

O Potencial da PCR em tempo real no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*

The potential of real-time PCR in the diagnosis of Helicobacter pylori infection

Maria de Fátima Silva ¹, Joana Ramos ¹, Ana Pelerito ^{1,2}, Lurdes Monteiro ^{1,2}

¹ Escola Superior de Saúde Ribeiro Sanches, Rua do Telhal aos Olivais, 8-8A,
1900-693 Lisboa, Portugal.

²Unidade de *Helicobacter/Campylobacter*, Centro de Bacteriologia, INSA, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal.

Resumo

H. pylori é um microrganismo responsável por gastrites e implicado, em associação com outros factores, na úlcera gastroduodenal e no cancro gástrico. O diagnóstico da infecção por microrganismo pode realizar-se recorrendo a métodos invasivos através da obtenção de uma biópsia gástrica obtida por endoscopia digestiva alta e a métodos não invasivos. Nenhum dos métodos, desenvolvido até hoje, constitui o método ideal. Todos eles possuem as suas vantagens e desvantagens consoante a situação em que são aplicados. A reacção de polimerização em cadeia (PCR) conduziu a uma modificação fundamental no campo da biologia molecular, abrindo novos horizontes nas ciências médicas e biológicas.

Apesar da cultura de *H. pylori* a partir de biópsia gástrica continuar a ser o método de referência para o diagnóstico da infecção por esta bactéria, ela apresenta inconvenientes que podem ser ultrapassados pela utilização da PCR, como sejam o longo período para a obtenção de resultados e o respeito de condições estritas de transporte da biópsia gástrica.

Recentemente foi desenvolvido um protocolo baseado no princípio da PCR em tempo real, utilizando o aparelho LightCycler Roche Diagnostics. Este protocolo permite a obtenção de um resultado de detecção da presença de *H. pylori* na biópsia gástrica assim como do seu perfil de susceptibilidade aos macrólidos.

A PCR em tempo real é dotada de uma grande sensibilidade e especificidade, rapidez de obtenção de resultados o que aliado à sua capacidade de detecção de mutações responsáveis pela resistência dos microrganismos aos antibióticos faz com que esta técnica seja a metodologia do futuro no diagnóstico das doenças infecciosas.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, PCR em Tempo Real, Macrólidos.

Abstract

H. pylori is the microorganism responsible for gastritis and is implicated, in association with other factors, in gastroduodenal ulcer and gastric cancer. The diagnosis of an infection by this microorganism can be carried out by resorting to invasive methods that obtain a gastric biopsy through upper digestive endoscopy and non-invasive methods. None of the methods developed until now constitute an ideal method. They all possess their advantages and disadvantages depending on the situation in which they are applied. The polymerase chain reaction (PCR) led to a fundamental modification in the field of molecular biology, opening new horizons in the medical and biological sciences.

In spite of the culture of *H. pylori* through gastric biopsy, which continues being the method of reference for the diagnosis of bacteria infection, it presents inconveniences that may be overcome with the usage of PCR, such as the long period needed to obtain results and the respect for strict transport conditions of the gastric biopsy specimens.

Recently a new protocol was developed based on the principle of real-time PCR using the LightCycler Roche Diagnostics instrument. This protocol allows for us to attain results that detect the presence of *H. pylori* in the gastric biopsy as well as a profile of its susceptibility to macrolides.

The real-time PCR presents a great sensitivity, specificity and velocity in obtaining results which when allied to its detection capacity of the mutations responsible for the microorganisms' resistance to antibiotics turns this technique into a methodology for the future in the diagnosis of infectious diseases.

Key-words: *Helicobacter pylori*, Real-time PCR, Macrolides.

Introdução

Se viajarmos até ao passado longínquo, apesar de não existirem registos da existência de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), há indicadores que a sua convivência com o Homem existe há muitos séculos. Estudos realizados em canídeos e felinos por Bizzozero em 1893, mostraram a existência de bactérias espiraladas no estômago destes animais, porém o primeiro registo de microrganismos espiralados no estômago Humano data apenas de 1906. Muitos estudos foram realizados para provar a existência desses microrganismos, mas o registo confirmatório ocorreu em 1982, quando se isolou esta bactéria^[1]. Taxonomicamente, após serem identificados em 1984, este microrganismo designou-se por *Campyobacter pyrolydis*, uma vez que apresenta muitas semelhanças com bactérias deste género. Porém a designação desta espécie alterou-se por razões semânticas, denominando-se de *Campyobacter pylori*^[2]. Posteriormente estudos mostraram que estes microrganismos diferiam em termos morfológicos, ultraestruturais e até mesmo no conteúdo de ácidos gordos, o que desencadeou a criação de um novo género. Assim em 1989, criou-se o género *Helicobacter*, que actualmente engloba mais de vinte espécies diferentes^[2].

H. pylori é um microrganismo responsável por gastrites e implicado, em associação com outros factores, na úlcera gastroduodenal e no cancro gástrico^[3]. Caracteriza-se por ser uma bactéria Gram negativa de forma espiralada possuindo quatro a seis flagelos unipolares com bainha que em condições disgénicas adquire uma forma cocóide^[3]. O seu crescimento óptimo ocorre a 37°C em atmosfera de microaerofilia e exibe uma forte actividade da enzima urease apresentando também actividade das enzimas catalase e oxidase^[1,4].

