



CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**Detecção Molecular e Genotipagem de *Helicobacter pylori* em Pacientes
Dispépticos atendidos no Hospital Central de Maputo.**

Nashon Dussin Majaliwa

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Jahit Sacarlal, UEM

Doutora Elisa Taviani, UEM

Professor Doutor Jorge Manuel Barreto Vítor, FFUL

Doutora Ana Filipa Ferreira do Vale, FFUL

Maputo, Julho de 2022

Nashon Dussin Majaliwa

**Detecção Molecular e Genotipagem de *Helicobacter pylori* em Pacientes
Dispépticos atendidos no Hospital Central de Maputo.**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação do
Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane,
como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Maputo, Julho de 2022

“Põe todo o teu empenho em tudo aquilo que fazes, pois lá no mundo dos mortos aonde vais parar não se fazem planos nem se executam, não há conhecimento nem sabedoria”

Eclesiastes 9:10,

in Bíblia sagrada.

Este trabalho foi realizado no Serviço de Gastrenterologia do Hospital Central de Maputo e no Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, em Moçambique. O Processamento laboratorial de amostras foi feito no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Farmácia, Farmacologia e Tecnologia em Saúde com a colaboração do grupo de investigação “*Pathogen Genome Bioinformatics and Computational Biology*” do Instituto de Investigação de Medicamentos da Universidade de Lisboa (iMed-ULisboa), em Portugal. Foi financiado pelo **Fundo Nacional de Investigação** (na fase inicial de colheita de amostras de biópsias gástricas) e pelo **Instituto Gulbenkian de Ciência da Fundação Calouste Gulbenkian** (na fase final de processamento de amostras positivas para o *Helicobacter pylori* - caracterização genómica) através da bolsa de Investigação Científica “*Prémio António Coutinho*” 2ª Edição com a referência **6/BI-M/21**.

Declaração de honra

Eu, **Nashon Dussin Majaliwa**, declaro por minha honra que este trabalho é da minha autoria, resulta da minha investigação e guia dos meus orientadores. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.

Nashon Dussin Majaliwa

(Nashon Dussin Majaliwa)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais **Evariste Ntirampeba & Rosa Riberata** pelo amor, carinho e apoio que demonstraram, não mediram esforço para que eu pudesse chegar à esta etapa da minha vida, incentivaram-me a estudar e sempre diziam “*filho apesar de todas as dificuldades estude, pois, a caneta é mais leve do que a enxada*”. Aos meus queridos irmãos pela confiança, à toda minha família e amigos pelo apoio.

Agradecimentos

Antes de mais nada, gostaria de endereçar os meus agradecimentos à Deus pela vida, que sem a qual não seria o que sou hoje.

De seguida, agradecer a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e motivaram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

Ao Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM) por me ter aceite como estudante deste programa de Mestrado. Ao Projeto de Cooperação Italiana pela bolsa de estudo que garantiu o pagamento das propinas e todas as despesas até ao fim da fase curricular do programa. Ao Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM por me ter recebido e me integrar no estudo REHEPY que aprimorou a minha paixão pela pesquisa. A todos investigadores do estudo REHEPY pela receptividade, motivação e confiança. À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, instituição que me acolheu e disponibilizou todas as condições possíveis para a realização de uma parte deste trabalho. Ao Fundo Nacional de Investigação pelo financiamento que tornou possível a implementação do estudo e ao Instituto Gulbenkian de Ciência pela bolsa de investigação e financiamento do estágio profissional disponibilizado que permitiu a consecução dos resultados deste trabalho.

Aos meus orientadores Professor Doutor Jahit Sacarlal e Doutora Elisa Taviani pelos ensinamentos que me transmitiram desde no início deste estudo, pelo apoio e disponibilidade que demonstraram sempre que precisei, ao Prof. Doutor Jorge Manuel Barreto Vítor e à Doutora Ana Filipa Ferreira do Vale por me terem aceite e me integrar no seu grupo de pesquisa, agradeço pelo acompanhamento, disponibilidade, confiança, paciência na orientação e ensinamentos práticos que me transmitiram durante fase laboratorial deste estudo.

Aos colegas grupo *Pathogen Genome Bioinformatics and Computational Biology*, nomeadamente: Andreia Marques, Luís Tanoeiro, Diana Morais, Mónica Azevedo, Joana Vital pelo apoio e ensinamentos, bem como toda a paciência que tiveram para me esclarecer e me motivar; sem me esquecer da motivação, companhia e apoio de colegas do Laboratório F.231 nomeadamente: David Pires, Cátia Silveiro, Francisco Olivença, e Manoj Mandal.

Ao grupo de investigadores do Laboratório Nacional de Referência de infeções Gastrointestinais, Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde - Doutor Ricardo Jorge, pela receptividade, colaboração e ensinamentos partilhados.

A todos investigadores e colaboradores do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM. De modo particular agradecer aos Doutores: Tufária Mussá, Alfeu Passanduca e José Sumbana; aos Mestres: Alice Manjate, José Langa, Arsénio Muchongo pela receptividade e paciência que tiveram de me ensinar e me aconselhar sempre que eu precisei, sem me esquecer da Darlenne Kenga e do Fabião Maússe, pela boa convivência, amizade incondicional e pelo apoio na recepção e conservação de amostras.

A todo Corpo Técnico Administrativo e estagiários do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM pelo suporte durante fase da realização deste trabalho.

A todos professores nacionais e estrangeiro, e coordenadores do programa do mestrado pelos ensinamentos e por terem ampliado o meu horizonte no mundo da ciência, na investigação e na minha vida académica.

Aos meus amigos investigadores que carinhosamente chamo de Biotecnólogos mais velhos e ao Corpo Administrativo do Centro de Biotecnologia vai o meu obrigado. De modo particular quero agradecer aos Doutores: Chanisso, Lucinda, Olívia e Ivete; aos Mestres: Vlademir, Valter, Marília, Raquelina, Iara, Amélia, Nídia, Dinise e Jossias pelo apoio, ensinamento e amizade; à Lic. Etelvina e Lic. Tuty pelos conselhos, simpatia e amizade. Sem me esquecer de agradecer o Senhor Abreu e Técnico Jussa pelo apoio.

Por fim agradeço aos meus colegas da 5ª Edição do Programa de Mestrado em Biotecnologia: Alberto Nhalungo, Benilde Munlela, Irina de Souza, Júlia Muando, Lopes Mavuque, Márcio Madussa, Simone Boene, Rachid Ibraimo, Titos Buene, e Vanessa da Graça pela boa convivência, apoio e amor incondicional.

O meu eterno obrigado!

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resumo de métodos não – invasivos.....	24
Tabela 2: Resumo de métodos invasivos	24
Tabela 3: Resumo de regimes de terapia usados na erradicação do <i>H. pylori</i>	31
Tabela 4: Linhas terapêuticas recomendadas para erradicação do <i>H. pylori</i>	32
Tabela 5: Primers para detecção do <i>H. pylori</i> e da sua sensibilidade genotípica aos antibióticos	42
Tabela 6: Primers para detecção dos factores de virulência do <i>H. pylori</i>	43
Tabela 7: Primers para determinação populacional de <i>H. pylori</i> em amostras positivas.....	44
Tabela 8: Características demográficas dos pacientes (sexo e idade dos pacientes).....	47
Tabela 9: Características demográficas (residência e estado civil dos pacientes)	48
Tabela 10: Características demográficas (condições de habitabilidade e acesso a água potável)	48
Tabela 11: Características demográficas (tipo de antibiótico usado no tratamento).....	50
Tabela 12: Características demográficas (tipo de IBP's usado no tratamento).....	51
Tabela 13: Relação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por <i>H. pylori</i> (sexo, faixa etária e residência dos pacientes)	53
Tabela 14: Relação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por <i>H. pylori</i> (consumo da água, hábitos tabágicos e alcoólicos e os achados endoscópicos)	54
Tabela 15: A taxa de resistência do <i>H. pylori</i> aos antibióticos avaliado por PCR para os genes <i>23S rRNA</i> , <i>gyrA</i> e <i>rdxA</i>	57
Tabela 16: A taxa das mutações que conferem resistência do <i>H. pylori</i> aos antibióticos avaliado para os genes <i>23S rRNA</i> , <i>gyrA</i> e <i>rdxA</i>	58

Lista de Figuras

Figura 1: Coloração de Gram da morfologia de <i>H. pylori</i>	7
Figura 2: Representação do genoma circular do <i>H. pylori</i>	8
Figura 3: Mapa de representação das diferentes taxas de prevalência global de infecção por <i>H. pylori</i>	10
Figura 4: Visão global da distribuição genética das populações de <i>H. pylori</i>	12
Figura 5: Proteínas que o <i>H. pylori</i> utiliza para colonizar o estômago do hospedeiro.....	15
Figura 6: Infecção causada por <i>H. pylori</i> e doenças gástricas associadas.....	19
Figura 7: Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos (Neto, 2021).	34
Figura 8: Vias de influxo e de efluxo de fármacos em bactérias Gram-negativas.....	35
Figura 9: Diversidade funcional entre as proteínas efluxo com base no modo de transporte, mecanismo substrato e fonte de energia.....	37
Figura 10: Localização do Hospital Central de Maputo	39
Figura 11: Tipo de água consumida pelos participantes.	49
Figura 12: Factores de risco associados à dispépsia.	49
Figura 13: Diagnóstico endoscópico dos pacientes.....	52
Figura 14: Diagnóstico molecular de infecção causada pelo <i>H. pylori</i>	52
Figura 15: Alinhamento múltiplo das sequências de nucleótidos geradas através da sequenciação Sanger dos produtos de PCR de amostras que amplificaram para o gene <i>23S rRNA</i> utilizado para testar a resistência de <i>H. pylori</i> à claritromicina.	55
Figura 16: Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos geradas através da sequenciação de produtos de PCR de amostras que amplificaram para o gene <i>gyrA</i> utilizado para testar a resistência de <i>H. pylori</i> às fluoroquinolonas	56
Figura 17: Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos geradas através da sequenciação de produtos de PCR de amostras que amplificaram para o gene <i>rdxA</i> utilizado para testar a resistência de <i>H. pylori</i> ao metronidazol.....	57
Figura 18: Taxa de multirresistência num grupo de amostras em que foram identificadas as mutações associadas à resistência aos antibióticos testados	58
Figura 19: Detecção dos factores de virulência em amostras positivas para o <i>H. pylori</i>	59
Figura 20: Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da região C-terminal em amostras <i>cagA</i> -positivas.....	60
Figura 21: Árvore filogenética das sequências de 30 amostras <i>H. pylori</i> positivas.....	61

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

<i>ATPase</i>	<i>Adenosine triphosphate synthase</i>
AMM	Associação Medica Mundial
<i>BabA</i>	<i>Blood Antigen Binding Adhesin gene</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>cagA</i>	<i>Cytotoxin associated gene A</i>
cag-PAI	<i>cytotoxin associated gene pathogenicity island</i>
CNBS	Comité Nacional de Bioética em Saúde
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>dupA</i>	<i>Duodenal ulcer promoting gene A</i>
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
FFUL	Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
<i>frxA</i>	<i>NADPH flavin oxidoreductase gene</i>
<i>flaA</i>	<i>flagellin A</i>
<i>flaB</i>	<i>flagellin B</i>
<i>gyrA</i>	<i>gyrase A</i>
HCM	Hospital Central de Maputo
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H+	Ião hidrogénio
IBP	Inibidores da Bomba de Protões
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina-8
IM	<i>Inner Membrane</i>
iMed - Ulisboa	Instituto de Investigação de Medicamentos da Universidade de Lisboa
Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton
K+	Ião potássio
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
<i>mI</i>	<i>Mid-region of Vacuolating cytotoxin A</i>
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>

Mbp	<i>Mega-base-pair</i>
MISAU	Ministério da Saúde
MLST	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
NADPH	<i>Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>OipA</i>	<i>Outer inflammatory gene A</i>
OM	<i>Outer Membrane</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMPs	<i>Outer Membrane Proteins</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBP	Penicillin-binding proteins
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>Potential of hydrogen used to specify the acidity or basicity of solution</i>
PubMLST	<i>Public databases for molecular typing and microbial genome diversity</i>
QRDR	Quinolone Resistance Domain Region
<i>rdxA</i>	<i>NADPH nitroreductase gene</i>
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
REHEPY	Resistência do <i>Helicobacter pylori</i>
RNA	Ribonucleic acid
<i>S</i>	<i>Signal region of Vacuolating cytotoxin A</i>
<i>SabA</i>	<i>Sialic acid binding adhesin</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TRU	Teste Rápido de Urease
T4SS	<i>Bacterial type IV secretion system</i>
UBT	<i>Urea Breath Teste</i>
<i>UreA</i>	<i>Urease subunit A</i>
<i>UreB</i>	<i>Urease subunit B</i>
<i>vacA</i>	<i>Vacuolating cytotoxin A</i>
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
°C	Grau Celsius ou centígrado

Resumo

Introdução: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria patogénica humana responsável por uma variedade de doenças gástricas, incluindo a dispepsia. A prevalência global da sua infecção é de aproximadamente 50%, mas pode chegar aos 90% nos países em desenvolvimento, como os da África subsaariana, de que Moçambique faz parte. As estirpes de *H. pylori* apresentam um elevado nível de diversidade genotípica e expressam vários genes que contribuem para a sua patogenicidade e resistência. Em Moçambique, há escassa informação sobre infecção por *H. pylori*, sua resistência aos antibióticos, seus factores de virulência e sua filogenia. Assim sendo, o nosso objectivo foi de investigar a ocorrência de infecção por *H. pylori*, e a sua caracterização genómica em pacientes dispépticos atendidos no Serviço de Gastroenterologia, do Hospital Central de Maputo, em Moçambique.

Metodologia: Trata-se de um estudo descritivo transversal realizado entre Junho de 2017 e Junho de 2020, em que foram estudados 171 pacientes dispépticos, e através da Endoscopia Digestiva Alta foram colhidas biópsias gástricas. Para a realização de análise molecular, o DNA genómico bacteriano foi directamente extraído das biópsias, e foi feito PCR para a detecção de *H. pylori* e seus mecanismos de resistência à claritromicina (23S *rRNA*), às fluoroquinolonas (*gyrA*) e ao metronidazol (*rdxA*) e, as mutações que conferem resistência a esses antibióticos foram investigadas através da sequenciação desses genes (23S *rRNA*, *gyrA* e *rdxA*). Adicionalmente, foram detectados os genes de virulência (*vacA*, *dupA* e *cagA*), e também foi realizada a tipificação por MLST para a caracterização filogenética das estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes.

Resultados: Das 171 amostras testadas, *H. pylori* foi detectado em 56,1% (96/171). A taxa de resistência à claritromicina foi de 10,4% (as mutações responsáveis foram: A2141G e A2142G), a taxa de resistência às fluoroquinolonas foi de 20% (as mutações responsáveis foram: N87I e D91G) e, a taxa de resistência ao metronidazol foi de 55,2% (foram identificados 4 tipos de mutações responsáveis por resistência ao metronidazol que incluem, D59N, R90K, H97Te A118T, contudo, elas apareciam combinadas em muitos casos, tendo sido D59N+R90K+A118T a combinação mais frequente). Relativamente aos genes de virulência, *vacA* foi detectado em todas as amostras (100%), *dupA* em 61,5% e *cagA* foi detectado apenas em 16,7% das amostras e, entre as combinações do genótipo *vacA*, *vacA* *s1/m2* é que foi a mais frequente. A caracterização de locais de fosforilação em amostras *cagA*-positivas revelou que 93,8% eram do EPIYA-ABC e apenas 6,2% é que era EPIYA-ABCCC. Com base na tipagem por MLST, foi verificada uma diversidade entre as estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes e, foram classificadas em: 50% hpAfrica2 (50%), hpAfrica1 (33,3%) e hpEurope (16,7%).

Conclusão: Mais de metade dos pacientes dispépticos atendidos no Serviço de Gastroenterologia, do Hospital Central de Maputo, estão infectados com estirpes de *H. pylori* resistentes ao metronidazol e às fluoroquinolonas; isso compromete a segunda linha de tratamento, podendo ocasionar aumento da falência terapêutica nesses pacientes. No entanto, os seus factores de virulência sugerem uma virulência moderada dessas estirpes.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; dispepsia; antibióticos; resistência; mutação; virulência

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a human pathogenic bacterium responsible for a variety of gastric diseases, including dyspepsia. The global prevalence of its infection is approximately 50%, but can reach 90% in developing countries, such as those in sub-Saharan Africa, where Mozambique is included. *H. pylori* strains show a high level of genotypic diversity and express several genes that contribute to their pathogenicity and resistance. In Mozambique, there is lack of information on *H. pylori* infection, its resistance to antibiotics, its virulence factors, and its phylogeny. Therefore, we aimed to investigate the occurrence of *H. pylori* infection and its genomic characterization in dyspeptic patients seen at the Department of Gastroenterology, Hospital Central de Maputo, in Mozambique.

Methodology: This is a cross-sectional descriptive study conducted between June 2017 and June 2020, in which 171 dyspeptic patients were recruited, and through Upper GI endoscopy, gastric biopsies were collected from those patients. To perform molecular analysis, bacterial genomic DNA was directly extracted from gastric biopsies, and PCR was performed for the detection of *H. pylori* and its resistance mechanisms to clarithromycin (*23S rRNA*), fluoroquinolones (*gyrA*) and metronidazole (*rdxA*) and, mutations conferring resistance to these antibiotics were investigated by sequencing these genes (*23S rRNA*, *gyrA* and *rdxA*). Additionally, virulence genes (*vacA*, *dupA* and *cagA*) were detected, and MLST typing was also performed for the phylogenetic characterization of *H. pylori* strains infecting patients

Results: Of the 171 samples tested, *H. pylori* was detected in 56.1% (96/171). The clarithromycin resistance rate was 10.4% (the responsible mutations were: A2141G and A2142G), the fluoroquinolones resistance rate was 20% (the responsible mutations were: N87I and D91G) and, the metronidazole resistance rate was 55.2% (4 types of mutations responsible for metronidazole resistance were identified which include, D59N, R90K, H97T and A118T. However, in many cases, they appeared in combination, with D59N+R90K+A118T being the most frequent combination). Regarding virulence genes, *vacA* was detected in all samples (100%), *dupA* in 61.5% and *cagA* was detected only in 16.7% of samples and, among the combinations of *vacA* genotype, *vacA s1/m2* was the most frequent. Characterization of phosphorylation sites in *cagA*-positive samples revealed that 93.8% were EPIYA-ABC and only 6.2% were EPIYA-ABCCC. Based on MLST typing, a diversity was found among *H. pylori* strains infecting patients and, they were classified as hpAfrica2 (50%), hpAfrica1 (33.3%) and hpEurope (16.7%).

Conclusion: More than half of the dyspeptic patients seen at the Department of Gastroenterology, Hospital Central de Maputo, are infected with *H. pylori* strains resistant to metronidazole and fluoroquinolones. However, their virulence factors suggest moderate virulence of these strains.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Dyspepsia; Antibiotics; Resistance; Mutation; Virulence

Índice Geral

Declaração de honra	I
Dedicatória.....	II
Agradecimentos	III
Lista de Tabelas	V
Lista de Figuras	VI
Lista de Abreviaturas e Acrónimos	VII
Resumo	IX
Abstract.....	X
CAPÍTULO I.....	1
1.1 Introdução	1
1.2.Problema.....	3
1.3 Justificativa.....	4
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objectivo geral	4
1.4.2 Objectivos específicos.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2. Breve Historial sobre a descoberta do <i>H. pylori</i>	5
2.1. Caracterização Morfológica do <i>H. pylori</i>	6
2.1.2 Caracterização genómica do <i>H. pylori</i>	7
2.1.3 Cultura de <i>H. pylori</i> no laboratório	8
2.2. Epidemiologia de infecção por <i>H. pylori</i>	9
2.2.1 Prevalência de infecção causada por <i>H. pylori</i> em Moçambique.....	10
2.2.2 Propagação global de infecção por <i>H. pylori</i>	11
2.2.3 Vias de transmissão de <i>H. pylori</i>	12
2.3 Patogénese e marcadores de virulência do <i>H. pylori</i>	14

2.3.1	Marcadores de virulência do <i>H. pylori</i>	14
2.3.2	A ilha de patogenicidade (<i>cag-PAI</i>)	15
2.3.3	<i>vacA</i>	15
2.3.4	<i>cagA</i>	16
2.3.5	<i>dupA</i>	17
2.4	Manifestação clínica da infecção por <i>H. pylori</i> e doenças associadas	18
2.4.1	Dispepsia	19
2.4.2	Gastrite.....	20
2.4.3	Úlcera péptica	20
2.4.4	Cancro gástrico	21
2.4.5	Linfoma Gástrico do tipo MALT	22
2.4.6	Outras doenças (doenças extragástricas)	22
2.5	Métodos de diagnóstico de <i>H. pylori</i>	23
2.5.1.	Resumo de diferentes métodos usados para o de diagnóstico de <i>H. pylori</i>	24
2.6	Tratamento do <i>H. pylori</i>	25
2.6.1	A descrição de alguns fármacos usados para erradicação do <i>H. pylori</i>	25
2.6.1.1	Inibidores da bomba de prótons	25
2.6.1.2	Amoxicilina	26
2.6.1.3	Claritromicina.....	26
2.6.1.4	Fluoroquinolonas	27
2.6.1.5	Metronidazol.....	27
2.6.1.6	Tetraciclina	28
2.6.1.7	Rifabutina	29
2.6.1.8	Furazolidona	29
2.6.1.9	Sais de bismuto	30
2.6.2	Regimes de tratamento do <i>H. pylori</i>	30
2.6.3	Linhas de tratamento do <i>H. pylori</i>	31

2.6.4 Resistência do <i>H. pylori</i> aos antibióticos.....	32
2.6.4.1 Mecanismos de resistência a antibióticos	33
2.6.4.1.1 Resistência ocasionada pela alteração do local alvo	34
2.6.4.1.2 Resistência ocasionada pela inativação enzimática do composto.....	34
2.6.4.1.3 Resistência ocasionada pela diminuição da permeabilidade celular	35
2.6.4.1.3 Resistência ocasionada pela super expressão das bombas de efluxo	36
CAPÍTULO III	38
3. Metodologia.....	38
3.1 Área e caracterização do estudo	38
3.2 População de Estudo.....	39
3.2.1 Critérios de inclusão	40
3.2.2 Critérios de Exclusão.....	40
3.2.3 Determinação e cálculo do tamanho amostral	40
3.3 Considerações ética	40
3.4 Fluxograma do estudo	41
3.5 Gestão, análise e apresentação de dados	41
3.6 Análise laboratorial.....	41
3.6.1 Extração de DNA do <i>H. pylori</i>	41
3.6.2 Detecção do <i>H. pylori</i> e da sua sensibilidade genotípica aos antibióticos	41
3.6.3 Detecção dos factores de virulência em amostras positivas para <i>H. pylori</i>	42
3.6.4 Determinação da filogenia das estirpes de <i>H. pylori</i> que infectam os pacientes.....	43
3.6.5 Electroforese em gel de agarose	44
3.6.6 Sequenciação de amostras	45
3.6.7 Análise Bioinformática das sequências	45
3.6.7. 1 Análise filogenética	46
3.7 Análise estatística dos dados	46
CAPÍTULO IV	47

4. Resultados.....	47
4.1 Características demográficas dos pacientes.....	47
4.1.1 Diagnóstico endoscópico dos pacientes	51
4.2 Diagnóstico molecular	52
4.2.1 Detecção molecular do <i>H. pylori</i> por PCR.....	52
4.2.1.1 Relação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por <i>H. pylori</i>	53
4.3 Caracterização molecular das amostras positivas para <i>H. pylori</i>	55
4.3.1 Sensibilidade genotípica do <i>H. pylori</i> aos antibióticos e as mutações associadas	55
4.3.2 Detecção dos factores de virulência em amostras positivas	59
4.3.3 Determinação da filogenia das estirpes de <i>H. pylori</i> que infectam os pacientes.....	60
CAPÍTULO V.....	62
5. Discussão	62
5.1. Características sociodemográficas dos pacientes	62
5.2. A taxa de infecção causada pelo <i>H. pylori</i> e a sua relação com as características sociodemográficas dos pacientes.....	62
5.3. A taxa de resistência do <i>H. pylori</i> aos antibióticos usados para o tratamento.....	64
5.4. Detecção dos factores de virulência em amostras positivas para <i>H. pylori</i>	67
5.5. Determinação da filogenia das estirpes de <i>H. pylori</i> que infectam os pacientes.....	71
CAPÍTULO VI	74
6. Conclusões.....	74
7. Limitações	74
8. Recomendações	75
9. Referências bibliográficas	77

APÊNDICES

ANEXOS

CAPÍTULO I

1.1 Introdução

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria com a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal humano, e constitui maior componente do microbioma gástrico dos indivíduos infectados (Fischbach & Malfertheiner, 2018; Sousa *et al.*, 2021). Esta bactéria foi isolada pela primeira vez em 1982 por dois cientistas australianos (Marshall e Warren) que decifraram o seu papel nas doenças gastrointestinais (Ahmed, 2005; Jonsson, 2005).

H. pylori é considerado um agente patogénico de interesse global pelo facto de ser um microrganismo de fácil propagação entre os hospedeiros, e tem sido reportado como sendo um dos factores etiológicos da dispepsia, gastrite crónica, úlcera péptica e cancro gástrico (Júnior *et al.*, 2021; Graham & Dore, 2016; Júnior *et al.*, 2021). Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu este patógeno como agente carcinogénico do tipo I devido à sua capacidade de causar o cancro gástrico em humanos (Júnior *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2017).

A infecção por *H. pylori* continua a ser um grande problema de saúde pública global, pois, afecta aproximadamente cerca de 50% da população mundial, podendo chegar aos 90% nos países em desenvolvimento como África, América do Sul e Ásia Ocidental (Hooi *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2021).

A revisão sistemática sobre a prevalência global de infecção por *H. pylori* feita por Hooi *et al.*, (2017) reportou uma prevalência de aproximadamente 79,1% na população africana e sublinhou que esta infecção é mais comum na região da África subsaariana. Em Moçambique, a prevalência de infecção por *H. pylori* varia de 84% a 94,5% e, ela tem sido associada ao baixo nível socioeconómico, precárias condições de higiene e saneamento (Modcoicar *et al.*, 2011; Carrilho *et al.*, 2009).

A principal forma de transmissão de *H. pylori* ainda não é bem conhecida, porém, supõe-se que a infecção seja transmitida de pessoa para pessoa por várias vias: fecal-oral, oral-oral, e gastro oral (Mentis *et al.*, 2015 ; Hooi *et al.*, 2017; Vale & Vítor, 2010). Esta infecção é principalmente adquirida na infância, e quando não for tratada, persiste no estômago durante toda a vida do hospedeiro (Thung *et al.*, 2016; Sugano *et al.*, 2015).

H. pylori coloniza persistentemente o estômago usando vários factores de virulência para ultrapassar a barreira epitelial e o sistema imunitário do hospedeiro (Mattos & Freire, 2019; Kao *et al.*, 2016). Entre os vários factores de virulência que *H. pylori* possui, os mais estudados são os genes *cagA*, *vacA*, e *dupA* por serem considerados importantes na patogénica desta bactéria, e por estarem associados ao desenvolvimento das doenças gastrointestinais graves (Rizzato *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2014)

O tratamento de infecção por *H. pylori*, é feito pela combinação de antibióticos e inibidores da bomba de prótons, porém, a erradicação deste patógeno tem vindo a ser desafiante devido à crescente taxa de resistência aos antibióticos. Por isso, em 2017, a OMS incluiu esta bactéria na lista dos 16 microrganismos que requerem uma intervenção prioritária (Babiuc *et al.*, 2021; Gong & El-Omar, 2021).

Para a detecção de *H. pylori*, há vários métodos disponíveis. Geralmente, recomenda-se a utilização do método padrão "cultura", mas infelizmente este método é raramente utilizado devido à sua disponibilidade limitada (Gong & El-Omar, 2021). No entanto, na falta do método padrão, principalmente quando há suspeita de resistência aos antibióticos, aconselha-se a utilização de testes moleculares (por exemplo o PCR) para amplificar o DNA bacteriano a partir de biópsia ou fezes, mas também a baixa acessibilidade e o custo elevado destes testes, limitam a sua utilização na prática clínica de rotina em muitas regiões (Gong & El-Omar, 2021; Sousa *et al.*, 2017).

Portanto, este estudo foi realizado para fazer face à falta de dados actualizados sobre a prevalência de infecção por *H. pylori* em pacientes dispépticos e para gerar informação sobre a caracterização genómica das estirpes de *H. pylori* que os infectam, isso através da utilização dos testes moleculares.

1.2. Problema

A dispepsia é um problema comum e universal que interfere significativamente na qualidade de vida dos indivíduos com este quadro clínico. E, estima-se que sua prevalência global varia de 20 a 45% por ano (De Oliveira *et al.*, 2018; Moayyedi *et al.*, 2006). Em Moçambique, a dispepsia é uma das razões pelas quais os pacientes procuram cuidados primários de saúde, resultando em custos socioeconómicos elevados e uma grande sobrecarga do Sistema Nacional de Saúde (Modcoicar *et al.*, 2011).

A infecção por *H. pylori* é apontada como sendo uma das causas da dispepsia, pois, é uma infecção comum que envolve principalmente a mucosa gástrica; além disso, estudo reportam que esta bactéria encontra-se com mais frequência na mucosa gástrica de pacientes dispépticos do que em indivíduos saudáveis (Júnior *et al.*, 2021; Suzuki & Moayyedi, 2013).

Existem vários factores que influenciam a incidência e prevalência desta infecção, entre os quais se destaca o grau de virulência das diferentes estirpes de *H. pylori*, factor que pode influenciar também na prevalência das doenças gastrointestinais associadas à esta infecção (Jemilohun & Otegbayo, 2016; Cano-Contreras *et al.*, 2018).

Portanto, em Moçambique, ainda é desafiante estabelecer uma estreita relação entre a infecção por *H. pylori* e a dispepsia e prever seu impacto na saúde pública, devido à existência de pouca informação sobre o assunto e à falta de capacidade clínico-laboratorial para diagnosticar este agente patogénico com base na utilização do método padrão “cultura” ou métodos alternativos “métodos moleculares”.

Assim, é neste contexto, que este estudo pretende responder as seguintes questões:

- ☞ Qual é a prevalência de infecção por *H. pylori* em pacientes dispépticos atendidos no serviço da Gastroenterologia do Hospital Central de Maputo?
- ☞ Será que as estirpes de *H. pylori* que causam infecção são muito virulentas e resistentes aos antibióticos usados para o tratamento?

1.3 Justificativa

A maioria dos pacientes dispépticos são portadores de *H. pylori*, e seus sintomas resolvem-se quando este patógeno é erradicado. Por isso, é importante que esta infecção seja diagnosticada e tratada para a eliminação da dispepsia a longo prazo nesses pacientes (WGO, 2021; Talley *et al.*, 2017). Assim, não havendo dados actualizados sobre a infecção por *H. pylori* em Moçambique, particularmente no grupo de pacientes estudados, faz sentido a realização deste trabalho para saber o que está a acontecer neste grupo.

Os dados gerados neste estudo guiarão os profissionais de saúde, melhorando assim a qualidade dos serviços oferecidos aos pacientes com esta sintomatologia, tais como beneficiar o tratamento adequado baseado no resultado laboratorial. E, sem dúvidas, também servirão como uma contribuição valiosa para a comunidade científica.

1.4 Objetivos

Este trabalho tem como objectivos:

1.4.1 Objectivo geral

- ☞ Investigar a ocorrência de infecção por *H. pylori* e a sua caracterização genómica em pacientes dispépticos atendidos no Serviço da Gastroenterologia do Hospital Central de Maputo (HCM).

1.4.2 Objectivos específicos

- i.** Descrever as características sociodemográficas dos pacientes dispépticos atendidos no Serviço da Gastroenterologia do HCM;
- ii.** Detectar a infecção por *H. pylori* em pacientes dispépticos atendidos no Serviço da Gastroenterologia do HCM;
- iii.** Detectar a sensibilidade genotípica de *H. pylori* e as mutações associadas a resistência aos antibióticos;
- iv.** Detectar os factores de virulência em amostras positivas para *H. pylori*;
- v.** Determinar a filogenia das estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes dispépticos.

CAPÍTULO II

2. Breve Historial sobre a descoberta do *H. pylori*

O estômago humano foi considerado durante muito tempo como sendo um ambiente hostil para a sobrevivência de qualquer bactéria devido ao ácido clorídrico produzido nele. Porém, no século XIX, Bizzozero relatou a presença de microrganismos em forma espiral nas glândulas gástricas de mamíferos, especialmente em caninos (Hermanns *et al.*, 1995, Bizzozero, 1989).

O tempo foi passando, e os vários investigadores em seus estudos confirmavam a presença desses microrganismos no estômago de mamíferos, inclusive de humanos e, associavam esses microrganismos à úlcera gástrica (Silva, 2012, Goodwin & Armstrong, 1990).

Em 1979, Robin Warren, encontrou na mucosa gástrica dos pacientes com gastrite crónica os microrganismos semelhantes aos que foram encontrados por outros patologistas em estudos desenvolvidos anteriormente. Porém, pouco se conhecia sobre esses microrganismos, por isso muitas vezes eram ignorados (Fauchère, 2017, Marshall, 2002). Em 1981, Barry Marshall, interessou-se pelas observações de Robin Warren e uniu-se a ele para juntos tentarem isolar esses microrganismos a partir das biópsias gástricas de pacientes com gastrite crónica e, pela primeira vez em 1982, conseguiram isolá-los, mas foi de forma acidental, pois involuntariamente aumentaram o tempo incubação, (Lindo *et al.*, 1999; Buckley & O'Morain, 1998).

A bactéria foi inicialmente classificada como *Campylobacter pyloridis* devido a sua forma espiral, e era considerada como pertencente ao género *Campylobacter* devido às suas semelhanças morfológicas com espécies desse género (Alterthum, 2015; Buckley & O'Morain, 1998). No entanto, após a realização de estudos de caracterização taxonómica e molecular por sequenciação do gene *16S rRNA* desta bactéria, comprovou-se que ela não estava relacionada com o género *Campylobacter*, pois a sua posição filogenética era diferente das espécies do género *Campylobacter* (Alterthum, 2015; Höök-Nikanne *et al.*, 199). E, estas diferenças levaram à criação de um novo género "*Helicobacter*" a que esta bactéria passou a pertencer, sendo que em 1989, esta a bactéria passou a ser designada *Helicobacter pylori* (Marshall, 2002).

A descoberta de *H. pylori* criou reforma na gastroenterologia e na microbiologia por ter trazido novas percepções sobre a causa de algumas doenças gastrointestinais, e moldou a conduta terapêutica e diagnóstica de muito médicos e cientistas que actuavam nessas áreas (Buckley & O'Morain, 1998). Por isso, em 2005, Marshall e Warren ganharam o prémio Nobel de Medicina e Fisiologia por terem sido os primeiros a isolar o *H. pylori* (Ahmed, 2005; Jonsson, 2005).

2.1. Caracterização Morfológica do *H. pylori*

Morfologicamente, *H. pylori* é um bacilo Gram-negativo, microaerofílico de forma espiral medindo 0,3 a 1 micrómetros (μm) de largura e 1,5 a 5 μm de comprimento, podendo ter 4 a 6 flagelos unipolares que lhe conferem a mobilidade (Alterthum, 2015). Taxonomicamente ela pertence ao género *Helicobacter* (do grego: helix, helicoidal; bacter, bactéria), família *Helicobacteraceae* da classe *Epsilonproteobacteria* (Goodwin & Armstrong, 1990). Embora espiral, ela pode ser curva ou recta, e em condições de estresse ambiental, é capaz de se converter a sua forma espiral para uma forma cocóide (Keshavarz *et al.*, 1999).

Geralmente, *H. pylori* é encontrado no estômago em forma espiral, mas também há casos em que se identificam as formas coccóides desse agente no estômago (figura 1) (Ogata *et al.*, 1998). A forma em espiral é a mais virulenta, com alta capacidade de replicação e de induzir a inflamação, também é facilmente cultivável; enquanto que a forma cocóide é difícil de cultivar em meios sólidos, e é capaz de sobreviver em condições adversas, tais como, ambiente aeróbico com alterações de temperatura, alterações de pH, incubação prolongada e indisponibilidade de nutrientes ou em caso de tratamento prolongado com antibióticos e inibidores da bomba de prótons (Saito *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2007).

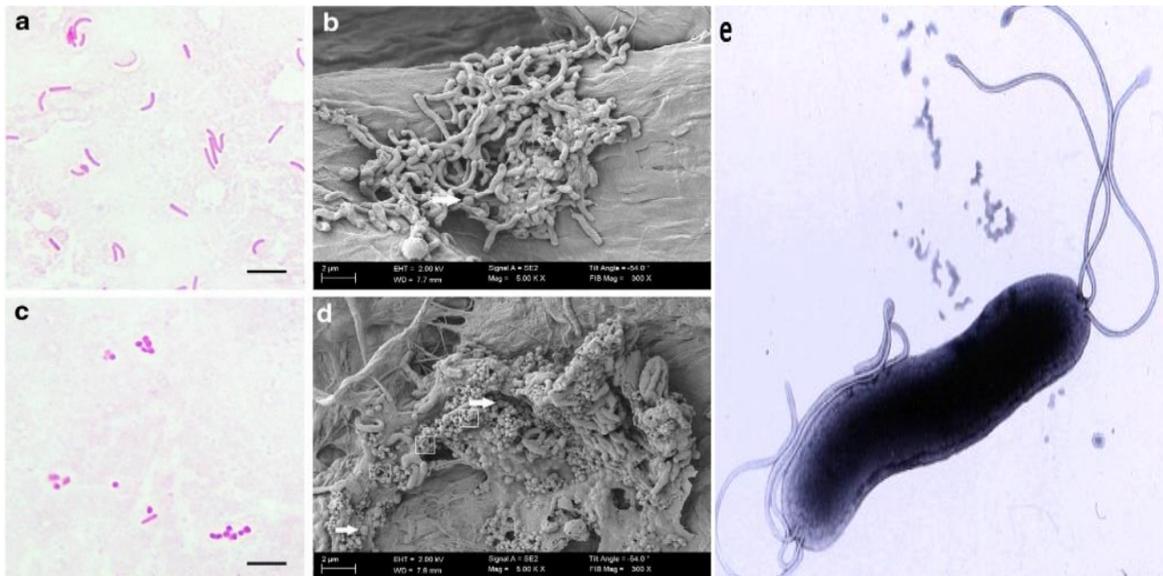


Figura 1: Coloração de Gram da morfologia de *H. pylori*. **a)** coloração de Gram da forma espiral de *H. pylori*, **b)** imagem da forma espiral de *H. pylori* tirada microscópio electrónico **c)** coloração de gram da forma cocóide de *H. pylori* **d)** imagem da forma coccóides de *H. pylori* tirada microscópio electrónico. Fonte: (Krzyżek *et al.*, 2019). **e)** imagem de *H. pylori* tirada através do microscópio electrónico mostrando dois bacilos sobrepostos. Fonte: (Mérgraud apud De Almeida, 2014).

