Nogueira Mendes E, Santos A, Valle Corrêa PR, Camargos Rocha AM, Martins Teixeira L, Affonso de Oliveira C. Helicobacter pylori primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2021-2023 [PMID: 12019131 DOI: 10.1128/AAC.46.6.2021-2023.2002]
- 29 **Godoy AP**, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L, Miranda Mde C, Mendonça S, Pedrazzoli J. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in Helicobacter pylori clinical isolates. *BMC Gastroenterol* 2003; **3**: 20 [PMID: 12911839 DOI: 10.1186/1471-230X-3-20]
- 30 **Martins GM**, Sanches BSF, Moretzsohn LD, Lima KS, Cota BDC, Coelho LGV. Molecular detection of clarithromycin and fluoroquinolones resistance in Helicobacter pylori infection, directly applied to gastric biopsies, in an urban brazilian population. *Arq Gastroenterol* 2016; In press.
- 31 **Eisig JN**, Silva FM, Barbuti RC, Navarro-Rodriguez T, Moraes-Filho JP, Pedrazzoli Jr J. Helicobacter pylori antibiotic resistance in Brazil: clarithromycin is still a good option. *Arq Gastroenterol* 2011; **48**: 261-264 [PMID: 22147131 DOI: 10.1590/S0004-28032011000400008]
- 32 **De Francesco V**, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F, Perna F, Hassan C, Morini S, Panella C, Vaira D. Phenotypic and genotypic Helicobacter pylori clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 327-332 [PMID: 20008044 DOI: 10.1093/jac/dkp445]
- 33 **Megraud F**, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 2013; **62**: 34-42 [PMID: 22580412 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302254]

- 34 **Trespacios Rangel AA**. Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los zanti-microbianos e implicaciones en las terapias de erradicación. Bogota. Tesis [Doctorado en Ciencias Biologicas] – Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana; 2011
- 35 **Kao CY**, Lee AY, Huang AH, Song PY, Yang YJ, Sheu SM, Chang WL, Sheu BS, Wu JJ. Heteroresistance of *Helicobacter pylori* from the same patient prior to antibiotic treatment. *Infect Genet Evol* 2014; **23**: 196-202 [PMID: 24576534 DOI: 10.1016/j.meegid.2014.02.009]
- 36 **Hung KH**, Sheu BS, Chang WL, Wu HM, Liu CC, Wu JJ. Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter* 2009; **14**: 61-65 [PMID: 19191898 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2009.00655.x]
- 37 **Zullo A**, Perna F, Hassan C, Ricci C, Saracino I, Morini S, Vaira D. Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated in northern and central Italy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **25**: 1429-1434 [PMID: 17539982 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03331.x]
- 38 **Navarro-Jarabo JM**, Fernández-Sánchez F, Fernández-Moreno N, Hervas-Molina AJ, Casado-Caballero F, Puente-Gutierrez JJ, Pallares-Manrique H, Rodríguez-Ramos C, Fernández-Gutierrez C, Pérez-Aisa A, Rivas-Ruiz F, Montiel Quezel-Guerraz N. Prevalence of Primary Resistance of *Helicobacter pylori* to Clarithromycin and Levofloxacin in Southern Spain. *Digestion* 2015; **92**: 78-82 [PMID: 26227669 DOI: 10.1159/000435949]

Table 1 - Distribution of patients by sampling region, gender, and age

Brazil - Region	Distribution by gender	Distribution by age
	(% of females)	(average; minimum and maximum)
Northern (<i>n</i> = 36)	22 F; 14 M (61.1%)	41.4 (21-71)
North-Eastern (<i>n</i> = 138)	89 F; 49 M (64.5%)	37.7 (18-75)
Central-Western (<i>n</i> = 26)	13 F; 13 M (50.0%)	41.3 (21-65)
South-Eastern (<i>n</i> = 217)	145 F; 72 M (66.8%)	40.6 (19-76)
Southern (<i>n</i> = 73)	45 F; 28 M (61.6%)	58 (23-79)
Total (<i>n</i> = 490)	314 F; 176 M (64.1%)	42.4 (18-79)

F: Female; M: Male.