O seu nicho ecológico é o estômago humano, ocorrendo a colonização essencialmente a nível do antro. As vias de transmissão da infecção por *H. pylori* continuam por esclarecer, existindo evidências que apoiam, igualmente, a via de transmissão oral-oral e a via de transmissão fecal-oral. Alguns estudos levantaram ainda a possibilidade de transmissão através de animais e de água^[1,2].

Esta infecção constitui uma das infecções bacterianas mais comuns em todo o mundo observando-se uma diferença na prevalência da infecção entre os países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento^[5,6].

O diagnóstico da infecção por *H. pylori* pode realizar-se recorrendo a métodos invasivos através da obtenção de uma biópsia gástrica obtida por endoscopia digestiva alta e a métodos não invasivos^[1,7]. Nenhum dos métodos, desenvolvido até hoje, constitui o método ideal. Todos eles possuem as suas vantagens e

Introduction

If we travel into the distant past, in spite of the fact that there aren't any records on the existence of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), we find indicators that it has coexisted with man for many centuries. Studies performed in canidae and felines by Bizzozero in 1893 showed the existence of spiraled bacteria in the stomachs of these animals, nonetheless the first record of a spiraled microorganism in a human stomach only dates back to 1906. Many studies were carried out to prove the existence of this microorganism, but the confirmatory record occurred in 1982, when *H. pylori* was isolated^[1]. Taxonomically speaking, this microorganism was designated, after having been identified in 1984, as *Campyobacter pyrolydis*, since it presented many similarities to bacteria of this genus. However the designation of this species was changed due to semantic reasons, naming it *Campyobacter pylori* instead^[2]. Later on, studies showed that this microorganism was different in terms of morphology, ultrastructure and even fatty acid content, which led to the creation of a new genus. Thus in 1989, the *Helicobacter* genus was created, which currently includes more than twenty different species^[2].

H. pylori is the microorganism responsible for gastritis and there is implicated, in association with other factors, in gastroduodenal ulcer and gastric cancer^[3]. It is characterized as being spiral shaped gram-negative bacteria that possess a unipolar bundle of four to six sheathed flagella which in dysgenic conditions acquires a coccoid form^[3]. Its optimal growth occurs at 37°C in a microaerophilic atmosphere and exhibits a strong urease enzyme activity and also a catalase and oxidase enzyme activity^[1,4].

Its ecological niche is the human stomach, where colonization occurs essentially in the antrum.

Transmission of the *H. pylori* infection still needs to be clarified, but there is evidence supporting both the oral-oral and the fecal-oral route of transmission. Some studies also raised the possibility of transmission through animals and water^[1,2].

This infection constitutes one of the most common bacterial infections in the entire world, with a difference in infection prevalence between developed and developing countries^[5,6].

The diagnosis of *H. pylori* infection can be carried out by resorting to invasive methods that obtain a gastric biopsy through upper digestive endoscopy and non-invasive methods^[1,7].

None of the methods developed until now constitute an ideal method. They all possess their advantages and disadvantages depending on the situation in which they are applied.

desvantagens consoante a situação em que são aplicados.

Métodos invasivos

Teste rápido da urease:

Este teste baseia-se na forte actividade ureásica de *H. pylori*. Ao colocar uma ou várias biópsias em contacto com um meio contendo ureia e um indicador de pH, se a bactéria se encontrar presente na biópsia, a urease produzida vai hidrolizar a ureia do meio com formação de amónia. Esta amónia ao alcalinizar o meio conduz à mudança de cor do indicador de pH^[7]. A principal vantagem deste teste reside na sua facilidade de execução e na rapidez de obtenção de resultados.

Exame anatomopatológico:

O exame anatomopatológico é importante não só, para pôr em evidência a presença de *H. pylori* na biópsia gástrica como também para a avaliação da mucosa gástrica. Este teste pode ser utilizado para demonstrar a presença de uma gastrite activa, de atrofia, de metaplasia intestinal, de displasia e malignidade^[7,8]. Na maioria dos casos esta bactéria pode ser identificada em cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina. Outras colorações podem ser utilizadas, como a coloração de prata (Warthin-Starry) ou de Giemsa^[7,4].

Exame citobacteriológico da biópsia gástrica:

A cultura é, teoricamente, o método de referência para a detecção de *H. pylori* e o único que permite o estudo da susceptibilidade aos antibióticos^[7,1]. Recomenda-se a colheita de duas biópsias a nível do antro e duas biópsias a nível do corpo, em particular quando se trata de uma avaliação pós terapêutica ou após toma de antissecretores. *H. pylori* é uma bactéria sensível ao oxigénio, à dissecação, e a sua sobrevivência está limitada à temperatura ambiente, pelo que se recomenda a utilização de um meio de transporte^[1,9]. Assim e após a colheita as amostras devem ser armazenadas: 1) numa solução salina ou de glucose a 20% e mantidas a 4°C, se o seu processamento se efectuar nas 4 horas seguintes à colheita; 2) num meio de transporte especial como o meio Portagerm pylori ou o meio de Stuart, igualmente a 4°C, se o transporte das biópsias ao laboratório não ultrapassar as 48 horas; 3) em tubo seco e mantidas a -70°C para períodos superiores^[1].

Exame microscópico

Diferentes colorações podem ser utilizadas para a detecção de *H. pylori* em esfregaços de biópsia gástrica: a coloração de Gram, de Giemsa modificada, de Steiner e de acridina laranja. No entanto uma simples coloração de Gram é suficiente para a visualização de bacilos Gram negativos de forma espiralada^[4,7].