2.1.2 Caracterização genómica do *H. pylori*

Helicobacter pylori foi a primeira espécie bacteriana a ter dois genomas completamente sequenciados e disponíveis publicamente (Alm *et al.*, 1999). Primeiramente foi sequenciado genoma de estirpe **26695** isolada de um paciente com gastrite, no Reino Unido (Tomb *et al.*, 1997). E, no ano seguinte foi sequenciado o genoma de estirpe **J99** isolada de um paciente com úlcera duodenal, nos Estados Unidos de América (Alm *et al.*, 1999).

A dimensão do genoma bacteriano de *H. pylori* varia de 1,6 a 1,73 Mega pares de bases (Mbp) dispostos num genoma circular (figura 2), e é rico em AT, conteúdo de GC de 39%. Contêm duas cópias dos genes *16S*, *23S* e *5S rRNA* presentes em vários plasmídeos (com dimensões entre 1,5 a 23,2 Kbp) que auxiliam na troca do material genético entre as estirpes de *H. pylori* (Baltrus *et al.*, 2009; Tomb *et al.*, 1997).

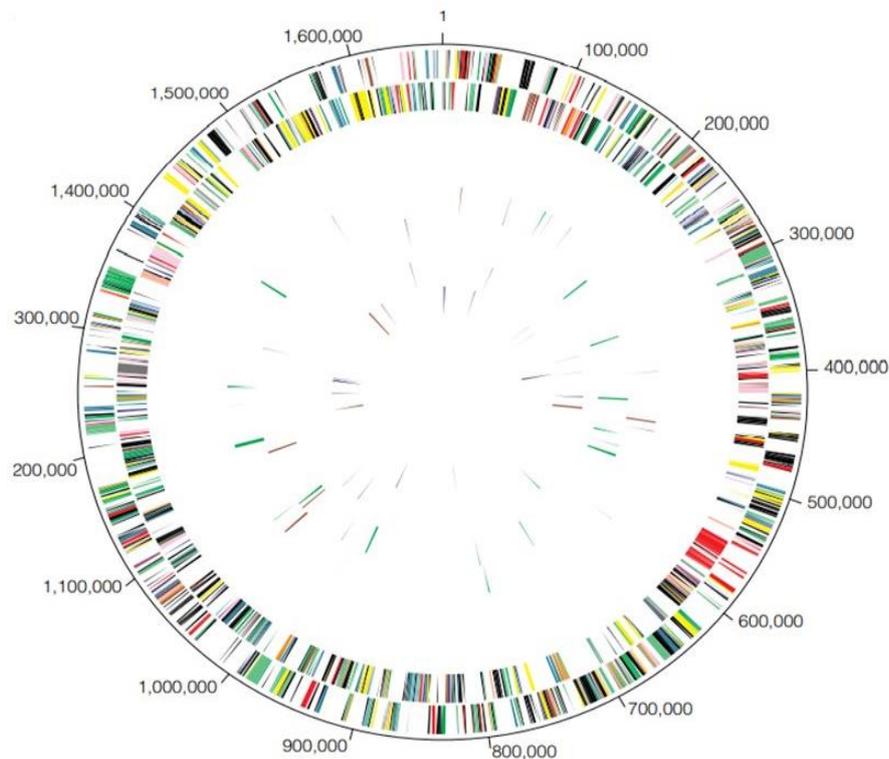


Figura 2: Representação do genoma circular do *H. pylori*. Fonte: (Tomb *et al.*, 1997).

As estirpes de *H. pylori* são conhecidas pelo seu elevado nível de diversidade genética, e isso se deve provavelmente à taxa de mutação no seu genoma, recombinação frequente e à existência de plasmídeos (Doig *et al.*, 1999).

O genoma de *H. pylori* apresenta uma zona de plasticidade com conteúdo menor em GC que contém aproximadamente 47% dos genes específicos de cada estirpe. Entretanto, a medida em que os dados de sequenciação dos genomas de foram disponibilizados, esta zona foi incluída nos genes do sistema de secreção tipo IV (patogenicidade). Desde esse momento, estas zonas de plasticidade foram reclassificadas como transposões encontrados em estirpes de *H. pylori* em todo o mundo (Kersulyte *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2014).

2.1.3 Cultura de *H. pylori* no laboratório

H. pylori é uma bactéria fastidiosa com um crescimento lento, demonstrando um comportamento acidófilo facultativo, ou seja, é incapaz de crescer em condições completamente anaeróbicas. Possui um crescimento ótimo com 2 a 5% de O₂ e 8 a 10% de CO₂ em ambiente húmido, com pH ótimo de 5,5 a 37°C (Park *et al.*, 2011; Jiang & Doyle, 1998).

Tem sido possível isolar esta bactéria utilizando meios selectivos impregnados com antibióticos que impedem o crescimento de outros microrganismos contaminantes (Jiang & Doyle, 1998). *H. pylori* cresce em meios sólidos e líquidos. Em meios sólidos, requer um meio rico em nutrientes contendo 10% de sangue de cavalo, boi ou ovelha ou soro fetal bovino; as bases mais usadas são “Columbia”, “Mueller Hinton” ou *Brain Heart Infusion*; e em meios líquidos é cultivável em *Brain Heart Infusion* ou *Brucella* suplementados com 10% de soro fetal bovino (Ndip et al., 2003); (Jiang & Doyle, 2002).

2.2. Epidemiologia de infecção por *H. pylori*

A revisão sistemática mais abrangente sobre a prevalência mundial de infecção por *H. pylori* mostra que, em 2015, aproximadamente 4,4 mil milhões de indivíduos em todo o mundo estavam infectados por *H. pylori* (Hooi et al., 2017).

Esta infecção, constitui um grande problema de saúde pública em todo o mundo, pois as taxas globais de infecção mostram que mais de 50% da população mundial encontra-se infectada por *H. pylori*, e que as prevalências mais elevadas se encontram em África, América Latina e Ásia (Hooi et al. 2017;Thung et al., 2016).

A prevalência desta infecção varia amplamente de acordo com a região geográfica e a fisiologia do hospedeiro (figura 3) (Ndip et al., 2003). Estudos realizados em diferentes países africanos, reportam uma prevalência de aproximadamente 79,1%. E, particularmente, as maiores taxas de prevalência de infecção são notáveis em países da África subsaariana. Nesses países, as altas taxas de prevalência de infecção estão associadas a baixo nível socioeconómico, superlotação, e precárias condições de saneamento do meio (Smith et al., 2019; Hooi et al., 2017).

Geralmente, as pessoas adquirem esta infecção durante a fase de infância e permanecem assintomáticas, mas quando a infecção não for tratada pode evoluir de gastrite, úlceras pépticas ou o cancro gástrico (Sugano et al., 2015).

Em 2012, cerca de 15% dos casos de cancro em todo o mundo foram associados a agentes infecciosos entre os quais *H. pylori* foi o agente patogénico mais predominante (Martel et al., 2012; Plummer et al., 2016). As elevadas taxas globais de infecção que levam a úlceras gástricas, dispepsia e neoplasias em alguns casos, demonstram a importância deste agente patogénico para a saúde e bem-estar da humanidade e a necessidade de envidar esforço na sua erradicação (Plummer et al., 2016).

Poucos dados disponíveis sobre esta infecção em Moçambique, indicam uma prevalência alarmante, e isso é evidenciado pelos estudos conduzidos por Modcoicar *et al.*, (2011) e Carrilho *et al.*, (2009) que reportaram prevalência de infecção que varia entre 84 a 94,5%, isso em pacientes com dispepsia. No entanto, embora existam poucos estudos sobre o assunto em Moçambique, o Ministério da Saúde, através do Plano Nacional de Controlo do Cancro 2019-2029, reconhece *H. pylori* como uma das infecções evitáveis e tratáveis, e que podem contribuir para a crescente carga de cancro que se verifica na África Subsaariana (MISAU, 2019).

2.2.2 Propagação global de infecção por *H. pylori*

H. pylori e o hospedeiro humano têm estado intimamente relacionados ao longo da sua história evolutiva, esta associação remonta a mais de 100.000 anos e, desde então *H. pylori* co-evoluíu com o hospedeiro humano (Suzuki *et al.*, 2016). Têm sido propostas hipóteses de que, em África, antes da Idade da Pedra, *H. pylori* já vinha infectando humanos, o que significa que a infecção causada por esta bactéria começou muito antes das migrações humanas (Moodley, 2016; Moodley *et al.*, 2012).

As estirpes de *H. pylori* isoladas em diferentes regiões geográficas do mundo, mostram a variabilidade genética que tiveram através de ocorrências das migrações humanas, por isso, esta bactéria tem sido utilizada como um marcador fiável para a migração humana devido à essa diversidade genética (Moodley & Linz, 2009; Suzuki *et al.*, 2016).

Segundo Moodley & Linz, (2009), informação sobre a co-evolução entre *H. pylori* e o homem tem sido conseguida graças à tipificação genómica (tipagem por MLST) das sequências de DNA de um conjunto de sete de genes (*House keeping genes*) desta bactéria, nomeadamente: *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureA*, e *yphC*, e, mais recentemente, utilizando a sequência genómica da bactéria (Muñoz-Ramirez *et al.*, 2021).

A tipagem por MLST visa padronizar a variabilidade nas sequências de DNA em microrganismos patogénicos, afim de comparar os dados das as diferentes regiões do mundo (Backert & Yamaoka, 2016). Ou seja, com base em análise dessas sequências, é possível saber a origem das diferentes estirpes e mostrar seus agrupamentos filogenéticos baseados na sua origem (Thorell *et al.*, 2017).

Até hoje, foram definidos globalmente sete grandes populações de *H. pylori* tal como mostra a Figura 4, elas incluem, *hpAfrica2*, *hpAfrica1*, *hpNEAfrica*, *hpSahul*, *hpEuropa*, *hpAsia2*, e *hpEastAsia* (Moodley, 2016).

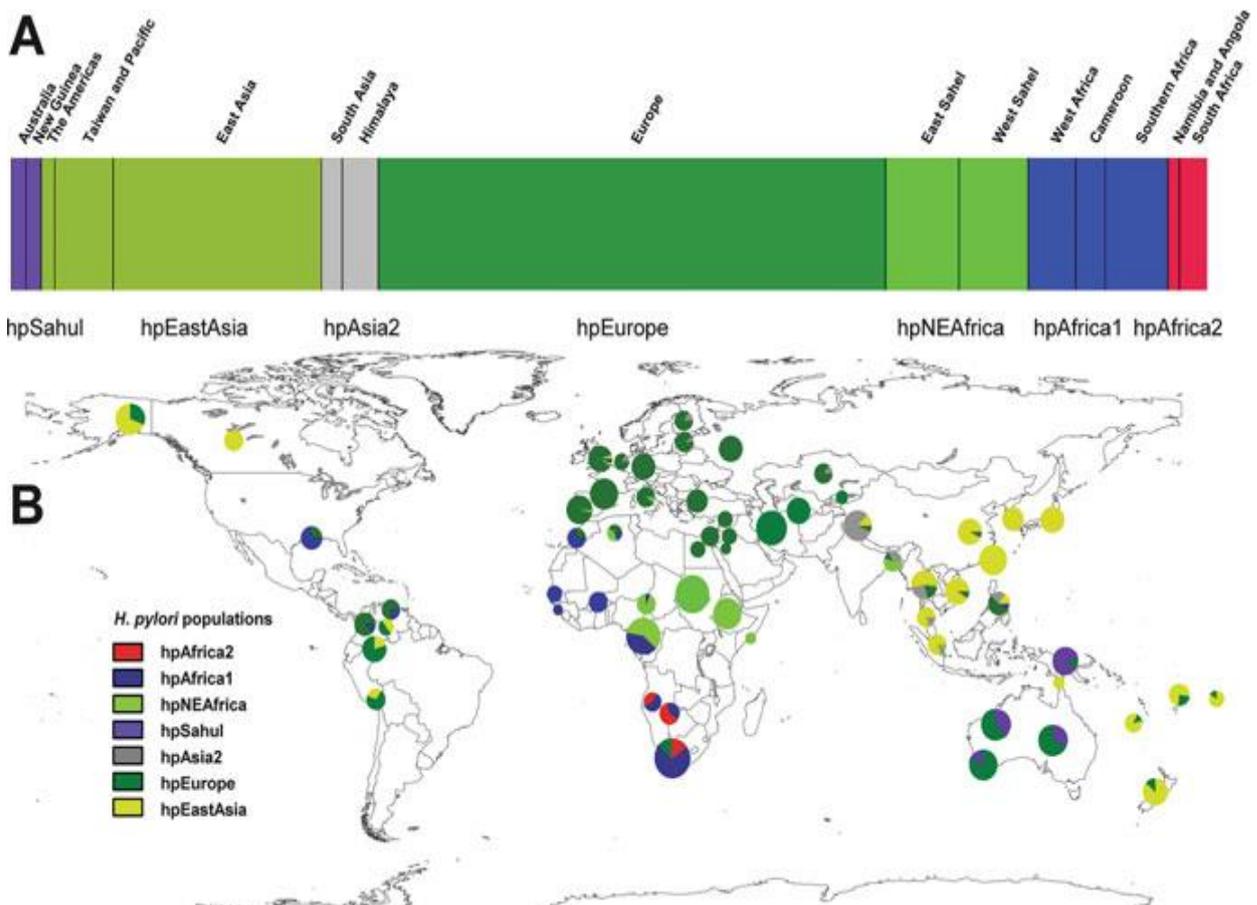


Figura 4: Visão global da distribuição genética das populações de *H. pylori*. **A**- Estrutura global da população de *H. pylori*, **B**- Estrutura geográfica mundial das populações de *H. pylori*. Fonte: (Moodley, 2016).

2.2.3 Vias de transmissão de *H. pylori*

Globalmente, tem-se registado grandes avanços no estudo do impacto de *H. pylori* na saúde humana, mas as suas vias de transmissão continuam a ser alvo de controvérsia. Portanto, em diferentes estudos epidemiológicos e microbiológicos realizados, foram propostas as várias vias de transmissão mais importantes, nomeadamente: fecal-oral, oral-oral e gastro-oral (Favian Bayas-Morejón *et al.*, 2019).

À estas vias foram acrescentadas outras não menos importantes como por exemplo a transmissão iatrogénica e a transmissão ambiental, elas são vias alternativas de transmissão desse agente patogénico (Camargo & Boschian, 2012; Vale & Vítor, 2010).

Ainda, existem três possíveis vectores que foram sugeridos para manter a forma viável desta bactéria que são: água, alimentos e animais. Entretanto, o homem e alguns primatas são reservatórios naturais para esta bactéria (Favian Bayas-Morejón *et al.*, 2019).

A infecção por *H. pylori* é geralmente a adquirida na infância, e a transmissão intrafamiliar de pessoa para pessoa parece ser a forma mais comum da sua propagação (Pérez-Pérez *et al.*, 2003). Contudo, ainda não está claro o porque é que a colonização não ocorre em algumas pessoas, mas noutras persiste para sempre (Kim, 2016).

Muitos estudos afirmam que as vias de transmissão podem ser diferentes dependendo do nível de desenvolvimento de cada país, isso porque os factores como idade exposta, etnia e estatuto socioeconómico variam de país para país (Raymond *et al.*, 2004; Kim, 2016).

No passado, a transmissão fecal-oral era considerada como a principal forma propagação desta bactéria nos países em desenvolvimento, ou seja, a transmissão ambiental, água potável e os alimentos contaminados, poderiam desempenhar um papel importante na infecção (Khedmat *et al.*, 2013). No entanto, à medida que surgiram mais evidências, a transmissão fecal-oral tornou-se uma via menos frequente, embora permaneça como uma via possível de transmissão da infecção (Harris *et al.*, 2016).

Para além disso, nesses países a transmissão parental tem sido frequentemente relatada como a via que facilita a propagação da bactéria, pois há evidências que mostram que uma mãe infectada constitui um factor de risco para os seus filhos e a sua família no geral (Kim, 2016). Portanto, estudos realizados em países africanos mostraram que a transmissão é mais frequente entre parentes próximos e indivíduos que vivem na mesma casa (Kim, 2016; Kivi *et al.*, 2003).

A transmissão parental tem sido relatada também em países desenvolvidos, pois existem estudos que provam que as mães infectadas têm maior possibilidade de transmitirem bactérias ao seu filho através de secreções bucais (Eusebi *et al.*, 2014). E, avós que tomam conta dos seus netos são consideradas também como factor de risco para a transmissão contínua da infecção aos demais membros da família. Contudo, a transmissão oral-oral, especialmente de mãe para filho, é a principal via através da qual as crianças ficam infectadas (Rowland *et al.*, 2006 ; Kim, 2016).

A infecção por *H. pylori* em crianças é preocupante e carece de uma atenção redobrada, pois em alguns casos pode levar a inflamação da mucosa gástrica podendo causar baixa secreção, o que pode resultar numa mucosa gástrica debilitada e susceptível às outras infecções entéricas. Portanto, essa pode ser uma das causas da diarreia e malnutrição que se verificam em crianças de países em desenvolvimento (Thomas, 2004).

2.3 Patogénese e marcadores de virulência do *H. pylori*

A infecção começa quando *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica, e a sua persistência baixa o nível de produção de ácido no estômago levando a uma infecção aguda, o que possivelmente pode resultar numa infecção crónica (Suerbaum & Michetti, 2002). Geralmente, a infecção crónica é assintomática em muitos hospedeiros, mas em alguns casos pode evoluir para doenças gastrointestinais graves (Ansari & Yamaoka, 2019; Sebastian & Pierre, 2002).

A patogenicidade do *H. pylori* depende principalmente de três factores: virulência da estirpe, resposta imunitária do hospedeiro e factores ambientais. Geralmente, a resposta imunitária serve para proteger o hospedeiro, mas em alguns casos pode agravar a infecção (Uotani *et al.*, 2015; Dunne, 2014). Os factores ambientais e comportamentais como por exemplo o tabagismo, dieta, álcool, stress, condições de vida e o uso excessivo de anti-inflamatórios, constituem factores de risco que podem agravar a infecção (Ddine *et al.*, 2012).

2.3.1 Marcadores de virulência do *H. pylori*

Para que *H. pylori* consiga invadir o seu hospedeiro e causar infecção, precisa de activar os seus factores de virulência, que podem ser divididos em: factores de invasão, factores de adesão, factores de colonização e factores de patogenicidade. Porém, os últimos factores têm sido mais estudados devido ao papel que exercem nas doenças gastrointestinais graves (Chang *et al.*, 2018; Sebastian & Pierre, 2002).

Existem factores que são expressos por todas as estirpes de *H. pylori* como por exemplo: urease (*UreA* e *UreB*), flagella (*flaA* e *flaB*) e proteínas de adesão que ajudam na colonização e sobrevivência do patógeno dentro do estômago (Alterthum, 2015). A urease neutraliza o pH ácido do estômago e reduz a função protectora das mucinas gástricas permitindo com que a bactéria consiga deslocar livremente graças aos seus flagelos e ligar-se às células epiteliais para começar com a colonização (figura 5) (Alterthum, 2015; Celli *et al.*, 2009).

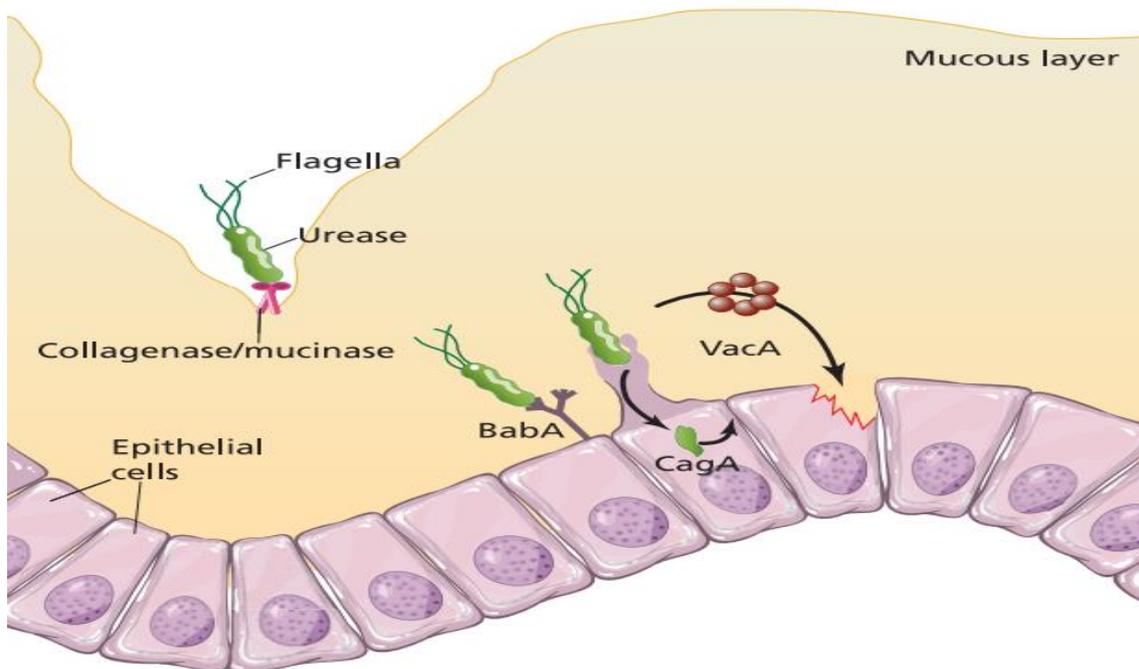


Figura 5: Proteínas que o *H. pylori* utiliza para colonizar o estômago do hospedeiro. - CagA – Proteína codificada pelo gene *cagA* (*cytotoxin associated gene*), VacA - proteína codificada pelo gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin gene*), BabA- proteína codificada pelo gene *babA* (*blood group antigen adhesin gene*) (Lima & Rabenhorst, 2009; Fleming, 2007).

Quando *H. pylori* se instala no estômago, são activados os factores de adesão que incluem os genes *BabA*, *SabA* e *OipA*, esses factores promovem adesão ao epitélio gástrico (Lemos, 2020). O hospedeiro para poder se defender a infecção, elabora uma resposta imunológica que inclui o desenvolvimento de anticorpos específicos como por exemplo as imunoglobulinas G e A (IgG e IgA) que visam os antígenos de *H. pylori* (proteínas da membrana, urease, flagelos e lipopolissacáridos). Contudo, *H. pylori* é conhecido pela sua capacidade de causar infecções crónicas de longa duração, por vezes a resposta imunológica do hospedeiro pode não ser adequada para o erradicar (Uotani *et al.*, 2015).

2.3.2 A ilha de patogenicidade (*cag-PAI*)

A ilha de patogenicidade (*cag-PAI*) corresponde a um fragmento cromossómico composto por muitos genes, entre os quais se destacam o gene *cagA* (*cytotoxin associated gene*), que codifica para a proteína CagA; o gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin gene*), que codifica para a proteína VacA (Alterthum, 2015; Sebastian & Pierre, 2002).

2.3.3 *vacA*

VacA é uma das principais toxinas que *H. pylori* possui, com a capacidade de induzir a vacuolização intracelular, sua presença associa-se epidemiologicamente com lesão da

mucosa gástrica e úlcera péptica. A proteína VacA é sintetizada como uma pré-toxina com peso molecular de aproximadamente 140kDa, mas depois sofre um processo proteolítico e fica uma toxina activa de 88 kDa (Foegeding *et al.*, 2016; Alterthum, 2015).

A proteína VacA, é um marcador importante que confere a resistência do *H. pylori* contra as respostas imunitárias do hospedeiro, ela reduz a resposta imunitária e induz a vacuolização nas células epiteliais levando à apoptose, e impedindo a via de sinalização para a activação das células T (Yahiro *et al.*, 2015).

O gene *vacA* está presente em todas as estirpes de *H. pylori*, mas os seus alelos podem variar em duas regiões nomeadamente: região média com dois alelos (m1, m2) e a região do sinal (s1, s2). Amostras tipo m1 associam-se a lesão do epitélio gástrico do que as do tipo m2, e a variedade s1 raramente se associa as doenças ulcerosas, pois, de uma forma geral, a sua presença não tem sido frequente (Alterthum, 2015).

A estrutura final do gene *vacA* resulta da combinação dos alelos da região média e região sinal do gene, e a combinação desses alelos associa-se a estirpes mais virulentas e doenças gástricas graves (Foegeding *et al.*, 2016). Assim, as amostras que possuem a combinação alélica do tipo s1/m1 são mais virulentas, enquanto que as amostras que possuem a combinação alélica do tipo s1/m2 têm uma virulência moderada e outras combinações patogénicas incluem s2/m1 e s2/m2, mas são pouco virulentas quanto comparadas com as combinações anteriores (Alterthum, 2015, Rhead *et al.*, 2007).

2.3.4 *cagA*

O gene *cagA* um marcador da ilha de patogenicidade *cag*-PAI, e constitui uma região genómica de aproximadamente 40kb contendo 30 genes (Noto & Peek, 2012). O gene *cagA* está presente em 50 - 70% dos isolados ocidentais e em 90% das estirpes isoladas na Ásia Oriental, e tem sido associado a doenças gastroduodenais e carcinoma gástrico (Lima & Rabenhorst, 2009).

Cag-PAI para além de codificar proteína CagA, codifica também o componente do T4SS responsável pelo fornecimento da proteína CagA no citoplasma da célula hospedeira. Uma vez no interior das células epiteliais, a proteína CagA é fosforilada por múltiplos integrantes da família das quinases, que atuam sobre os resíduos de tirosina (denominada EPIYA) presentes na região C-terminal da proteína (Alterthum, 2015).

Esta fosforilação permite *cagA* se unir a tirosina e ativar a tirosina fosfatase SHP-2, induzindo mudanças morfológicas por rearranjos do citoesqueleto. Sabe-se que a SHP-2 está implicada na regulação das respostas celulares, incluindo a proliferação, morfogénese e motilidade celular. Assim sendo, com a sua activação inicia sinalização das células hospedeiras para produzirem Interleucina-8 (IL-8), provocando uma resposta inflamatória severa (Lemos, 2020). Os níveis de produção da IL-8 estão directamente relacionados com a gravidade das doenças gastrointestinais nos pacientes infectados por *H. pylori* (Lemos, 2020; Alterthum, 2015).

As estirpes de *H. pylori* positivas têm sido agrupadas em dois tipos dependendo da presença ou não da ilha de patogenicidade e da secreção de proteína CagA e VacA. Estirpes do tipo I, são aquelas que apresentam todos estes factores e, são essas que induzem a secreção de IL-8, essas estirpes são associadas a úlcera péptica, gastrites atróficas e adenocarcinoma (Yamazaki *et al.*, 2005). Enquanto as estirpes do tipo II, embora tenham o gene *cagA*, elas não o expressam. Porém, apresentam o gene *vacA*, mas o mesmo pode estar silenciado. Portanto, as estirpes de tipo II têm virulência atenuada comparativamente às do tipo I (Miernyk *et al.*, 2011; Yamazaki *et al.*, 2005).

Estirpes que expressam o gene *cagA* podem ser classificadas com base no local de fosforilação de resíduos de tirosina (EPIYA). Existem quatro peptídeos EPIYA diferentes nomeadamente: A, B, C e D, que se diferenciam entre si pela sequência de aminoácidos adjacente à sequência EPIYA (Alterthum, 2015). Os peptídeos EPIYA apresentados por cada estirpe, determinam a sua origem geográfica. Assim, os isolados de países ocidentais possuem comumente EPIYA-A, EPIYA-B seguidas de um a três peptídeos de EPIYA-C, e a maioria dos isolados do oriente, (especificamente na região Este da Ásia), apresentam EPIYA-A, EPIYA-B seguida em vários casos por EPIYA-D que são consideradas mais virulentas e carcinogénicas (Alterthum, 2015; Lemos, 2020).

2.3.5 *dupA*

O gene *dupA* (*duodenal ulcer promoting gene A*) é também um importante marcador da virulência do *H. pylori* associado à úlcera duodenal. O gene é localizado na chamada região de plasticidade (*plasticity region*) do genoma bacteriano (Lu *et al.*, 2005). A presença de *dupA* é associada à infiltração de neutrófilos e produção de interleucina-8 (IL-8) por células

epiteliais, por isso, é considerado como sendo um indicador que contribui para o risco de úlcera duodenal em pacientes infectados pelo *H. pylori* (Wang *et al.*, 2015; Hussein, 2010).

O gene *dupA* é classificado em dois subtipos principais, nomeadamente: o *dupA* funcional e o *dupA* não funcional. O *dupA* funcional tem um *Open Reading Frame* (ORF) dentro do *jhp0917-19* e é designado por *dupA1*, e o *dupA* não funcional tem um codão de paragem precoce para trincar o ORF, é por sua vez designado por *dupA2* (Romo-González *et al.*, 2015). O gene *dupA* tem sido reportado como sendo mais frequente em estirpes ocidentais do que em estirpes orientais. (Yamaoka, 2012). Globalmente, a prevalência de gene *dupA* em pacientes com gastrite é superior a 40% (Yamaoka, 2012; Hussein, 2010).

2.4 Manifestação clínica da infecção por *H. pylori* e doenças associadas

Geralmente a infecção é adquirida na infância e sua persistência causa uma hipocloridria transitória que raramente é diagnosticada e que pode levar à gastrite em pessoas infectadas. Porém, 80 a 90% de pessoas infectadas permanecem assintomáticas (Suerbaum & Michetti, 2002).

Para além da gastrite, a infecção tem sido associada a várias doenças gastrointestinais graves (Ladeira *et al.*, 2003), tais como a úlcera péptica, cancro gástrico, figura 6 (Iwańczak *et al.*, 2017). Portanto, a intensidade e distribuição da inflamação induzida pelo *H. pylori*, são factores que diferenciam essas doenças associadas à infecção persistente. Por outro lado, a diversidade genotípica das estirpes de *H. pylori* e a resposta imunológica do hospedeiro, são factores contribuem na evolução dessas patologias, e isso já foi comprovado cientificamente (Iwańczak *et al.*, 2017).

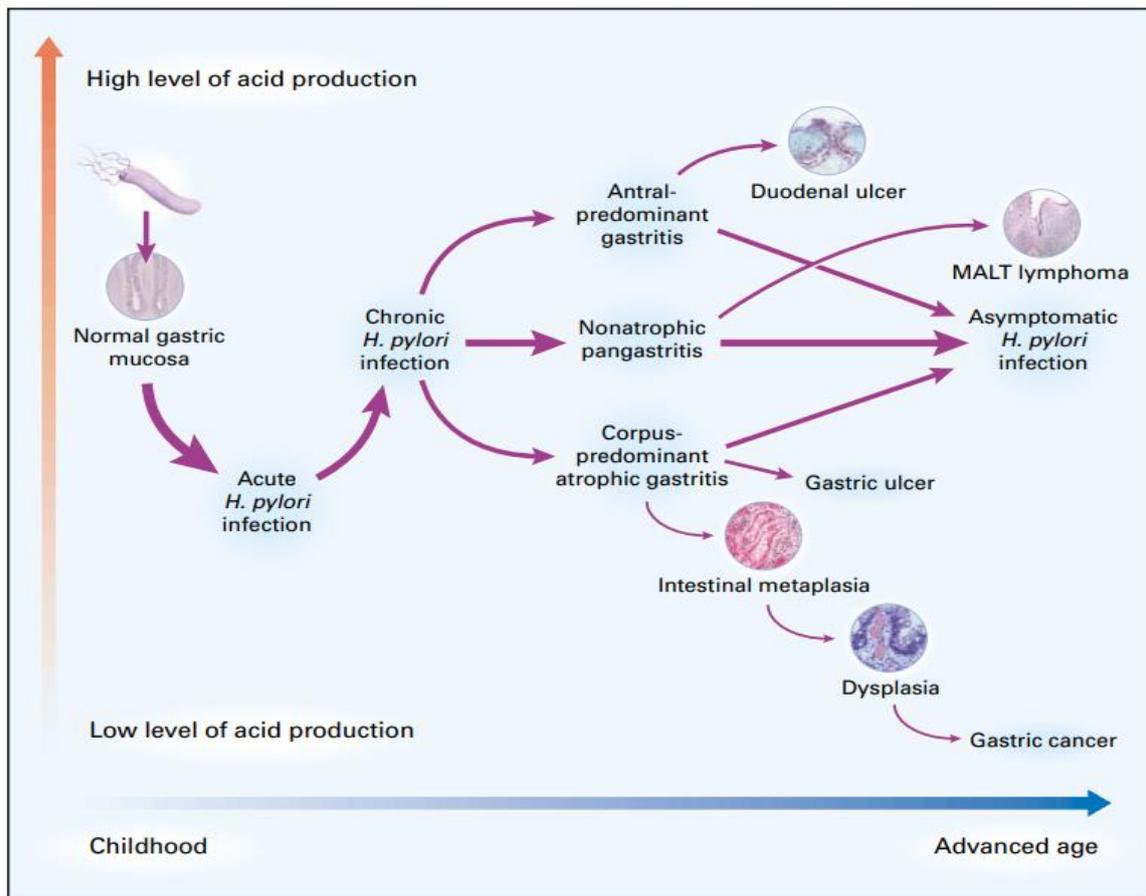


Figura 6: Infecção causada por *H. pylori* e doenças gástricas associadas. Fonte: (Suerbaum & Michetti, 2002).

2.4.1 Dispepsia

Dispepsia é um desconforto centrado na parte superior do abdómen que inclui dor epigástrica ou ardor e plenitude pós-prandial ou saciedade precoce. É uma das complicações gastrointestinais mais comuns que afecta a qualidade de vida e um problema comum nos cuidados primários de saúde (Bytzer & Talley, 2017).

A dispepsia tem origem multifactorial, porém, acredita-se o *H. pylori* seja uma das causas dessa condição, pois é a principal queixa entre as pessoas infectadas com *H. pylori* (Fleming, 2007), e a evidência da associação entre a infecção por *H. pylori* e a dispepsia tem vindo a aumentar (Ford *et al.*, 2020; Malfertheiner *et al.*, 2017). Contudo, ainda se desconhece por que razão a maioria dos indivíduos infectados pelo *H. pylori* não apresenta a sintomatologia dispéptica, enquanto alguns deles apresentam essa sintomatologia (Ford *et al.*, 2020; Bytzer & Talley, 2017).

2.4.2 Gastrite

A gastrite resulta de um processo inflamatório do revestimento do estômago associado a lesão da mucosa, pode ser agudo ou crónico, e as causas mais comuns são: intoxicação alimentar aguda (em particular por toxinas bacterianas), outras infeções como por exemplo infeção causada pelo *H. pylori*, álcool (especialmente em concentrações elevadas e quando o estômago está vazio) entre outros (Lauwers, 2010; Watari, 2014).

Histologicamente a gastrite é classificada como sendo aguda, quando o infiltrado inflamatório predominante é composto por neutrófilos, ou crónica, quando o infiltrado inflamatório é composto por linfócitos e plasmócitos (Mihály *et al.*, 2014). Portanto, a maioria dos pacientes infectados com *H. pylori* desenvolvem gastrite aguda que evolui para gastrite crónica em muitos casos, o que comprova uma associação entre a infeção pelo *H. pylori* e a gastrite crónica (Watari, 2014).

São conhecidos três tipos de gastrite crónica nomeadamente: pangastrite que predomina no antro e no corpo do estômago; gastrite antral que está associada a pouca ou nenhuma atrofia e úlceras duodenais e gastrite atrófica que resulta da inflamação persistente com hipocloridria ou acloridria. Essas alterações na mucosa gástrica fazem com que a bactéria tenha a facilidade de colonizar o antro e o corpo do estômago, podendo dessa forma evoluir para metaplasia e mais tarde para cancro gástrico (Watari, 2014).

2.4.3 Úlcera péptica

Úlcera péptica, refere-se a uma perda de tecido da mucosa e das camadas mais profundas do estômago e do duodeno. É o termo genérico de úlceras gástricas e duodenais associadas à hipersecreção de pepsina e ácido clorídrico, mas isto não significa que todas as úlceras ocorram da mesma forma. A úlcera péptica ocorre maioritariamente na pequena curvatura estômago e na parte proximal do duodeno, podendo também ocorrer na zona inferior do esófago, na zona distal do duodeno ou no jejuno (Ramakrishnan & Salinas, 2007).

Os sintomas da úlcera péptica incluem a dor persistente e dispepsia em cerca de 80% de pacientes. A dor é muitas vezes localizada e ocorre, preferencialmente, quando o estômago está vazio (Arakawa, 2012).

São conhecidos factores que condicionam o aparecimento de úlceras pépticas, nomeadamente a infeção pelo *H. pylori* e o uso de anti-inflamatórios não esteroides

(AINEs). Para além disso, sabe-se que o tabaco, o álcool e a dieta rica em alimentos picantes reduzem a proteção da mucosa gástrica, podendo levar ao aparecimento de úlceras, por isso, são também considerados como sendo factores de risco para o desenvolvimento de úlceras pépticas (Arakawa, 2012).

Existe uma clara associação entre a infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de úlcera péptica (Watari, 2014), pois a taxa de prevalência de úlcera péptica causada por *H. pylori* permanece elevada em alguns países orientais e ocidentais, podendo alcançar uma taxa de 24% (Li *et al.*, 2010).

2.4.4 Cancro gástrico

O cancro gástrico é o segundo tipo de cancro mais comum no mundo. Existem diferentes tipos de cancro do estômago, dependendo do tipo de células de onde o cancro ocorre. Os cancros que se formam nas glândulas secretoras do estômago são chamados adenocarcinomas; estes são a forma mais comum, representando mais de 90% de todos os cancros do estômago e estão fortemente associado à infecção por *H. pylori* (Arfaoui *et al.*, 2009; Herrero *et al.*, 2014). Outros tipos são os sarcomas (cancros do tecidos da parede do estômago), e os linfomas gástricos, que se formam em certas células imunológicas (células B e T) mucosa gástrica (Fleming, 2007).

O desenvolvimento do cancro gástrico é um processo complexo que está associado a vários factores, nomeadamente: factores imunológicos do hospedeiro, infecção por *H. pylori*, excesso de álcool e tabaco, e entre outros. Os factores imunológico do hospedeiro e infecção por *H. pylori*, são dois factores que exercem um papel crucial na carcinogénese, e que actuam de forma conjunta para produzir as alterações cancerígenas no hospedeiro (Fleming, 2007).

O hospedeiro activa o seu sistema imunológico libertando substâncias que que irão combater a infecção, e que podem de alguma forma causar danos no DNA das células do epitélio do estômago. *H. pylori* por sua vez, com base no nos seus mecanismos de virulência pode lesionar ou matar directamente as células que revestem o estômago, levando ao aumento da taxa de produção de células no tecido e uma diminuição da taxa de morte celular (Ladeira *et al.*, 2003).