Table 2 - Prevalence of *H. pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in each region

	Northern (<i>n</i> = 36)	North-East- ern (<i>n</i> = 138)	Central- Western (<i>n</i> = 26)	South- Eastern (<i>n</i> = 217)	Southern (<i>n</i> = 73)	<i>P</i> value	Total (<i>n</i> = 490)
Clarithromycin resistance	16.6%	14.5%	19.2%	17.5%	19.1%	0.055	16.9% (95%CI: 13.7%-20.6%)
Fluoroquinolones resistance	2.7%	13.7%	15.4%	13.8%	16.4%	0.060	13.5% (95%CI: 10.6%-16.8%)

Table 3 - Distribution of mutations in the 23S gene in each region

Brazil - Region	Northern	North- Eastern	Central- Western	South- Eastern	South- ern	Total
MUT1 ¹	-	3	2	8	1	14
MUT2 ²	-	1	-	1	1	3
MUT3 ³	6	18	5	32	14	75
MUT2 + MUT3	-	1	-	1	-	2
MUT1 + MUT3	-	1	2	3	-	6
MUT1 + MUT2 + MUT3	-	-	-	-	1	1
Total mutations	6	24	9	45	17	101

¹Mutation A2146G; ²Mutation A2146C; ³Mutation A2147G.

Table 4 - Distribution of mutations in the *gyrA* gene in each region

Region		Northern	North-Eastern	Central-West- ern	South- Eastern	Southern	Total
Codon 87 mutant							
	No ident*	-	6	1	10	2	19
	Gyr87 MUT ^a	1	4	-	4	2	11
	Total	1	10	1	14	4	30
Codon 91 mutant							
	No ident *	-	2	-	4	2	8
	MUT1 ^b	-	7	2	9	5	23
	MUT2 ^c	-	2	-	7	3	12
	MUT3 ^d	-	1	1	4	3	9
	Total		12	3	24	13	52
Multiple mutations in codon 91							
MUT1 + MUT3		-	1	1	-	2	4
MUT1 + MUT2		-	-	-	3	1	4
MUT1+MUT2+MUT3			-	-	1		1
Total		-	1	1	4	3	9
Codons 87 + 91 mutants							
		-	2	-	3	2	7
Total mutations							
		1	22	4	38	17	82

*: No ident: mutant codon not specified; a: Mutation at codon N87K, nucleotide AAA;

b: Mutation at codon D91N, nucleotide AAT; c: Mutation at codon D91G, nucleotide GGT;

d: Mutation at codon D91Y, nucleotide TAT.

ANEXO I



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

1. CONTROLE DE APROVAÇÃO E RESUMO DE REVISÃO		
Nº Revisão	Nº de Páginas	Histórico de Alteração
01/2013	11	Padronizado
Elaboração	Verificação	Aprovação
Karine Sampaio Lima	Bruno Squarcio F Sanches	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%)
- Phosphate-buffered saline (PBS)
- RNase A (100 mg/ml)

Componentes do kit

QIAamp DNA Kits	Mini (50)	Mini (250)
Catalog no.	51304	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

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

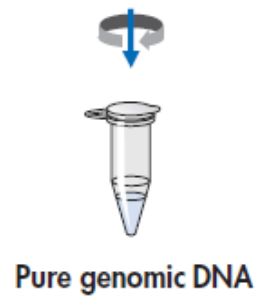
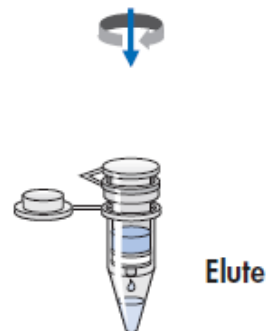
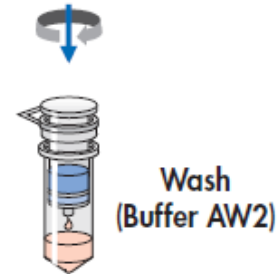
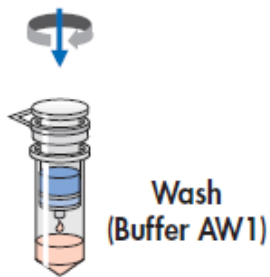
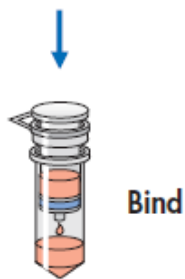
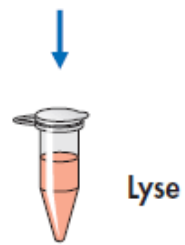
1. Retirar as amostras do armazenamento e fragmentá-las individualmente em placa Petri estéril com auxílio de bisturi e adição de 40 µl de Tampão ATL. É importante cortar os tecidos em pequenos pedaços para reduzir o tempo de lise.
Obs. Opcionalmente, pode-se fragmentar o tecido com nitrogénio líquido: 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 µl 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 µl 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 µl 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°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 absorbância no mesmo comprimento de onda da substância de interesse tende a superestimar o valor. DNA e RNA possuem pico de absorbância 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

2. REGISTROS GERADOS

NA

3.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

5.