Invasive methods

Urease test:

This test is based on the strong ureasic activity of the *H. pylori*. By placing one or several biopsies in contact with a urea-containing medium and a pH indicator, if the bacteria is present in the biopsy, the production of urease will hydrolyze the urea in the medium with ammonium formation. As this ammonium alkalizes the medium it will lead to the pH indicator's color change^[7]. This test's main advantage lies on its facility and quickness in obtaining results.

Histology:

The histology exam is important not only for showing the presence of *H. pylori* in the gastric biopsy but also in its evaluation of the gastric mucosa. This test may be used to demonstrate the presence of an active gastritis, atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia and malignity^[7,8]. In the majority of cases the bacteria can be identified by hematoxylin-eosin stain. Other methods for staining may be used, such as the Warthin-Starry silver stain or the Giemsa stain^[7,4].

Cultivation:

The culture is, theoretically, the reference method used for *H. pylori* detection and the only one that permits the study of antibiotic susceptibility^[7,1]. Taking two biopsy samples from the antrum and another two from the corpus are recommended, especially when dealing with post-therapeutic evaluation or after taking antissecretors. The *H. pylori* is sensitive to oxygen and dissection, and its survival is limited to the environmental temperature, which is why the use of transport media is recommended^[1,9]. Thus, after taking the samples they should be stored: 1) in a 20% saline or glucose solution and maintained at 4°C, if the process occurs in the first 4 hours after sample gathering; 2) in a special transport medium such as the Portagerm pylori medium or the Stuart medium, also at 4°C, if biopsy transport to the laboratory does not exceed 48 hours; 3) in a dry tube and maintained at -70°C for longer periods^[1].

Microscopic exam

Different stains may be used for *H. pylori* detection in gastric biopsy smears: Gram stain, modified Giemsa stain, Steiner stain and orange acridine stain. However, a simple Gram stain is enough to visualize the spiral shaped Gram negative bacilli^[4,7].

Culture

After homogenization, the samples are harvested in at least one selective and one non-selective culture medium and then incubated at 37°C, in a microaerophilic atmosphere during a period that can go up to 14 days, depending on the viability of the bacteria. When the culture is positive, the identification is made

Cultura

Após homogeneização, as amostras são semeadas em pelo menos um meio de cultura selectivo e um não selectivo adequado e em seguida incubadas a 37°C, numa atmosfera de microaerofilia, durante um período que pode ir até aos 14 dias, em função da viabilidade da bactéria. Quando a cultura é positiva, a identificação é feita de acordo com o aspecto morfológico das colónias e com base em características bioquímicas e citomorfológicas por coloração Gram. Para testar a sensibilidade de *H. pylori* aos antibióticos diferentes modalidades podem ser utilizadas: 1) método de diluição em agar, quer pela determinação da CIM (concentração inibitória mínima) através do método da escala de concentração (método de referência) quer pela determinação da concentração crítica; 2) método de difusão em agar quer pela determinação da CIM através da tira de E-teste, quer pela utilização de discos^[4,7,8]. Os diferentes antibióticos a testar, os métodos utilizados e as respectivas interpretações estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1- Determinação da susceptibilidade in vitro de *H. pylori* aos antibióticos.

Table 1- Determination of in vitro susceptibility of *H. pylori* to antibiotics .

Antibiótico <i>Antibiotic</i>	Metodologia <i>Methodology</i>	Leitura <i>Reading</i>
Metronidazol <i>Metronidazole</i>	Concentração crítica com as concentrações de 8 e 16mg/ml <i>Critical concentration with the 8 and 16mg/ml concentrations</i>	Resistente se houver crescimento <i>Resistant if there is growth</i>
	Tira de E-teste <i>E-test strip</i>	Resistente se CIM > 8 ug/ml <i>Resistant if MIC > 8 mg/ml</i>
Macrólidos <i>Macrolides</i>	Disco de 15 UI de eritromicina <i>15 UI erythromycin disk</i>	Resistente se diâmetro < a 17 mm <i>Resistant if diameter < than 17 mm</i>
Ciprofloxacina <i>Ciprofloxacin</i>	Disco de 5ug <i>5mg disk</i>	Resistente se diâmetro inferior a 19 mm <i>Resistant if the diameter is < than 19 mm</i>
Amoxicilina <i>Amoxicillin</i>	Tira de E-teste <i>E-test strip</i>	Resistente se CIM > 0,5 ug/ml <i>Resistant if MIC > 0.5 mg/ml</i>
Tetraciclina <i>Tetracycline</i>	Disco de 30 UI <i>30 UI disk</i>	Resistente se diâmetro inferior a 17 mm <i>Resistant if the diameter is < than 17 mm</i>

Métodos não invasivos

Teste respiratório com ureia marcada com ¹³C:

Este método baseia-se na actividade ureásica de *H. pylori*. Após a ingestão de uma solução de ureia marcada com ¹³C, esta é hidrolizada pela urease produzida pela bactéria presente na mucosa gástrica libertando amónia e CO₂ marcado^[1]. Este último é em seguida difundido através da mucosa gástrica para a circulação geral e eliminado pelo ar expirado. A detecção de ¹³CO₂ é efectuada utilizando um equipamento complexo e oneroso como a espectrometria de massa, de raios infravermelhos e laser^[1,7].