A estirpe de *H. pylori* a que o hospedeiro é exposto, pode influenciar o risco de desenvolvimento de cancro gástrico. Portanto, as estirpes de *H. pylori* que expressam

proteínas VacA e CagA, causam maiores danos aos tecidos do que aqueles que não as expressam. Estas proteínas sinalizam o sistema imunológico do hospedeiro em que há uma invasão em curso, e como resultado são formados os neutrófilos e macrófagos no tecido para combater a infecção (Yamaoka, 2012; Fleming, 2007).

Os macrófagos e neutrófilos produzem uma série de substâncias destrutivas para as células vizinhas, e que podem causar mutações no DNA dessas células levando à perda de alguns genes como por exemplo genes supressores tumorais, e daí activam-se oncogenes (Fleming, 2007).

A destruição de células no tecido do estômago resulta numa condição conhecida como atrofia gástrica que pode progredir para outro estado conhecido como metaplasia intestinal, no qual a função das células epiteliais que revestem o estômago torna-se desorganizada. À medida em que a metaplasia se agrava, as células tornam-se mais desordenadas e acabam por atingir um estado chamado displasia, uma condição mais perigosa em que as células não acompanham normalmente a função celular e começa crescimento excessivo, invasão, e propagação de células malignas (Fleming, 2007; Ladeira *et al.*, 2003).

2.4.5 Linfoma Gástrico do tipo MALT

Linfoma gástrico do tipo MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) constite essencialmente numa acumulação de células imunológicas que se distribuem pelo epitélio do estômago de indivíduos com infecção persistente causada por *H. pylori* (Fleming, 2007). Com a presença do *H. pylori*, o sistema imunológico do hospedeiro activa a inflamação de tecido do estômago que leva às alterações nos linfócitos (células T ou B) e cria o desequilíbrio na divisão celular e apoptose de tal maneira que, os linfócitos começam a acumular-se de forma anormal originando assim o linfoma MALT (Fleming, 2007)

Acredita-se que, para além do adenocarcinoma gástrico, o linfoma MALT seja também o mais destacado em pacientes previamente infectados por esta bactéria , pois há evidencias que mostram que o linfoma MALT é encontrado frequentemente em pacientes adultos infectados por *H. pylori*, e sua taxa varia de 50 a 100% nesses pacientes (Hu *et al.*, 2016).

2.4.6 Outras doenças (doenças extragástricas)

Para além de *H. pylori* ser um patógeno que tem a capacidade de causar doenças gastrointestinais graves, tem sido associado também à varias doenças extragástricas tais

como: doenças autoimunes, anemia ferroidiopática, resistência à insulina, síndrome metabólica, diabetes mellitus entre outras (Zendehdel & Roham, 2019). E, sugere-se que, em paciente infectados, *H. pylori* pode aumentar o risco de síndrome coronariana aguda, doença cerebrovascular e doença neurodegenerativa (Quintairos *et al.*, 2020).

Portanto, *H. pylori* manifesta-se como sendo um factor de risco importante para o desenvolvimento das doenças extragástricas. Porém, é preciso que se façam estudos contínuos para claramente se explicar a relação existente entre essas doenças e a infecção por *H. pylori*, pois a maior parte dessas teorias são assuntos muito controversos (Quintairos *et al.*, 2020).

2.5 Métodos de diagnóstico de *H. pylori*

Vários métodos têm sido usados na prática clínica para diagnosticar a infecção por *H. pylori*. A detecção de *H. pylori* pode ser feita por métodos invasivos e não-invasivos (Czinn, 2005; Fleming, 2007).

Segundo Dunn *et al.*, (1997), em caso de suspeita de infecção, existem vários factores que podem conduzir a escolha do teste adequado a ser usado para o diagnóstico de *H. pylori*, nomeadamente o quadro clínico do paciente, a disponibilidade e o custo do teste, e sensibilidade e especificidade do teste.

O método invasivo é geralmente recomendado para pacientes cujos sintomas sugerem um motivo de muita preocupação, como por exemplo os sintomas que conduzem à suspeita de uma úlcera grave que incluem: a idade avançada, um historial longo de infecção, uma perda de peso constante, fezes negras, anemia, e dores de estômago graves (Cosgun *et al.*, 2016).

Os principais métodos não-invasivos são: teste respiratório da ureia marcada, a serologia e pesquisa de antígeno nas fezes. Os métodos invasivos incluem o teste rápido de urease, exame histológico, cultura e a reacção em cadeia de polimerase. Portanto, os testes invasivos são baseados na endoscopia digestiva alta, ou seja, eles requerem uma biópsia gástrica para serem realizados. (Dunn *et al.*, 1997).

2.5.1. Resumo de diferentes métodos usados para o diagnóstico de *H. pylori*

a) Métodos não – invasivos

Tabela 1: Resumo de métodos não – invasivos

Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Aplicação do método
Respiratório da Ureia (UBT)	96 - 97	93 - 96	De fácil execução; pode ser usado no diagnóstico precoce e na avaliação da resposta terapêutica.
Serológico	55,6 - 100	58,7 - 96,8	Barato e de fácil execução; não discrimina uma infecção activa e não pode ser utilizado para a monitorização da erradicação.
Pesquisa de antigénio	83	87 - 94	Caro e fácil de implementar; pode ser usado antes e depois do tratamento.

b) Métodos invasivos

Tabela 2: Resumo de métodos invasivos

Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Aplicação do método
Rápido de urease (TRU)	80 - 95	93 - 96	Simple e rápido; em alguns casos pode apresentar resultados falsos (negativos ou positivos). Permite verificar a erradicação da infecção, mas não é recomendado para a monitorização terapêutica.
Histologia	90	97	Eficiente, avaliando também o estado geral da mucosa gástrica. Requer pessoal técnico qualificado. A sua sensibilidade pode ser diminuta em pacientes que estão a fazer o tratamento com antibióticos ou IBP's.
Cultura*	60	98 - 100	Detecta a presença de <i>H. pylori</i> , avalia a susceptibilidade microbiana. Requer pessoal qualificado; caro e pouco utilizado.
PCR	97 - 100	98	Caro, rápido, simple e requer pessoal técnico qualificado. Permite avaliar a susceptibilidade a alguns antibióticos.

As duas tabelas (tabela 1 e tabela2) foram compiladas com base em Lee & Kim, (2015); Favian Bayas-Morejón *et al.*, (2019) e Chahuán *et al.*, (2020).

* Cultura é o método de referência para o diagnóstico de infecção por *H. pylori*. (Fleming, 2007; Mégraud & Lehours, 2007). Este método para além de permitir a identificação de *H. pylori*, permite também estudar a susceptibilidade do patógeno aos antibióticos, facilitando a orientação do tratamento, especialmente em pacientes com falência terapêutica (Huh & Kim, 2018). Na falta deste método, recomenda-se o uso de métodos moleculares, como por exemplo a reacção em cadeia da polimerase (PCR) que permite a detecção do patógeno e avaliação da diversidade genética das estirpes de *H. pylori* e os seus genes de resistência aos antibióticos, principalmente quando a PCR está associada à outros métodos moleculares como por exemplo a sequenciação (Sanger *et al.*, 1977; Wolk *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2019).

2.6 Tratamento do *H. pylori*

Uma boa gestão da erradicação da infecção envolve três etapas nomeadamente, diagnóstico, tratamento e confirmação da cura (Romano & Cuomo, 2004). O tratamento bem sucedido de qualquer infecção consiste na completa erradicação de seu agente etiológico; portanto, um teste negativo após o tratamento indica que, o agente etiológico foi completamente erradicado (Mathias, 2014).

Quando é diagnosticada uma infecção por *H. pylori*, esta é geralmente tratada com uma terapia tripla, que consiste em combinar dois ou mais antibióticos e um inibidor da bomba de prótons (IBP), que são administrados duas vezes por dia durante 7 a 14 dias (Crowe, 2019). E, se a estirpe causadora de infecção não for resistente aos antibióticos será totalmente eliminada, pois este regime erradica com sucesso mais de 90% das infecções em que é utilizado (Fleming, 2007).

Os antibióticos usados para tratar esta infecção incluem, amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina entre outros. Geralmente são combinados dois antibióticos e um IBP por seguintes motivos: primeiro, para garantir que a bactéria não desenvolva resistência a um dos antibióticos durante o tratamento (Fleming, 2007), pois *H. pylori* pode facilmente resistir ao tratamento devido a frequente mutação que ocorre a nível do seu DNA, e que pode fazer com que ele escape à acção do antibiótico; segundo, porque o habitat preferencial do patógeno é o estômago e a maioria dos antibióticos não são estáveis num ambiente ácido, por isso aos antibióticos adiciona-se um IBP que irá diminuir o volume do ácido gástrico e aumentar a absorção e penetração dos antibióticos no local onde são mais necessários (Romano & Cuomo, 2004).

2.6.1 A descrição de alguns fármacos usados para erradicação do *H. pylori*

2.6.1.1 Inibidores da bomba de prótons

Os Inibidores da bomba de prótons (IBP) são medicamentos potentes amplamente utilizados no tratamento de doenças gastrointestinais, bem como na erradicação do *H. pylori*. Eles actuam sobre as células parietais gástricas bloqueando a enzima H⁺/K⁺ ATPase, e resultando na diminuição da produção de ácido clorídrico no estômago (Gunaratnam *et al.*, 2006; Huang & Hunta, 1996). Os IBP's comumente conhecidos incluem omeprazol, pantoprazol, esomeprazol lansoprazol e rabeprazol (Shah *et al.*, 2015; Cammarota *et al.*, 2012).

2.6.1.2 Amoxicilina

Amoxicilina é um antibiótico utilizado em combinação com outros na terapia tripla padrão. É um derivado da penicilina que pertence à classe dos beta-lactâmicos, esta classe de antibióticos age na biossíntese da parede celular bacteriana, eles se ligam à proteínas de ligação à penicilina (PBP) enzimas que são envolvidas na biossíntese da parede celular inibindo assim a sua síntese (Morcillo-Muñoz *et al.*, 2018). Amoxicilina continua a ser um antibiótico de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *H. pylori*, pois, globalmente a resistência à amoxicilina é baixa (Nishizawa & Suzuki, 2014; Nahar *et al.*, 2004).

A resistência de *H. pylori* à amoxicilina está relacionada com ocorrência de mutações no gene *pbp1A* que codifica a proteína PBP, e o aumento das mutações nesse gene pode levar a um aumento gradual da resistência à amoxicilina (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021; Rimbara *et al.*, 2008). As mutações que conferem resistência à amoxicilina ocorrem geralmente pela substituição de aminoácidos, e as mais estudados incluem A369T, V374L, S414R, L423F, V16I, V45I, T593A, G595(A/S), A599(T/P/V), D535N, S543 (H/R) (Tshibangu-Kabamba *et al.*, 2020; Gong & Yuan, 2018; Hu *et al.*, 2016).

2.6.1.3 Claritromicina

Claritromicina é um macrolídeo utilizado na terapia tripla padrão para o tratamento do *H. pylori*, o seu principal mecanismo de acção é inibir a síntese proteica através da sua ligação aos receptores localizados no ribossoma 50S, especialmente na região 23S rRNA em que ocorrem mutações associadas à resistência do *H. pylori* à claritromicina (Coelho *et al.*, 2013; Molina-Infante, 2014; Chung *et al.*, 2017).

Actualmente, regista-se uma eficácia terapêutica reduzida do regime que contém esse antibiótico. Provavelmente, pelo facto da claritromicina ter sido amplamente prescrito para o tratamento de outras doenças infecciosas, registou em várias regiões do mundo, uma taxa de resistência preocupante (Gong & El-Omar, 2021); e isso pode ser uma das causas que levou ao desenvolvimento de estirpes de *H. pylori* resistentes para esse antibiótico (Puah *et al.*, 2021).

Muitas mutações que conferem resistência do *H. pylori* à claritromicina tem sido descritas em muitos estudos, porém as que ocorrem frequentemente na região 23S rRNA são:

A2143G, A2142G e A2142C (Magalhães *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2020; Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021).

2.6.1.4 Fluoroquinolonas

Fluoroquinolonas são fármacos que actuam sobre a girase ligando-se à sua subunidade A e provocando quebras no DNA bacteriano, e como consequência há bloqueio da função desta enzima fundamental para a replicação do DNA bacteriano (Francesco, 2011; Furuta & Graham, 2010). A Levofloxacina é o exemplo de fluoroquinolonas comumente utilizada tanto na primeira linha assim como na segunda linha de tratamento, nas regiões em que há uma taxa de resistência à claritromicina superior a 15% e, tem sido utilizada em alguns casos como terapia de resgate na falência terapêutica com claritromicina (Otero *et al.*, 2018; Graham & Dore, 2016).

A levofloxacina é geralmente utilizada para tratar infecções de vias respiratórias superiores em muitas regiões do mundo, e isso pode ocasionar o desenvolvimento de estirpes de *H. pylori* resistentes à levofloxacina (Sugano *et al.*, 2015). Portanto, reportam-se altas taxas de resistência de *H. pylori* à esse antibiótico em algumas regiões da América Latina com uma taxa de resistência que pode chegar até 27% (Trespacios-Rangél *et al.*, 2016; Sugimoto *et al.*, 2015), por isso, nessas regiões para melhor erradicação de *H. pylori*, aconselha-se a adição do bismuto à terapia tripla para contrariar essa resistência (Malfertheiner *et al.*, 2017).

As mutações que conferem resistência à fluoroquinolonas ocorrem na região denominada *Quinolone Resistance Domain Region* (QRDR) da girase A (*gyrA*). Essas mutações impedem a ligação de antibióticos à girase, alterando o local de ligação de fluoroquinolonas no complexo de DNA-girase (Olmedo *et al.*, 2020).

2.6.1.5 Metronidazol

Metronidazol é um antibiótico que pertence à classe dos nitroimidazóis de largo espectro, utilizado para tratar infecções causadas por bactérias anaeróbicas ou microaerófilas, Gram-positivas ou Gram-negativas e protozoários (Moreth *et al.*, 2010). O metronidazol é utilizado para tratar infecções causadas por *H. pylori* como uma alternativa à claritromicina e amoxicilina, em doentes com alergia ou resistência a esses dois últimos antibióticos (Coelho *et al.*, 2013).

A acção bactericida do metronidazol depende da redução enzimática da NADPH nitroreductase (RdxA) e NADPH flavina-oxiredutase (frxA) para produzir radicais aniónicos como derivados nitrosos e hidroxilaminas, que levam à inibição da síntese de ácidos nucleicos quando ligados ao anel imidazol (Jones *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Os mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias ocorrem principalmente através de alterações na sequência de resíduos de aminoácidos nas proteínas codificadas pelos genes *rdxA* e *frxA* (Nishizawa & Suzuki, 2014). As mutações no gene *RdxA* que têm sido frequentemente estudados incluem A22S, E27Q/V, T31E, D59N, R90K, H97T/Y, P106S, S108A, A118S/T, R131K, e G189C (Gong & Yuan, 2018; Y. Hu *et al.*, 2016).

Em algumas regiões do mundo, a taxa de insucesso do tratamento de infecções por *H. pylori* é superior a 20% na terapia tripla em que metronidazol faz parte (Ghotaslou, 2015; Wu *et al.*, 2010). As altas taxas de resistência registam-se principalmente nos países Asiáticos, Africanos e em alguns países Europeus. Essas taxas elevadas de resistência registadas nestas regiões, resultam possivelmente da ampla utilização do metronidazol no tratamento de outras infecções, tais como infecções ginecológicas e parasitoses (Ghotaslou, 2015; Howden *et al.*, 2014)

2.6.1.6 Tetraciclina

Tetraciclina é um dos antibióticos mais usados para erradicação do *H. pylori*, ele tem efeito bacteriostático quando se liga à subunidade 30S do gene *16S rRNA* inibindo a síntese proteica e crescimento bacteriano (Atehortua Rendon *et al.*, 2020; Muñoz *et al.*, 2018).

Em *H. pylori*, é sabido que a resistência à tetraciclina pode acontecer devido a ocorrência de mutações no gene *16S rRNA*, no entanto, os mecanismos moleculares que determinam essa resistência têm sido menos explorados comparativamente aos de outros antibióticos (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021; Lauener *et al.*, 2019). As mutações comumente descritas são mutações duplas e pontuais que envolvem os nucleótidos 926 e 928 (AGA→TTC), eles incluem A926T, A928C, A926G, G927T, A926G e A928C (Atehortua Rendon *et al.*, 2020; Lawson *et al.*, 2005)

A taxa de resistência à tetraciclina varia de região para região, mas sob ponto de vista global ela é baixa com excepção de alguns países como por exemplo a Colômbia onde a taxa de resistência pode chegar aos 85,7% (Smith *et al.*, 2019; Ghotaslou, 2015; Yepes *et al.*, 2008).

2.6.1.7 Rifabutina

Rifabutina é um antibiótico de largo espectro derivado da rifamicina, geralmente utilizado em combinação com outros antibióticos para tratar infecções causadas por micobactérias como por exemplo a tuberculose pulmonar (Nightingale *et al.*, 1993). A rifabutina tem um efeito bactericida, ela se liga à subunidade β de RNA polimerase dependente de DNA codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a extensão da cadeia do RNA durante o início da transcrição (Mosaei & Zenkin, 2020; Mori *et al.*, 2016)

Em relação ao *H. pylori*, a rifabutina é usada em terapias de regime de resgate após a falência terapêutica com outros tratamentos (Nishizawa *et al.*, 2011; Gisbert, 2008), e é eficaz contra o *H. pylori*, pois regista baixas taxas de resistência (Siavoshi *et al.*, 2018). A taxa média de resistência de *H. pylori* à rifabutina é 1,3% podendo chegar a 7,4% em estirpes isolados em pacientes que tiveram tuberculose pulmonar e que fizeram tratamento com rifampicina no passado (Nishizawa & Suzuki, 2014; Gisbert *et al.*, 2012).

As alterações na sequência de resíduos de aminoácidos que constituem a proteína β da RNA polimerase codificada pelo gene *rpoB* que conferem à resistência à rifampicina, e as mais estudadas são: V149F, Q524P, L525P, Q527(K/R), D530(V/E/N), V538I, H540(N/Y), S545L, A603T, I586(N/L) (Siavoshi *et al.*, 2018; Nishizawa *et al.*, 2011).

2.6.1.8 Furazolidona

Furazolidona é um antibiótico de largo espectro pertencente aos nitrofuranos usado na terapia de resgate para tratar infecção causada por *H. pylori* e, é muito eficaz contra outros microrganismos, pois, ele tem um efeito bacteriostático e em doses altas pode ter efeito bactericida (Lu *et al.*, 2013; Graham & Lu, 2012).

A resistência à furazolidona é muito baixa a nível global com excepção de alguns países asiáticos como por exemplo Irão, China e Índia em que são reportadas altas taxas de resistência, mas mesmo assim, o uso da furazolidona é recomendado para regimes alternativos contra a infecção causada por *H. pylori* (Chey *et al.*, 2017; Ghotaslou, 2015; Natan *et al.*, 2011).

Há pouca informação disponível sobre o mecanismo de resistência de *H. pylori* a este antibiótico, mas alguns estudos sobre a resistência genotípica aos nitrofuranos sugerem que as mutações que ocorrem a nível dos genes *porD* e *oorD*, são elas que causam a resistência

do *H. pylori* à furazolidona e algumas já foram identificadas (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021; Kwon *et al.*, 2001). As mutações que ocorrem frequentemente no gene *porD* incluem G353A, A356G, e C357T, e as que ocorrem no gene *oorD* incluem A041G, A122G, e C349A/G (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021; Gómez *et al.*, 2007).

2.6.1.9 Sais de bismuto

Desde há muito, os sais de bismuto são utilizados no tratamento das doenças gastrointestinais. Primeiro foram utilizados para tratar os pacientes com sintomatologia dispéptica e com úlceras (Graham & Lee, 2015; Marshall *et al.*, 1987), e depois foram gradualmente utilizados no tratamento de infecções causadas por *H. pylori* (Alkim *et al.*, 2017).

Os sais de bismuto mais conhecidos são subcitrato de bismuto, subnitrato de bismuto e subsalicilato de bismuto (Graham & Lee, 2015). Quando utilizados no tratamento do *H. pylori*, eles impedem a entrada de iões de hidrogénio no citoplasma, inibindo assim a replicação e sua contínua colonização do agente patogénico (Marcus *et al.*, 2016). Portanto, os sais de bismuto quando são hidrolisados no estômago formam polímeros insolúveis que têm efeitos bactericidas (Marcus *et al.*, 2016; Keogan & Griffith, 2014).

A eficácia esperada do regime de tratamento em que bismuto faz parte é superior a 95%, mesmo com uma elevada resistência ao metronidazol (Muñoz *et al.*, 2018), por isso, esse regime é recomendado como segunda ou primeira linha de tratamento em pacientes com alergia à penicilina, em casos em que há resistência à claritromicina superior a 15% ou em casos em que há dupla resistência (Malfertheiner *et al.*, 2017).

2.6.2 Regimes de tratamento do *H. pylori*

Existem vários regimes usados para a erradicação de *H. pylori*, no entanto, a escolha do regime adequado deve ser baseada nos seguintes factores: a taxa local de resistências, prévia exposição aos antibióticos, alergias, efeitos secundários, custo e facilidade de administração de antibióticos (Angelov *et al.*, 2019; Crowe, 2019). Os regimes existentes a nível global estão resumidos na tabela 3:

Tabela 3: Resumo de regimes de terapia usados na erradicação do *H. pylori*

Terapia	Fármacos	Posologia	Duração	Referência
Tripla	1 IBP + amoxicilina (1 g) + claritromicina (500 mg)	2 vezes/dia	7 – 14 dias	(Angelov <i>et al.</i> , 2019)
	1 IBP + amoxicilina (1 g) + metronidazol (500 mg)	2 vezes/dia	7 – 14 dias	McColl, 2010)
	1 IBP + metronidazol (500mg) + claritromicina (500 mg)	2 vezes/dia	7 dias	Gisbert, 2009)
	1 IBP + levofloxacina (500 mg) + amoxicilina (1 g)	2 vezes/dia	10 dias	(Angelov <i>et al.</i> , 2019)
	1 IBP + rifabutina (150 mg) + amoxicilina (1 g)	2 vezes/dia	10 dias	O'Connor <i>et al.</i> , 2009)
Quádrupla de Bismuto	1 IBP + bismuto (120 – 300 mg) + 2 metronidazol (500 mg) + tetraciclina (500 mg)	2 vezes/dia (IBP) 4 vezes/dia (Antibióticos)	7 – 14 dias	(McColl, 2010; O'Connor <i>et al.</i> , 2009)
Concomitante	1 IBP + claritromicina (500 mg) + amoxicilina (1 g) + metronidazol 2 (500 mg)	2 vezes/dia	7 – 14 dias	(Angelov <i>et al.</i> , 2019; Gisbert <i>et al.</i> , 2012)
Sequencial*	1 IBP + amoxicilina (1 g), seguido de 1 IBP + claritromicina (500 mg) + metronidazol 2 (500 mg)	2 vezes/dia	5 – 7 dias 5 – 7 dias	(McColl, 2010)
Híbrida*	1 IBP + amoxicilina (1 g), seguido de	2 vezes/dia	7 dias	O'Connor <i>et al.</i> , 2009)
	1 IBP + amoxicilina (1 g) + claritromicina (500 mg) + metronidazol (500 mg)	2 vezes/dia	7 dias	
Dupla de alta dose	1 IBP + amoxicilina (1 g ou 750 mg)	2 ou 3 vezes/dia	14 dias	(Chuah, 2011)

1 IBP - uma dose de inibidor da bomba de prótons, geralmente tem sido omeprazol.

* A utilização de terapia sequencial e híbrida durante longos períodos de tempo pode reduzir a especificidade dos antibióticos, comprometendo a eficácia terapêutica em doentes infectados (Uthansingh *et al.*, 2021).

2.6.3 Linhas de tratamento do *H. pylori*

Segundo as novas directrizes para a erradicação de *H. pylori*, uma terapia deve durar 10 a 14 dias (Debraekeleer & Remaut, 2018; Malfertheiner *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2017), e recomendam-se as seguintes linhas de tratamento resumidas na tabela 4.

Tabela 4: Linhas terapêuticas recomendadas para erradicação do *H. pylori*

Linha de Tratamento	Tipo de Terapia	Fármacos
Primeira linha	Terapia tripla padrão *	IBP + claritromicina + amoxicilina ou metronidazol
	Terapia concomitante	IBP + amoxicilina + metronidazol + claritromicina**
	Quádrupla com Bismuto	IBP + bismuto+ metronidazol + tetraciclina
	Terapia para os alérgicos à penicilina	IBP+ claritromicina + levofloxacina IBP+ tetraciclina IBP + tetraciclina + metronidazol + bismuto
Segunda linha	Quádrupla sem Bismuto	IBP + amoxicilina + metronidazol + claritromicina
	Quádrupla de Bismuto	IBP + bismuto+ metronidazol + tetraciclina
	Terapia tripla com Lev.	IBP + amoxicilina + levofloxacina***
Linha ou Tratamento de resgate	Terapia tripla de resgate	IBP + amoxicilina + rifabutina

IBP - inibidor da bomba de prótons; Lev – levofloxacina. Essa tabela foi compilada com base em Hafeez *et al.*, (2021); Angelov *et al.*, (2019); Sousa *et al.*, (2017).

* A terapia tripla padrão (IBP + claritromicina + amoxicilina **ou** metronidazol) já é uma opção obsoleta em muitas regiões do mundo (Angelov *et al.*, 2019), devido ao aumento da taxa de multirresistência do *H. pylori* aos antibióticos, por isso, a terapia quádrupla tende a ser incluída na primeira linha de tratamento, o que poderá comprometer a eficácia terapêutica futura (Debraekeleer & Remaut, 2018).

** A terapia concomitante (IBP + amoxicilina + metronidazol + claritromicina) é a opção terapêutica de primeira linha em áreas onde existe uma taxa de resistência à claritromicina menor que 15%, no entanto, esta combinação é normalmente utilizada como tratamento de segunda linha (Angelov *et al.*, 2019; Malfertheiner *et al.*, 2017).

*** A terapia tripla com levofloxacina (IBP + amoxicilina + levofloxacina) é atualmente, a terapia mais usada em muitas regiões do mundo, pois mostra ser mais eficaz após a falha da primeira linha de tratamento com claritromicina (Sousa *et al.*, 2017).

2.6.4 Resistência do *H. pylori* aos antibióticos

A resistência bacteriana é a capacidade através da qual uma bactéria consegue resistir aos efeitos inibidores dos antibióticos ou antimicrobianos (Harbarth *et al.*, 2015). Ela é considerada como sendo a causa mais comum que leva ao fracasso no processo de erradicação de doenças infecciosas (Cambaco *et al.*, 2020; Yepes *et al.*, 2008).

Globalmente, a resistência bacteriana constitui uma preocupação de saúde pública que afecta particularmente os países que estão em via desenvolvimento (Cambaco *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2020; Berendes *et al.*, 2019).

A resistência do *H. pylori* aos antibióticos é um problema crescente em todo o mundo, e é a principal causa da ineficácia de alguns regimes terapêuticos actuais usados na sua erradicação (Sousa *et al.*, 2021). Estudos recentes reportam altas taxas de resistências do *H. pylori* aos antibióticos que são geralmente usados na primeira e segunda linha de tratamento, como é o caso da claritromicina, Metronidazol e levofloxacina (Jiao *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2021).

A elevada taxa resistência do *H. pylori* tem sido relatada principalmente na Ásia, África, América Latina, bem como em alguns países da Europa (Jiao *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2021). Em 2017, a OMS reconheceu a resistência de *H. pylori* à claritromicina como sendo um problema global, pelo que foi colocado na lista de agentes patogénicos que carecem de uma intervenção prioritária para se determinar as novas recomendações terapêuticas (Khan *et al.*, 2021; Marques *et al.*, 2020).

O uso inadequado de antibióticos tem sido mencionado como sendo a maior causa da resistência bacteriana e que contribui para o desenvolvimento de estirpes multirresistentes, mas vários outros factores, tais como factores relacionados com o hospedeiro e factores relacionados com os mecanismos de resistência do próprio patógeno, podem também contribuir (Uotani *et al.*, 2015 ; Ghotaslou, 2015).

2.6.4.1 Mecanismos de resistência a antibióticos

A resistência bacteriana pode ser ocasionada por vários mecanismos que actuam para permitir que a células bacteriana absorva quantidade reduzida de uma vasta gama de compostos, incluindo antibióticos, metais pesados, biocidas e outros que podem ter efeitos tóxicos para a célula (Rahman *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2008).

Vários mecanismos que condicionam à essa resistência já foram identificados, eles incluem, alteração do local alvo, inactivação enzimática do composto; diminuição da permeabilidade celular; e aumento do efluxo devido à super expressão das bombas de efluxo (Anes *et al.*, 2015; Bbosa *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2008), tal como mostra a figura 7.

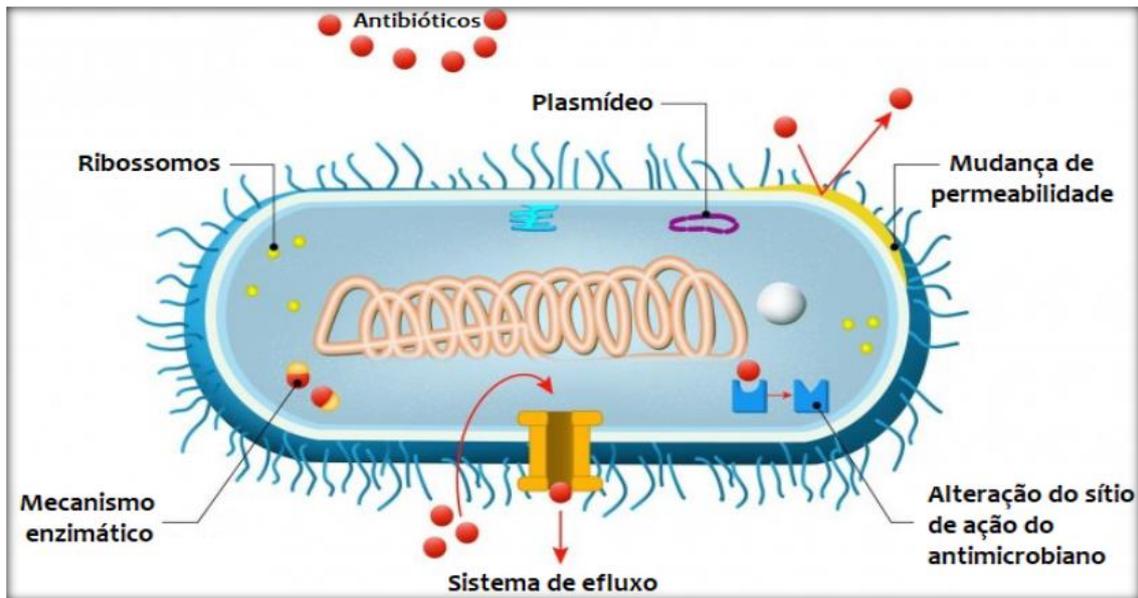


Figura 7: Principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos (Neto, 2021).

2.6.4.1.1 Resistência ocasionada pela alteração do local alvo

A alteração do local alvo é um dos mecanismos de resistência descrito para macrólidos, usados para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas tais como, *Campylobacter spp* e *H. pylori* (Munita & Arias, 2016; Hirata *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana a esta classe de antibióticos está principalmente associada a mutações pontuais na região codificadora da enzima peptidil-transferase no domínio V do gene *23S rRNA* (Hirata *et al.*, 2010).

Portanto, uma pequena alteração nessa proteína pode perturbar a conformação do local alvo e dificultar a ligação do fármaco, ocasionando assim a resistência das bactérias aos macrólidos (Iwamoto *et al.*, 2014; Hirata *et al.*, 2010); enquanto que a resistência às fluoroquinolonas tem sido atribuída a alterações nos genes da *DNA gyrase* e da *DNA topoisomerase IV* (Rice, 2012; Wang, 2010).

2.6.4.1.2 Resistência ocasionada pela inativação enzimática do composto

Este é o mecanismo mais comum em bactérias Gram-negativas mediado pela produção de enzimas classificadas em acetil-transferases e hidrólases que têm efeito modificador dos compostos (Rice, 2012; Wright, 2005). Este mecanismo está entre os que mais inativam os antibióticos β -lactâmicos por via da produção de enzimas, as β -lactamases, capazes de hidrolisar a ligação amida do anel β -lactâmico do antibiótico levando a uma consequente resistência (Rice, 2012).

O mecanismo de inativação enzimática do composto tem sido mencionado como uma das causas que contribuem para o aumento da resistência das estirpes de *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) e *Campylobacter coli* (*C. coli*) (Alfredson & Korolik, 2007).

2.6.4.1.3 Resistência ocasionada pela diminuição da permeabilidade celular

Esse mecanismo é exclusivo para as bactérias gram-negativas por possuírem uma membrana externa na constituição da sua parede celular, que serve como uma barreira permeável que controla a entrada das moléculas na célula, tais como antibióticos (de Andrade, 2020).

As moléculas entram na célula através de canais de proteína chamados porinas (ver a figura 8). Assim, uma pequena alteração ou ausência de um canal proteico pode diminuir a permeabilidade da membrana, impedindo a entrada do fármaco na célula (de Andrade, 2020; Iwamoto *et al.*, 2014).

Este mecanismo tem sido sugerido como uma das causas da resistência de algumas estirpes de *C. jejuni* e *H. pylori* à fluoroquinolonas, tais como ácido nalidíxico, em que não foram detetadas mutações ao nível do gene *gyrA*. No entanto, a resistência nessas estirpes tem sido associada a uma possível diminuição da permeabilidade da camada externa (Miller *et al.*, 2007).

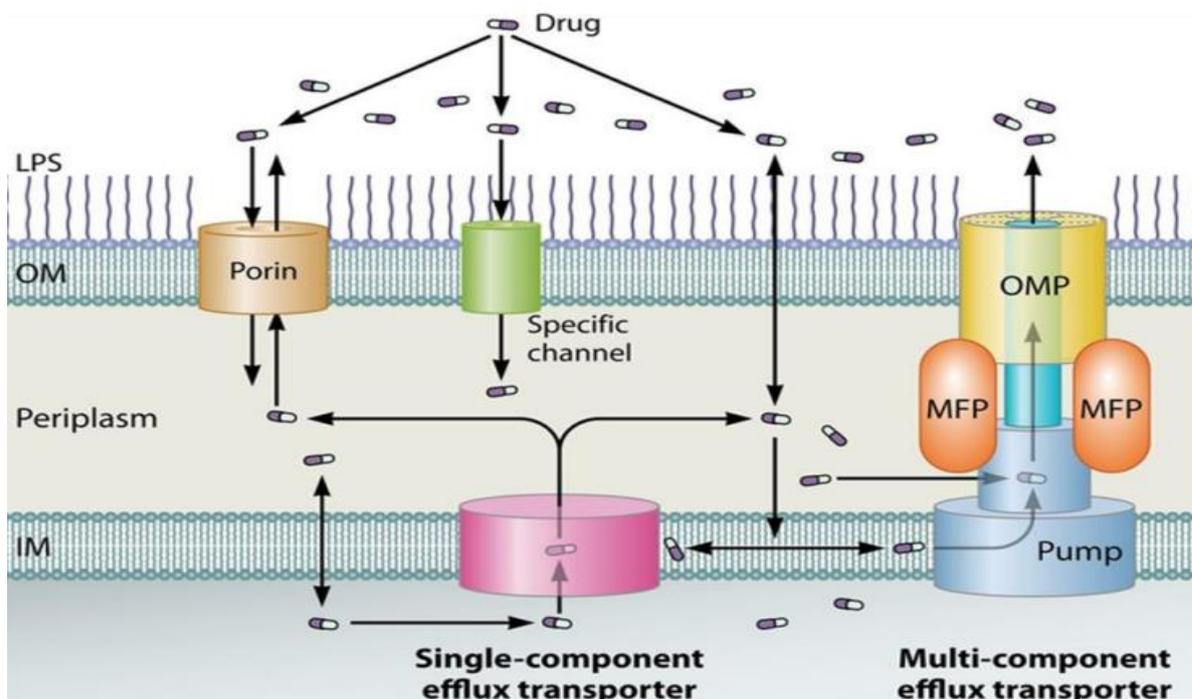


Figura 8: Vias de influxo e de efluxo de fármacos em bactérias Gram-negativas. LPS: lipopolissacarídeo; OM: membrana externa; IM: membrana interna; A direita está o sistema de efluxo, composto por: bomba de efluxo (Pump); MFP: proteína acessória de ligação; OMP: canal proteico chamada porina (de Andrade, 2020).

2.6.4.1.3 Resistência ocasionada pela super expressão das bombas de efluxo

As bactérias quando estão expostas a baixo nível de antibióticos são capazes responder através de vários mecanismos como por exemplo a regulação dos transportadores de efluxo, (Liu *et al.*, 2008), e isso resulta numa defesa mais forte que lhes permite resistir à elevados níveis de antibióticos que normalmente as matariam (Rahman *et al.*, 2017).

A bomba de efluxo desempenha um papel fundamental na eliminação de compostos tóxicos incluindo antibióticos, e é um dos mecanismos que ocasionam a resistência bacteriana (Rahman *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2010). Por outro lado, a super expressão das bombas de efluxo para além de estar relacionada a resistência, está também envolvida na virulência da bactéria (Davin-Regli *et al.*, 2019; Anes *et al.*, 2015; Blair *et al.*, 2015).

As bombas de efluxo encontram-se tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas, mas a resistência mediada pelo mecanismo de efluxo em bactérias Gram-negativas é mais preocupante (Delmar *et al.*, 2014), devido ao facto de estas possuírem uma membrana externa que inibe a entrada de compostos citotóxicos, incluindo antibióticos, bem como a capacidade de expeli-los através de bombas de efluxo, reduzindo a acumulação intracelular destes compostos evitando o seu efeito citotóxico (Otrębska-Machaj *et al.*, 2016).

Assim sendo, o efluxo constitui uma das mais frequentes estratégias de resistência que as bactérias usam não apenas para resistirem aos antibióticos e outros compostos citotóxicos, mas também na adaptação a condições ambientais por alteração da sua expressão (Sun *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2005). Já foram descritas cinco superfamílias de transportadores de efluxos tal como mostara a figura 9, eles incluem, *ATP binding cassette superfamily* (ABC), *Major facilitator superfamily* (MFS), *Small multidrug resistance family* (SMR), *Resistance-nodulation-cell division superfamily* (RND) e *Multi antimicrobial extrusion protein family* (Otrębska-Machaj *et al.*, 2016; Anes *et al.*, 2015; Tsugawa *et al.*, 2011).