ANEXO II



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas



LABORATÓRIO DE PESQUISA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

TAREFA: 002 POP.HELICO. LABORATÓRIO DE PESQUISA – IAG – HC: **REAÇÃO EM**
CADEIA DA POLIMERASE

APLICAÇÃO: LABORATÓRIO DE PESQUISA DO IAG

6. CONTROLE DE APROVAÇÃO E RESUMO DE REVISÃO		
Nº Revisão	Nº de Páginas	Histórico de Alteração
00/2013	10	Emissão Inicial
Elaboração	Verificação	Aprovação
Karine Sampaio Lima	Bruno Squárcio F Sanches	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

- Ponteiras 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 HP 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 H₂O 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).

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

*Procedimento padronizado conforme kit GenoType HelicoDR.

**Concentração final de MgCl₂ neste mix é de 2.5mM.

***PNM HelicoDR contem *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.

Fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

- Pipetar 5 µl de H₂O 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	∞

- Armazenar material amplificado a -20°C.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% (Opcional)

Equipamentos necessários

- Balança semi-analítica
- Microondas
- Micropipetas automáticas
- Cubas de eletroforese
- Pipetas de 5, 10, e 20 µl
- Transiluminador UV

● Kits e reagentes

- Agarose

- Tampão TAE 1x
- Água MilliQ ou ultrapura
- (livre de DNase e RNase)
- Água hospitalar estéril ou destilada
- Brometo de etídeo
- Amostras de DNA
- Padrão 50bp DNA Step Ladder + Dye

● 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.*
- Fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$*
- *C_i = concentração inicial*
- *V_i = volume inicial*
- *C_f = concentração final*
- *V_f = volume final*
- Ou seja:*
- *$10.000 \mu g (C_i) \times V_i = 0.5 \mu g (C_f) \times 200 ml (V_f)$*
- *$= 100/10.000 = 0,01 ml$, que é igual a 10 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 ponteiras 0,5-10 µl).
- Cuidado para não tocar na cama e nem na superfície dos poços do gel!

●Padrão 50bp DNA Step Ladder	●Controle -	●Amostras
------------------------------------	-------------	-----------

● 1 µl Tampão Dye ● 2 µl Água ultrapura ● 3 µl Padrão	● 5 µl Amostra (-)	● 5 µl Amostra
● 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)

ANEXO III



• Universidade Federal de Minas Gerais
• Hospital das Clínicas



• 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		
Nº Revisão	Nº de Páginas	Histórico de Alteração
00/2013	11	Emissão Inicial
Elaboração	Verificação	Aprovação
Karine Sampaio Lima	Bruno Squárcio F Sanches	Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
Assinatura	Assinatura	Assinatura
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

-
- Amostras amplificadas Refrigerador e Freezer -20°C
- Banho - Maria



- Incubadora TwinCubator
- Kit GenoType HelicoDR
- H₂O 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 µL 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 ponteiras, 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 µL 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 H₂O destilada por 1 min no TwinCubator. Remover completamente a H₂O 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 H₂O destilada por 1 min noTwinCubator. Remover completamente a H₂O destilada.

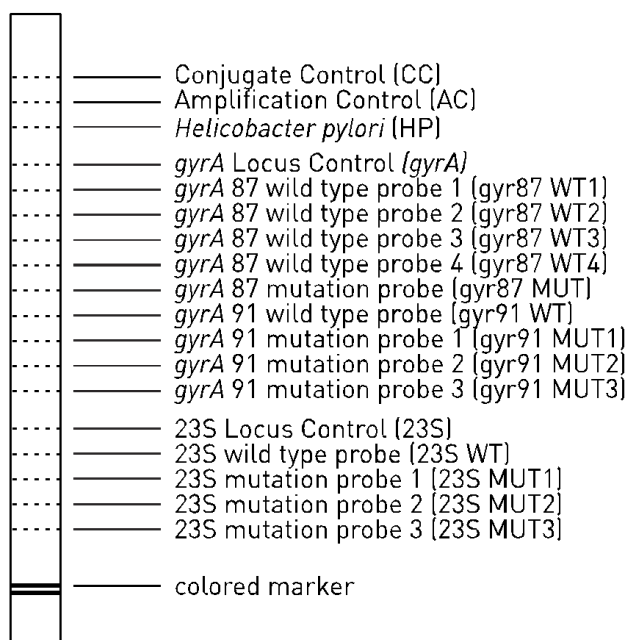
18. Com pinça, remover as fitas ainda umedecidas da placa e aplicá-las no mapa de resultados respectivamente.