Detecção de anticorpos específicos anti-*H.pylori*:

Embora *H. pylori* não seja uma bactéria invasiva,

in accordance with the morphological aspect of the colonies and based on the biochemical and cytomorphological characteristics of the Gram stain. Different modalities may be used to test the antibiotic sensibility of *H. pylori*: 1) the agar dilution method, either by the determination of MIC (minimum inhibitor concentration) through the method of the scale of concentration (reference method) or by the determination of critical concentration; 2) the agar diffusion method, either through the determination of MIC through the E-test strip, or the usage of disks^[4,7,8]. The different antibiotics to test, the methods used and the respective interpretations are presented in Table 1.

Noninvasive methods

¹³C-urea breath test:

This method is based on the ureasic activity of the *H. pylori*. After the ingestion of ¹³C-urea, it is hydrolyzed by the urease produced by the bacteria present in the gastric mucous liberating ammonia and marked CO₂^[1]. The latter is then diffused through the gastric mucosa to the general circulation and eliminated by the air expired. The detection of ¹³CO₂ occurs by using complex and onerous equipment such as infrared and laser mass spectrometry^[1,7].

Detection of specific anti-*H.pylori* antibodies:

Although *H. pylori* is not an invasive bacteria, it actively stimulates the imunitary system of its host by liberating lipopolysaccharides and immunogenic

estimula activamente o sistema imunitário do hospedeiro pela libertação de lipopolissacáridos e de proteínas imunogénicas. O teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-linked immunosorbed assay) é o método mais comumente utilizado para a determinação de anticorpos anti-*H. pylori* no soro. Com este teste é possível detectar os anticorpos tipo IgG e tipo IgA assim como obter resultados quantitativos. Actualmente, os melhores testes disponíveis no mercado para a detecção dos anticorpos tipo IgG apresentam uma sensibilidade e uma especificidade superiores a 90% , ver 95%^[7]. A detecção de anticorpos anti-*H. pylori* tipo IgG na saliva e na urina possui algum interesse, sendo um método de diagnóstico menos invasivo, que uma colheita de sangue^[1,7]. Tem sido verificada boa correlação com os valores séricos, mas a sua aplicação na prática clínica ainda não está muito difundida. O teste imunoblot é um excelente método de estudo da resposta imunitária contra os diferentes antígenos de *H. pylori*. Esta técnica pode ser utilizada para confirmar os resultados serológicos duvidosos. No entanto, a sua utilização na rotina ainda é reduzida^[7].

Mais recentemente, foi desenvolvido um teste que utiliza o sangue total para a detecção de IgG anti-*H. pylori* e que pode ser realizado no consultório médico. Este teste denomina-se doctor test e trata-se de um teste qualitativo pouco oneroso, de execução fácil e rápida, no entanto a sua precisão é muito variável^[7]. Estes métodos são bastante bons para a realização de rastreios de infecção por *H. pylori* antes do tratamento de erradicação. No entanto, não permitem a avaliação da eficácia terapêutica na medida em que o título de anticorpos diminui muito lentamente após a terapêutica o que não permite a definição de um limite a partir do qual se pode considerar que houve ou não sucesso terapêutico ou não^[7].

Deteção de antígenos de *H. pylori* nas fezes:

Recentemente foi desenvolvido um novo método não invasivo, para o diagnóstico da infecção por *H. pylori*. Este método baseia-se na detecção imunoenzimática de antígenos de *H. pylori* nas fezes (1). Para além do seu carácter não invasivo, a facilidade e a rapidez de execução constituem vantagens adicionais deste método. A sua precisão é boa mesmo em situações de avaliação pós-terapêutica^[7].

Amplificação genómica - PCR

A reacção de polimerização em cadeia (PCR) conduziu a uma modificação fundamental no campo da biologia molecular, abrindo novos horizontes nas ciências médicas e biológicas. Apesar da cultura de *H. Pylori*, a partir de biópsia gástrica continuar a ser o método de referência para o diagnóstico da infecção por esta bactéria, ela apresenta inconvenientes que podem ser

proteins. The immunoenzymatic ELISA (Enzyme-linked immunosorbed assay) test is the most commonly used method for determining anti-*H. pylori* antibodies in serum. With this test it is possible to detect IgG and IgA antibodies as well as obtain quantitative results. Currently, the best tests available in the market for IgG antibodies detection present a sensitivity and a specificity that is above 90%, and up to 95%^[7]. The detection of anti-*H. pylori* IgG antibodies in saliva and urine is of interest since it is a less invasive diagnostic method than a blood sample^[1,7]. A good correlation has been verified with the serum values, but its application in clinical practice still has not been made known. The immunoblot test is an excellent study method of the imunitary response against different *H. pylori* antigens. This technique may be used to confirm doubtful serological results. However, its routine usage is still reduced^[7].

Recently, a test was developed using all of the blood to detect anti-*H. pylori* IgG which may be done in a doctor's office. This test is called the doctor test and it is a qualitative test that is not very onerous, it is also easy and quick to execute although its precision is extremely variable^[7]. These methods are fairly good for screening *H. pylori* infection before eradication treatment. However, they do not allow for the evaluation of its therapeutic efficacy in that the antibodies diminish very slowly after therapy which does not allow for the definition of a limit from which one can consider if there was or not therapeutic success^[7].