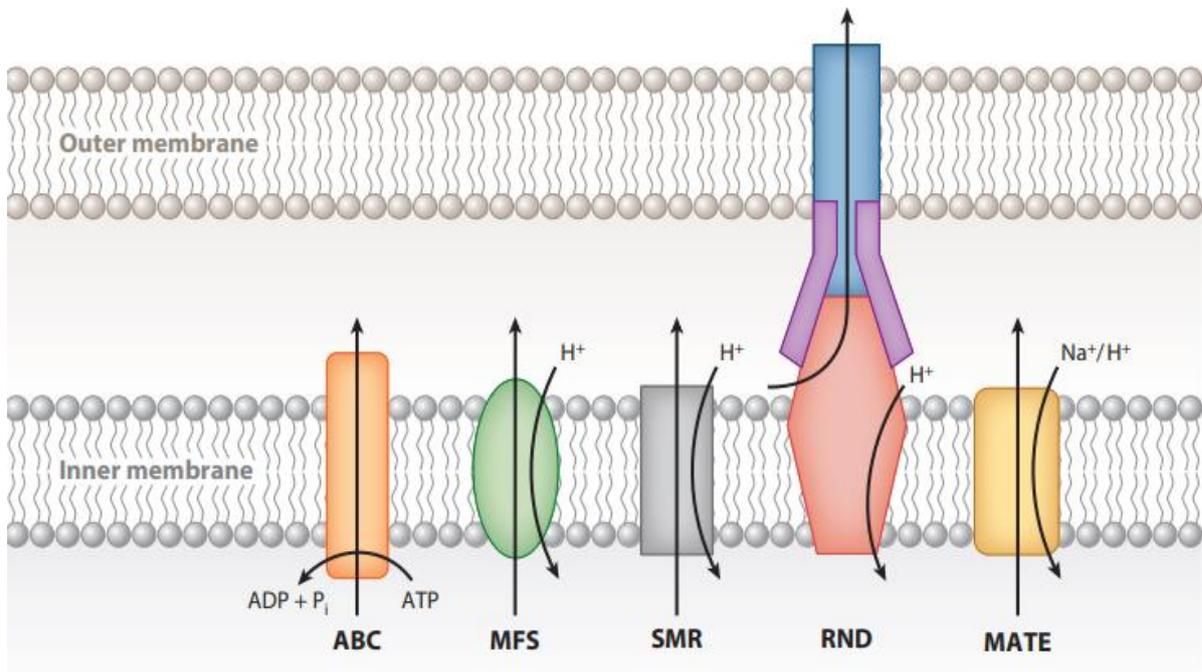


Figura 9: Diversidade funcional entre as proteínas efluxo com base no modo de transporte, mecanismo substrato e fonte de energia: ABC - usam ATP para transportar diversos substratos, através da membrana interna. MFS, SMR, e RND funcionam através dos mecanismos uniporte e simporte de substrato/catião (H⁺ ou Na⁺). As proteínas MATE utilizam ambas H⁺ e Na⁺ como fontes de energia. Os transportadores RND, em particular, podem formar estruturas multiprotéicas que fazem a ponte entre o interior e o exterior membranas (Delmar *et al.*, 2014).

No entanto, todas essas superfamílias estão presentes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas com exceção da superfamília RND, que se encontra presente apenas nas bactérias Gram-negativas (Tsugawa *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010).

Das cinco superfamílias descritas, a RND é única que é formada pela associação entre três proteínas, nomeadamente uma proteína transmembranar interna, proteína transmembrana externa e proteína de fusão membrana periplasmática, formando assim um canal que atravessa o espaço periplasmático (porina), permitindo o efluxo de compostos através das membranas até ao exterior da célula (Blanco *et al.*, 2016). E a superfamílias RND tem sido mais associada à resistência nas bactérias Gram-negativa (Tsugawa *et al.*, 2011).

A super expressão do sistema de efluxo RND nas estirpes de *H. pylori* induz à resistência (Zhang *et al.*, 2010), pois foram identificadas quatro famílias de RND (HP0605 a HP0607; HefABC, HP0971 e HP0969; HefDEF, HP1327 e HP1329; HefGHI e HP1489, HP1487) associadas ao desenvolvimento de estirpes *H. pylori* multirresistentes (Tsugawa *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010), principalmente a família HefAB que tem sido associada a resistência claritromicina, metronidazol e amoxicilina (Tsugawa *et al.*, 2011; Hirata *et al.*, 2010).

CAPÍTULO III

3. Metodologia

3.1 Área e caracterização do estudo

O presente trabalho faz parte de um estudo cujo título é “*Perfil Demográfico e de Resistência do Helicobacter pylori aos Antibióticos nos Pacientes com Dispepsia no Hospital Central de Maputo*”, aprovado pelo Comité Nacional de Bioética em Saúde de Moçambique (CNBS) com as seguintes referencias: Ref.224/CNBS/17 & Ref.411/CNBS/2020 (Anexos 1, 4 e 5).

Trata-se de um estudo descritivo transversal realizado entre Junho de 2017 e Junho de 2020, no Hospital Central de Maputo (HCM). O HCM é um hospital escola do nível quaternário e de referência nacional, localizado no centro da cidade de Maputo (figura1), no Distrito Urbano número 1. No Sul faz limite com a Av. Eduardo Mondlane, e a Norte com a Av. Agostinho Neto, a Este com a Av. Tomas Ndunda e a Oeste com a Av. Salvador Allende. o HCM é um hospital com mais de 100 anos de existência, que assiste directamente cerca de 2.000.000 habitantes na Província de Maputo e oferece no total 48 serviços médicos com cerca de 1454 camas.

O HCM oferece vários serviços, incluindo o de Gastroenterologia. Este serviço possui 14 camas, e tem a capacidade fazer seguimento de doentes em regime de internamento e ambulatório. Ele tem ainda a capacidade de realizar exames especiais que incluem, Ecografia abdominal, Endoscopia digestiva alta e baixa, Biopsia rectal, biopsia hepática entre outros.

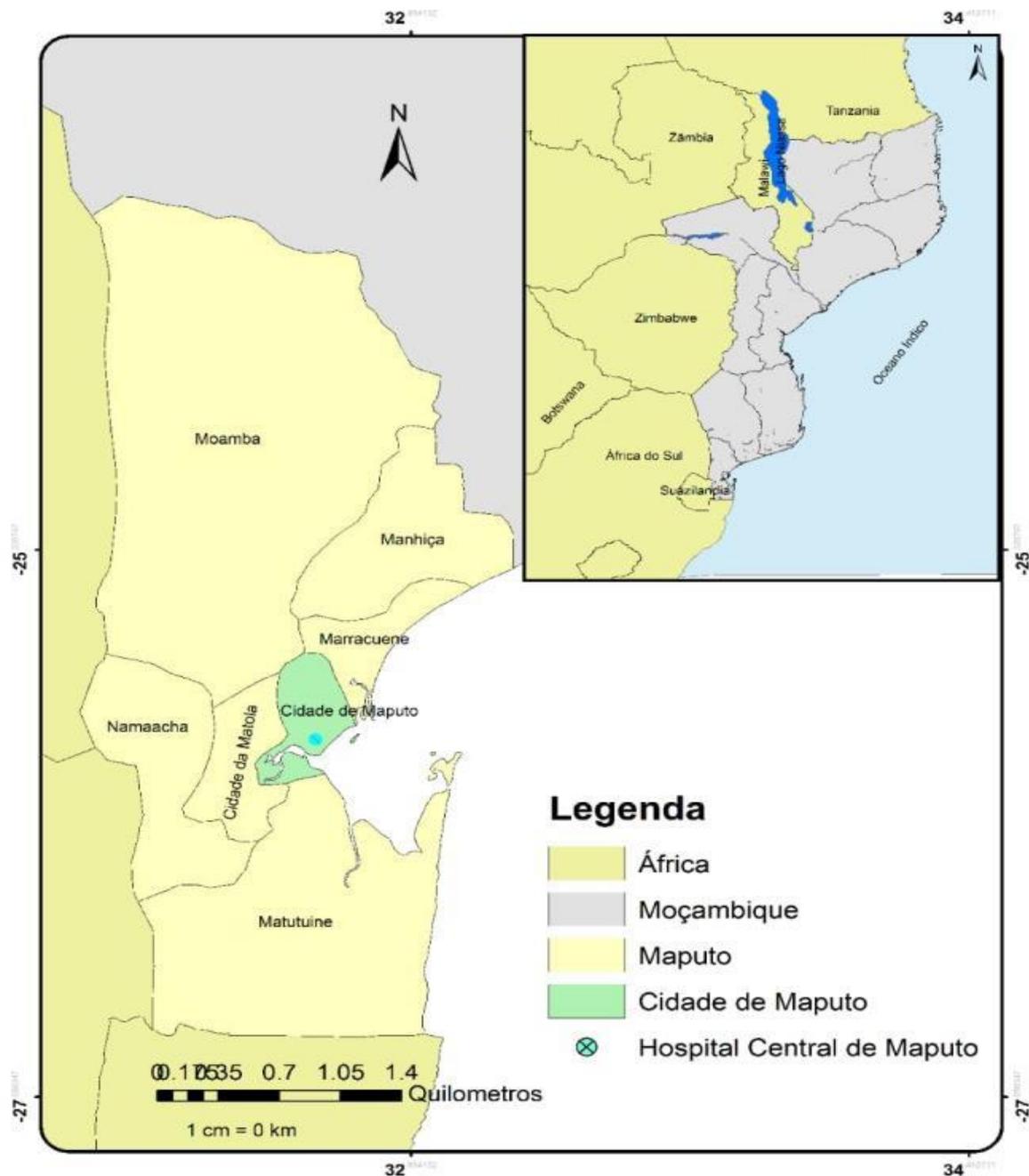


Figura 10: Localização do Hospital Central de Maputo (HCM) com base no Software ArcGIS 10.3 que ajuda a criar e a compartilhar mapas. O HCM está situado na latitudes -25.9694 e longitude 32.58819, na Província de Maputo, em Moçambique (Sufiana, 2020).

3.2 População de Estudo

Constituíram a população de estudo, pacientes adultos com sintomas da dispepsia que vieram à consulta da Gastroenterologia no período em que o estudo estava a decorrer (2017 – 2020), e que tinham critérios clínicos para serem submetidos à endoscopia digestiva alta (EDA); a técnica de amostragem usada foi não – probabilística por conveniência.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Ter idade igual ou superior a 18 anos;
- Aceitar participar no estudo assinando o consentimento e respondendo o inquérito (Anexo 2 e 3);
- Não estar a fazer nenhum tratamento com antibiótico e IBP's ou anti-flamatórios não esteroides;
- Ter sintomatologia dispéptica e com TRU positivo

3.2.2 Critérios de Exclusão

- Ter feito tratamento com antibiótico e IBP's ou anti-flamatórios não esteroides pelo menos um mês antes da consulta;
- Ter outras doenças concomitantes;
- Não ter vontade de consentir ou sem capacidade de consentir.

3.2.3 Determinação e cálculo do tamanho amostral

A determinação do tamanho amostral fez-se por meio de um pacote de ferramentas inter-operacionais de software “**Epi InfoTM**”, versão 7.2, projectado para a comunidade global de médicos e pesquisadores da saúde pública, e a função usada foi *STATCALC- Populacional Survey*.

Assim sendo, o tamanho amostral foi calculado tendo em conta o número da população que habita a cidade de Maputo e uma estimativa da prevalência actual da infecção, onde população que habita na cidade de Maputo foi estimada em 1.100.000 habitantes com base no ultimo censo populacional de 2017, e a prevalência actual estimada foi de 87% que resultou da média entre a prevalência da população africana (79,1%) estimada por Hooi et al., (2017) e a da população moçambicana em específico (94,5%) estimada por Carrilho et al., (2009); a margem de erro foi de 5% e nível de confiança foi de 95%. Assim sendo, o tamanho amostral obtido foi de 174 pacientes, porém, apenas 171 pacientes é que foram recrutados.

3.3 Considerações ética

Foram recrutados pacientes que reuniram todos os requisitos, e uma vez que o estudo envolveu os seres humanos, foram cumpridos os princípios básicos preconizados pela

Declaração de Helsínquia, versão de Seul 2010, adaptado pela Associação Médica Mundial, desde 1964 (AMM, 1964).

3.4 Fluxograma do estudo

O recrutamento dos pacientes foi feito no Serviço da Gastroenterologia do Hospital Central de Maputo, onde cada paciente que reuniu critérios de inclusão foi submetido a Endoscopia Digestiva Alta (EDA) através da qual foram colhidas 4 biópsias de cada paciente, duas do antro e duas do corpo. Após a colheita das biópsias, era feito imediatamente o Teste Rápido da Urease (TRU), e as biópsias que testassem positivo para *H. pylori* eram conservadas em tubos de plástico de 2 ml contendo soro fisiológico e enviadas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina - UEM, onde eram congeladas a -80°C até à análise molecular do patógeno.

3.5 Gestão, análise e apresentação de dados

Inicialmente, para facilitar a gestão de dados foi criada uma base de dados no Programa Microsoft® Excel versão 2019, e depois foi convertida para o programa SPSS versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), onde todas as variáveis foram codificadas para garantir a confidencialidade dos dados de cada paciente.

3.6 Análise laboratorial

3.6.1 Extracção de DNA do *H. pylori*

O DNA genómico bacteriano foi obtido directamente a partir dos fragmentos de biópsia gástrica usando o kit de extracção de *QIAamp DNA mini – kit* (Qiagen) conforme as instruções do fabricante (Anexo 6). As amostras de DNA de *H. pylori* extraídas das biópsias gástricas foram usadas para amplificação de genótipos de interesse nesse estudo através dos primers específicos previamente descritos na literatura e apresentados nas tabelas 5, 6 e 7 (páginas 51 e 52 respectivamente).

3.6.2 Detecção do *H. pylori* e da sua sensibilidade genotípica aos antibióticos

A detecção do *H. pylori* em amostras de DNA extraídas das biópsias gástricas, foi realizada com base na amplificação do gene *16S rRNA* específico para a espécie (ver a tabela 5) através da técnica de PCR.

Para amplificação do gene-alvo, preparou-se uma mistura “*master – mix*” num volume de 23 µl contendo: 10,7 µl de H₂O, 5 µl de Flexi Buffer (5X), 1,5 µl de MgCl₂ (25mM), 0,5 µl de dNTP’s (10mM), 2,5 µl de primer - F (10 µM) e 2,5 µl de primer - R (10 µM) e 0,3 µl de GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (5 U/µl) da Promega. Portanto, ao volume do *master-mix* (23 µl) adicionou-se 2 µl de DNA bacteriano extraído das biópsias gástricas, perfazendo assim um volume final de 25 µl em cada reacção de PCR.

As amostras que testaram positivo para *H. pylori* foram ainda submetidas a análise de sensibilidade genotípica aos antibióticos para saber se as estirpes de *H. pylori* que infectaram os pacientes eram resistentes ou não à claritromicina, fluoroquinolonas e Metronidazol. A sensibilidade genotípica foi feita através da amplificação dos genes: *23S rRNA* (para claritromicina), *gyrA* (para fluoroquinolonas) e *rdxA* (para metronidazol) nas mesmas condições de PCR em o que gene *16S rRNA* foi amplificado.

Amostras que testaram positivas para esses genes (*23S rRNA*, *gyrA* e *rdxA*) foram purificadas e sequenciadas, e através da análise das suas sequências foi possível determinar os tipos de mutações que conferem resistência do *H. pylori* a esses três tipos de antibióticos.

Tabela 5: Primers para detecção do *H. pylori* e da sua sensibilidade genotípica aos antibióticos

Gene-alvo	Primer – Foward (5'- 3')	Primer - Reverse (5'- 3')	Dimensão
<i>16S rRNA</i> ¹	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CTACGGCTACCTTGTTACGA	522 bp
<i>23S rRNA</i> ²	AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC	CGCATGATATCCCATTAGCAGT	267 bp
<i>gyrA</i> ³	TTTRGCYTATTCMATGAGCGT	GCAGACRCTTGGTARAATA	402 bp
<i>rdxA</i> ⁴	TTAGGGATTTTATTGTATGCTA	TCACAACCAAGTAATTGCATCAA	686 bp

1 - Idris *et al.*, (2020); 2 - Oleastro *et al.*, (2003); 3 - De Palma *et al.*, (2017); 4 - Mirzaei *et al.*, (2016).

3.6.3 Detecção dos factores de virulência em amostras positivas para *H. pylori*

A detecção dos factores de virulência em amostras positivas para *H. pylori* foi feita com base na amplificação dos genes *vacA* (subtipos: *s1*, *s2*), *m1* e *m2*, *dupA* e *cagA* tal como mostra a tabela 6.

Preparou-se o *master-mix* num volume de 23 µl contendo: 10,7 µl de H₂O, 5 µl de Flexi Buffer (5X), 1,5 µl de MgCl₂ (25mM), 0,5 µl de dNTP’s (10mM), 2,5 µl de primer - F (10 µM) e 2,5 µl de primer - R (10 µM) e 0,3 µl de GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (5 U/µl)

da Promega. A 23 µl do *master-mix* foram adicionados 2 µl de DNA bacteriano extraído das biópsias gástricas, perfazendo um volume final de 25 µl em cada reacção de PCR.

A amplificação desses genes por PCR foi realizada obedecendo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento do termociclador. Todas as amostras que amplificaram para o gene *cagA*, foram purificadas e sequenciadas para identificação dos locais de fosforilação na proteína CagA (EPIYA - Motifs) que tornam possível a identificação de cada estirpe *cagA*-positivo com base na sua origem.

Tabela 6: Primers para detecção dos factores de virulência do *H. pylori*

Gene-alvo	Primer – Foward (5'- 3')	Primer - Reverse (5'- 3')	Dimensão
<i>vacAs1/S2</i> ¹	ATGGAAATACAACAAACACAC	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	259/286 bp
<i>vacAm1</i> ¹	GGTCAAAATGCGGTCATGG	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	290 bp
<i>vacAm2</i> ¹	CATAACTAGCGCCTTGAC	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352 bp
<i>dupA</i> ¹	GACGATTGAGCGATGGGAATAT	CTGAGAAGCCTTATTATCTTGTGG	971 bp
<i>cagA</i> ²	ACCCTAGTCGGTAATGGG	GCTTTAGCTTCTGAYACYGC	Entre 400-700 bp

1- Idowu et al., (2019); 2 - Rodríguez Gómez *et al.*, (2020).

3.6.4 Determinação da filogenia das estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes

A determinação da filogenia das estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes dispépticos foi feita com base na tipagem MLST (*Multi-locus sequence typing*), que consistiu na amplificação dos 7 genes de manutenção (como mostra a tabela 7) em 30 amostras de DNA positivas para *H. pylori* escolhidas aleatoriamente.

A reacção de PCR foi realizada numa mistura de reacção de 25 µl, constituído por 10,7 µl de H₂O, 5 µl de Flexi Buffer (5X), 1,5 µl de MgCl₂ (25mM), 0,5 µl de dNTP's (10mM), 2,5 µl de primer - F (10 µM) e 2,5 µl de primer - R (10 µM) e 0,3 µl de GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (5 U/µl) da Promega e 2 µl de DNA bacteriano extraído das biópsias gástricas.

A amplificação foi realizada obedecendo os seguintes parâmetros cíclicos: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30

segundos, hibridização a 52°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C.

Após a realização de PCR, as amostras que amplificaram para os sete genes de manutenção (ver a tabela 7), foram purificadas e enviadas para sequenciação.

Tabela 7: Primers para determinação populacional de *H. pylori* em amostras positivas

Gene-alvo	Primer – Foward (5'- 3')	Primer - Reverse (5'- 3')	Dimensão
<i>atpA</i>	GGACTAGCGTTAAACGCACG	CTTGAAACCGACAAGCCCAC	841 bp
<i>efp</i>	GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC	CTTCACCTTTTCAAGATACTC	559 bp
<i>mutY</i>	GTGGTTGTAGYTGGAAACTTTACAC	CTTAAGCGTGTGYTTTTCTAGG	676 bp
<i>ppa</i>	GGAGATTGCAATGAATTTAGA	GTGGGGTTAARATCGTTAAATTG	706 bp
<i>trpC</i>	TAGAATGCAAAAAAGCATCGCCCTC	TAAGCCCGCACACTTTATTTTCGCC	633 bp
<i>ureI</i>	AGGTTATTCGTAAGGTGCG	GTTTAAATCCCTTAGATTGCC	686 bp
<i>yphC</i>	CACGCCTATTTTTTTGACTAAAAAC	CATTYACCCTCCCAATGATGC	734 bp

Tabela compilada de acordo com Palamides *et al.*, (2020).

3.6.5 Electroforese em gel de agarose

Após a reacção de PCR, procedeu-se com a análise electroforética em gel de agarose dos produtos amplificados. Para se detectar o produto amplificado, 5µl do produto da PCR misturado com 2µl de Green GoTaq® Buffer a 5X (Promega) foram aplicados no poço do gel de agarose a 2% em tampão Tis Borato EDTA (TBE) a 1X; o gel foi corado com Brometo de Etídio [(500 ng/ml) da Sigma-Aldrich, EUA] e a electroforese ocorreu nas seguintes condições: 120 Volts e 200 miliamperes durante 45 minutos.

Os géis foram visualizados num aparelho transluminador ultravioleta (VWR-CC003531) acoplado a câmara digital (Canon-PC1234) para evidenciação e registo das bandas. A identificação das bandas foi estabelecida por comparação das dimensões das bandas com os marcadores de peso molecular conhecidos de 100 bp ou 1kb da *New England BioLabs®*, Inc. Os resultados foram considerados positivos ou negativos para os marcadores genéticos estudados pela presença ou ausência das bandas correspondentes a esses marcadores, tendo em conta o controlo positivo e obedecendo as dimensões das bandas obtidas referenciadas na literatura, tabelas 5, 6 e 7.

3.6.6 Sequenciação de amostras

Para detectar a sensibilidade genotípica do *H. pylori* aos antibióticos (com base nos genes *23S rRNA*, *gyrA* e *rdxA*), identificar as regiões EPIYA-Motifs em amostras *cagA* positivas (usando gene *cagA*) e para se determinar a filogenia das estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes (usando os sete genes da tabela 7), foi necessário sequenciar todas as amostras de DNA que amplificaram para esses marcadores genéticos através da sequenciação de DNA pelo método de Sanger. Segundo Wolk et al., (2001), a sequenciação de DNA é uma ferramenta útil para identificação e caracterização molecular das estirpes de *H. pylori*, principalmente em casos de crescimento lento, fastidioso, e má identificado das estirpes por técnicas microbiológica.

A preparação de amostras a serem sequenciadas foi feita obedecendo o preconizado pelos pontos B e C do anexo 7. Todas as amostras foram preparadas no Laboratório de Biologia Molecular do Prof. Jorge Vítor, no Departamento de Farmácia, Farmacologia e Tecnologia da Saúde, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; e foram sequenciadas pela STAB VIDA (Empresa Portuguesa de Biotecnologia especializada em Investigação e que oferece Serviços em Ciências Biológicas).

3.6.7 Análise Bioinformática das sequências

As sequências de nucleótidos dos genes (*23S rRNA*, *gyrA* e *rdxA*) foram analisadas usando uma ferramenta bioinformática Geneious® Prime - Versão 21.2.1. No entanto, todas as sequências foram alinhadas com outras sequências da estirpe de referência (sensível aos antibióticos estudados) previamente identificadas e depositadas no GeneBank idris, obtidas utilizando a função BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

para melhor identificação das possíveis mutações que ocorrem a nível desses genes e que são associadas a resistência do *H. pylori* aos antibióticos de interesse do presente estudo. As sequências de nucleótidos dos genes *gyrA* e *rdxA* depois do alinhamento com as da estirpe de referência foram transformadas em sequências de aminoácidos usando o programa Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Geneious (*Sequence* → *New sequence* → *Type* → *Protein sequence*) para determinar a existência das possíveis mutações que conferem alteração nas sequências proteicas codificadas por esses genes (*gyrA* e *rdxA*).

A sequenciação das amostras *cagA* positivas foi necessária para determinação do motivo EPIYA, que está associado à origem geográfica das estirpes, assim como as outras sequências, elas também formam alinhadas a sequência da estirpe de referência e analisadas através do Geneious® Prime - Versão 21.2.1.

Para MLST, as sequências de 7 genes de manutenção (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *ypbC*), foram montadas e alinhadas com as sequências das estirpes de referência de *H. pylori* disponíveis na base de dados PubMLST (<http://pubmlst.org/helicobacter/>) para verificar a correspondência entre elas (entre as sequências geradas neste estudo e as de referência).

3.6.7. 1 Análise filogenética

Para a análise filogenética das estirpes, foi necessário concatenar as sequências dos sete genes usados para tipificar por MLST para cada uma das 30 amostras selecionadas aleatoriamente neste estudo. A este grupo foram adicionadas mais 21 sequências das populações de *H. pylori* já identificadas (3sequências de cada população) disponíveis no PubMLST (<http://pubmlst.org/helicobacter/>) que incluem, *hpAfrica1*, *hpAfrica2*, *hpNEAfrica*, *hpSahul*, *hpEuropa*, *hpAsia2* e *hpEastAsia*. Procedeu-se ao multi alinhamento das 51 sequências recorrendo ao software MAFFT V7.017, sendo posteriormente este alinhamento usado para construir a árvore filogenética usando o método de máxima verossimilhança, através de Fastree 2.1.11. A árvore filogenética foi visualizada no Geneious® Prime - Versão 21.2.1

3.7 Análise estatística dos dados

Todas as análises foram feitas através do programa SPSS versão 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para descrever o perfil sócio-demográfico dos pacientes foi usada estatística descritiva: média, mediana, desvio padrão, valores mínimos e máximos e intervalos de confiança considerando o nível de significância de 95%.

Para comparação das variáveis categóricas que atenderam aos pressupostos paramétricos foi realizado o teste do Qui-quadrado - χ^2 e as associações entre as variáveis foram testadas considerando o valor de $p \leq 0,05$ estatisticamente significativa usando as tabulações cruzadas.

CAPÍTULO IV

4. Resultados

4.1 Características demográficas dos pacientes

De 171 pacientes com sintomatologia dispéptica, recrutados entre Junho de 2017 e Junho de 2020, 72,5% (124/171) eram pacientes de sexo feminino e 27,5% (47/171) eram de sexo masculino. As suas idades variavam entre os 18 aos 78 anos, a idade média foi de 42 anos com um desvio padrão de 14 anos, e formam agrupados em faixas etárias consoante o preconizado pelo Inquérito Demográfico e de Saúde de Moçambique (tabela 8), tendo sido encontrada a maioria na faixa etária dos 35-49 anos com 33,3% (57/171), seguindo a faixa etária dos 50-64 anos com 26,9% (46/171).

Tabela 8: Características demográficas dos pacientes (sexo e idade dos pacientes)

Características			
Dimensão da amostra (N)		171	
Idade (anos)			
Idade mínima		18	
Idade máxima		78	
Idade (média ± SD)		42 ± 14	
Idade (Faixa – etária)	n	%	(n/N)
≤ 24 *	21	12,3	(21/171)
25-34	36	21,1	(36/171)
35-49	57	33,3	(57/171)
50-64	46	26,9	(46/171)
65-79	11	6,4	(11/171)
Sexo (Género)	n	%	(n/N)
Feminino	124	72,5	(124/171)
Masculino	47	27,5	(47/171)

* ≤ 24 - dos 18 aos 24 anos de idade.

Em relação a residência, 49,1% (84/171) eram residentes na Província de Maputo, 44,4% (76/171) residiam na Cidade de Maputo, 4,1% (7/171) na Província de Gaza, 1,2% (2/171) em Inhambane, 0,6% (1/171) em Sofala e 0,6 (171) na Província da Zambézia, ver a tabela 9. Quanto ao estado civil, 46,8 (80/171) eram casados ou viviam em união marital, 41,5% (71/171) eram solteiros, 4,7% (8/171) eram viúvos e 7% (12/171) eram divorciados ou separados, tal como mostra a tabela 9.

Tabela 9: Características demográficas (residência e estado civil dos pacientes)

Características		
Dimensão da amostra (N)		171
Residência	n	% (n/N)
Maputo Província	84	49,1 (84/171)
Maputo Cidade	76	44,4 (76/171)
Gaza	7	4,1 (7/171)
Inhambane	2	1,2 (2/171)
Sofala	1	0,6 (1/171)
Zambézia	1	0,6 (1/171)
Estado Civil	n	% (n/N)
Casado(a)/ União marital	80	46,8 (80/171)
Solteiro(a)	71	41,5 (71/171)
Viúvo(a)	8	4,7 (8/171)
Separado(a)/ Divorciado(a)	12	7 (12/171)

Quanto às condições de habitabilidade, 98,2% (168/171) dos pacientes viviam em habitações convencionais e apenas 1,8% (3/171) é que viviam em habitações precárias. Em relação ao acesso à água potável, 94,7% (162/171) tinham água canalizada e 5,3% (9/171) não tinham água canalizada, ver a tabela 10. No entanto, embora a maioria tenha acesso a água potável, 47,4 (81/171) bebiam água não tratada, ver a Figura 11.

Tabela 10: Características demográficas (condições de habitabilidade e acesso a água potável)

Características		
Dimensão da amostra (N)		171
Tipo de Habitação	n	% (n/N)
Convencional	168	98,2 (168/171)
Precária	3	1,8 (3/171)
Fonte de água	n	% (n/N)
Canalizada	162	94,7 (162/171)
Não Canalizada	9	5,3 (9/171)

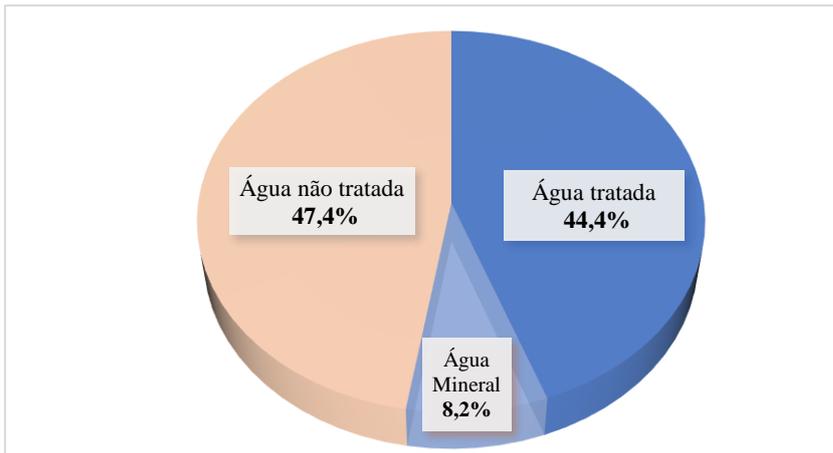


Figura 11: Tipo de água consumida pelos participantes.

Relativamente aos factores de risco que têm sido associados à dispepsia, 1,8% (3/171) bebia álcool frequentemente enquanto 42,7% (7/171) bebia ocasionalmente. Quanto aos hábitos tabágicos, 1,8% (3/171) eram fumadores e 5,8% (10/171) eram ex-fumadores, tal como mostra a figura 12.

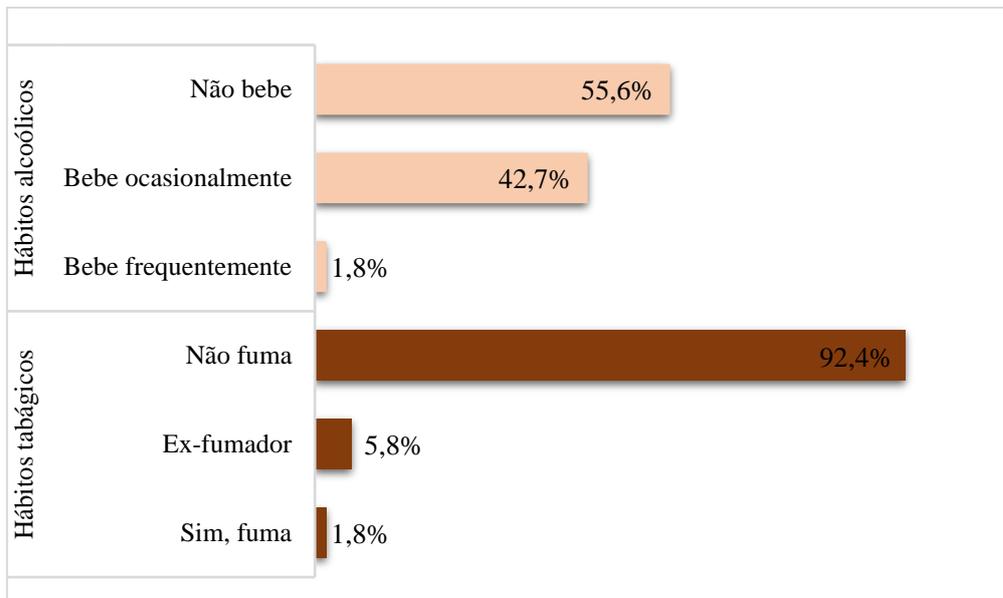


Figura 12: Factores de risco associados à dispépsia.

Em relação ao tipo de tratamento que os pacientes tinham feito antes de serem recrutados para o estudo, mais de metade dos pacientes não sabia o tipo de tratamento tinham feito, e os restantes afirmaram ter utilizado antibióticos e inibidores da bomba de protões (IBP's) durante o seu tratamento.

Os antibióticos e os inibidores da bomba de protões utilizados pelos pacientes ao longo do tratamento variaram bastante. No entanto, o tipo de antibiótico mais utilizado foi amoxicilina com 19,9% (34/171) seguido por metronidazol com 14% (41/171), ver a tabela 11.

Tabela 11: Características demográficas (tipo de antibiótico usado no tratamento)

Características		
Dimensão da amostra (N)		171
Tratamento com antibióticos		
Metronidazol	n	% (n/N)
Sim	24	14 (24/171)
Não	133	77,8 (133/171)
Não sabe	14	8,2 (14/171)
Ciproflaxacina	n	% (n/N)
Sim	13	7,6 (13/171)
Não	150	87,7 (150/171)
Não sabe	8	4,7 (8/171)
Claritromicina	n	% (n/N)
Sim	13	7,6 (13/171)
Não	148	86,5 (148/171)
Não sabe	10	5,8 (10/171)
Amoxicilina	n	% (n/N)
Sim	34	19,9 (34/171)
Não	123	71,9 (123/171)
Não sabe	14	8,2 (14/171)
Eritromicina	n	% (n/N)
Sim	13	7,6 (13/171)
Não	150	87,7 (150/171)
Não sabe	8	4,7 (8/171)
Tetraciclina	n	% (n/N)
Sim	8	4,7 (8/171)
Não	153	89,5 (153/171)
Não sabe	10	5,8 (10/171)

Para o caso dos os inibidores da bomba de protões, o omeprazol é que foi mais usado com 30,4% (52/171), tal como indica a tabela 12.

Tabela 12: Características demográficas (tipo de IBP's usado no tratamento)

Características		
Dimensão da amostra (N)		171
Tratamento com de IBP's		
Omeprazol	n	% (n/N)
Sim	52	30,4 (52/171)
Não	103	60,2 (103/171)
Não sabe	16	9,4 (16/171)
Ranitidina	n	% (n/N)
Sim	4	2,3 (4/171)
Não	152	88,9 (152/171)
Não sabe	15	8,8 (15/171)
Pantoprazol	n	% (n/N)
Sim	2	1,2 (2/171)
Não	154	90,1 (154/171)
Não sabe	15	8,8 (15/171)
Gastralgina	n	% (n/N)
Sim	5	2,9 (5/171)
Não	155	90,6 (155/171)
Não sabe	11	6,4 (11/171)
Esomeprazol	n	% (n/N)
Sim	6	3,5 (6/171)
Não	155	90,6 (155/171)
Não sabe	10	5,8 (10/171)

4.1.1 Diagnóstico endoscópico dos pacientes

Quanto ao diagnóstico endoscópico, a gastrite eritematosa foi o achado endoscópico mais registado nos pacientes com 64,9% (111/171) seguido do exame normal com 24% (41/171) e da gastrite erosiva com 5,8% (10/171), Figura 13.

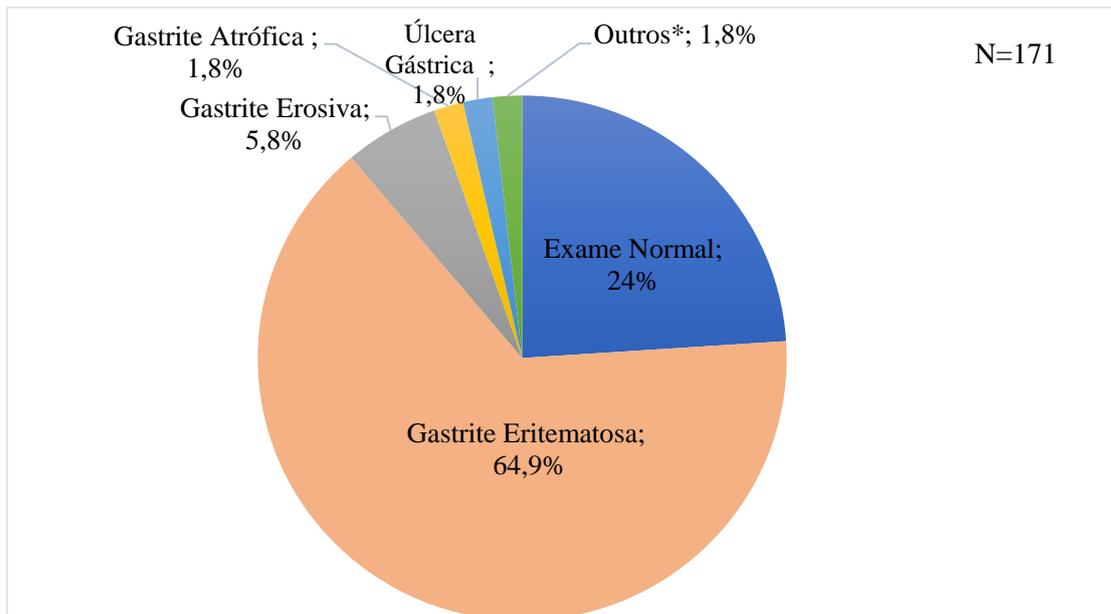


Figura 13: Diagnóstico endoscópico dos pacientes. * **Outros** (Gastrite hiperplásica, Refluxo duodeno-gástrico, Tumor gástrico).

4.2 Diagnóstico molecular

4.2.1 Detecção molecular do *H. pylori* por PCR

O diagnóstico molecular da infecção causada pelo *H. pylori* em pacientes dispépticos, revelou uma prevalência de infecção de 56,1% (96/171), tal como mostra a figura 14.