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 HP. 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 HP).
- 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 tipo selvagem do códon 87 do gyrA, juntamente com a sonda selvagem do gyr91 e do 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 tipo selvagem correspondente. Resultados nas 2 posições do gene gyrA deverão ser combinados para chegar à conclusão sobre a possível resistência a fluoroquinolonas. Se nenhuma das 4 bandas do tipo selvagem do códon 87 ou a banda selvagem do gyr 91 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 de a espécime testada conter mais de uma cepa de HP. Se uma das cepas contiver 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)

ANEXO IV – Aprovação COEP / UFMG

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Projeto: CAAE – 011/2012	
Interessado(a): Prof. Luiz Gonzaga Departamento de Faculdade de Medicina	
DECISÃO	
O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua reunião ordinária de 18 de setembro de 2012, aprovou o projeto de pesquisa intitulado "Detecção molecular da infecção por <i>Streptococcus pneumoniae</i> em pacientes com doenças respiratórias agudas".	

APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Detecção molecular da infecção por *Helicobacter pylori* e sua susceptibilidade à claritromicina e fluoroquinolonas a partir de fragmentos obtidos por biópsia gástrica no Brasil

Seu médico lhe solicitou uma endoscopia digestiva alta para estudo de seu caso. Estamos lhe convidando para 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 outras doenças. A erradicação desta bactéria exige o emprego de antibióticos. No entanto, em todo o mundo, têm sido observadas dificuldades em eliminar esta bactéria e a principal causa é a sua resistência aos antibióticos usados.

Se você concordar em participar dessa pesquisa, durante o exame de endoscopia digestiva alta indicada por seu médico serão colhidas amostras de biópsia para estudo da bactéria. O principal benefício desse estudo é conhecer a resistência da bactéria aos antibióticos em nosso país. Essa informação poderá ajudar a definir quais antibióticos devem ser usados para eliminar a bactéria e indicar se os medicamentos atualmente receitados são boas opções de tratamento ou se devem ser modificados.

Durante o exame de endoscopia, serão realizadas biópsias para coletar pequenas amostras de tecido de seu estômago. Tal procedimento não causa dor. O risco de sangramento é muito raro, sendo mais freqüente em pacientes em uso de anticoagulantes. Por esse motivo, se você estiver em uso de anticoagulantes não poderá participar da pesquisa. Através da biópsia, se for confirmada a infecção pela bactéria nesse material, as amostras de tecido do estômago 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.

Este estudo pretende estudar de 514 portadores de infecção por *Helicobacter pylori* que nunca se submeteram a tratamentos anteriores contra a bactéria. As coletas serão feitas em diferentes cidades das cinco regiões do país e analisadas em Belo Horizonte – MG.

A sua participação neste estudo é voluntária. Caso não concorde em participar, não haverá prejuízo no acompanhamento e no tratamento médico. Você tem a garantia de que seus dados individuais serão confidenciais e de que não será identificado quando os resultados deste estudo forem apresentados em congressos médicos, ou publicados em revistas científicas.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho e Dr Bruno Squárcio Fernandes Sanches, que podem ser encontrados no endereço Avenida

Alfredo Balena, nº 110, 2º andar, sala 218, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG. Outro meio de contato é através do telefone (031) 3409 9403.

Este estudo foi analisado e aprovado pelos Comitês locais de Ética em Pesquisa (CEP), que poderão ser consultados em caso de dúvida acerca dos aspectos éticos. Outras dúvidas deverão ser esclarecidas diretamente com os pesquisadores. O CEP da Universidade Federal de Minas Gerais situa-se na Av Antônio Carlos, nº 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Câmpus Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil. O telefone do COEP é (031) 3409 4592.

Avalie estas informações, faça ao médico as perguntas que desejar e, após ter certeza de haver entendido o que lhe foi explicado, dê seu consentimento, se estiver de acordo, assinando no 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
responsável

Assinatura médico