Detection of *H. pylori* antigens in feces:

Recently a new non-invasive method was developed for the diagnosis of *H. pylori* infection. This method is based on the immunoenzymatic detection of *H. pylori* antigens in feces^[1]. Besides its non-invasive nature, facility and quick execution, there are additional advantages to this method. Its precision is good even in situations of post-therapeutic evaluation^[7].

PCR genomic amplification

The polymerase chain reaction (PCR) led to a fundamental modification in the field of molecular biology, opening new horizons in the medical and biological sciences. In spite of the culture of *H. pylori* through gastric biopsy, which continues being the method of reference for the diagnosis of bacteria infection, it presents inconveniences that may be overcome with the usage of PCR, such as the long period needed to obtain results and the respect for strict transport conditions of the gastric biopsy specimens. Currently, the big challenge in this infection diagnosis is the development of less invasive diagnostic methods and PCR constitutes a crucial tool in that development. Besides gastric biopsy, different biological samples such as saliva, dental plaque, gastric juice and feces

ultrapassados pela utilização da PCR, como sejam o longo período para a obtenção de resultados e o respeito de condições estritas de transporte da biópsia gástrica. Actualmente, o grande desafio no diagnóstico desta infecção é o desenvolvimento de métodos de diagnóstico menos invasivos e a PCR constitui uma ferramenta crucial para esse desenvolvimento. Diferentes amostras biológicas, para além da biópsia gástrica, como a saliva, a placa dentária, o suco gástrico e as fezes têm sido alvo de vários estudos com o objectivo da sua utilização no diagnóstico desta infecção^[6,9]. Uma outra aplicação da PCR, potencialmente interessante, é a detecção da resistência microbiana aos antibióticos.

O tratamento da infecção por este microorganismo baseia-se numa terapia tripla que inclui dois antibióticos e um inibidor da bomba de prótons^[11]. Os antibióticos mais frequentemente utilizados são a claritromicina, o metronidazol e a amoxicilina^[11,12]. A prevalência da resistência de *H. pylori* à claritromicina e ao metronidazol tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e existe uma correspondência directa entre este aumento e o decréscimo da taxas de erradicação da infecção por este microorganismo^[11,13].

Um estudo realizado na área de Lisboa entre 1990 e 1998 revelou uma taxa de resistência à claritromicina de 14,6 % e de 44,8 % na população adulta e na população pediátrica respectivamente^[10]. A mesma equipa, realizou posteriormente um estudo numa população pediátrica de Lisboa entre 1998 e 2001 que revelou taxas idênticas de resistências aos macrólidos (41,2 %)^[14,15]. O mecanismo de resistência de *H. pylori* está bem estabelecido para os macrólidos, são igualmente conhecidos alguns dos mecanismos de resistência aos nitroimidazóis e às fluoroquinolonas^[12,16,17,18].

No que diz respeito à amoxicilina e à tetraciclina foram descritas estirpes resistentes a estes antibióticos. No entanto, os mecanismos associados ainda não se encontram completamente esclarecidos^[17,19,20].

Recentemente foi desenvolvido um protocolo baseado no princípio da PCR em tempo real, utilizando o aparelho LightCycler Roche Diagnostics. Este protocolo permite a obtenção de um resultado de detecção da presença de *H. pylori* na biópsia gástrica assim como do seu perfil de susceptibilidade aos macrólidos^[10].

PCR em Tempo Real

Esta técnica baseia-se na monitorização dos produtos de amplificação através da utilização de um fluorocromo, que ao emitir fluorescência permite a sua detecção e integração num sistema computadorizado e consequente visualização do produto de amplificação^[10,14]. O sistema LightCycler, da Roche, consiste num termociclador associado a um desenvolvido

have been the target of several studies with the aim of discovering its usage in the diagnosis of this infection^[6,9]. Another potentially interesting PCR application is the detection of microbial resistance in antibiotics.

The treatment of infection by this microorganism is based on a triple therapy that includes two antibiotics and a proton pump inhibitor^[11]. The most commonly used antibiotics are claritromycin, metronidazole and amoxicillin^[11,12]. The prevalence of *H. pylori* resistance to claritromycin and metronidazole has increased considerably in the past years and there is a direct correspondence between this increase and the decrease in the rate of eradication of this infection by this microorganism^[11,13].

A study carried out in the Lisbon area between 1990 and 1998 revealed a resistance rate to claritromycin of 14.6% and 44.8% in the adult and pediatric population, respectively^[10]. The same team carried out another study in Lisbon's pediatric population between 1998 and 2001 that revealed identical resistance rates to macrolids (41.2%)^[14,15]. The mechanism of *H. pylori* resistance is well established for the macrolids, and some of the resistance mechanisms to nitroimidazoles and fluoroquinolones are equally known^[12,16,17,18]. In relation to amoxicillin and tetracycline, there was a description of resistant strains to these antibiotics; however, the associated mechanisms have not yet been completely clarified^[17,19,20].

Recently a new protocol was developed based on the principle of real-time PCR using the LightCycler Roche Diagnostics instrument. This protocol allows for us to attain results that detect the presence of *H. pylori* in the gastric biopsy as well as a profile of its susceptibility to macrolids^[10].