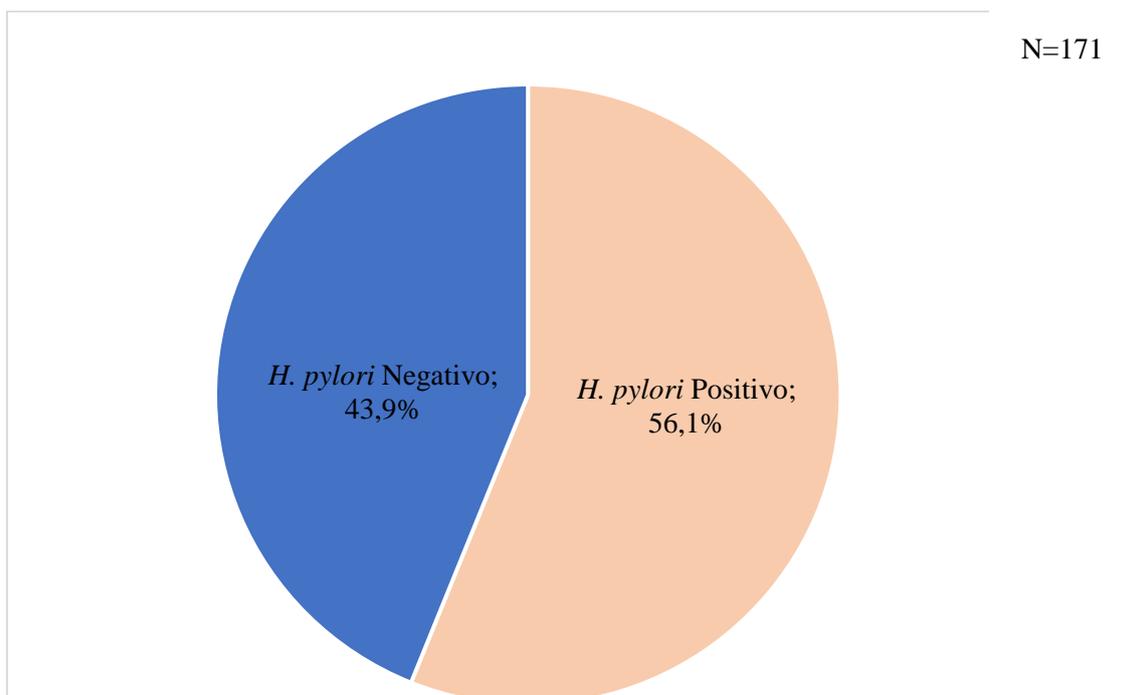


Figura 14: Diagnóstico molecular de infecção causada pelo *H. pylori*.

4.2.1.1 Relação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por *H. pylori*

Ao estabelecer a relação entre as características sociodemográficas de pacientes e a infecção causada pelo *H. pylori*, não se verificou nenhuma relação estatisticamente significativa. No entanto, a infecção tende a ser mais elevada em pacientes de sexo feminino com 58,9% (73/124) e as faixas etárias mais infectadas incluem, a faixa etária de ≤ 24 anos (18 – 24 anos) com 61,9% (13/21), a faixa etária dos 25 aos 34 anos com 58,3% (21/36) e faixa etária dos 35 aos 49 anos com 57,9 (33/57). Para o caso do local de residência dos pacientes, também não houve relação estatisticamente significativa mesmo com elevadas taxas de infecção que se verificaram nas províncias de Gaza e de Inhambane, pois o número de pacientes estudados não foi representativo, tabela 13.

Tabela 13: Relação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por *H. pylori* (sexo, faixa etária e residência dos pacientes)

Características	<i>H. pylori</i>			Valor de $p \leq 0,05$
	Indivíduos n	Positivos %(n/N)	Negativos %(n/N)	
Sexo				
Feminino	124	58,9 (73/124)	41,1 (51/124)	0,242
Masculino	47	48,9 (23/47)	51,1 (24/47)	
Total	171	56,1 (96/171)	43,9 (75/171)	
Faixa - Etária				
≤ 24 *	21	61,9 (13/21)	38,1 (8/21)	0,873
25 - 34	36	58,3 (21/36)	41,7 (15/36)	
35 - 49	57	57,9 (33/57)	42,1 (24/57)	
50 - 64	46	52,2 (24/46)	47,8 (22/46)	
65 - 79	11	45,5 (5/11)	54,5 (6/11)	
Total	171	56,1 (96/171)	43,9 (75/171)	
Residência				
Maputo Cidade	76	51,3 (39/76)	48,7 (37/76)	0.187
Maputo Província	84	58,3 (49/84)	41,7 (35/84)	
Gaza	7	85,7 (6/7)	14,3 (1/7)	
Inhambane	2	100 (2/2)	0	
Sofala	1	0	100 (1/1)	
Zambézia	1	0	100 (1/1)	
Total	171	56,1 (96/171)	43,9 (75/171)	

* ≤ 24 - dos 18 aos 24 anos de idade.

Os pacientes que bebiam água não tratada apresentaram uma elevada taxa de infecção com 60,5% (49/81), porém, não houve relação estatisticamente significativa entre o consumo da água não tratada e a infecção causada pelo *H. pylori* ($p=0,221$). Verificou-se também uma elevada taxa de infecção em pacientes que fumavam e que bebiam álcool frequentemente. No entanto, a relação entre esses factores (hábitos tabágicos e alcoólicos) e a infecção por *H. pylori* não foi estatisticamente significativa. Avaliada a taxa de infecção tendo em conta o diagnóstico endoscópico de cada paciente, foram verificadas altas taxas de infecção em pacientes com gastrite atrófica e gastrite erosiva, porém a relação entre a infecção e os achados endoscópicos não foi estatisticamente significativa e o número de amostragem não era representativo, ver a tabela 14.

Tabela 14: Relação entre as características sociodemográficas dos pacientes e a infecção por *H. pylori* (consumo da água, hábitos tabágicos e alcoólicos e os achados endoscópicos)

Características	<i>H. pylori</i>			Valor de p $\leq 0,05$
	Indivíduos n	Positivos %(n/N)	Negativos %(n/N)	
Consumo da água				
Tratada	76	55,3 (42/76)	44,7 (34/76)	0,221
Não tratada	81	60,5 (49/81)	39,5 (32/81)	
Mineral	14	35,7 (5/14)	64,3 (9/14)	
Total	171	56,1 (96/171)	43,9 (75/171)	
Hábitos tabágicos				
Fumador	3	100 (3/3)	0	0,290
Não fumador	158	55,1 (87/158)	44,9 (71/158)	
Ex-fumador	10	60 (6/10)	40 (4/10)	
Total	171	56,1 (96/171)	43,9 (75/171)	
Hábitos alcoólicos				
Sim, frequentemente	3	100 (3/3)	0	0,298
Sim, ocasionalmente	73	56,2 (41/73)	43,8 (32/73)	
Não	95	54,7 (53/95)	45,3 (43/95)	
Total	171	56,1 (96/171)	43,9 (75/171)	
Achados endoscópicos				
Exame normal	41	46,3 (19/41)	53,7 (22/41)	0,117
Gastrite Eritematosa	111	55 (61/111)	45 (50/111)	
Gastrite erosiva	10	80 (8/10)	20 (2/10)	
Gastrite Atrófica	3	100 (3/3)	0	
Úlcera gástrica	3	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	
Outros*	3	100 (3/3)	0	
Total	171	56,1 (96/171)	43,9 (75/171)	

* **Outros** (Gastrite hiperplásica, Refluxo duodeno-gástrico, Tumor gástrico).

4.3 Caracterização molecular das amostras positivas para *H. pylori*

A caracterização molecular foi feita em todas as amostras que testaram positivo para *H. pylori*. Assim sendo, das 171 amostras de pacientes que foram recrutados para o estudo, apenas 96 amostras é que foram caracterizadas molecularmente.

4.3.1 Sensibilidade genotípica do *H. pylori* aos antibióticos e as mutações associadas

Com base na utilização da técnica de PCR, foram caracterizadas todas as amostras positivas para *H. pylori* com vista a detectar a sua sensibilidade genotípica à três tipos de antibióticos, nomeadamente: claritromicina, fluoroquinolonas e metronidazol. Para claritromicina o gene alvo foi *23S rRNA*, para fluoroquinolonas foi *gyrA* e para metronidazol o gene alvo foi *rdxA*.

Todas as 96 amostras testadas amplificaram para o gene *23S rRNA*, e com base na análise bioinformática das sequências (figura 15), 10 amostras das testadas foram resistentes para claritromicina, o que corresponde à uma taxa de resistência de 10,4% (10/96) (tabela 15), e as mutações associadas a essa resistência foram: mutação do tipo A2141G com 20% (2/10) e a do tipo A2142G com 80% (8/10), tal como indica a tabela 16.

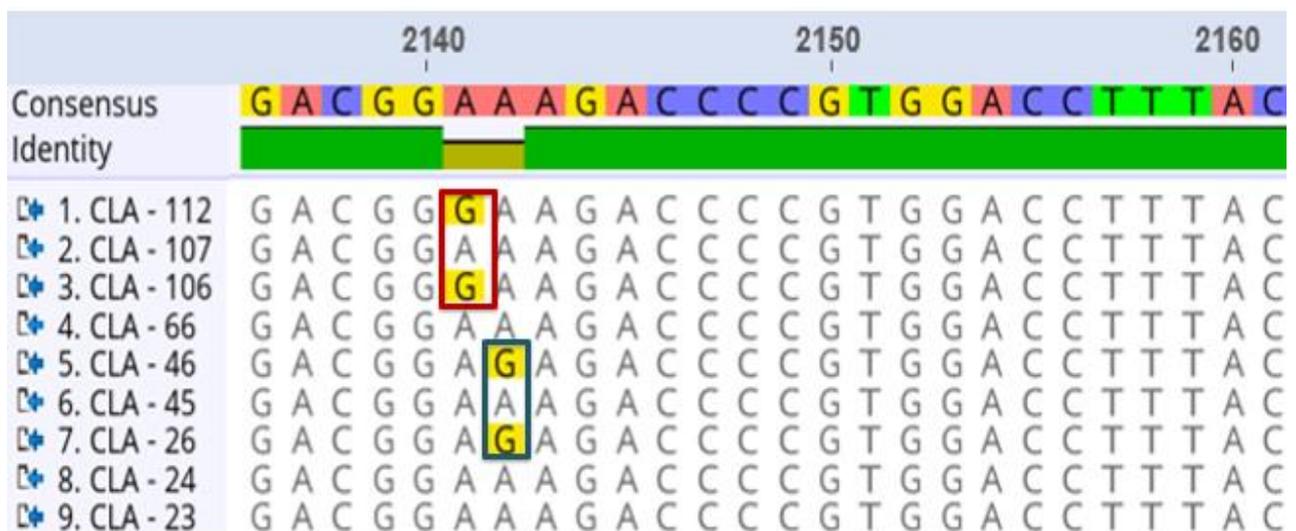


Figura 15: Alinhamento múltiplo das sequências de nucleótidos geradas através da sequenciação Sanger dos produtos de PCR de amostras que amplificaram para o gene *23S rRNA* utilizado para testar resistência genotípica de *H. pylori* a claritromicina. Foram identificados dois tipos de mutações associadas à resistência de *H. pylori* à claritromicina que incluem, a mutação do tipo A2141G e a do tipo A2142G. A mutação do tipo A2141G foi identificada nas amostras CLA-106 e CLA-112, e a mutação do tipo A2142G foi identificada em CLA-26 e CLA-46. A figura foi feita através do software Geneious® Prime - Versão 21.2.1.

Das 96 amostras testadas para o gene *gyrA*, apenas 40 amostras amplificaram para o gene. Portanto, feita a análise bioinformática das sequências (figura 16), evidenciou-se que 8 amostras das 40 que amplificaram eram resistentes para fluoroquinolonas, o que corresponde à uma taxa de resistência de 20% (8/40), ver a tabela 15.

As mutações associadas à essa taxa de resistência do *H. pylori* aos fluoroquinolonas incluem, a mutação do tipo N87I com 50% (4/8) e a do tipo D91G na mesma proporção, ver a tabela 16.

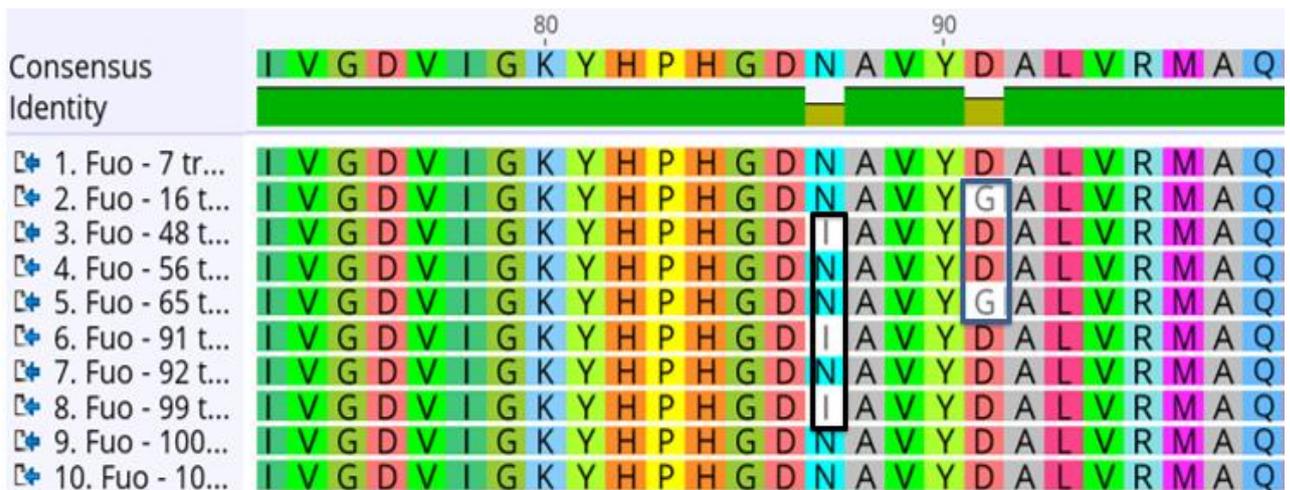


Figura 16: Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos geradas através da sequenciação de produtos de PCR de amostras que amplificaram para o gene *gyrA* utilizado para testar resistência genotípica de *H. pylori* às fluoroquinolonas. Primeiro foram geradas as sequências de nucleótidos pela sequenciação Sanger, que depois foram traduzidas nas sequências de aminoácidos através do Geneious (*Sequence* → *New sequence* → *Type* → *Protein sequence*) para identificar as mutações que ocorrem a nível dos resíduos de aminoácidos associadas à resistência. As mutações identificadas e incluem, a do tipo N87I e a do tipo D91G e estão sinalizadas na figura. Alteração do tipo N87I foi detectada nas seguintes amostras: Fuo-48, Fuo-91 e Fuo-99; e a D91G foi detectada nas amostras Fuo-16 e Fuo-65. A figura foi feita software Geneious® Prime - Versão 21.2.1.

Para o gene *rdxA*, todas as 96 amostras amplificaram, e com base na análise bioinformática (figura 17), verificou-se que 53 amostras das 96 eram resistentes para o metronidazol. Assim sendo, a taxa de resistência do *H. pylori* ao metronidazol foi de 55,2% (53/96), ver a tabela 15. Foram identificados 4 tipos de mutações (D59N, R90K, H97T e A118T) associadas à essa resistência, no entanto, as mutações apareciam em combinações quase em todos os casos, e as combinações que apareceram com muita frequência foram: D59N+R90K+A118T com 35,8% (19/53) e D59N+R90K com 20,8% (11/53), tal como mostra a tabela 16.



Figura 17: Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos geradas através da sequenciação de produtos de PCR de amostras que amplificaram para o gene *rdxA* utilizado para testar a resistência genotípica de *H. pylori* ao metronidazol. Primeiro foram geradas as sequências de nucleótidos pela sequenciação Sanger, que depois foram traduzidas nas sequências de aminoácidos através do Geneious (*Sequence* → *New sequence* → *Type* → *Protein sequence*) para identificar as mutações que ocorrem a nível dos resíduos de aminoácidos, associadas à resistência ao metronidazol. Foram detectadas algumas mutações já descritas e associadas a resistência ao metronidazol (que estão sinalizadas na figura17) e outras não descritas (que se encontram nas posições 47, 62, 68, 74, 75 e 78. As mutações descritas incluem, D59N, R90K, H97T e A118T. A mutação do tipo D59N foi detectada nas seguintes amostras: A67, A79, A91, A98, A99, A100, A107, A112, A114 e A118; a mutação do tipo R90K foi detectada em A91, A99, A100, A107, A112 e A114; a mutação tipo H97T foi detectada em A100 e A118 e por fim a mutação do tipo A118T foi detectada em A79, A91, A98, A99, A107 e A114. A figura foi feita software Geneious® Prime - Versão 21.2.1.

Tabela 15: A taxa de resistência do *H. pylori* aos antibióticos avaliado por PCR para os genes *23S rRNA*, *gyrA* e *rdxA*.

Antibiótico	Amostras	Resistente	Sensível
	N	% (n/N)	% (n/N)
Claritromicina	96	10,4 (10/96)	89,6 (86/96)
Fluoroquinolonas	40	20 (8/40)	80 (32/40)
Metronidazol	96	55,2 (53/96)	44,8 (43/96)

Tabela 16: A taxa das mutações que conferem resistência do *H. pylori* aos antibióticos avaliado para os genes *23S rRNA*, *gyrA* e *rdxA*.

Antibiótico	Tipo de Mutação	n	%(n/N)
23S rRNA			
Claritromicina (N= 10)	A2141G	2	20 (2/10)
	A2142G	8	80 (8/10)
gyrA			
Fluoroquinolonas(N=8)	N87I	4	50 (4/8)
	D91G	4	50 (4/8)
RdxA			
Metronidazol(N=53)	D59N	9	17 (9/53)
	D59N+H97T	3	5,7 (3/53)
	D59N+R90K	11	20,8 (11/53)
	D59N+R90K+H97T	8	15 (8/53)
	R90K+A118T	3	5,7 (3/53)
	D59N+R90K+A118T	19	35,8 (19/53)

Nas 96 amostras testadas, 13 (13,5%, 13/96) apresentaram uma multirresistência para pelo menos dois dos três tipos de antibióticos (claritromicina, fluoroquinolonas e metronidazol), tendo sido a maioria multirresistente para claritromicina e metronidazol (Cla+Metro) com 46,2% (6/13) e para fluoroquinolonas e metronidazol (Fluo+Metro) na mesma proporção (figura 18).

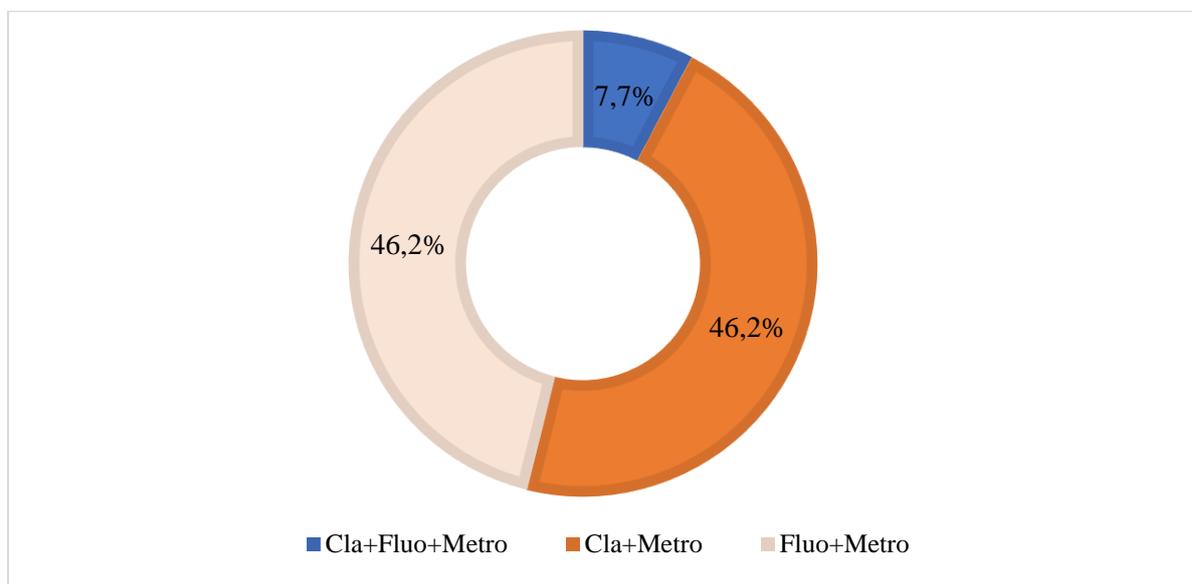


Figura 18: Taxa de multirresistência num grupo de amostras em que foram identificadas as mutações associadas à resistência aos antibióticos (claritromicina, fluoroquinolonas e metronidazol).

4.3.2 Detecção dos factores de virulência em amostras positivas

Foram detectados com recurso à técnica PCR, os genes *vacA*, *dupA* e *cagA* em amostras positivas para o *H. pylori*. O gene *vacA* foi detectado em todas as amostras, no entanto os seus genótipos variaram da seguinte forma: o genótipo *s1/m1* foi detectado em 25% (24/96) das amostras, o genótipo *s1/m2* em 36,5% (35/96), genótipo *s2/m1* em 18,8% (18/96) e o genótipo *s2/m2* em 19,8% (19/96). O gene *dupA* foi detectado em 61,5% (59/96) das amostras e o gene *cagA* foi detectado em 16,7% (16/96) das amostras testadas, ver a figura 19.

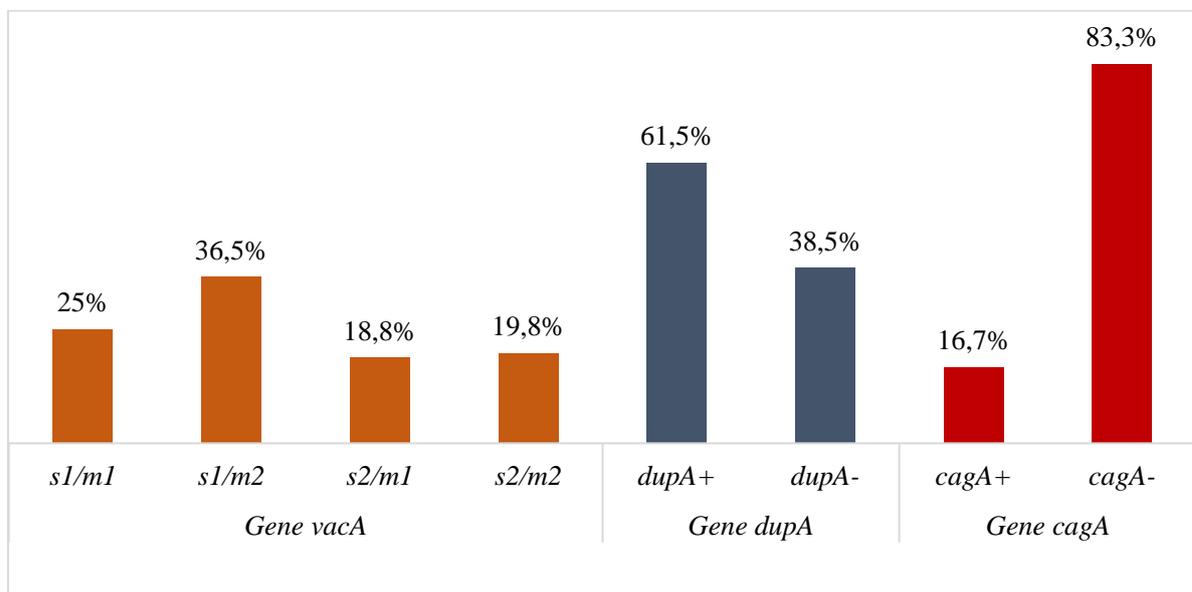


Figura 19: Detecção dos factores de virulência em amostras positivas para o *H. pylori* (*dupA+* = *dupA* positivo, *dupA-* = *dupA* negativo; *cagA+* = *cagA* positivo e *cagA-* = *cagA* negativo).

Todas as amostras que através da técnica de PCR testaram positivo para o gene *cagA* (16 amostras) foram sequenciadas com vista a detectar os locais de fosforilação de tirosina em CagA (EPIYA) que têm sido utilizados na identificação da origem das estirpes *cagA* positivas e seu papel nas doenças gastrointestinais graves, como é o caso do cancro gástrico. Portanto, a análise bioinformática das sequências evidenciou que, 93,8% (15/16) das estirpes *cagA* positivas tinham um sítio C de fosforilação (eram do tipo EPIYA- ABC) e 6,2% (1/16) tinham três sítios (eram do tipo EPIYA- ABCCC), tal como mostra a figura 20. No entanto, com base no resultado, foi demonstrado que todas as estirpes eram de origem ocidental.

CAPÍTULO V

5. Discussão

5.1. Características sociodemográficas dos pacientes

Com base nos resultados, a população do nosso estudo foi maioritariamente constituída por pacientes de sexo feminino (72,5%) na faixa etária dos 35 - 49 anos. Esses resultados são consistentes com estudo desenvolvido por Modcoicar *et al.*, (2011) em pacientes com características similares na mesma unidade hospitalar que encontrou um número maior de pacientes do sexo feminino (62,3%).

Esses dados são substanciados por Talley *et al.*, (2017) que afirmam que, a queixa da dispepsia se verifica mais em pacientes de sexo feminino do que em pacientes de sexo masculino, apesar de ambos terem igual probabilidade de serem afectados; e para além disso, Agah *et al.*, (2020) e Mounsey *et al.*, (2020) também apontam que cerca de 30% da população adulta maioritariamente de sexo feminino é afectada pela dispepsia em algum momento da sua vida.

5.2. A taxa de infecção causada pelo *H. pylori* e a sua relação com as características sociodemográficas dos pacientes

A detecção de infecção por *H. pylori* em pacientes estudados foi feita através de teste molecular (PCR), e encontrou-se uma taxa de infecção de 56,1%. Esta taxa é menor quando comparada com às de outros estudos anteriores que relataram taxas de infecção de 84 e 94,5% em pacientes dispépticos moçambicanos (Carrilho *et al.*, 2009; Modcoicar *et al.*, 2011). Portanto, com base na taxa actual, nota-se que de 2009 a 2020, a taxa de infecção diminuiu cerca de 33%.

Esta redução pode ser atribuída à melhoria das condições de transmissibilidade, pois, segundo dados do nosso estudo, 98,2% dos pacientes estudados viviam em habitações convencionais, e 94,7 % destes tinham acesso à água potável (ver a tabela 10). Provavelmente, este pode ter sido um dos factores que contribuiu para essa redução. Malfertheiner *et al.*, (2017) & Graham, (2014) afirmam que, a taxa de infecção por *H. pylori* tende a diminuir ultimamente por conta da melhoria das condições de vida, da melhoria do saneamento do meio, rápida industrialização e a urbanização.

A taxa de infecção obtida neste estudo, embora com uma ligeira diferença, tende a corresponder à que foi encontrada por Idowu *et al.*, (2019) num estudo realizado em pacientes dispépticos na África do Sul (52,7%). E é inferior comparativamente às taxas de infecção reportadas no Uganda e na Tanzânia (68% e 92%, respectivamente) (Angol *et al.*, 2017; Jaka *et al.*, 2019), bem como às taxas relatadas em vários países da África Ocidental, que variam entre 70 e 95% (Ofori *et al.*, 2019, Archampong *et al.*, 2017, Doh *et al.*, 2017)

Segundo Kodaira *et al.*, (2002)., vários factores sociodemográficos tais como sexo, idade, qualidade da água, consumo de álcool e tabagismo têm sido relacionados a com infecção por *H. pylori*. No entanto, no presente estudo, não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre estes factores e a infecção por *H. pylori*. O mesmo foi observado por Idowu *et al.*, (2019) em pacientes dispépticos na África do Sul.

Entretanto, embora não tenha sido encontrada relação significativa entre estes factores e a infecção, relativamente à idade, observou-se uma redução progressiva da infecção, tendo sido a faixa etária dos 65 aos 79 anos apresentado menor taxa de infecção comparativamente às outras faixas etárias mais jovens. A tendência semelhante foi observada no estudo desenvolvido por Santos *et al.*, (2010) no Brasil, e nesse estudo ela foi associada à história natural de infecção por *H. pylori* (infecção é geralmente adquirida na infância).

Também no que diz respeito à qualidade da água consumida, verificou-se uma tendência crescente de infecção em pacientes que bebiam água não tratada. Segundo Todor *et al.*, (2019), a água não tratada serve como um veículo para propagação de infecção por *H. pylori*, isso foi comprovado por Favian Bayas-Morejón *et al.*, (2019) em seu estudo quando através de métodos moleculares detectaram a presença do *H. pylori* em água potável; e o mesmo foi comprovado por Eusebi *et al.*, (2014) quando detectaram a presença de *H. pylori* na rede de distribuição de água potável na Turquia.

Em Moçambique, o Ministério da Saúde aponta o fornecimento de água potável como sendo um factor fundamental para a redução de impacto de infecções veiculadas pela água, por isso, recomenda o tratamento da água pelo cloro ou pela fervura nas zonas onde não há fonte de água tratada, e mesmo quando a água é potável, a cloração é sempre uma técnica recomendada para garantir a melhor qualidade de água para o consumo (MISAU, 2016).

5.3. A taxa de resistência do *H. pylori* aos antibióticos usados para o tratamento.

A eficácia terapêutica de regimes propostos para a erradicação de *H. pylori* está a diminuir globalmente devido ao desenvolvimento da resistência aos antibióticos que *H. pylori* pode adquirir através de vários mecanismos, tais como mutações pontuais; e por ser uma bactéria fastidiosa, tem sido difícil avaliar a sua susceptibilidade fenotípica aos antibióticos, pelo que a sua resistência aos antibióticos é geralmente detectada usando técnicas moleculares (Nemr *et al.*, 2022; Eed *et al.*, 2019).

Neste estudo, com base na técnica molecular (PCR), avaliamos mecanismos que levam à resistência de *H. pylori* ao metronidazol, fluoroquinolonas e claritromicina; e encontramos altas taxas de resistência ao metronidazol e fluoroquinolonas, e uma taxa moderada de resistência à claritromicina.

A resistência ao metronidazol foi de 55,2%, e foi atribuída a quatro tipos de mutações, detectadas em amostras de pacientes estudados, e que haviam sido previamente descritas por Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, (2021), nomeadamente D59N, R90K, H97T, e A118T; e notámos que estas mutações apareciam combinadas em muitos casos. A taxa de resistência ao metronidazol encontrada no nosso estudo é similar à que foi encontrada por Mansour *et al.*, (2010) em pacientes tunisinos, e inferior à taxa encontrada no estudo realizado por Acosta *et al.*, (2017) em pacientes colombianos, que também encontrou as mesmas mutações, mas a sua distribuição foi diferente, sendo mutação D59N a mais frequente, seguida de R90K.

Segundo Smith *et al.* (2019), a resistência de *H. pylori* ao metronidazol é preocupante, particularmente nos países em desenvolvimento, pois, nesses países, as taxas de resistência ao metronidazol podem exceder 80%, a prova disso são as taxas que foram reportadas em alguns países africanos, tais como, África do Sul (83,3%), Nigéria (99,1%), e Camarões (97,85%) (Palamides *et al.*, 2020; Kouitcheu Mabeku *et al.*, 2019).

A taxa resistência de *H. pylori* ao metronidazol obtida no nosso estudo, embora inferior à reportada na África do Sul e na Nigéria, ainda é preocupante. De acordo com Cambaco *et al.*, (2020) e Torres *et al.*, (2020), metronidazol é o antibiótico mais acessível e comumente utilizado em Moçambique para tratar as doenças diarreicas de origem bacteriana e protozoária, e infecções ginecológicas, pelo que é provável que essa resistência tenha resultado da exposição prévia ao metronidazol durante o tratamento dessas doenças.

Segundo Ben Mansour *et al.*,(2010), em regiões onde a resistência de *H. pylori* ao metronidazol é elevada recomenda-se a proibição de uso de metronidazol no regime terapêutico para evitar o aparecimento de estirpes mais resistentes, ou seja, a prescrição de metronidazol deve basear-se apenas no resultado laboratorial.

Quanto às fluoroquinolonas, o presente estudo revelou uma taxa de resistência de 20%, e as mutações associadas a esta resistência foram N87I e D91G, detectadas com a mesma frequência (50%). A taxa de resistência de *H. pylori* às fluoroquinolonas obtida neste estudo, excede a taxa global (18,94%), bem como as taxas reportadas em alguns países africanos como é o caso da África do Sul (10,26%) e da Nigéria (15%) (Smith *et al.*, (2019; Tanih *et al.*, 2013); e é ainda inferior comparativamente às taxas que têm sido reportadas outros países como Uganda (42%), Congo (50%) e Tanzânia (58,8%) Angol *et al.*, 2017; Jaka *et al.*, 2019; Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015).

Estudo realizado por Jaka *et al.*, (2019) em pacientes dispépticos Tanzanianos reportou uma elevada taxa de resistência de *H. pylori* às fluoroquinolonas e encontrou várias mutações associadas à essa taxa de resistência incluído as duas que foram encontradas no presente estudo, tendo sido N87I a mutação frequentemente encontrada nesse estudo. As mesmas mutações têm sido associadas à resistência de *H. pylori* às fluoroquinolonas nalguns países da América Latina como é o caso do Brasil e da Colômbia (Sanches *et al.*, 2016; Trespalacios-Rangél *et al.*, 2016).

É comum o uso das fluoroquinolonas para tratar uma série de infecções, tais como infecções do tracto urinário, febre tifóide, diarreia, e muitas outras; assim, o seu uso indiscriminado pode contribuir para o aumento da resistência que tem vindo a crescer ultimamente (Jaka *et al.*, 2019; Berendes *et al.*, 2019; Bachir *et al.*, 2018) .

Portanto, este estudo revela um surgimento de estirpes de *H. pylori* resistentes às fluoroquinolonas, e isso pode comprometer a eficácia terapêutica de regimes que contêm este grupo de antibióticos, utilizados normalmente como segunda linha de tratamento. Em situações iguais, Sanches *et al.*, (2016) e Malfertheiner *et al.*, (2012) recomendam o uso das fluoroquinolonas com base no antibiograma, e ressaltam que as fluoroquinolonas podem ser livremente usadas nas regiões em que a taxa de resistência é inferior a 10%.

Relativamente à claritromicina, encontramos uma taxa de resistência de 10,4%, que é menor comparativamente às que têm sido reportadas em vários estudos conduzidos em alguns países Africanos tais como Africa do Sul (15 - 20%), Tanzânia (28,7%), Uganda (29%) e Camarões (85%). Nesses países, a utilização excessiva de macrólidos para o tratamento de outras doenças infecciosas tem sido sugerida como uma das causas que ocasionam essas altas taxas de resistência (Angol *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2019, Jaka *et al.*, 2019).

Por outro lado, a taxa de resistência à claritromicina reportada neste estudo é maior às reportadas em Congo (1,7%) e em Quênia (6%) (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2019). Segundo White *et al.*, (2022), nos países onde a taxa de resistência é ainda inferior a 15%, é possível que o consumo de macrólidos tenha permanecido estável por ser controlado pelas entidades competentes.

A semelhança do que é observado em alguns países africanos, altas taxas de resistência de *H. pylori* à claritromicina têm sido encontradas na América e Europa (29,3% e 17,5%, respectivamente) e, em muitos países asiáticos onde a taxa de resistência à claritromicina pode atingir os 84,9% (Nemr *et al.*, 2022; Binh *et al.*, 2013; De Francesco *et al.*, 2010).

várias mutações associadas à resistência de *H. pylori* à claritromicina já foram identificadas, e as mais estudadas incluem, A2142G e A2143G, e acredita-se que estas sejam responsáveis por 90% da resistência de *H. pylori* à claritromicina (Nemr *et al.*, 2022; Smith *et al.*, 2019). Neste estudo, foram detectadas duas mutações, nomeadamente: A2141G e A2142G; e se diferem das que têm sido encontradas em muitos estudos.

As mutações A2142G e A2143G são frequentemente reportados nos estudos desenvolvidos em alguns países africanos, incluindo Egito, Argélia, Tunísia e Tanzânia; bem como em alguns países latino-americanos tais como, Brasil e Colômbia (Smith *et al.*, 2019; Jaka *et al.*, 2019; Acosta *et al.*, 2017 ; De Francesco *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2003).

Estudo desenvolvido por Jaka *et al.*, (2019) em pacientes Tanzanianos, encontraram quatro tipos de mutações (A2143G, A2142G , A2142C e A2143C), tendo sido A2143G a mutação mais frequente em amostras resistentes (55,6%), seguida pela mutação A2142G (37%); o que se difere com o que foi encontrado no presente estudo; neste estudo, a mutação A2142G foi a mais frequente nas amostras resistentes à claritromicina (80%).

A mutação A2141G detectada em 20% das amostras resistentes, parece ser um novo achado, pois tem sido reportada apenas em estirpes colombianas resistentes à claritromicina. A prova disso, é o estudo realizado por Rozo, (2020) sobre análise genómica comparativa em isolados de *H. pylori* em pacientes colombianos, que detectou a mutação A2141G pela primeira vez em dois dos 55 isolados analisados, e associou essa mutação a resistência de *H. pylori* à claritromicina nos dois isolados em que foi detectada.

Com base nos resultados, é importante notar que, há uma indicação de que as mutações identificadas neste estudo podem estar associadas à falência terapêutica de regimes que contêm a claritromicina, uma vez que em 80% das amostras resistentes foi identificada a mutação (A2142G) que tem sido relatada como uma das mutações comumente associadas à resistência de *H. pylori* à claritromicina a nível global (Nemr *et al.*, 2022).

Segundo Chey *et al.*, (2017) e Malfertheiner *et al.*, (2012), em países em que a taxa de resistência à claritromicina local é superior a 15%, recomenda-se a remoção da claritromicina na terapia tripla empírica usada para tratar a infecção por *H. pylori*, e em países em que taxa de resistência local ainda não atingiu os 15%, a tripla terapia contendo a claritromicina deve se basear sempre no antibiograma. Com isso, o nosso resultado leva a creditar que a claritromicina continua sendo um antibiótico eficiente para a erradicação de infecção por *H. pylori* nos pacientes estudados contrariamente ao metronidazol e às fluoroquinolonas; no entanto, estes resultados não podem ser generalizados. Para que se conheça de forma consistente a taxa de resistência local mais estudos precisam de ser feitos.

5.4. Detecção dos factores de virulência em amostras positivas para *H. pylori*

A patogenicidade de *H. pylori* está ligada aos seus factores de virulência, dentre os quais se destacam os genes *vacA*, *cagA* e *dupA*, por estes estarem relacionados à gravidade dos sintomas em pacientes infectados (Baj *et al.*, 2020; Osman *et al.*, 2017).

Neste estudo, procuramos detectar a presença destes genes em amostras *H. pylori* positivas e observamos que o gene *vacA* era o mais predominante (100%), seguido pelo gene *dupA* (61,5%) e, o gene *cagA* era o menos predominante (16,7%). Também, gene *vacA* mostrou várias combinações alélicas que originaram diferentes genótipos, tendo sido *vacAs1/m2* o genótipo predominante (36,5%), seguido pelo *vacAs1/m1* (25%). Portanto, este resultado corrobora com estudos de Ferreira, (2006) e Ladeira *et al.*, (2003), que afirmaram que o gene *vacA* está presente quase em todas as estirpes de *H. pylori*.

O gene *vacA* tem sido associado à vacuolização das células epiteliais do estômago, no entanto, a virulência de cada estirpe *vacA* positiva depende do seu genótipo (Silva *et al.*, 2021). Segundo Baj *et al.*, (2020), estirpes *vacA s1/m1* são mais virulentas e produzem grandes quantidades de toxina, estirpes *vacA s1/m2* são menos virulentas e produzem quantidades moderadas de toxina, enquanto que estirpes *vacA s2/m1* e *s2/m2* não são virulentas e produzem pouca ou nenhuma toxina.

O nosso estudo mostrou que 36,5% dos pacientes estudados foram infectados com estirpes menos virulentas, e 25% com estirpes muito virulentas. Este resultado tende a ser semelhante ao obtido por Archampong, (2020), no seu estudo desenvolvido em pacientes dispépticos, no Gana.

Ao contrário do nosso resultado, Idowu *et al.*, (2019) encontraram uma alta prevalência de gene *vacA* em amostras de pacientes infectados por *H. pylori*, na África do Sul, no entanto, o genótipo predominante foi *vacAs1/m1* (56,4%), o que indica que mais de metade desses pacientes estavam infectados com estirpes muito virulentas. O mesmo tem sido observado em doentes dispépticos infectados por *H. pylori* na Etiópia e no Senegal, onde estirpes *vacA s1/m1* são apontadas como as que causam mais a infecção; e nesses pacientes, a presença das estirpe com esse genótipo foi associada ao risco de desenvolvimento da úlcera gástrica (Breurec *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2002).

O genótipo *vacA s1/m1* também tem sido reportado nos vários estudos realizados em alguns países da América Latina como a Argentina, Brasil, Colômbia e México (Silva *et al.*, 2021; Molina-Castro *et al.*, 2019), bem como em alguns países asiáticos (China, Índia, Japão e Malásia); e nestes países, as estirpes *vacA s1/m1* foram associadas a úlcera gástrica, enquanto as estirpes *vacA s1/m2* e *vacA s2/m2* foram associadas a gastrite (Osman *et al.*, 2017; Salih *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2012; Hussein, 2010). Portanto, neste estudo, embora não tenhamos encontrado relação significativa entre genótipos de estirpes e achados endoscópicos, suspeitamos que estirpes *vacA s1/m2* sejam responsáveis pela gastrite eritematosa, uma vez que é mais comum em pacientes infectados por *H. pylori*.

Relativamente ao gene *dupA*, o nosso estudo reportou uma prevalência de 61,5% , que é superior à relatada por Idowu *et al.*, (2019) na África do Sul (53,4%) e inferior à reportada por Fowora *et al.*, (2020) na Nigéria (80%); nesses dois estudos a presença do gene *dupA* foi associada à úlcera duodenal.

Segundo Trujillo *et al.*, (2014), a presença de gene *dupA* em amostras de pacientes infectados por *H. pylori* não é suficiente para predizer o quão virulenta é a estirpe. Este gene está presente em muitas estirpes de *H. pylori*, mas em muitos casos parece estar inativado, por isso, o seu papel na patogénese de infecção ainda é uma questão controversa (Jung *et al.*, 2012); mas, mesmo assim, acredita-se que ele esteja associado ao risco do desenvolvimento da úlcera duodenal (Lemos, 2020; Vale *et al.*, 2017; Yamaoka & Graham, 2014).

Chang *et al.*, (2018) e Miftahussurur & Yamaoka, (2015), afirmam que presença do gene *dupA* nas estirpes de *H. pylori*, eleva a infiltração de neutrófilos e a produção de IL-8, aumentando assim o risco do desenvolvimento de úlcera duodenal; facto que tem sido comprovado em vários estudos desenvolvidos principalmente na Ásia que indica o gene *dupA* estando associado à úlcera duodenal (Salih *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2009); contrariamente ao que relatado em alguns países americanos e europeus, onde o gene *dupA* não estava associado à úlcera duodenal mas sim ao cancro gástrico (Hussein, 2010; Argent *et al.*, 2007). Portanto, isto sugere que, dependendo da região e, a presença do gene *dupA* pode estar associado à úlcera duodenal em algumas populações e cancro gástrico em outras (Argent *et al.*, 2004).

É de ressaltar que, estirpes *dupA* positivas têm sido frequentemente reportadas em África, América Latina e alguns países europeus, onde a prevalência pode chegar até 80%, ao contrário do que tem sido reportado no continente Asiático, onde a prevalência varia geralmente entre 18,5 a 50%, no entanto, é no continente Asiático onde há mais casos de úlcera duodenal (Sallas *et al.*, 2017; Osman *et al.*, 2017; Salih *et al.*, 2013).

Também encontramos uma prevalência de 16,7% de gene *cagA* em amostras *H. pylori* positivas, esta prevalência se difere às reportadas em alguns países africanos tais como, África do Sul (62 - 95%), Nigéria (90%), Gana (74,8%) e Senegal (73,3%) (Archampong, 2020; Idowu *et al.*, 2019; Breurec *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2002). O nosso resultado está de acordo com Yamaoka, (2012) e Yamaoka *et al.*, (2002) que constataram que, geralmente, as estirpes que circulam em África e na Europa, eram maioritariamente *cagA*-negativas comparativamente às estirpes que circulam no continente asiático que são na sua maioria *cagA*-positivas.

A presença de *cagA* nas estirpes de *H. pylori* tem sido associado ao desenvolvimento cancro gástrico (Essawi *et al.*, 2013; Arévalo *et al.*, 2009). Vários estudos desenvolvidos na Ásia,

apontam que mais de 90% das estirpes de *H. pylori* isolada em pacientes com diferentes complicações gastrointestinais, são *cagA*-positivas, e esses estudos mostram que os pacientes infectados com essas estirpes tem maior risco de desenvolver o cancro gástrico; portanto, isto pode explicar a elevada prevalência do cancro gástrico que se reporta em vários países do continente asiático (Oliveira *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021;Plummer *et al.*, 2016).

Segundo Hatakeyama; (2017), o grau de virulência das estirpes *cagA*-positivas é determinado por várias características relacionadas com a região *cag*-PAI. Portanto, para avaliarmos o grau de virulência dessas estirpes, analisamos a região C-terminal da *CagA* que contém os motivos EPIYA, e o resultado revelou que, *cagA*-positivas eram maioritariamente do tipo EPIYA-ABC (93,8%) e apenas 6,2% eram do tipo EPIYA-ABCCC.

Segundo Yamaoka & Graham, (2014), o motivo EPIYA pode ser classificado em quatro tipos com base nas sequências desses aminoácidos: EPIYA-A, B, C e D. No entanto, a actividade funcional de uma estirpe *H. pylori cagA*-positiva é determinada por combinações dos motivos EPIYA, e estas combinações podem ser diferentes com base na localização geográfica; portanto, as estirpes ocidentais têm as seguintes combinações: EPIYA-ABC, EPIYA-ABCC, e EPIYA-ABCCC e são menos virulentas, enquanto que as estirpes da Ásia Oriental têm tipicamente EPIYA-ABD e geralmente são as mais virulentas (Šterbenc *et al.*, 2019;Yamaoka & Graham, 2014) . Assim, podemos afirmar que, todas as estirpes de *H. pylori cagA*-positivas detectadas neste estudo são ocidentais e menos virulentas.

Comparando os nossos resultados com os de outros estudos, verificamos que os motivos EPIYA-ABC são os mais detectados em estirpes *cagA*-positivas isoladas em pacientes de vários países africanos. Estudo desenvolvidos por Khiddi *et al.*, (2020), reportou uma prevalência de 91,3% de motivos EPIYA-ABC em estirpes *cagA*-positivas isoladas de pacientes mauritanianos; em Marrocos, El Khadir *et al.*, (2018) relataram uma prevalência de 71,4% de motivos EPIYA-ABC, e apenas o motivo EPIYA-ABCCC foi detectado num paciente com uma úlcera duodenal, e descobriram que as estirpes EPIYA-ABC estavam fortemente associadas à gastrite.

Entre os pacientes iranianos, o motivo EPIYA- ABCCC foi fortemente associado ao risco de desenvolver cancro gástrico Keikha & Karbalaie (2021). Esta associação foi também verificada por Rodríguez Gómez *et al.*, (2020) em pacientes colombianos e por Oliveira *et al.*, (2021) em pacientes brasileiros após terem constatado que o motivo EPIYA- ABCCC

era frequentemente encontrado em pacientes com mais de 50 anos de idade e que já tinham sido diagnosticados com cancro gástrico. Isso alinha com o estudo de Archampong, (2020) que sugeriu que, a presença do gene *cagA* contendo motivos mais fosforilados pode contribuir para a maior incidência de cancro gástrico dentro de uma determina população.

Os genes *cagA* e *vacA*, tanto individual como em conjunto, têm sido associados a doenças gastrointestinais graves (Archampong, 2020; Breurec *et al.*, 2012). De acordo com Yamaoka, (2012), quase todas as estirpes *cagA*-positivas são classificadas como estirpe *vacA s1/m1* ou *vacA s1/m2*, enquanto as estirpes *cagA*-negativas são geralmente classificadas como a estirpe *vacAs2/m2*, e isso foi comprovado neste estudo. Encontramos uma relação estatisticamente significativa entre os genes *cagA* e *vacA*; das 16 amostras *cagA*-positivas, 10 eram simultaneamente *vacAs1/m2* e 6 eram simultaneamente *vacAs1/m1* ($p=0,007$), ver Apêndice - 9.

Estudos desenvolvidos sobre a sinergia dos genes *cagA* e *vacA* e o grau de virulência entre as combinações dos seus genótipos mostram que, a combinação *cagA+vacA s1m1* está associada ao risco do desenvolvimento de úlceras gastroduodenais e cancro gástrico, enquanto a combinação *cagA+vacA s1m2* está associada ao desenvolvimento de gastrite (Silva *et al.*, 2021; Cavalcante *et al.*, 2012;). Embora não tenhamos encontrado uma relação significativa entre estas combinações e os achados endoscópicos no nosso estudo, podemos suspeitar que a combinação *cagA+vacA s1m2* esteja a contribuir para elevada incidência de gastrite eritematosa em pacientes infectados, uma vez que é a mais frequente nas amostras *H. pylori* positivas.

5.5. Determinação da filogenia das estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes

A análise filogenética por MLST de 30 amostras *H. pylori*-positivas revelou três populações distintas entre os pacientes estudados, nomeadamente hpEurope, hpAfrica1, e hpAfrica2, sendo esta última a mais preponderante que as outras populações.

Segundo Nell *et al.*, (2013) e Moodley & Linz, (2009), as populações hpAfrica1 e hpAfrica2 têm sido apontadas como sendo nativas de África, enquanto que hpEurope é tipicamente europeia, mas também tem sido encontrada em vários países do Médio Oriente; e afirmam ainda que hpAfrica1 é típica da região da África Ocidental e hpAfrica2 da África Austral.

Há provas de que as migrações humanas desempenham um papel significativo na criação de populações distintas de *H. pylori* (Lehours, *et al.*, 2016; Owen *et al.*, 2004). Por conseguinte, faz sentido que tenhamos encontrado a população hpAfrica1 nos pacientes estudados; Secka *et al.*, (2014) e Nell *et al.*, (2013) sugerem que a distribuição de hpAfrica1 na África Austral tenha resultado das migrações do povo bantu que ocorreram há cerca de 5.000 anos.

Geralmente, ocorrência de estirpes hpAfrica1 é mais frequente nos países como, Gâmbia, Nigéria e Senegal, Senegal, e isto está de acordo com a localização geográfica destes países, pois é na África Ocidental onde predomina a população hpAfrica1 (Secka *et al.*, 2014; Linz *et al.*, 2014).

A presença da população hpAfrica1 em Moçambique, foi reportada pela primeira vez por Oleastro *et al.*, (2017), no seu estudo sobre a estrutura genética da população das estirpes de *H. pylori* que ocorrem nos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa e nesse estudo, a população hpAfrica1 foi encontrada em dois isolados de Moçambique.

Em relação à população hpAfrica2, Moodley *et al.*, (2012) e Duncan *et al.*, (2013) sugeriram que sua ocorrência frequente na África Austral estava relacionada à abundância do povo san nesta região, povo em que esta população foi identificada pela primeira vez. O povo san é um povo primitivo que habitou a África Austral, e estudos de Choudhury *et al.*, (2021) e Semo *et al.*, (2020) relatam ter encontrado vestígios desse povo em muitos países da região, incluindo Moçambique (principalmente nas partes do sul do país).

Portanto, com base na localização geográfica de Moçambique e da região em que o estudo foi realizado, a predominância de hpAfrica2 faz muito sentido. Este resultado é similar ao obtido no estudo realizado por Palamides *et al.*, (2020), que relatou uma elevada prevalência da população hpAfrica2 em pacientes sul-africanos infectados por *H. pylori*. Além de África, altas prevalências da população hpAfrica2 foram também relatadas em países latino-americanos tais como, Colômbia e México, onde a presença desta população foi sugerida como prova genética de existência de escravos oriundo da África Austral (Guzman *et al.*, 2021; Muñoz-Ramírez *et al.*, 2017).

Neste estudo, é importante ressaltar que as estirpes que agruparam para a população hpAfrica2 foram as mais distantes daquelas que serviram de referência, portanto, isto pode remeter para existência de uma população específica de linhagem hpAfrica2 presente em

Moçambique; contudo, esta hipótese deve ser confirmada com a realização de estudos adicionais poderão abranger outras regiões do país.

A população hpEurope na África tem sido relacionado com a história de invasão e colonização da África por europeus (Nell *et al.*, 2013). No caso particular de Moçambique, a população hpEurope pode servir como um vestígio da colonização pelos portugueses (Oleastro *et al.*, 2017). Ao contrário do que foi encontrado neste estudo, foram relatadas elevadas taxas de prevalência da população hpEurope nos países da África Ocidental, nestes países, suspeita-se que população hpEurope tenha surgido da região nordeste de África, onde abunda Secka *et al.*, (2014), e isto confirmado pelo estudo de Raaf *et al.*, (2017), que relatou uma taxa de prevalência de hpEurope de 78,6% em amostras de pacientes argelinos infectados.

CAPÍTULO VI

6. Conclusões

Com base nos resultados, podemos concluir que,

- ☞ O presente estudo foi constituído maioritariamente por pacientes de sexo feminino na faixa etária dos 35 aos 49 anos de idade, residentes na província de Maputo. E, a gastrite eritematosa foi o achado endoscópico mais frequente entre elas.
- ☞ Há uma prevalência de infecção por *H. pylori* de 56,1% nos pacientes dispépticos atendidos no Serviço da Gastroenterologia do Hospital Central de Maputo.
- ☞ As estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes são altamente resistentes ao metronidazol (55,2%) e às fluoroquinolonas (20%), e menos resistentes à claritromicina (10,4%), e isto compromete a eficácia terapêutica da segunda linha que usa metronidazol e fluoroquinolonas.
- ☞ Os pacientes foram infectados com estirpes que continham simultaneamente os genes *vacA* e *dupA*, e apenas 16% destas estirpes continham genes *cagA* do tipo EPIYA-ABC com o genótipo *vacA s1/m2*. Isto sugere que as estirpes eram menos virulentas.
- ☞ Existe uma diversidade genética entre as estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes estudados, sendo a maioria pertencente a populações nativas de África (hpAfrica1 – 33,3% e hpAfrica2 -50%).

7. Limitações

- ☞ Faltou a caracterização fenotípica das estirpes, pois não fomos capazes de as cultivar directamente a partir das biópsias gástrica, e isso limitou-nos a associar algumas mutações no gene *rdxA* com a resistência ao metronidazol,
- ☞ Não fomos capazes de estudar a resistência do *H. pylori* à amoxicilina devido à inespecificidade dos primers que utilizamos para detectar o gene-alvo nas nossas amostras (gene *pbp* – *penicillin-binding-protein*).

8. Recomendações

À **MISAU** (Direcção Nacional de Assistência Médica - Plano Nacional de Controlo do Cancro 2019-2029):

- ☞ Criar uma rede de gestão epidemiológica de infecção por *H. pylori* para adotar medidas de controlo desta infecção e prever o seu impacto nas doenças gastrointestinais graves a nível do país.
- ☞ Implementar sistema de vigilância da resistência de *H. pylori* aos antibióticos para recomendar a terapia mais apropriada para cada região do nosso país, evitando assim falência terapêutica.
- ☞ Limitar o uso de metronidazol no algoritmo terapêutico para a erradicação de *H. pylori* e controlar a utilização das fluoroquinolonas.

À Direcção Científica e Pedagógica do HCM

- ☞ Promover a formação contínua para uma abordagem integrada de infecção por *H. pylori* envolvendo a colaboração de todos os profissionais.

Ao Serviço de Gastroenterologia do HCM

- ☞ Reforçar o sistema de registo de dados para permitir a identificação de pacientes e o tratamento a que foram submetidos, evitando assim uma exposição continua a tratamentos que podem não ser eficazes dependendo de cada caso.
- ☞ Evitar o máximo o tratamento empírico da infecção e, acoplar o teste molecular (PCR) no diagnóstico de rotina.

Aos futuros investigadores

- ☞ Realizar estudos semelhantes em outras regiões do país, visto que poucos estudos disponíveis foram desenvolvidos apenas na região sul, especificamente na cidade e província de Maputo.

- ☞ Continuar a estudar outros mecanismos de resistência de *H. pylori* aos antibióticos, particularmente à amoxicilina.

- ☞ Estudar profundamente todos os factores de virulência importantes na patogenicidade de *H. pylori* e correlacioná-los com as patologias gástricas, e caracterizar filogeneticamente estirpes de *H. pylori* que circulam em outras regiões do país.

9. Referências bibliográficas

- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D. E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.-J., Suerbaum, S., Thompson, S. A., van der Ende, A., & van Doorn, L.-J. (1999). Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Molecular Microbiology*, 32(3), 459–470. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01382.x>
- Acosta, C. P., Quiroga, A. J., Sierra, H., & Trespalacios, A. A. (2017). Mutations frequency of RdxA a nitroreductase *Helicobacter pylori* for activation of metronidazole: A population study in the Department of Cauca. *Biomédica*, 37(2). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3007>
- Agah, S., Akbari, A., Heshmati, J., Sepidarkish, M., Morvaridzadeh, M., Adibi, P., Mazidi, M., Farsi, F., Ofori-Asenso, R., Talley, N. J., & Feinle-Bisset, C. (2020). Systematic review with meta-analysis: Effects of probiotic supplementation on symptoms in functional dyspepsia. *Journal of Functional Foods*, 68, 103902. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103902>
- Ahmed, N. (2005). 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 4(1), 17, 1476-0711-4–17. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-4-17>
- Alam, J., Maiti, S., Ghosh, P., De, R., Chowdhury, A., Das, S., Macaden, R., Devarbhavi, H., Ramamurthy, T., & Mukhopadhyay, A. K. (2012). Significant association of the dupA gene of *Helicobacter pylori* with duodenal ulcer development in a South-east Indian population. *Journal of Medical Microbiology*, 61(9), 1295–1302. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038398-0>
- Alfredson, D. A., & Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x>
- Alkim, H., Koksall, A. R., Boga, S., Sen, I., & Alkim, C. (2017). Role of Bismuth in the Eradication of *Helicobacter pylori*. *American Journal of Therapeutics*, 24(6), e751–e757. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000389>
- Alm, R. A., Ling, L.-S. L., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., ... Trust, T. J. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397(6715), 176–180. <https://doi.org/10.1038/16495>
- Alterthum, F. (2015). *Microbiologia* (6ª Edição). Editora Atheneu - São Paulo, Brasil.

AMM. (1964). *Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial Princípios Éticos para a Investigação Médica em Seres Humanos*. 18^a Assembleia Geral da AMM, Helsínquia, Finlândia.

Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00587>

Angelov, T., Dimitrova Kovacheva-Slavova, M., Ilianov Iliev, H., Yankov Valkov, H., & Georgiev Vladimirov, B. (2019). *Helicobacter pylori* Infection. Em B. Maria Roesler (Ed.), *Gastritis—New Approaches and Treatments*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86963>

Angol, D. C., Ocama, P., Ayazika Kirabo, T., Okeng, A., Najjingo, I., & Bwanga, F. (2017). *Helicobacter pylori* from Peptic Ulcer Patients in Uganda Is Highly Resistant to Clarithromycin and Fluoroquinolones: Results of the GenoType HelicoDR Test Directly Applied on Stool. *BioMed Research International*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/5430723>

Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2019). *Helicobacter pylori* Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity. *Toxins*, 11(11), 677. <https://doi.org/10.3390/toxins11110677>

Arakawa, T. (2012). Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance. *World Journal of Gastroenterology*, 18(35), 4811. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i35.4811>

Archampong, T. N. A. (2020). *Helicobacter pylori* diversity and gastro-duodenal disease in Western Africa. [Thesis]. Department of Genetics and Genome Biology, University of Leicester.

Archampong, T. N., Asmah, R. H., Aidoo, E. K., Wiredu, E. K., Gyasi, R. K., Adjei, D. N., Beleza, S., Bayliss, C. D., & Krogfelt, K. (2017). *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genes in dyspeptic Ghanaian patients. *BMC Research Notes*, 10(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2542-8>

Arévalo, A., Trespalacios, A. A., & Otero, W. (2009). *The importance of CagA protein in Helicobacter Pylori infection*. 8.

Arfaoui, D., Elloumi, H., & Abdelaziz, A. B. (2009). Revue Systématique de la Litterature. *La Tunisie Medicale*, 87, 6.

Argent, R. H., Burette, A., Miendje Deyi, V. Y., & Atherton, J. C. (2007). The Presence of *dupA* in *Helicobacter pylori* Is Not Significantly Associated with Duodenal Ulceration in Belgium, South Africa, China, or North America. *Clinical Infectious Diseases*, 45(9), 1204–1206. <https://doi.org/10.1086/522177>

- Argent, R. H., Kidd, M., Owen, R. J., Thomas, R. J., Limb, M. C., & Atherton, J. C. (2004). Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, *127*(2), 514–523. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.06.006>
- Atehortua Rendon, J. D., Pérez Cala, T. L., & Martínez, A. (2020). Descripción de la resistencia de *Helicobacter pylori* a seis antibióticos de uso frecuente en Colombia. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, *35*(3), 351–361. <https://doi.org/10.22516/25007440.493>
- Azevedo, N. F., Almeida, C., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2007). Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(10), 3423–3427. <https://doi.org/10.1128/AEM.00047-07>
- Bachir, M., Allem, R., Benejat, L., Tifrit, A., Medjekane, M., Drici, A. E.-M., Megraud, F., & Douidi, K. T. (2018). Molecular detection of mutations involved in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Algeria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(8), 2034–2038. <https://doi.org/10.1093/jac/dky167>
- Backert, S., & Yamaoka, Y. (Eds.). (2016). *Helicobacter pylori Research: From Bench to Bedside*. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55936-8>
- Baj, J., Forma, A., Sitarz, M., Portincasa, P., Garruti, G., Krasowska, D., & Maciejewski, R. (2020). *Helicobacter pylori* Virulence Factors—Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells*, *10*(1), 27. <https://doi.org/10.3390/cells10010027>
- Baltrus, D. A., Amieva, M. R., Covacci, A., Lowe, T. M., Merrell, D. S., Ottemann, K. M., Stein, M., Salama, N. R., & Guillemin, K. (2009). The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27. *Journal of Bacteriology*, *191*(1), 447–448. <https://doi.org/10.1128/JB.01416-08>
- Bbosa, G. S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. B., & Ntale, M. (2014). Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, *06*(05), 410–425. <https://doi.org/10.4236/health.2014.65059>
- Ben Mansour, K., Burucoa, C., Zribi, M., Masmoudi, A., Karoui, S., Kallel, L., Chouaib, S., Matri, S., Fekih, M., Zarrouk, S., Labbene, M., Boubaker, J., Cheikh, I., Hriz, M., Siala, N., Ayadi, A., Filali, A., Mami, N., Najjar, T., ... Fendri, C. (2010). Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: A prospective multicentre study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *9*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-22>
- Berendes, D., Knee, J., Sumner, T., Capone, D., Lai, A., Wood, A., Patel, S., Nalá, R., Cumming, O., & Brown, J. (2019). Gut carriage of antimicrobial resistance genes among young children in urban Maputo, Mozambique: Associations with enteric pathogen carriage

and environmental risk factors. *PLOS ONE*, 14(11), e0225464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225464>

Binh, T. T., Shiota, S., Nguyen, L. T., Ho, D. D. Q., Hoang, H. H., Ta, L., Trinh, D. T., Fujioka, T., & Yamaoka, Y. (2013). The Incidence of Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 47(3), 233–238. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182676e2b>

Bizzozero, G. (1989). *Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut.*

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M., & Martinez, J. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>

Breurec, S., Michel, R., Seck, A., Brisse, S., Côme, D., Dieye, F. B., Garin, B., Huerre, M., Mbengue, M., Fall, C., Sgouras, D. N., Thiberge, J. M., Dia, D., & Raymond, J. (2012). Clinical relevance of cagA and vacA gene polymorphisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(2), 153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03524.x>

Buckley, M. J. M., & O'Morain, C. A. (1998). Helicobacterbiology - Discovery. *British Medical Bulletin*, 54(1), 7–16. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011681>

Bytzer, P., & Talley, N. J. (2017). *Investigating Selecting Systems.*

Camargo, C. P., & Boschian, E. T. (2012). *Helicobacter pylori: Rol del agua y los alimentos en su transmisión.*

Cambaco, O., Alonso Menendez, Y., Kinsman, J., Sigaúque, B., Wertheim, H., Do, N., Gyapong, M., John-Langba, J., Sevene, E., & Munguambe, K. (2020). Community knowledge and practices regarding antibiotic use in rural Mozambique: Where is the starting point for prevention of antibiotic resistance? *BMC Public Health*, 20(1), 1183. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09243-x>

Cammarota, S., Bruzzese, D., Sarnelli, G., Citarella, A., Menditto, E., Riegler, S., Savino, I. G., Vozzella, L., Piccinocchi, G., Napoli, L., Arpino, G., & Cuomo, R. (2012). Proton pump inhibitors prescribing following the introduction of generic drugs: PPIS Market and Acid-related Disorders. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(10), 1068–1078. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02696.x>

- Cano-Contreras, A. D., Rascón, O., Amieva-Balmori, M., Ríos-Gálvez, S., Maza, Y. J., Meixueiro-Daza, A., Roesch-Dietlen, F., & Remes-Troche, J. M. (2018). Approach, attitudes, and knowledge of general practitioners in relation to *Helicobacter pylori* is inadequate. There is much room for improvement! *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 83(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.rgmxcn.2017.08.005>
- Carrilho, C., Modcoicar, P., Cunha, L., Ismail, M., Guisseve, A., Lorenzoni, C., Fernandes, F., Peleteiro, B., Almeida, R., Figueiredo, C., David, L., & Lunet, N. (2009). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection, chronic gastritis, and intestinal metaplasia in Mozambican dyspeptic patients. *Virchows Archiv*, 454(2), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0713-7>
- Cavalcante, M. Q. de F., Silva, C. I. S., Braga-Neto, M. B., Fialho, A. B. C., Nunes Fialho, A., Barbosa, A. M. C., Cruz, F. W. S., Rocha, G. A., Queiroz, D. M. M. de, & Braga, L. L. B. C. (2012). *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 561–563. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400021>
- Celli, J. P., Turner, B. S., Afdhal, N. H., Keates, S., Ghiran, I., Kelly, C. P., Ewoldt, R. H., McKinley, G. H., So, P., Erramilli, S., & Bansil, R. (2009). *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14321–14326. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903438106>
- Chahuán A., J., Pizarro R., M., Díaz P., L. A., Villalón F., A., & Riquelme P., A. (2020a). Métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Gastroenterología Latinoamericana*, 31(2), 98–106. <https://doi.org/10.46613/gastrolat202002-08>
- Chahuán A., J., Pizarro R., M., Díaz P., L. A., Villalón F., A., & Riquelme P., A. (2020b). Métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Gastroenterología Latinoamericana*, 31(2), 98–106. <https://doi.org/10.46613/gastrolat202002-08>
- Chang, W.-L., Yeh, Y.-C., & Sheu, B.-S. (2018). The impacts of *Helicobacter pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0466-9>
- Chey, W. D., Leontiadis, G. I., Howden, C. W., & Moss, S. F. (2017). ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *American Journal of Gastroenterology*, 112(2), 212–239. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.563>
- Choudhury, A., Sengupta, D., Ramsay, M., & Schlebusch, C. (2021). Bantu-speaker migration and admixture in southern Africa. *Human Molecular Genetics*, 30(R1), R56–R63. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa274>

- Chuah, S.-K. (2011). A new look at anti-*Helicobacter pylori* therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 17(35), 3971. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i35.3971>
- Chung, Kim, S. Y., Park, H. J., Chung, C. S., Lee, H. W., Lee, S. M., Kim, I., Pak, J. H., Lee, G. H., & Jeong, J.-Y. (2017). In Vitro Activity of Diphenyleneiodonium toward Multidrug-Resistant *Helicobacter pylori* Strains. *Gut and Liver*, 11(5), 648–654. <https://doi.org/10.5009/gnl16503>
- Coelho, L. G., Maguinilk, I., Zaterka, S., Parente, J. M., Passos, M. do C. F., & Moraes-Filho, J. P. P. (2013). 3rd Brazilian Consensus on *Helicobacter pylori*. *Arquivos de Gastroenterologia*, 50(2), 81–96. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032013005000001>
- Cosgun, Y., Yildirim, A., Yucel, M., Karakoc, A. E., Koca, G., Gonultas, A., Gursoy, G., & Ustun, H. (2016). *Evaluation of Invasive and Noninvasive Methods for the Diagnosis of Helicobacter Pylori Infection*. 17(12), 8.
- Crowe, S. E. (2019). *Helicobacter pylori* Infection. *New England Journal of Medicine*, 380(12), 1158–1165. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1710945>
- Czinn, S. J. (2005). *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation, and management. *The Journal of Pediatrics*, 146(3), S21–S26. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.11.037>
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.-P., & Pagès, J.-M. (2019). Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>
- Ddine, L. C., Ddine, C. C., Rodrigues, C. C. R., Kirsten, V. R., & Colpo, E. (2012). Fatores associados com a gastrite crônica em pacientes com presença ou ausência do *Helicobacter pylori*. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 25(2), 96–100. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202012000200007>
- De Almeida, N. (2014). *Estudo da Resistência Primária e Secundária de Helicobacter pylori* [Tese]. Universidade de Coimbra.
- de Andrade, L. N. (2020). *Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos*. Divisão de MI – CM – FMRP-USP, Brasil.
- De Francesco, V. D., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., & Zullo, A. (2010). *Worldwide H. pylori Antibiotic Resistance: A Systematic Review*. 6.
- De Oliveira, S. M., Fenandes, W. A., Da Silva, A. F., & De Brito, F. M. (2018). *Características clínicas e fatores de risco da dispepsia funcional em pessoas idosas: Revisão integrativa*. 12.
- De Palma, Z., Mendiondo, N., Wonaga, A., Viola, L., Ibarra, D., Campitelli, E., Salim, N., Corti, R., Goldman, C., & Catalano, M. (2017). Occurrence of Mutations in the Antimicrobial Target Genes Related to Levofloxacin, Clarithromycin, and Amoxicillin

Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates from Buenos Aires City. *Microbial Drug Resistance*, 23(3), 351–358. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0361>

Debraekeleer, A., & Remaut, H. (2018). Future perspective for potential *Helicobacter pylori* eradication therapies. *Future Microbiology*, 13(6), 671–687. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0115>

Delmar, J. A., Su, C.-C., & Yu, E. W. (2014). Bacterial Multidrug Efflux Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 43(1), 93–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022855>

Doh, K., Thiam, I., Halim, A., Takin, R. C. A., & Woto-Gaye, G. (2017). Pathological overview of chronic gastritis in Senegal: Results of upper gastrointestinal tract endoscopies. *Médecine et Santé Tropicales*, 27(4), 439–442. <https://doi.org/10.1684/mst.2017.0740>

Doig, P., de Jonge, B. L., Alm, R. A., Brown, E. D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S. D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B. C., Moir, D. T., Vovis, G. F., & Trust, T. J. (1999). *Helicobacter pylori* Physiology Predicted from Genomic Comparison of Two Strains. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 675–707. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.675-707.1999>

Duncan, S. S., Bertoli, M. T., Kersulyte, D., Valk, P. L., Tamma, S., Segal, I., McClain, M. S., Cover, T. L., & Berg, D. E. (2013). Genome Sequences of Three hpAfrica2 Strains of *Helicobacter pylori*. *Genome Announcements*, 1(5), e00729-13, 1/5/e00729-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00729-13>

Dunn, B. E., Cohen, H., & Blaser, Ma. J. (1997). *Helicobacter pylori*. *American Society for Microbiology, Vol. 10*(4), 720–741.

Dunne, C. (2014). Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5610. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5610>

Eed, E. M., Hawash, Y. A., Khalifa, A. S., Alsharif, K. F., Alghamdi, S. A., Saber, T., Ismail, K. A., & Shehab-Eldeen, S. A. (2019). Molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in the Taif region, Saudi Arabia. *Microbiology and Immunology*, 63(6), 199–205. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12686>

El Khadir, M., Alaoui Boukhris, S., Benajah, D.-A., Ibrahimi, S. A., Chbani, L., Bouguenouch, L., El Rhazi, K., El Abkari, M., Nejjari, C., Mahmoud, M., & Bennani, B. (2018). *Helicobacter pylori* CagA EPIYA-C motifs and gastric diseases in Moroccan patients. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.015>

Essawi, T., Hammoudeh, W., Sabri, I., Sweidan, W., & Farraj, M. A. (2013). Determination of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Gastric Biopsies by PCR. *ISRN Gastroenterology*, 2013, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2013/606258>

- Eusebi, L. H., Zagari, R. M., & Bazzoli, F. (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, *19*, 1–5. <https://doi.org/10.1111/hel.12165>
- Fauchère, J. L. (2017). La folle histoire de la découverte de *Helicobacter pylori*. *Feuillets de Biologie/N° 336 - Mai, 2017*, 51–58.
- Favian Bayas-Morejón, I., Angélica Tigre-León, R., Riviño Ramón-Curay, E., & Alberto Núñez-Torres, D. (2019). *Helicobacter pylori*: A Pathogen of Ample Risk to Health. *Gastritis - New Approaches and Treatments*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86789>
- Ferreira, L. S. D. S. (2006). Diagnóstico Laboratorial da Infecção por *Helicobacter pylori*. Universidade Fernando Pessoa.
- Ferreira, R. M., Machado, J. C., & Figueiredo, C. (2014). Clinical relevance of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in gastric carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *28*(6), 1003–1015. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.09.004>
- Fischbach, W., & Malfertheiner, P. (2018). *Helicobacter pylori* Infection. *Deutsches Arzteblatt Online*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0429>
- Fischer, W., Breithaupt, U., Kern, B., Smith, S. I., Spicher, C., & Haas, R. (2014). A comprehensive analysis of *Helicobacter pylori* plasticity zones reveals that they are integrating conjugative elements with intermediate integration specificity. *BMC Genomics*, *15*(1), 310. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-310>
- Fleming, S. L. (2007). *Deadly Diseases and Epidemics—Helicobacter pylori*. Chelsea House Publishers - New York, 132 West 31st Street, NY-10001, United States of America.
- Foegeding, N., Caston, R., McClain, M., Ohi, M., & Cover, T. (2016). An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Biology. *Toxins*, *8*(6), 173. <https://doi.org/10.3390/toxins8060173>
- Ford, A. C., Mahadeva, S., Carbone, M. F., Lacy, B. E., & Talley, N. J. (2020). Functional dyspepsia. *The Lancet*, *396*(10263), 1689–1702. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30469-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30469-4)
- Francesco, V. D. (2011). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, *2*(3), 35. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v2.i3.35>
- Furuta, T., & Graham, D. Y. (2010). Pharmacologic Aspects of Eradication Therapy for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, *39*(3), 465–480. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2010.08.007>
- Ghotaslou, R. (2015). Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World Journal of Methodology*, *5*(3), 164. <https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i3.164>

- Gisbert, J. P. (2008). “Rescue” regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World Journal of Gastroenterology*, *14*(35), 5385. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5385>
- Gisbert, J. P. (2009). Review: Second-line rescue therapy of *Helicobacter pylori* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *2*(6), 331–356. <https://doi.org/10.1177/1756283X09347109>
- Gisbert, J. P., Castro-Fernandez, M., Perez-Aisa, A., Cosme, A., Molina-Infante, J., Rodrigo, L., Modolell, I., Cabriada, J. L., Gisbert, J. L., Lamas, E., Marcos, E., Calvet, X., & on behalf of the H. pylori Study Group of the Asociación Española de Gastroenterología (Spanish Gastroenterology Association). (2012). Fourth-line rescue therapy with rifabutin in patients with three *Helicobacter pylori* eradication failures. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *35*(8), 941–947. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05053.x>
- Gómez, M., Otero, W., & Gutiérrez, Ó. (2007). Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Encuesta en un grupo de médicos generales y especialistas en Colombia. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*, *10*.
- Gong, L., & El-Omar, E. M. (2021). Application of molecular techniques in *Helicobacter pylori* detection: Limitations and improvements. *Helicobacter*, *26*(5). <https://doi.org/10.1111/hel.12841>
- Gong, Y., Meng, Z., Lu, B., & Dai, J. (2016). *Helicobacter pylori* and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter*, *21*(5), 349–363. <https://doi.org/10.1111/hel.12299>
- Gong, & Yuan, Y. (2018). Resistance mechanisms of *Helicobacter pylori* and its dual target precise therapy. *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(3), 371–392. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1418285>
- Goodwin, C. S., & Armstrong, J. A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/BF01969526>
- Graham, D., & Lu, H. (2012). Furazolidone in *Helicobacter pylori* therapy: Misunderstood and often unfairly maligned drug told in a story of French bread. *Saudi Journal of Gastroenterology*, *18*(1), 1. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.91724>
- Graham, D. Y., & Dore, M. P. (2016). *Helicobacter pylori* therapy: A paradigm shift. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *14*(6), 577–585. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1178065>
- Graham, D. Y., & Lee, S.-Y. (2015). How to Effectively Use Bismuth Quadruple Therapy. *Gastroenterology Clinics of North America*, *44*(3), 537–563. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.05.003>