Real-time PCR

This technique is based on monitoring the amplification products through the use of a fluorochrome, which emits fluorescence and allows for the detection and integration in a computerized system and its subsequent visualization of the amplification product^[10,14]. The Light Cycler system, by Roche, consists of a thermocyclator associated to a microspectrofluorimetre that is developed with the aim of maximizing the quantity of information that may be obtained from the amplification reaction^[10,14]. In this system the variation of temperature during the cycles of PCR reaction is obtained by air heated from a heat pump and controlled in a thermal chamber. Therefore when the reaction is compared to the conventional PCR technique it is faster since you can reach temperature variations more quickly (20°C/second)^[10]. An added fact is that this system does not require the visualization of amplified products in agarose gel, which reduces even more the reaction time. The

microespectrofluorímetro desenvolvido com a finalidade de maximizar a quantidade de informação que poderá ser obtida sobre a reacção de amplificação^[10,14]. Neste sistema a variação de temperatura durante os ciclos de reacção de PCR, é obtida por ar aquecido a partir de uma bomba de calor e controlado numa câmara térmica. Assim a reacção, quando comparada com a técnica de PCR convencional, é mais rápida, uma vez que as variações de temperatura são atingidas mais rapidamente (20°C/segundo)^[10]. Acresce ainda o facto de este sistema dispensar a visualização dos produtos amplificados em gel de agarose o que reduz ainda mais o tempo de reacção. A identificação dos produtos de amplificação é possível através da análise das curvas de temperatura de fusão (Tm)^[10,14,15]. Cada produto de amplificação (ADN) apresenta uma Tm específica, que será aquela na qual metade da cadeia de ADN está desnaturada e a outra metade se mantém em cadeia dupla^[10,14,15]. A reacção ocorre em capilares de vidro de borosilicato, que apresentam uma elevada superfície para que ocorra o rápido equilíbrio entre a temperatura do ar e os componentes da reacção. Desta combinação resulta que um ciclo de amplificação pode ser efectuado em menos de 30 segundos. Assim, uma reacção de amplificação completa de 30 a 40 ciclos, pode ser executada num curto espaço de tempo (20 a 30 minutos)^[10,14]. As propriedades ópticas do vidro de borosilicato fazem dos capilares um local ideal para a quantificação da fluorescência. A fluorescência produzida dentro do capilar é detectada por fibras ópticas existentes no aparelho, que permitem a observação de cada ciclo em particular. A unidade óptica do aparelho é constituída por três canais de detecção, os quais medem a luz emitida a comprimentos de onda diferentes e pela “light-emitting-diode” (LED), que vão permitir a monitorização da fluorescência a partir do computador ligado ao aparelho^[10,14]. No sistema Light Cycler, a monitorização dos produtos de PCR, pode ser realizada através de dois métodos. Um dos métodos consiste na aplicação de um fluorocromo, o “SYBR Green I dye”, com capacidade para intercalar-se à cadeia dupla de ADN. “SYBR GREEN I dye” liga-se ao “minor groove” da cadeia dupla de ADN, acentuando a sua fluorescência^[10,14]. Outro método de monitorização dos produtos amplificados baseia-se no emprego de sondas de hibridação, que permite uma maior especificidade na detecção e identificação dos produtos de amplificação. Neste sistema são utilizadas duas sondas, duas sequências de oligonucleótidos marcadas com dois fluorocromos diferentes que hibridam com o ADN alvo^[10,14]. Este método rege-se pelo princípio de transferência de energia o qual se designa de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), em que a energia emitida pelo fluorocromo dador (fluoresceína)

identification of amplification products is possible with the analysis of melting temperature curves (Tm)^[10,14,15]. Each amplification product (DNA) presents a specific Tm, which will be the temperature needed to denature half of the DNA double chain^[10,14,15]. The reaction occurs in borosilicate glass capillaries that present a high surface in order for there to be a quick balance between the air temperature and reaction components. This combination results in an amplification cycle that can be carried out in less than 30 seconds. Thus, a complete amplification reaction of 30 to 40 cycles can be carried out in a short space of time (20 to 30 minutes)^[10,14]. The optical properties of the borosilicate glass make the capillaries an ideal place for fluorescence quantification. The fluorescence produced inside the capillary is detected by fiber optics in the instrument that allow for the observance of each individual cycle. The instrument's optical unit has detection channels that measure light emitted at different wavelengths and light-emitting-diode (LED), which allows to monitor the fluorescence from a computer connected to the instrument^[10,14]. In the Light Cycler system, the monitoring of PCR products may be carried out in two methods. One consists in the application of fluorochrome, the SYBR Green I dye, with the capacity to insert itself in the DNA's double chain. SYBR Green I dye connects to the minor groove of the DNA double chain, heightening its fluorescence^[10,14]. Another monitoring method of the amplified products is based on the use of hybridization probes that allow for higher specificity in the detection and identification of amplification products. Two probes are used in this system, with two sequences of marked oligonucleotides with two different fluorochromes that hybridize with the target DNA^[10,14]. This method follows the principle of energy transfer which is designated as FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), where the energy emitted by the fluorochrome donor (fluorescein) will excite the fluorochrome receptor connected to the second hybridization probe (Figure 1). The quantity of fluorescence emitted is directly proportional to the target DNA quantity generated during the amplification reaction^[10,14].

vai excitar o fluorocromo receptor ligado à segunda sonda de hibridação (Figura 1). A quantidade de fluorescência emitida é directamente proporcional à quantidade de DNA alvo gerado durante a reacção de amplificação^[10,14].

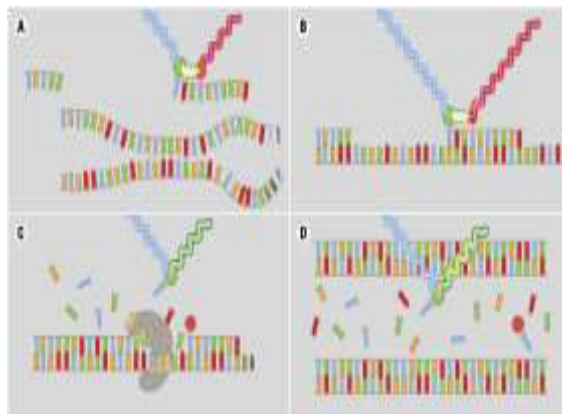


Figura 1- Metodologia de detecção de fluorescência por sondas de hibridação do Sistema Light Cycler.

Figure 1- The LightCycler System methodology of fluorescence detection with hybridization probes.

A resistência de *H. pylori* aos macrólidos é devida a uma diminuição da ligação destes ao ribossoma^[15,16]. Esta resistência está associada a mutações pontuais nas posições 2142 e 2143 do domínio V do ARN ribossomal 23S de *H. pylori*^[16,17,19]. Uma adenina normalmente presente é substituída por uma guanina (em 2142 e 2143) ou, uma citosina (em 2143) (Figura 2)^[16]. As concentrações mínimas inibitórias estão consideravelmente aumentadas, tendo sido descrito que a mutação A2142G origina as concentrações mínimas inibitórias mais elevadas^[16]. A resistência é cruzada para todos os macrólidos o que não permite a substituição de um macrólido por outro numa situação de resistência a este grupo de antibióticos^[11,17]. Assim, e baseado no princípio de transferência de energia FRET do sistema LC, foram desenhadas sondas de hibridação complementares à zona do domínio V do ARN ribossomal de *H. pylori* onde se encontram as mutações pontuais responsáveis pela resistência deste microrganismo aos macrólidos (Figura 3)^[10,17,19,21].

H. pylori resistance to macrolides is due to a decrease in antibiotic binding to the ribosome^[15,16]. This resistance is associated to specific point mutations at positions 2142 and 2143 of the domain V of the 23S ribosomal RNA in *H. pylori*^[16,17,19]. A normally present adenine is replaced by a guanine (at positions 2142 and 2143), or a cytosine (at position 2143) (Figure 2)^[16]. The minimal inhibitory concentrations increase considerably since the A2142G mutation originates higher inhibitory minimal concentrations^[16]. The resistance is crossed for all macrolides which does not allow for the substitution of a macrolid by another in a situation of resistance to this group's antibiotics^[11,17]. And so, based on the LC system's FRET energy transfer principle, hybridization probes, which are complementary to the domain V of the ribosomal RNA in *H. pylori*, were drawn where the specific point mutations responsible for this microorganism's resistance to macrolides are found (Figure 3)^[10,17,19,21].

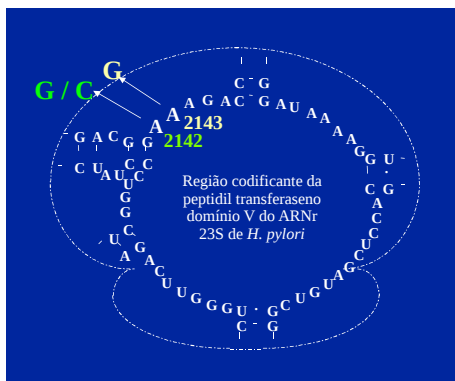


Figura 2- Mecanismo de resistência de *H. pylori* aos macrólidos.

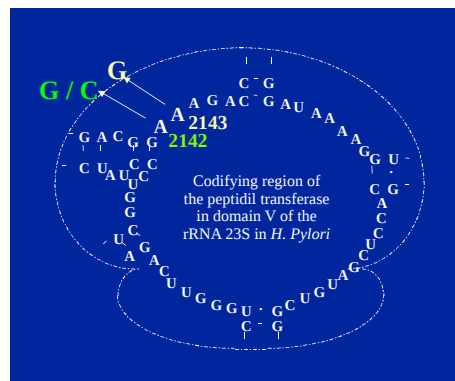


Figure 2- *H. pylori* resistance mechanism to macrolides (codifying region of the peptidyl transferase in domain V of the rRNA 23S in *H.*

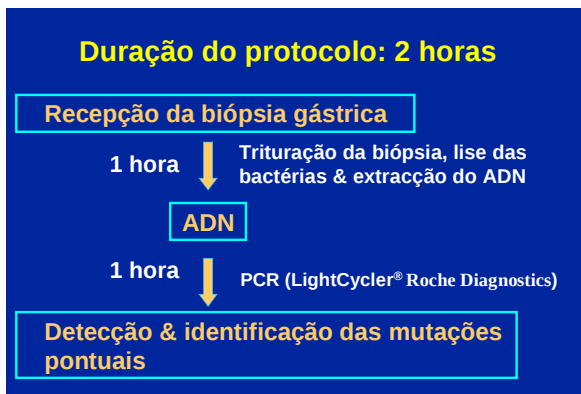


Figura 3- Protocolo de detecção de *H. pylori* em biópsia gástrica por PCR em Tempo Real.