- Gunaratnam, N. T., Jessup, T. P., Inadomi, J., & Lascewski, D. P. (2006). Sub-optimal proton pump inhibitor dosing is prevalent in patients with poorly controlled gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(10), 1473–1477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02911.x>
- Guzman, K., Montenegro, L., & Pazos, A. (2021). *The Helicobacter pylori genome evolution in different gastric cancer risk Colombian populations*. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-960798/v1>
- Hafeez, M., Qureshi, Z. A., Khattak, A. L., Saeed, F., Asghar, A., Azam, K., & Khan, M. A. (2021). *Helicobacter pylori* Eradication Therapy: Still a Challenge. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.14872>
- Harbarth, S., Balkhy, H. H., Goossens, H., Jarlier, V., Kluytmans, J., Laxminarayan, R., Saam, M., Van Belkum, A., & Pittet, D. (2015). Antimicrobial resistance: One world, one fight! *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 4(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0091-2>
- Harris, R. B., Oren, E., Bui, D., & Brown, H. E. (2016). Serologic Evidence for Fecal–Oral Transmission of *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(1), 82–88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0297>
- Hatakeyama, M. (2017). Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 93(4), 196–219. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.013>
- Hermanns, W., Kregel, K., Breuer, W., & Lechner, J. (1995). Helicobacter-like organisms: Histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology*, 112(3), 307–318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80083-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80083-0)
- Herrero, R., Park, J. Y., & Forman, D. (2014). The fight against gastric cancer – the IARC Working Group report. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28(6), 1107–1114. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.10.003>
- Hirata, K., Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Muraoka, H., Saito, Y., Matsuzaki, J., & Hibi, T. (2010). Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: Efflux pumps and CLR resistance in H. pylori. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, S75–S79. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06220.x>
- Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D. Y., Wong, V. W. S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>

- Howden, C. W., Chey, W. D., & Vakil, N. B. (2014). *Clinical Rationale for Confirmation Testing After Treatment of Helicobacter pylori Infection: Implications of Rising Antibiotic Resistance*. 20.
- Hu, Q., Zhang, Y., Zhang, X., & Fu, K. (2016). Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori* infection: A review of current diagnosis and management. *Biomarker Research*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40364-016-0068-1>
- Hu, Y., Zhang, M., Lu, B., & Dai, J. (2016). Helicobacter pylori and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter*, 21(5), 349–363. <https://doi.org/10.1111/hel.12299>
- Huang, J. Q., & Hunta, R. H. (1996). PH, Healing Rate and Symptom Relief in Acid-Related Diseases. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 69(159-174.), 16.
- Huh, C. W., & Kim, B.-W. (2018). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *The Korean Journal of Gastroenterology*, 72(5), 229. <https://doi.org/10.4166/kjg.2018.72.5.229>
- Hussein, N. R. (2010). The association of dupA and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(7), 817–821. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-0933-z>
- Idowu, A., Mzukwa, A., Harrison, U., Palamides, P., Haas, R., Mbao, M., Mamdoo, R., Bolon, J., Jolaiya, T., Smith, S., Ally, R., Clarke, A., & Njom, H. (2019). Detection of *Helicobacter pylori* and its virulence genes (cagA, dupA, and vacA) among patients with gastroduodenal diseases in Chris Hani Baragwanath Academic Hospital, South Africa. *BMC Gastroenterology*, 19(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-0986-0>
- Idris, A. B., Hassan, H. G., Ali, M. A. S., Eltaher, S. M., Idris, L. B., Altayb, H. N., Abass, A. M., Ibrahim, M. M. A., Ibrahim, E.-A. M., & Hassan, M. A. (2020). Molecular Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Sequences Identified Two Lineages of *Helicobacter pylori* Strains Detected from Different Regions in Sudan Suggestive of Differential Evolution. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/8825718>
- Iwamoto, A., Tanahashi, T., Okada, R., Yoshida, Y., Kikuchi, K., Keida, Y., Murakami, Y., Yang, L., Yamamoto, K., Nishiumi, S., Yoshida, M., & Azuma, T. (2014). Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. *Gut Pathogens*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-27>
- Iwańczak, B., Buchner, A., & Iwańczak, F. (2017). Clinical differences of *Helicobacter pylori* infection in children. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(7), 1131–1136. <https://doi.org/10.17219/acem/60581>
- Jaka, H., Rüttgerodt, N., Bohne, W., Mueller, A., Gross, U., Kasang, C., & Mshana, S. E. (2019a). *Helicobacter pylori* Mutations Conferring Resistance to Fluoroquinolones and

Clarithromycin among Dyspeptic Patients Attending a Tertiary Hospital, Tanzania. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/8481375>

Jemilohun, A. C., & Otegbayo, J. A. (2016). *Helicobacter pylori* infection: Past, present and future. *Pan African Medical Journal*, 23. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.23.216.8852>

Jiang, & Doyle, M. P. (1998). Effect of Environmental and Substrate Factors on Survival and Growth of *Helicobacter pylori*. *Journal of Food Protection*, 61(8), 929–933. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.8.929>

Jiang, & Doyle, M. P. (2002). Optimizing Enrichment Culture Conditions for Detecting *Helicobacter pylori* in Foods. *Journal of Food Protection*, 65(12), 1949–1954. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.12.1949>

Jiang, F., Guo, C., Cheung, K. S., & Leung, W. K. (2021). Long-term risk of upper gastrointestinal bleeding after *Helicobacter pylori* eradication: A population-based cohort study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 54(9), 1162–1169. <https://doi.org/10.1111/apt.16604>

Jiao, L., Wang, J., & Ma, H. (2021). Analysis of *Helicobacter pylori*'s Antibiotic Resistance Rate and Research on Its Eradication Treatment Plan. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2021, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/6009602>

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

Jones, K., Cha, J.-H., & Merrell, D. (2008). Whos Winning the War? Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *Current Drug Therapy*, 3(3), 190–203. <https://doi.org/10.2174/157488508785747899>

Jonsson, R. (2005). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005. *Scandinavian Journal of Immunology*, 62(6), 497–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01709.x>

Jung, S. W., Sugimoto, M., Shiota, S., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2012). The Intact dupA Cluster Is a More Reliable *Helicobacter pylori* Virulence Marker than dupA Alone. *Infection and Immunity*, 80(1), 381–387. <https://doi.org/10.1128/IAI.05472-11>

Júnior, E. D. S. Q., Novaes, R. F., Brandão, Í. N., Costa, G. S., Filho, M. C. S., Sales, B. R. C. C., Vieira, G. M. de R., Lima, C. C., Moreira, S. M., Lago, L. M. C., Veloso, L. D. S., Abreu, M. I. S., Fonseca, M. L. de A. F., & Júnior, A. M. R. da S. (2021). Criteria for requesting upper digestive Endoscopy in the diagnosis of dyspeptic Syndrome: A literature review. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 8(4), 266–272. <https://doi.org/10.22161/ijaers.84.31>

Kao, C.-Y., Sheu, B.-S., & Wu, J.-J. (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*, 39(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>

Keikha, M., & Karbalaei, M. (2021). EPIYA motifs of *Helicobacter pylori* cagA genotypes and gastrointestinal diseases in the Iranian population: A systematic review and meta-analysis. *New Microbes and New Infections*, 41, 100865. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100865>

Keogan, D., & Griffith, D. (2014). Current and Potential Applications of Bismuth-Based Drugs. *Molecules*, 19(9), 15258–15297. <https://doi.org/10.3390/molecules190915258>

Kersulyte, D., Lee, W., Subramaniam, D., Anant, S., Herrera, P., Cabrera, L., Balqui, J., Barabas, O., Kalia, A., Gilman, R. H., & Berg, D. E. (2009). *Helicobacter pylori*'s Plasticity Zones Are Novel Transposable Elements. *PLoS ONE*, 4(9), e6859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006859>

Keshavarz, T., Walker, M. M., Karim, Q. N., Sidebotham, R. L., & Worku, M. L. (1999). The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: Implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology*, 145(10), 2803–2811. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2803>

Khan, S. F., Teng, J. C., Holmes, J. A., Perera, C., Prendergast, L., & Waring, L. (2021). *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance in Melbourne, Australia. Time to review therapeutic guidelines? *Internal Medicine Journal*, 51(11), 1919–1926. <https://doi.org/10.1111/imj.15355>

Khedmat, H., Karbasi-Afshar, R., Agah, S., & Taheri, S. (2013, agosto 5). *Helicobacter pylori* Infection in the general population: A Middle Eastern perspective.

Khiddi, F., Abdellahi, M. val M., Horma, M. A., Billoet, A., Collobert, G., Amar, A. M., Nech, H. D. M., Vadel, E. H. M., Houmeida, A., Raymond, J., Dauga, C., & Gastli, N. (2020). Characteristics of *Helicobacter pylori* strains isolated from Mauritanian patients. *Helicobacter*, 25(5). <https://doi.org/10.1111/hel.12726>

Kim, N. (Ed.). (2016). *Helicobacter pylori*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-287-706-2>

Kivi, M., Tindberg, Y., Sörberg, M., Casswall, T. H., Befrits, R., Hellström, P. M., Bengtsson, C., Engstrand, L., & Granström, M. (2003). Concordance of *Helicobacter pylori* Strains within Families. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5604–5608. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5604-5608.2003>

Kodaira, M. S., Escobar, A. M. de U., & Grisi, S. (2002). Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Revista de Saúde Pública*, 36(3), 356–369. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102002000300017>

- Kouitcheu Mabeku, L. B., Eyoum Bille, B., Tepap Zemnou, C., Tali Nguetack, L. D., & Leundji, H. (2019). Broad spectrum resistance in *Helicobacter pylori* isolated from gastric biopsies of patients with dyspepsia in Cameroon and efflux-mediated multiresistance detection in MDR isolates. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 880. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4536-8>
- Krzyżek, P., Biernat, M. M., & Gościński, G. (2019). Intensive formation of coccoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains (Folia Microbiol (2019) 64:273–281). Springer Japan.
- Kwon, D. H., Lee, M., Kim, J. J., Kim, J. G., El-Zaatari, F. A. K., Osato, M. S., & Graham, D. Y. (2001). Furazolidone- and Nitrofurantoin-Resistant *Helicobacter pylori*: Prevalence and Role of Genes Involved in Metronidazole Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(1), 306–308. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.306-308.2001>
- Ladeira, M. S. P., Salvadori, D. M. F., & Rodrigues, M. A. M. (2003). Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *39*(4), 335–342. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000400011>
- Lauener, F., Imkamp, F., Lehours, P., Buissonnière, A., Benejat, L., Zbinden, R., Keller, P., & Wagner, K. (2019). Genetic Determinants and Prediction of Antibiotic Resistance Phenotypes in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(1), 53. <https://doi.org/10.3390/jcm8010053>
- Lauwers, G. Y. (2010). Gastritis: Beyond *Helicobacter pylori*. *International Journal of Surgical Pathology*, *18*(3_suppl), 28–32. <https://doi.org/10.1177/1066896910366462>
- Lawson, A. J., Elviss, N. C., & Owen, R. J. (2005). Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(2), 282–286. <https://doi.org/10.1093/jac/dki199>
- Lee, J. Y., & Kim, N. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: Histology. *Annals of Translational Medicine*, *3*(1), 8.
- Lemos, J. R. (2020). Genes de virulência de *Helicobacter pylori* e polimorfismos gênicos do hospedeiro ligados à suscetibilidade à infecção. *Saúde em Revista*, *20*(52), 12.
- Li, Z., Zou, D., Ma, X., Chen, J., Shi, X., Gong, Y., Man, X., Gao, L., Zhao, Y., Wang, R., Yan, X., Dent, J., Sung, J. J., Wernersson, B., Johansson, S., Liu, W., & He, J. (2010). Epidemiology of Peptic Ulcer Disease: Endoscopic Results of the Systematic Investigation of Gastrointestinal Disease in China. *American Journal of Gastroenterology*, *105*(12), 2570–2577. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.324>
- Lima, V. P., & Rabenhorst, S. H. B. (2009). Genes Associados à Virulência de *Helicobacter pylori*. *Revista Brasileira de Cancerologia*, *55*(4), 389–396. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2009v55n4.1599>

- Lin, J., Cagliero, C., Guo, B., Barton, Y.-W., Maurel, M.-C., Payot, S., & Zhang, Q. (2005). Bile Salts Modulate Expression of the CmeABC Multidrug Efflux Pump in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7417–7424. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7417-7424.2005>
- Lindo, J. F., Lyn-Sue, A. E., Palmer, C. J., Lee, M. G., Vogel, P., & Robinson, R. D. (1999). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a Jamaican community. *Tropical Medicine and International Health*, 4(12), 862–866. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00480.x>
- Linz, B., Vololonantenainab, C. R. R., Seck, A., Carod, J.-F., Dia, D., Garin, B., Ramanampamonjy, R. M., Thiberge, J.-M., Raymond, J., & Breurec, S. (2014). Population Genetic Structure and Isolation by Distance of *Helicobacter pylori* in Senegal and Madagascar. *PLoS ONE*, 9(1), e87355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087355>
- Liu, Z.-Q., Zheng, P.-Y., & Yang, P.-C. (2008). Efflux pump gene hefA of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World Journal of Gastroenterology*, 14(33), 5217. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5217>
- Lu, H., Hsu, P.-I., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2005). Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 128(4), 833–848. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.009>
- Lu, H., Zhang, W., & Graham, D. Y. (2013). Bismuth-containing quadruple therapy for *Helicobacter pylori*: Lessons from China. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 1. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283633b57>
- Magalhães, P., Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, Campos Barbosa, D. V., Aguiar Rocha, G., Nogueira Mendes, E., Santos, A., Valle Corrêa, P. R., Camargos Rocha, A. M., Martins Teixeira, L., & Affonso de Oliveira, C. (2002). *Helicobacter pylori* Primary Resistance to Metronidazole and Clarithromycin in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 2021–2023. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.2021-2023.2002>
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T. R., Bazzoli, F., Gensini, G. F., Gisbert, J. P., Graham, D. Y., Rokkas, T., El-Omar, E. M., Kuipers, E. J., & The European Helicobacter Study Group (EHSG). (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61(5), 646–664. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084>
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D. Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., & El-Omar, E. M. (2017a). Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, 66(1), 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>

- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D. Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., & El-Omar, E. M. (2017b). Management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, *66*(1), 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- Marcus, E. A., Sachs, G., & Scott, D. R. (2016). Eradication of *Helicobacter pylori* Infection. *Current Gastroenterology Reports*, *18*(7), 33. <https://doi.org/10.1007/s11894-016-0509-x>
- Marques, A. T., Vítor, J. M. B., Santos, A., Oleastro, M., & Vale, F. F. (2020). Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: From phenotypic to genomic approaches. *Microbial Genomics*, *6*(3). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000344>
- Marshall, B. (2002). *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clinical Medicine*, *2*(2), 147–152. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.2-2-147>
- Marshall, B., Armstrong, J., Francis, G., Nokes, N., & Wee, S. (1987). Antibacterial Action of Bismuth in Relation to *Campylobacter pyloridis* Colonization and Gastritis. *S. Karger A. G. Basel - Australia*, *37*(2), 16–30.
- Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, *13*(6), 607–615. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70137-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7)
- Mathias, L. A. (2014). *Apostila de Epidemiologia Geral* (www.fcav.unesp.br). Fcav -Unesp, Brasil.
- Mattos, S. M., & Freire, K. A. (2019). *Atenção Interdisciplinar em Saúde* (1.^a ed.). Atena Editora. <https://doi.org/10.22533/at.ed.611191311>
- McCull, K. E. L. (2010). *Helicobacter pylori* Infection. *New England Journal of Medicine*, *362*(17), 1597–1604. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1001110>
- Mégraud, F., & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(2), 280–322. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
- Mentis, A., Lehours, P., & Mégraud, F. (2015). Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, *20*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/hel.12250>
- Miernyk, K., Morris, J., Bruden, D., McMahon, B., Hurlburt, D., Sacco, F., Parkinson, A., Hennessy, T., & Bruce, M. (2011). Characterization of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* Genotypes among Alaskans and Their Correlation with Clinical Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(9), 3114–3121. <https://doi.org/10.1128/JCM.00469-11>
- Miftahussurur, M., & Yamaoka, Y. (2015). *Helicobacter pylori* virulence genes and host genetic polymorphisms as risk factors for peptic ulcer disease. *Expert Review of*

Gastroenterology & *Hepatology*, 9(12), 1535–1547.
<https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1095089>

Mihály E., Micsik T., Juhász M., Herszényi L., & Tulassay Z. (2014). Gastritis and gastropathy. *Orvosi Hetilap*, 155(2), 43–61. <https://doi.org/10.1556/OH.2014.29807>

Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H., & Mandrell, R. E. (2007). The Complete Genome Sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS ONE*, 2(12), e1358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001358>

Mirzaei, N., Poursina, F., Moghim, S., Ghaempanah, A. M., & Safaei, H. G. (2016). The Bioinformatics Report of Mutation Outcome on NADPH Flavin Oxidoreductase Protein Sequence in Clinical Isolates of *H. pylori*. *Current Microbiology*, 72(5), 596–605. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-0992-1>

MISAU. (2016). *Manual de prevenção e controlo da Cólera e de outras diarreias agudas*. Direcção Nacional de Saúde Pública – Departamento de Epidemiologia.

MISAU. (2019). *Plano Nacional de Controlo do Cancro 2019-2029*. Ministério da Saúde da República de Moçambique.

Moayyedi, P., Talley, N. J., Fennerty, M. B., & Vakil, N. (2006). Can the Clinical History Distinguish Between Organic and Functional Dyspepsia? *JAMA*, 295(13), 1566. <https://doi.org/10.1001/jama.295.13.1566>

Modcoicar, P., Arteaga, J., Cunha, L., Carrilho, C., & Lorenzoni, C. (2011). Padrão Endoscópico e Histopatológico em Doentes Dispepticos no Hospital Central de Maputo - Moçambique. *Jornal Portugues de Gastroenterologia*.

Molina-Infante, J. (2014). Optimizing clarithromycin-containing therapy for *Helicobacter pylori* in the era of antibiotic resistance. *World Journal of Gastroenterology*, 20(30), 10338. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10338>

Moodley, Y. (2016). *Helicobacter pylori*: Genetics, Recombination, Population Structure, and Human Migrations. S. Backert, Y. Yamaoka (Eds.), *Helicobacter Pylori Research*, 3–27. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55936-8_1

Moodley, Y., & Linz, B. (2009). *Helicobacter pylori* Sequences Reflect Past Human Migrations. Em H. de Reuse & S. Bereswill (Eds.), *Genome Dynamics* (Vol. 6, pp. 62–74). KARGER. <https://doi.org/10.1159/000235763>

Moodley, Y., Linz, B., Bond, R. P., Nieuwoudt, M., Soodyall, H., Schlebusch, C. M., Bernhöft, S., Hale, J., Suerbaum, S., Mugisha, L., van der Merwe, S. W., & Achtman, M. (2012). Age of the Association between *Helicobacter pylori* and Man. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002693. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002693>

- Moreth, M., Ornelas, D., Gomes, C. R. B., & Souza, M. V. N. D. (2010). Nitroimidazoles—A promising class of compounds for the treatment of Tuberculosis. *Revista Virtual de Química*, 2(2). <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100010>
- Mori, H., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Tsugawa, H., Fukuhara, S., Miyoshi, S., Hirata, K., Seino, T., Matsushita, M., Nishizawa, T., Masaoka, T., & Kanai, T. (2016). Rifabutin-based 10-day and 14-day triple therapy as a third-line and fourth-line regimen for *Helicobacter pylori* eradication: A pilot study. *United European Gastroenterology Journal*, 4(3), 380–387. <https://doi.org/10.1177/2050640615618043>
- Mosaei, H., & Zenkin, N. (2020). Inhibition of RNA Polymerase by Rifampicin and Rifamycin-Like Molecules. *EcoSal Plus*, 9(1), ecosalplus.ESP-0017-2019. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0017-2019>
- Mounsey, A., Barzin, A., & Rietz, A. (2020). *Functional Dyspepsia: Evaluation and Management*. 101(2), 5.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Muñoz, J. A., Regino-Otero, W. A., & Gómez Zuleta, M. A. (2018). *Helicobacter pylori*: cómo mejorar las terapias de erradicación? *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 33(4), 437. <https://doi.org/10.22516/25007440.314>
- Muñoz-Ramírez, Z. Y., Mendez-Tenorio, A., Kato, I., Bravo, M. M., Rizzato, C., Thorell, K., Torres, R., Aviles-Jimenez, F., Camorlinga, M., Canzian, F., & Torres, J. (2017). Whole Genome Sequence and Phylogenetic Analysis Show *Helicobacter pylori* Strains from Latin America Have Followed a Unique Evolution Pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00050>
- Muñoz-Ramirez, Z. Y., Pascoe, B., Mendez-Tenorio, A., Mourkas, E., Sandoval-Motta, S., Perez-Perez, G., Morgan, D. R., Dominguez, R. L., Ortiz-Princz, D., Cavazza, M. E., Rocha, G., Queiroz, D. M. M., Catalano, M., Palma, G. Z. D., Goldman, C. G., Venegas, A., Alarcon, T., Oleastro, M., Vale, F. F., ... Torres, J. (2021). A 500-year tale of co-evolution, adaptation, and virulence: *Helicobacter pylori* in the Americas. *The ISME Journal*, 15(1), 78–92. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00758-0>
- Nahar, S., Mukhopadhyay, A. K., Khan, R., Ahmad, M. M., Datta, S., Chattopadhyay, S., Dhar, S. C., Sarker, S. A., Engstrand, L., Berg, D. E., Nair, G. B., & Rahman, M. (2004). Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori* Strains Isolated in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4856–4858. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4856-4858.2004>
- Natan, J., Marcuz, F., & Correa, R. (2011). Clarithromycin is still a good option. *Arq Gastroenterol*, 48, 4.

- Ndip, R. N., MacKay, W. G., Farthing, M. J. G., & Weaver, L. T. (2003). Culturing *Helicobacter pylori* from Clinical Specimens: Review of Microbiologic Methods: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 36(5), 616–622. <https://doi.org/10.1097/00005176-200305000-00005>
- Nell, S., Eibach, D., Montano, V., Maady, A., Nkwescheu, A., Siri, J., Elamin, W. F., Falush, D., Linz, B., Achtman, M., Moodley, Y., & Suerbaum, S. (2013). Recent Acquisition of *Helicobacter pylori* by Baka Pygmies. *PLoS Genetics*, 9(9), e1003775. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003775>
- Nemr, N., Kishk, R. M., Salem, A., Abdalla, M. O., Abd El-Fadeal, N. M., & Soliman, N. M. (2022). Genotypic detection of metronidazole and clarithromycin resistance in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori*. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18198-4>
- Neto, A. (2021). Como a *Escherichia coli* e demais bactérias resistem aos antibióticos. *Zoetis*, 1–2.
- Nightingale, S. D., Cameron, W., Gordin, F., Sparti, P., Bihari, B., Laufman, D., Stern, J., Pierce, D., Winkler, W., LaMarca, A., & Siegal, F. (1993). Two Controlled Trial of Rifabutin Prrophylaxis Against Micobacteriu avium Complex Infectionin AIDS. *New England Journal of Medicine*, 329(12), 828–833.
- Nishizawa, T., & Suzuki, H. (2014). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>
- Nishizawa, T., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Muraoka, H., Tsugawa, H., Hirata, K., & Hibi, T. (2011). *Helicobacter pylori* Resistance to Rifabutin in the Last 7 Years. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5374–5375. <https://doi.org/10.1128/AAC.05437-11>
- Noto, J. M., & Peek, R. M. (2012). The *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island. Em J. Houghton (Ed.), *Helicobacter Species* (Vol. 921, pp. 41–50). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-005-2_7
- O'Connor, J. P. A., Taneike, I., & O'Morain, C. (2009). Review: Improving compliance with *Helicobacter pylori* eradication therapy: when and how? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2(5), 273–279. <https://doi.org/10.1177/1756283X09337342>
- Ogata, M., Araki, K., & Ogata, T. (1998). An electron microscopic study of *Helicobacter pylori* in the surface mucous gel layer. *Histology and Histopathology*, 13, 347–358. <https://doi.org/10.14670/HH-13.347>
- Oleastro, M., Ménard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthélémy, P., & Mégraud, F. (2003). Real-Time PCR Assay for Rapid and Accurate Detection of Point Mutations Conferring Resistance to Clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 397–402. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.397-402.2003>

- Oleastro, M., Rocha, R., & Vale, F. F. (2017). Population genetic structure of *Helicobacter pylori* strains from Portuguese-speaking countries. *Helicobacter*, 22(4), e12382. <https://doi.org/10.1111/hel.12382>
- Oliveira, A. K. S., Silva, L. L. de L., Miguel, M. P., Blanco, A. J. V., Carneiro, L. C., & Barbosa, M. S. (2021). *Helicobacter pylori* cagA virulence gene and severe esogastroduodenal diseases: Is there an association? *Arquivos de Gastroenterologia*, 58(4), 468–475. <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.202100000-85>
- Olmedo, L., Azagra, R., Aguyé, A., Pascual, M., Calvet, X., & Gené, E. (2020). High Effectiveness of a 14-Day Concomitant Therapy for *Helicobacter pylori* Treatment in Primary Care. An Observational Multicenter Study. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 2410. <https://doi.org/10.3390/jcm9082410>
- Ontsira Ngoyi, E. N., Atipo Ibara, B. I., Moyen, R., Ahoui Apendi, P. C., Ibara, J. R., Obengui, O., Ossibi Ibara, R. B., Nguimbi, E., Niama, R. F., Ouamba, J. M., Yala, F., Abena, A. A., Vadivelu, J., Goh, K. L., Menard, A., Benejat, L., Sifre, E., Lehours, P., & Megraud, F. (2015). Molecular Detection of *Helicobacter pylori* and its Antimicrobial Resistance in Brazzaville, Congo. *Helicobacter*, 20(4), 316–320. <https://doi.org/10.1111/hel.12204>
- Osman, H. A., Hasan, H., Suppian, R., Hassan, S., Andee, D. Z., Majid, N. A., & Zilfalil, B.-A. (2017). Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, babA2, and dupA genotypes and correlation with clinical outcome in Malaysian patients with dyspepsia. *Turk J Med Sci*, 7.
- Otero, W., Gómez, M., Otero, L., & Alba, T. (2018). *Helicobacter pylori*: How do we treat it in 2018? *Rev Gastroenterol Peru*, 38(1), 54–63.
- Otrębska-Machaj, E., Chevalier, J., Handzlik, J., Szymańska, E., Schabikowski, J., Boyer, G., Bolla, J.-M., Kieć-Kononowicz, K., Pagès, J.-M., & Alibert, S. (2016). Efflux Pump Blockers in Gram-Negative Bacteria: The New Generation of Hydantoin Based-Modulators to Improve Antibiotic Activity. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00622>
- Owen, R. J., Xerry, J., Gotada, T., Naylor, G., & Tompkins, D. (2004). Analysis of geospecific markers for *Helicobacter pylori* variants in patients from Japan and Nigeria by triple-locus nucleotide sequence typing. *Microbiology*, 150(1), 151–161. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26467-0>
- Palamides, P., Jolaiya, T., Idowu, A., Loell, E., Onyekwere, C., Ugiagbe, R., Agbo, I., Lesi, O., Ndububa, D., Adekanle, O., Carranza, M., Ally, R., Njom, H., Adeleye, I. A., Harrison, U., Clarke, A., Fischer, W., Smith, S., & Haas, R. (2020). *Helicobacter pylori* patient isolates from South Africa and Nigeria differ in virulence factor pathogenicity profile and associated gastric disease outcome. *Scientific Reports*, 10(1), 11409. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66128-0>

- Park, S. A., Ko, A., & Lee, N. G. (2011). Stimulation of growth of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* by atmospheric level of oxygen under high carbon dioxide tension. *BMC Microbiology*, *11*(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-96>
- Pérez-Pérez, G. I., Sack, R. B., Reid, R., Santosham, M., Croll, J., & Blaser, M. J. (2003). Transient and Persistent *Helicobacter pylori* Colonization in Native American Children. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(6), 2401–2407. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2401-2407.2003>
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: A synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, *4*(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
- Puah, S. M., Goh, K. L., Ng, H. K., & Chua, K. H. (2021). Current status of *Helicobacter pylori* resistance to Clarithromycin and Levofloxacin in Malaysia findings from a molecular based study. *PeerJ*, *9*, e11518. <https://doi.org/10.7717/peerj.11518>
- Quinteiros, M. Q., Sá, L. L., Sousa, G. M. de, Frazão, H. A. de A., Brito, A. P. S. O., & Garcia, H. C. R. (2020). Doenças relacionadas à infecção pelo *Helicobacter pylori*: Revisão Sistemática. *Pará Research Medical Journal*, *4*, e30. <https://doi.org/10.4322/prmj.2019.030>
- Raaf, N., Amhis, W., Saoula, H., Abid, A., Nakmouche, M., Balamane, A., Ali Arous, N., Ouar-Korichi, M., Vale, F. F., Bénéjat, L., & Mégraud, F. (2017). Prevalence, antibiotic resistance, and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria. *Helicobacter*, *22*(6), e12446. <https://doi.org/10.1111/hel.12446>
- Rahman, T., Yarnall, B., & Doyle, D. A. (2017). Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. *European Biophysics Journal*, *46*(7), 647–653. <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1238-2>
- Ramakrishnan, & Salinas. (2007). Peptic Ulcer Disease. *American Family Physician*, *Vol. 47*(7).
- Raymond, J., Thiberge, J.-M., Chevalier, C., Kalach, N., Bergeret, M., Labigne, A., & Dauga, C. (2004). Genetic and Transmission Analysis of *Helicobacter pylori* Strains within a Family. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(10), 1816–1821. <https://doi.org/10.3201/eid1010.040042>
- Rhead, J. L., Letley, D. P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M. A., Eshagh Hosseini, M., & Atherton, J. C. (2007). A New *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Determinant, the Intermediate Region, Is Associated with Gastric Cancer. *Gastroenterology*, *133*(3), 926–936. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.056>
- Ribeiro, M. L., Vitiello, L., Miranda, M. C., Benvenuto, Y. H., Godoy, A. P., Mendonça, S., & Pedrazzoli, J. (2003). Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *2*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-2-11>

- Rice, L. B. (2012). Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(2), 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003>
- Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T., & Sasatsu, M. (2008). Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 995–998. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn051>
- Rodríguez Gómez, E. R., Otero Regino, W., Monterrey, P. A., & Trespalcacios Rangel, A. A. (2020). cagA gene EPIYA motif genetic characterization from Colombian *Helicobacter pylori* isolates: Standardization of a molecular test for rapid clinical laboratory detection. *PLOS ONE*, 15(1), e0227275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227275>
- Romano, M., & Cuomo, A. (2004). Eradication of *Helicobacter pylori* - A Clinical Update. *MedGenMed*, 17(6).
- Romo-González, C., Consuelo-Sánchez, A., Camorlinga-Ponce, M., Velázquez-Guadarrama, N., García-Zúñiga, M., Burgueño-Ferreira, J., & Coria-Jiménez, R. (2015). Plasticity Region Genes jhp0940, jhp0945, jhp0947, and jhp0949 of *Helicobacter pylori* in Isolates from Mexican Children. *Helicobacter*, 20(3), 231–237. <https://doi.org/10.1111/hel.12194>
- Rowland, M., Daly, L., Vaughan, M., Higgins, A., Bourke, B., & Drumm, B. (2006). Age-Specific Incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 130(1), 65–72. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.004>
- Rozo, J. S. (2020). *Análisis de genómica comparativa en aislamientos colombianos de Helicobacter pylori: Enfoque asociado a virulencia, resistencia antibiótica y estructura poblacional*. Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología - Pontificia Universidad Javeriana.
- Saito, N., Konishi, K., Sato, F., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T., & Asaka, M. (2003). Plural Transformation-Processes from Spiral to Coccoid *Helicobacter pylori* and its Viability. *Journal of Infection*, 46(1), 49–55. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.1047>
- Salih, A. M., Goreal, A., Hussein, N. R., Abdullah, S. M., Hawrami, K., & Assafi, M. (2013). The distribution of cagA and dupA genes in *Helicobacter pylori* strains in Kurdistan region, northern Iraq. *Annals of Saudi Medicine*, 33(3), 290–293. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2013.290>
- Sallas, M. L., Melchades, J. L., Zabaglia, L. M., Moreno, J. R. do P., Orcini, W. A., Chen, E. S., Smith, M. de A. C., Payão, S. L. M., & Rasmussen, L. T. (2017). Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, dupA and oipA Genotypes in Patients with Gastric Disease. *Advances in Microbiology*, 07(01), 1–9. <https://doi.org/10.4236/aim.2017.71001>
- Sanches, B. S., Martins, G. M., Lima, K., Cota, B., Moretzsohn, L. D., Ribeiro, L. T., Breyer, H. P., Maguilnik, I., Maia, A. B., Rezende-Filho, J., Meira, A. C., Pinto, H., Alves, E.,

- Mascarenhas, R., Passos, R., de Souza, J. D., Trindade, O. R., & Coelho, L. G. (2016). Detection of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones in Brazil: A national survey. *World Journal of Gastroenterology*, 22(33), 7587. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i33.7587>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schmidt, H.-M. A., Andres, S., Kaakoush, N. O., Engstrand, L., Eriksson, L., Goh, K.-L., Fock, K. M., Hilmi, I., Dhamodaran, S., Forman, D., & Mitchell, H. (2009). The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (dupA) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: A case-control study. *Gut Pathogens*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-5>
- Secka, O., Moodley, Y., Antonio, M., Berg, D. E., Tapgun, M., Walton, R., Worwui, A., Thomas, V., Corrah, T., Thomas, J. E., & Adegbola, R. A. (2014). Population Genetic Analyses of *Helicobacter pylori* Isolates from Gambian Adults and Children. *PLoS ONE*, 9(10), e109466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109466>
- Semo, A., Gayà-Vidal, M., Fortes-Lima, C., Alard, B., Oliveira, S., Almeida, J., Prista, A., Damasceno, A., Fehn, A.-M., Schlebusch, C., & Rocha, J. (2020). Along the Indian Ocean Coast: Genomic Variation in Mozambique Provides New Insights into the Bantu Expansion. *Molecular Biology and Evolution*, 37(2), 406–416. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz224>
- Shah, N. H., LePendou, P., Bauer-Mehren, A., Ghebremariam, Y. T., Iyer, S. V., Marcus, J., Nead, K. T., Cooke, J. P., & Leeper, N. J. (2015). Proton Pump Inhibitor Usage and the Risk of Myocardial Infarction in the General Population. *PLOS ONE*, 10(6), e0124653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124653>
- Siavoshi, F., Saniee, P., & Malekzadeh, R. (2018). Effective antimicrobial activity of rifabutin against multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 23(6). <https://doi.org/10.1111/hel.12531>
- Silva. (2012). *Estudo Soroepidemiológico da bactéria Helicobacter pylori em Populações Ribeirinhas Amazônicas, Estado de Amazonas*. 144.
- Silva, L. L. L., Oliveira, A. K. S., Gama, A. R., Pontes, J. C., Ramos, A. F. P. L., Silva, A. M. T. C., Cardoso, D. M. M., Blanco, A. J. V., Rasmussem, L. T., Carneiro, L. C., & Barbosa, M. S. (2021). Research Article Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, dupA and vacA genotypes and their association with the severity of gastropathies in patients with dyspepsia. *Genetics and Molecular Research*, 20(3). <https://doi.org/10.4238/gmr18883>
- Smith, Ajayi, A., Jolaiya, T., Onyekwere, C., Setshedi, M., Schulz, C., Otegbayo, J. A., Ndip, R., Dieye, Y., Alborai, M., Ally, R., Gunturu, R., Hyasinta, J., Ugiagbe, R., Ndububa, D., Arigbabu, A., & on behalf of the African Helicobacter and Microbiota Study Group. (2021).

Helicobacter pylori infection in Africa:update of the current situation and challenges. *Digestive Diseases*. <https://doi.org/10.1159/000518959>

Smith, S., Fowora, M., & Pellicano, R. (2019a). Infections with *Helicobacter pylori* and challenges encountered in Africa. *World Journal of Gastroenterology*, 25(25), 3183–3195. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i25.3183>

Smith, S., Fowora, M., & Pellicano, R. (2019b). Infections with *Helicobacter pylori* and challenges encountered in Africa. *World Journal of Gastroenterology*, 25(25), 3183–3195. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i25.3183>

Smith, S. I., Kirsch, C., Oyedeji, K. S., Arigbabu, A. O., Coker, A. O., Bayerdöffer, E., & Miehlke, S. (2002). Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *Journal of Medical Microbiology*, 51(10), 851–854. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-851>

Sousa, Almeida, U. T. de F. H., & Bastos, D. A. de O. (2017). H. pylori: Implicações atuais e a resistência à terapia antimicrobiana revisão de literatura. *Pará Research Medical Journal*, 1(3). <https://doi.org/10.4322/prmj.2017.028>

Sousa, C., Ferreira, R., Azevedo, N. F., Oleastro, M., Azeredo, J., Figueiredo, C., & Melo, L. D. R. (2021). *Helicobacter pylori* infection: From standard to alternative treatment strategies. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1975643>

Šterbenc, A., Jarc, E., Poljak, M., & Homan, M. (2019). *Helicobacter pylori* virulence genes. *World Journal of Gastroenterology*, 25(33), 4870–4884. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i33.4870>

Suerbaum, S., & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* Infection. *The New England Journal of Medicine*, 12.

Sufiana, M. (2020). *Caracterização Fenotípica e Molecular de Betalactamases de Amplo Espectro e Carbapenamase KPC em Klebsiella pneumoniae Isolada em Hemoculturas no Hospital Central de Maputo*. [Monografia]. Universidade Eduardo Mondlane.

Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., Graham, D. Y., El-Omar, E. M., Miura, S., Haruma, K., Asaka, M., Uemura, N., & Malfertheiner, P. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 64(9), 1353–1367. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>

Sugimoto, M., Sahara, S., Ichikawa, H., Kagami, T., Uotani, T., & Furuta, T. (2015). High *Helicobacter pylori* cure rate with sitafloxacin-based triple therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42(4), 477–483. <https://doi.org/10.1111/apt.13280>

- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
- Suzuki, H., & Moayyedi, P. (2013). *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(3), 168–174. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.9>
- Suzuki, H., Warren, R., & Marshall, B. (Eds.). (2016). *Helicobacter pylori*. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55705-0>
- Talley, N. J., Goodsall, T., & Potter, M. (2017). Functional dyspepsia. *Australian Prescriber*, 40(06).
- Tanih, N., Rol, & N, N. (2013). A South African perspective on *Helicobacter pylori*: Prevalence, epidemiology and antimicrobial chemotherapy. *African Journal of Microbiology Research*, 7(21), 2430–2437. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5594>
- Thomas, J. E. (2004). Early *Helicobacter pylori* colonisation: The association with growth faltering in The Gambia. *Archives of Disease in Childhood*, 89(12), 1149–1154. <https://doi.org/10.1136/adc.2002.015313>
- Thorell, K., Yahara, K., Berthenet, E., Lawson, D. J., Mikhail, J., Kato, I., Mendez, A., Rizzato, C., Bravo, M. M., Suzuki, R., Yamaoka, Y., Torres, J., Sheppard, S. K., & Falush, D. (2017). Rapid evolution of distinct *Helicobacter pylori* subpopulations in the Americas. *PLOS Genetics*, 13(2), e1006546. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006546>
- Thung, I., Aramin, H., Vavinskaya, V., Gupta, S., Park, J. Y., Crowe, S. E., & Valasek, M. A. (2016). Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(4), 514–533. <https://doi.org/10.1111/apt.13497>
- Todor, A. A., Dimitrova Kovacheva-Slavova, M., Ilianov Iliev, H., Yankov Valkov, H., & Georgiev Vladimirov, B. (2019). *Helicobacter pylori* Infection. Em B. Maria Roesler (Ed.), *Gastritis—New Approaches and Treatments*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86963>
- Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., ... Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), 539–547. <https://doi.org/10.1038/41483>
- Torres, N., Solomon, V., & Middleton, L. (2020). Pharmacists' practices for non-prescribed antibiotic dispensing in Mozambique. *Pharmacy Practice*, 18(3), 1965. <https://doi.org/10.18549/PharmPract.2020.3.1965>

- Torres, R., Carvalho, J. o, Cunha, M. nica, Serrano, E., Palmeira, J., & Fonseca, C. (2020). *A systematic review of AMR in wildlife: Temporal and geographical distribution trends* [Preprint]. Preprints. <https://doi.org/10.22541/au.159466958.84737751>
- Trespacios-Rangél, A. A., Otero, W., Arévalo-Galvis, A., Poutou-Piñales, R. A., Rimbara, E., & Graham, D. Y. (2016). Surveillance of Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Bogotá-Colombia (2009-2014). *PLOS ONE*, *11*(7), e0160007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160007>
- Trujillo, E., Martínez, T., & Bravo, M. M. (2014). Genotipificación de los factores de virulencia vacA y cagA de *Helicobacter pylori* en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico. *Biomédica*, *34*(4). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2273>
- Tshibangu-Kabamba, E., Ngoma-Kisoko, P. de J., Tuan, V. P., Matsumoto, T., Akada, J., Kido, Y., Tshimpi-Wola, A., Tshiamala-Kashala, P., Ahuka-Mundeke, S., Mumba Ngoy, D., Disashi-Tumba, G., & Yamaoka, Y. (2020). Next-Generation Sequencing of the Whole Bacterial Genome for Tracking Molecular Insight into the Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates from the Democratic Republic of Congo. *Microorganisms*, *8*(6), 887. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060887>
- Tshibangu-Kabamba, E., & Yamaoka, Y. (2021). *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance -from biology to clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*(9), 613–629. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00449-x>
- Tsugawa, H., Suzuki, H., Muraoka, H., Ikeda, F., Hirata, K., Matsuzaki, J., Saito, Y., & Hibi, T. (2011). Enhanced bacterial efflux system is the first step to the development of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *404*(2), 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.034>
- Uotani, T., Miftahussurur, M., & Yamaoka, Y. (2015). Effect of bacterial and host factors on *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *19*(12), 1637–1650. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1073261>
- Uthansingh, K., Kumari, R., Pati, G. K., Behera, M. K., Sahu, M. C., Narayan, J., Patnaik, S. K., Mallick, P., & Sahu, M. K. (2021). Molecular Docking of Anti *Helicobacter pylori* Antibiotics and Proton Pump Inhibitor: A Single Center Survey. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *15*(4), 2103–2116. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.4.33>
- Vale, F. F., & Vítor, J. M. B. (2010). Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*, *138*(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.016>
- Van Der Poorten, D., & Katelaris, P. H. (2007). The effectiveness of rifabutin triple therapy for patients with difficult-to-eradicate *Helicobacter pylori* in clinical practice: Rifabutin

Triple therapy *H. pylori*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(11–12), 1537–1542. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03531.x>

Versalovic, J. (1997). Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(2), 283–286. <https://doi.org/10.1093/jac/40.2.283>

Wang, L. (2010). Distribution of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2272. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2272>

Wang, M., Shao, C., Li, J., Yang, Y.-C., Wang, S., Hao, J., Wu, C., Gao, X., & Shao, S. (2015). *Helicobacter pylori* with the Intact dupA Cluster is more Virulent than the Strains with the Incomplete dupA Cluster. *Current Microbiology*, 71(1), 16–23. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0812-z>

Watari, J. (2014). *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), 5461. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5461>

WGO. (2021). *Diretrizes mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia—Helicobacter pylori*. 33.

White, B., Winte, M., DeSipio, J., & Phadtare, S. (2022). Clinical Factors Implicated in Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Patients. *Microorganisms*, 10(2), 322. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020322>

Wolk, D., Mitchell, S., & Patel, R. (2001). Principles of Molecular Microbiology Testing Methods. *Infectious Disease Clinics of North America*, 15(4), 1157–1204. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70190-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70190-2)

Wright, G. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>

Wu, D., Hsu, P., Wu, J., Opekun, A. R., Kuo, C., Wu, I. –Chen, Wang, S. S. W., Chen, A., Hung, W., & Graham, D. Y. (2010). Sequential and Concomitant Therapy with Four Drugs Is Equally Effective for Eradication of *H. pylori* Infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 8(1), 36–41.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.09.030>

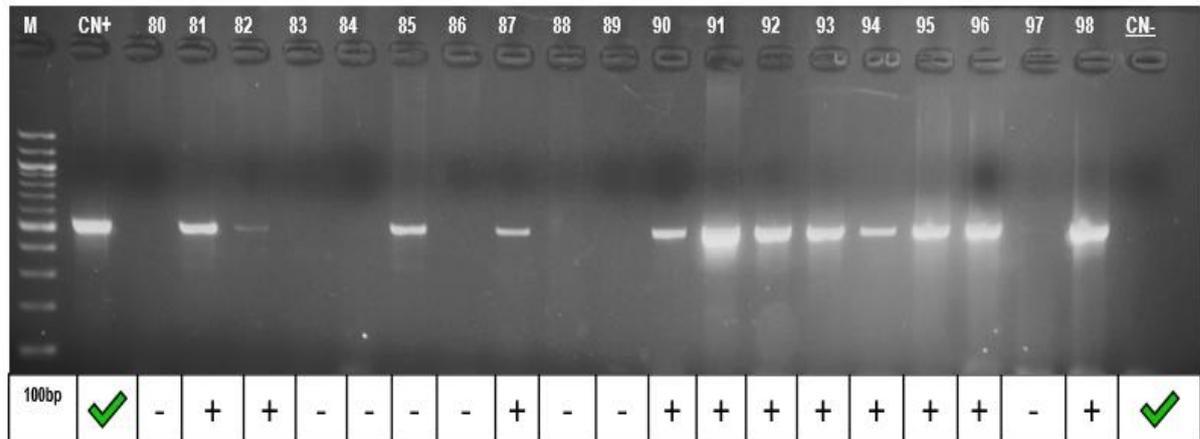
Yahiro, K., Hirayama, T., Moss, J., & Noda, M. (2015). *Helicobacter pylori* VacA toxin causes cell death by inducing accumulation of cytoplasmic connexin 43. *Cell Death & Disease*, 6(11), e1971–e1971. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.329>

Yamaoka, Y. (2012). Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Related Gastrointestinal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/371503>

- Yamaoka, Y., & Graham, D. Y. (2014). *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncology*, *10*(8), 1487–1500. <https://doi.org/10.2217/fo.14.29>
- Yamaoka, Y., Orito, E., Mizokami, M., Gutierrez, O., Saitou, N., Kodama, T., Osato, M. S., Kim, J. G., Ramirez, F. C., Mahachai, V., & Graham, D. Y. (2002). *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Letters*, *517*(1–3), 180–184. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02617-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02617-0)
- Yamazaki, S., Yamakawa, A., Okuda, T., Ohtani, M., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Keida, Y., Higashi, H., Hatakeyama, M., & Azuma, T. (2005). Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(8), 3906–3916. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.3906-3916.2005>
- Yepes, C. A., Rodríguez, A., Ruiz, Á., & Ariza, B. (2008). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Med Colombiana*, *33*(1), 4.
- Zendehdel, A., & Roham, M. (2019). Biological evidence of the relationship between *Helicobacter pylori* and associated extragastric disease. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(8), 12128–12140. <https://doi.org/10.1002/jcb.28681>
- Zhang, Liu, Z.-Q., Zheng, P.-Y., Tang, F.-A., & Yang, P.-C. (2010). Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(10), 1279. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i10.1279>
- Zhang, Y.-Y., Xia, H. H.-X., Zhuang, Z.-H., & Zhong, J. (2009). Review article: ‘True’ re-infection of *Helicobacter pylori* after successful eradication – worldwide annual rates, risk factors and clinical implications. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *29*(2), 145–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03873.x>

APÊNDICES

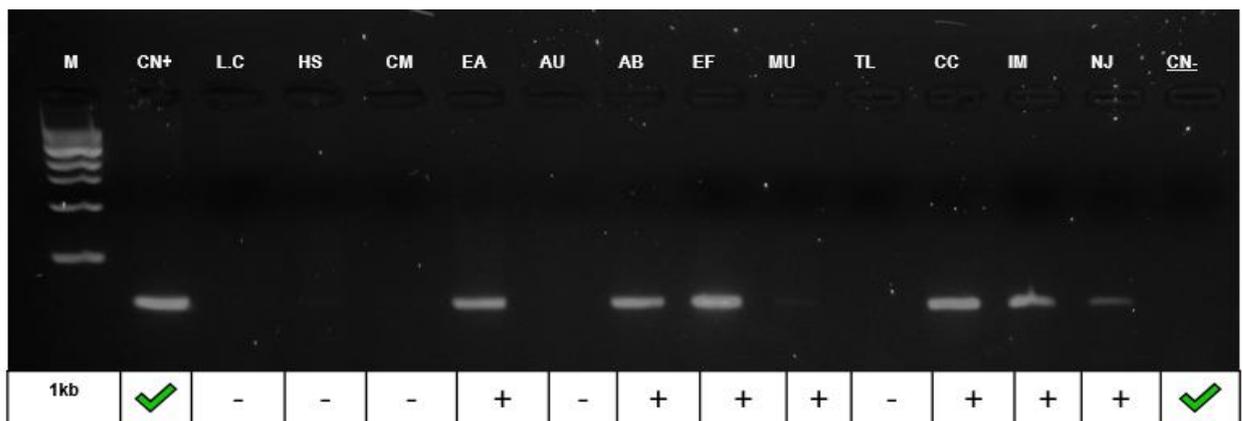
Apêndice - 1: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do gene *16S rRNA* (para detecção do *H. pylori*) – é apenas uma parte de algumas amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 100bp; CN+: controlo positivo, CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho da banda = 522bp.**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

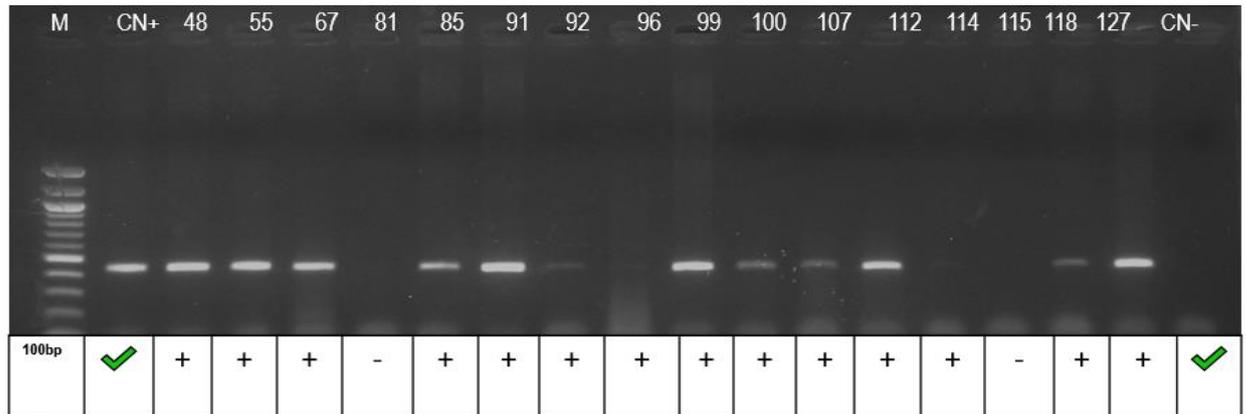
Apêndice - 2: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do gene *23S rRNA* (para detecção de resistência à claritromicina) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 1kb; CN+: controlo positivo, CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho da banda = 266bp.**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

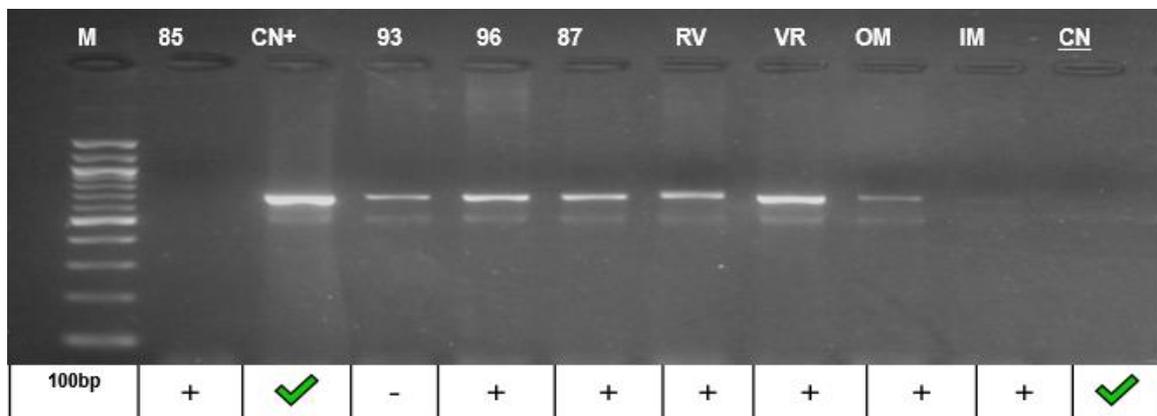
Apêndice - 3: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do gene *gyrA* (para detecção de resistência às fluoroquinolonas) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 100bp; CN+: controlo positivo, CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho da banda = 402bp.**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

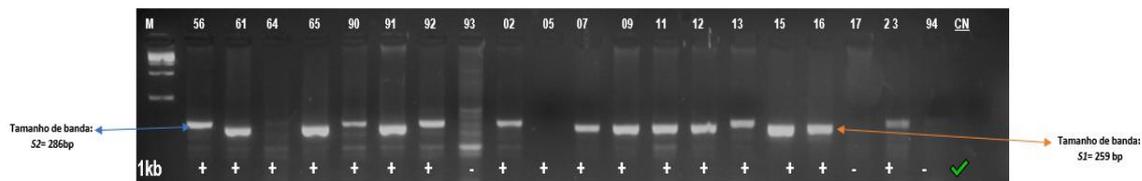
Apêndice - 4: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do gene *rdxA* (para detecção de resistência ao metronidazol) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 100bp; CN+: controlo positivo, CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho da banda = 686bp.**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

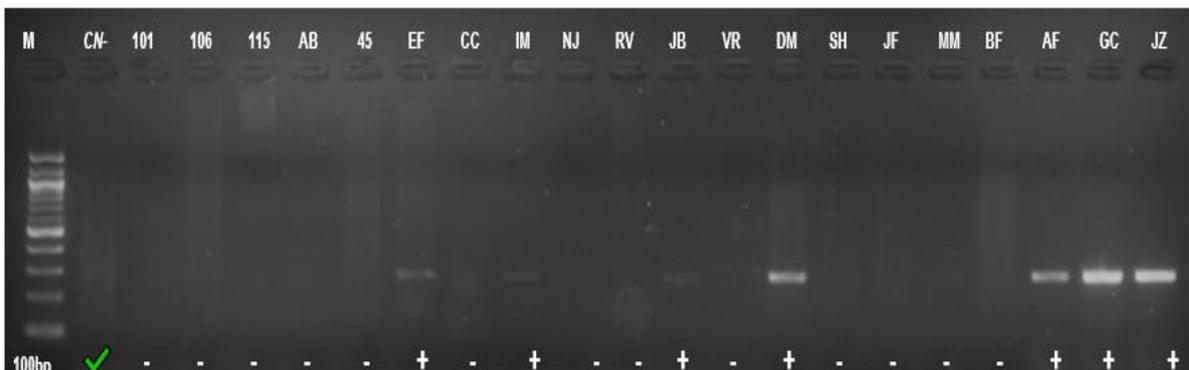
Apêndice - 5: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do genótipo *vacA s1/s2* (factores de virulência do *H. pylori*) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 1kb; CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho das bandas = s1 - 259bp, s2- 286bp**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

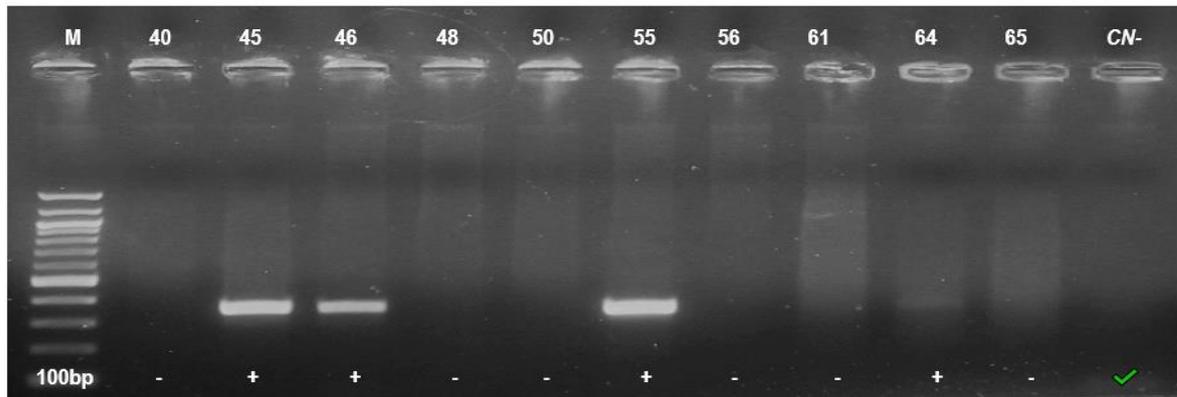
Apêndice - 6: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do genótipo *vacAm1* (factor de virulência do *H. pylori*) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 100bp; CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho das bandas = 290bp**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

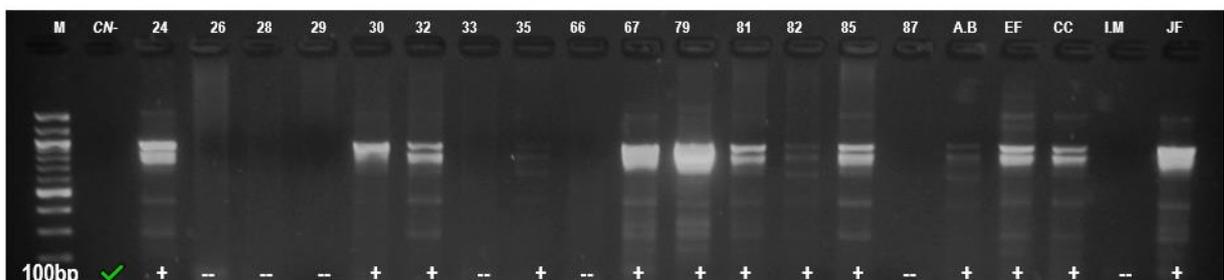
Apêndice - 7: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do genótipo *vacAm2* (factor de virulência do *H. pylori*) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 100bp; CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho das bandas = 352bp**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

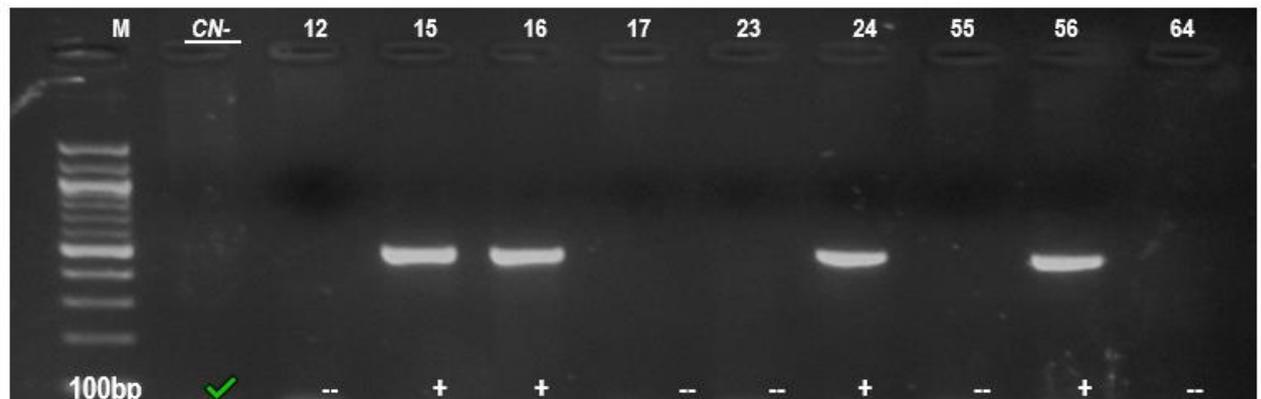
Apêndice - 7: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do gene *dupA* (factor de virulência do *H. pylori*) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 100bp; CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho das bandas = 971bp**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

Apêndice - 8: Figura de gel de agarose para visualização das bandas da amplificação do gene *cagA* (factor de virulência do *H. pylori*) – é apenas uma parte das amostras testadas.



Legenda: M- Marcador ou ladder de 100bp; CN-: controlo negativo; (+) positivo (amplificou); (-) negativo (não amplificou). **Tamanho das bandas = 500bp**

Condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida dos 35 ciclos da (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 54°C durante 30 segundos, extensão inicial a 72°C durante 30 segundos), extensão final a 72°C durante 10 minutos e 4°C para o arrefecimento.

Apêndice - 9: Tabela que mostra a relação existente entre os genótipos *cagA* e *vacA*

Genótipo <i>vacA</i>	<i>CagA</i> +		<i>cagA</i> -		Valor do <i>p</i>
	n	% (n/N)	n	% (n/N)	
<i>vacAs2/m2</i> (N=19)	0	0	19	100 (19/19)	0,007*
<i>vacAs2/m1</i> (N=18)	0	0	18	100 (18/18)	
<i>vacAs1/m2</i> (N=35)	10	28,6 (10/35)	25	71,4 (25/35)	
<i>vacAs1/m1</i> (N=24)	6	25 (6/24)	18	75 (6/24)	

* Existe uma correlação estatisticamente significativa entre os 2 genótipos (*cagA* e *vacA*), uma vez que 10 das 16 amostras *cagA*+ são simultaneamente *vacAs1/m2* (28,6%) e 6 são *vacAs1/m1* (25%).

Apêndice - 10: Tabela que mostra a caracterização de sítios de fosforilação em amostras *cagA*-positivas

Nº	Amostra	Gene - <i>cagA</i>	EPIYA - Motif
1	A - 15	<i>cagA</i> +	ABC
2	A - 16	<i>cagA</i> +	ABC
3	A - 24	<i>cagA</i> +	ABCCC
4	A - 26	<i>cagA</i> +	ABC
5	A - 65	<i>cagA</i> +	ABC
6	A - 85	<i>cagA</i> +	ABC
7	A - 99	<i>cagA</i> +	ABC
8	A - 112	<i>cagA</i> +	ABC
9	A - 114	<i>cagA</i> +	ABC
10	A - 118	<i>cagA</i> +	ABC
11	A - 116	<i>cagA</i> +	ABC
12	A - 127	<i>cagA</i> +	ABC
13	A - GC	<i>cagA</i> +	ABC
14	A - EAN	<i>cagA</i> +	ABC
15	A - JZ	<i>cagA</i> +	ABC
16	A - SH	<i>cagA</i> +	ABC
EPIYA- ABC = 93,8% (15/16)			
EPIYA – ABCCC = 6,2% (1/16)			

Apêndice - 11: Tabela que mostra a distribuição das estirpes de *H. pylori* que infectam os pacientes (a tabela foi gerada com base na tipagem MLST das 30 amostras *H. pylori* positivas selecionadas aleatoriamente e constatou-se que amostras eram distribuídas em 3 populações nomeadamente: hpAfrica1, hpAfrica2 e hpEuropa).

Nº	Amostra	População
1	A - 16	hpAfrica2
2	A - 23	hpAfrica2
3	A - 26	hpAfrica2
4	A - 28	hpAfrica2
5	A - 46	hpAfrica2
6	A - 49	hpAfrica2
7	A - 55	hpAfrica2
8	A - 56	hpAfrica2
9	A - 82	hpAfrica2
10	A - 95	hpAfrica2
11	A - 100	hpAfrica2
12	A - 116	hpAfrica2
13	A - CC	hpAfrica2
14	A - GC	hpAfrica2
15	A - RV	hpAfrica2
hpAfrica2 = 50% (15/30)		

Nº	Amostra	População
1	A - 11	hpAfrica1
2	A - 61	hpAfrica1
3	A - 65	hpAfrica1
4	A - 79	hpAfrica1
5	A - 91	hpAfrica1
6	A - 99	hpAfrica1
7	A - 106	hpAfrica1
8	A - 112	hpAfrica1
9	A - 127	hpAfrica1
10	A - EA	hpAfrica1
hpAfrica1 = 33,3% (10/30)		

Nº	Amostra	População
1	A - 35	hpEurope
2	A - 37	hpEurope
3	A - 40	hpEurope
4	A - 67	hpEurope
5	A - EAN	hpEurope
hpEurope = 16,7% (5/30)		

ANEXOS

Anexo 1: Estudo – Mãe



**HOSPITAL CENTRAL DE MAPUTO, DEPARTAMENTO DE
GASTRO-ENTEROLOGIA E DE ANATOMIA PATOLÓGICA
FACULDADE DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA**

PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

TÍTULO: *Perfil Demográfico e de Resistência do Helicobacter pylori aos Antibióticos nos Pacientes com Dispepsia no HCM (REHEPY)*

INVESTIGADOR PRINCIPAL : Muhammad Ismail¹

CO-INVESTIGADOR PRINCIPAL: **Nashoni Dussin Majaliwa**²

CO- INVESTIGADORES: Prasad Modcoicar¹

Jahit Sacarlal²

Carla Carrilho³

Edlilia Botão³

1- Departamento de Gastroenterologia, Hospital Central de Maputo, Moçambique

2- Departamento de Microbiologia, Faculdade de Medicina, Universidade

3- Departamento de Anatomia Patológica, Hospital Central de Maputo, Moçambique

Versão 6 de 11 de Maio de 2016;

Emenda 1 de 21 de Junho de 2017;

Emenda 2 de 14 de Julho de 2020.

Anexo 2 – Consentimento informado

É convidado a participar como voluntário em um estudo, tendo o direito de estar ciente dos procedimentos que serão realizados.

Objectivo deste estudo: Determinar a resistência antibiótica do *Helicobacter pylori* (bactéria) em pacientes com dispepsia no Hospital Central De Maputo, serviço de Gastroenterologia. Estamos a realizar essa pesquisa para obter informações que vão nos ajudar a conhecer a dimensão deste problema e tomar as medidas adequadas que poderão melhorar o seu tratamento.

Envolvimento na pesquisa e procedimentos: Sua participação nesta pesquisa se limitará apenas a responder ao questionário e a permissão para outros procedimentos adicionais como:

A Endoscopia Digestiva Alta, sendo colhidos fragmentos do estomago para o TRU. Este teste quando positivo muda de cor imediatamente após a inserção do fragmento num mini tubo de ensaio, para cor vermelha.

Caso o TRU seja positivo, os fragmentos serão enviados para exames laboratoriais tais como a cultura e TSA, PCR e histologia.

Não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Possíveis Riscos: A endoscopia digestiva alta é um exame seguro. No entanto como todo ato médico, ela não é isenta de riscos. A primeira coisa que vai sentir é algum desconforto no momento de introdução do endoscópio. A complicação mais frequente é dor e inchaço que pode acontecer em até 5% dos casos. Complicações mais graves são muito raras ocorrendo em menos de 0,2% dos casos, podendo estar relacionadas ao emprego de medicamentos sedativos ou ao próprio procedimento endoscópico. As medicações utilizadas na anestesia podem provocar reacções locais como dor e sistêmicas de natureza cardiorrespiratória, incluindo depressão respiratória com diminuição na oxigenação sanguínea e alterações no ritmo cardíaco (bradicardia e taquicardia) e na pressão arterial sistêmica (hipotensão e hipertensão). Esses efeitos colaterais serão constantemente monitorizados durante o exame com o uso de monitor de oxigenação sanguínea e de controle da frequência cardíaca, estando a equipe habilitada para o tratamento imediato de qualquer uma dessas complicações. O risco de sangramento ou de perfuração nesses procedimentos é mínimo. O seu médico está habilitado a realizar todas as medidas cabíveis para a prevenção e tratamento desses eventos adversos.

Benefícios: receberá tratamento adequado caso o seu teste dê positivo para a infecção pelo *Helicobacter pylori*.

Confidencialidade: Todos os seus registos, informações e resultados obtidos neste estudo serão estritamente confidenciais. Assim, não será permitida a sua identificação, o que garante a privacidade. Entretanto, fica ciente pelo presente documento, que um número limitado de investigadores integrantes da equipe poderá ter acesso à essas informações. Os dados serão analisados e divulgados sem identificação de nenhum dos voluntários participantes da pesquisa.

Entendimento por parte do participante: O Médico/investigador responsável colocou-me a par das informações necessárias relacionadas aos exames e objetivo da pesquisa. Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária. Fui informado que posso recusar a participar do estudo ou que posso interromper minha participação em qualquer fase da pesquisa, o que não impedirá que eu continue a receber a assistência médica necessária. Meu relacionamento com os funcionários ou outras pessoas associadas ao Serviço envolvido neste estudo não será afetado em nenhum momento durante o desenvolvimento dessa pesquisa. O seu médico pode também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgar conveniente para a sua saúde.

Maputo, aos ____/____/____ (Dia/mês/ano)

Participante:

Nome _____ Assinatura _____

Acompanhante:

Nome _____ Assinatura _____

Investigador: _____

Anexo 3 – Inquérito

Data Entrevista:				(Dia/Mês/Ano)
Iniciais do nome (CODIGO):				
NID:				
Telefone:			Telemóvel:	
Naturalidade:			Residência:	
<i>Informação sócio demográfica</i>				
Sexo: Masculino () Feminino ()				
Data de nascimento:(Dia/Mês/Ano)				
Idade: (anos)				
Etnia: Negra() Mista () Indiana () Branca () Outra ()				
Estado Civil: Solteiro(a) () Casado(a)/União marital () Viúvo(a) () Separado(a)/Divorciado(a) ()				
Profissão actual:				
Escolaridade: Nenhuma () Primária() Secundária/Medio () Licenciatura()				
Residência:				
Tipo de habitação: Precária () Convencional()				
Nr de Quartos: 1() 2 () 3 () +3 () Nº de agregado familiar: ()				
Saneamento: Casa de banho () Latrina ()				
Consumo de água: Canalizada () Não canalizada() Tratada () Não tratada() Mineral()				
Manuseio do lixo: Sim () Não ()				
<i>Informação referente aos hábitos tabágicos e alcoólicos</i>				
Fuma: Sim () Ex-fumador() Nunca fumou()				
Nº de cigarros: () por dia/semana/mês				
Se é ex-fumador(a), parou há () anos				
Bebe ou alguma vez bebeu bebidas alcoólicas? Sim () Não () Diariamente () Semanalmente () Ocasionalmente ()				
<i>Informação acerca de uso de antibióticos e drogas anti ulcerosas</i>				
Uso de antibióticos antes: Sim () Não ()				
Se sim quais:				
Há quanto tempo: < 1 mês () 1 mês () > 1 mês ()				

Detecção Molecular e Genotipagem de Helicobacter pylori em Pacientes Dispépticos atendidos no Hospital Central de Maputo.

Uso de drogas anti ulcerosas antes: Sim () Não ()			
Se sim quais:			
Há quanto tempo: < 1 mês () 1 mês () > 1 mês ()			
Achados Endoscópicos			
- Gastrite Corpo ()		- Gastropatia Erosiva ()	
- Gastrite Antral ()		- Gastropatia Atrófica ()	
- Gastrite Fundica ()		- Gastropatia hemorrágica	
- Gastrite hiperplásica ()		- Úlcera Gástrica ()	
- Pangastropatia ()		- Úlcera a Duodenal ()	
- Gastropatia Eritematosa ()		- Exame Normal ()	
Data	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> (Dia/mês/ano)
Nome do Médico:			

Anexo 4: Aprovação Bioética (Emenda 1)



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exmo Senhor
Dr. Muhammad Ismail
Faculdade de Medicina

Ref: 224/CNBS/17

Data 27 de Junho de 2017

Assunto: Renovação da aprovação do protocolo de estudo intitulado: "*Perfil Demográfico e Resistência do Helicobacter pylori aos Antibióticos nos Pacientes com Dispepsia no HCM (REHEPY)*"

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou o pedido de renovação anual da aprovação do protocolo de estudo intitulado: "*Perfil Demográfico e Resistência do Helicobacter pylori aos Antibióticos nos Pacientes com Dispepsia no HCM (REHEPY)*", sobre o mesmo o CNBS chegou a seguinte conclusão:

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a continuação do estudo, o CNBS dá a autorização.

Todavia, recomenda aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.

Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.

Sem mais de momento, queiram aceitar as nossas cordiais saudações.

O Presidente

Dr. João Fernando Lima Schwabach

C/c: Comité Institucional de Bioética para Saúde da Faculdade de Medicina e Hospital Central de Maputo

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320

Anexo 5: Aprovação Bioética (Emenda2)



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exmo Senhor
Dr. Muhammad Ismail
HCM

Ref:411/CNBS/20

Data 11 de Agosto de 2020

Assunto: *Aprovação pelo Comité Nacional de Bioética Para Saúde da emenda ao Protocolo de estudo intitulado "Perfil Demográfico e de Resistência do Helicobacter pylori aos Antibióticos nos Pacientes com Dispepsia no HCM (REHEPY)"*

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) analisou o pedido de aprovação da emenda do protocolo de estudo intitulado: **"Perfil Demográfico e de Resistência do Helicobacter pylori aos Antibióticos nos Pacientes com Dispepsia no HCM (REHEPY)"**, e sobre o mesmo chegou a seguinte conclusão:

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a aprovação da emenda, o CNBS dá a sua aprovação a emenda 2 de 14 de Julho de 2020:

Todavia, recomenda aos investigadores que o mantenham informados do decurso do estudo.

Qualquer alteração que venha a ocorrer deve ser submetida ao CNBS para avaliação e aprovação.

Sem mais de momento, queiram aceitar as nossas cordiais saudações.

O Presidente


Dr. João Fernando Lima Schwalbach

C/c: CIBS-FM&HCM

Anexo 6: Protocolo para extracção com QIAamp DNA minikit® (Qiagen)

1. Adicionar em m cada tubo 180 µl de Buffer ATL (Tissue Lysis Buffer), além de 20 µl de proteinase K.
2. Homogeneizar as amostras e incubar em banho Maria a 55°C, durante três horas, e agitadas suavemente a cada hora.
3. Após esse período, adicionaram-se a cada tubo 200 µl de Buffer AL (fornecido pelo fabricante) e aquecer a 70°C durante 10 minutos para a inactivação da proteinase residual.
4. Em seguida, adicionar 200 µl de etanol, agitando-se durante 15 segundos e centrifugando em pouco tempo.
5. Transferir a solução resultante para o dispositivo da coluna QIAamp DNA minikitR e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto.
6. Remover o dispositivo com a coluna do tubo e recolocar em um tubo limpo.
7. Adicionar 500 µl de Buffer AW1 (Wash Buffer 1) ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm por um minuto.
8. Repetir o procedimento de lavagem com 500 µl de Buffer AW2 (Wash Buffer 2), seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos.
9. Eluir o DNA extraído da coluna pela adição de 100 µl de Buffer AE (fornecido pelo fabricante). Adicionar primeiramente 50 µl, aguardando-se um minuto e centrifugando-se a 8.000 rpm durante um minuto. Em seguida, adicionar 50 µl de Buffer AE, aguardando-se cinco minutos e centrifugando-se a 8.000 rpm por um minuto,
10. Após as amostras terem sido transferidas do dispositivo para tubo de recuperação, devem ser conservadas a -20°C.
11. Avaliar a qualidade do DNA extraído com base na técnica de electroforese em gel,
12. Quantificar a pureza do DNA extraído por densidade óptica em espectrofotómetro (NanoDrop).
13. Amplificar o DNA utilizando-se a técnica de PCR com iniciadores (Primers)

Anexo 7: Resinas Cromatográficas Sephacryl S300 e S400

As resinas **Sephacryl S400** e **S300** permitem a purificação rápida e reprodutível de macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, polissacáridos entre outras) por cromatografia de exclusão de tamanho. A escolha da resina a usar depende do tamanho da banda a ser purificada. Geralmente, as resinas vêm em solução de etanol a 20%, e este deve ser eliminado.

A - Preparação das resinas Sephacryl S400 e S300

1. Homogeneizar suavemente à temperatura ambiente o gel Sephacryl (pode ser S300 ou 400),
2. Retirar 20 ml do gel para tubos de 50 ml,
3. Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm (não ultrapassar os 3000 rpm),
4. Descartar o sobrenadante,
5. Adicionar um volume de água miliQ equivalente ao volume da resina e homogeneizar suavemente,
6. Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm (não ultrapassar os 3000 rpm),
7. Descartar o sobrenadante,
8. Repetir esta operação 6 vezes, porém, na última vez na se retira o sobrenadante,
9. Preparada a resina, guarda-se a 4°C.

B - Purificação do produto de PCR

1. Usar a resina devidamente preparada e escolher a resina que vai de acordo com tamanho do produto de PCR,
2. Homogeneizar suavemente e retirar 700 µl para uma coluna,
3. Centrifugar durante 1 minuto a 3000 rpm,
4. Descartar o tubo de eppendorf e colocar um novo tubo de eppendorf,
5. Adicionar o produto de PCR sem tocar na resina,
6. Centrifugar durante 2 minuto a 3000 rpm,
7. Recuperar o eluído – pronto para a sequenciação,
8. Analisar a pureza do eluído no gel de electroforese,
9. Não deitar fora a coluna, ela deve ser reciclada para sua reutilização.

C - Envio de produto de PCR para sequenciação

O produto de PCR para ser sequenciado deve reunir os seguintes critérios: ter boa qualidade depois da sua purificação e ter concentrações desejáveis e recomendadas pela entidade que presta serviço de sequenciação.

Preparação do produto a ser sequenciado:

- 1- Identificar o tubo de eppendorf de preferência tubo de 1,5 ml,
- 2- Colocar 8 μ l de produto de PCR purificado,
- 3- Adicionar 3 μ l do primer usado na amplificação (se for para sequenciar para os 2 sentidos, preparam-se 2 tubos, um para cada primer),
- 4- Colocar o código de barra no tubo de eppendorf previamente identificado (o código de é barra fornecido pela entidade que presta esse serviço de sequenciação),
- 5- No site da entidade que presta serviço de sequenciação, elabora-se uma lista de amostras que serão envidas para sequenciação e submete-se a lista consoante o número das reacções de sequenciação disponíveis,
- 6- O resultado da sequenciação é disponibilizado depois de 48 horas.