Este protocolo exige apenas duas horas após recepção da biópsia gástrica, para a obtenção de um resultado (Figura 4) permitindo a detecção da presença de *H. pylori* e a identificação em simultâneo das mutações pontuais, responsáveis pela resistência aos macrolídeos^[10,14]. Com base na análise da curva de fusão para a determinação do T_m da fragmento amplificado é possível, numa mesma reacção, diferenciar entre uma estirpe resistente e uma estirpe sensível presentes na biópsia gástrica (Figura 5)^[10]. Esta tecnologia permite uma detecção rápida e sensível da presença de *H. pylori* directamente na biópsia gástrica com resultado imediato do seu perfil de susceptibilidade aos macrólídeos o que permite ao clínico instaurar a terapêutica mais precocemente e mais adaptada de acordo com o perfil de susceptibilidade. A aplicação desta metodologia é tanto mais importante quanto maiores forem as taxas de resistência aos macrólídeos da população em estudo, como é o caso da população pediátrica portuguesa^[11].

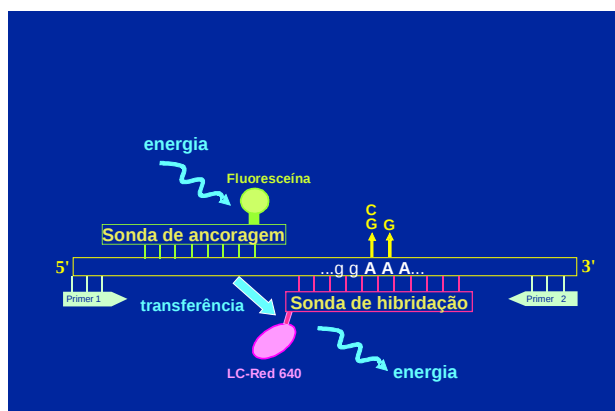


Figura 4-Técnica do sistema LightCycler® : iniciadores, sondas de ancoragem e de hibridação (Roche Diagnostics).

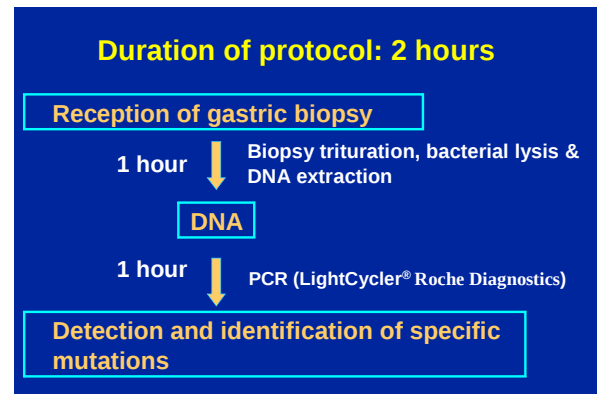


Figure 3- Real-time PCR protocol for the detection of *H. pylori* in gastric biopsy.

This protocol requires only two hours after reception of the gastric biopsy in order to obtain a result (figure 4) allowing for the detection of *H. pylori* presence and simultaneous identification of the specific point mutations, responsible for its resistance to the macrolides^[10,14]. Based on the analysis of the melting curve for T_m determination of the amplified fragment, it is possible, in the same reaction, to differentiate between a resistant and sensitive strain present in the gastric biopsy (Figure 5)^[10]. This technology allows for a quick and sensitive detection of *H. pylori* presence directly in the gastric biopsy with the immediate result of its profile and susceptibility to macrolides. This allows a doctor to begin therapy earlier and have it be better adapted to the profile of susceptibility. The application of this methodology will be evermore important so long as the resistance rates to macrolides in the population under study increase, as is the case of the Portuguese pediatric population^[15].

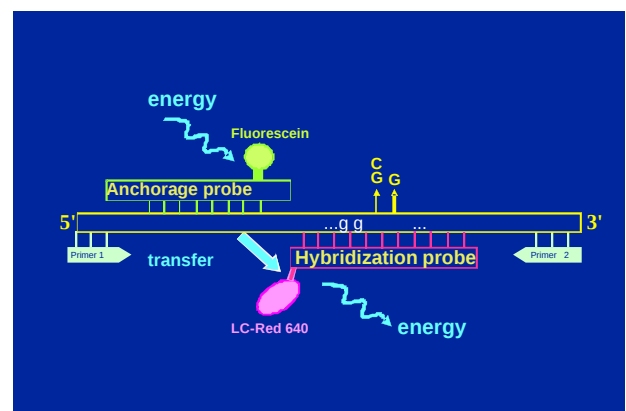


Figure 4 - LightCycler® system technique: primers, anchorage and hybridization probes (Roche Diagnostics).

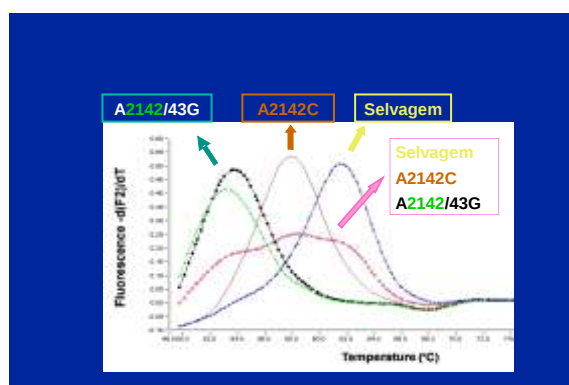


Figura 5- Detecção das diferentes mutações pontuais em ADN de estirpe, de *H. Pylori* controlo por análise das curvas de fusão.

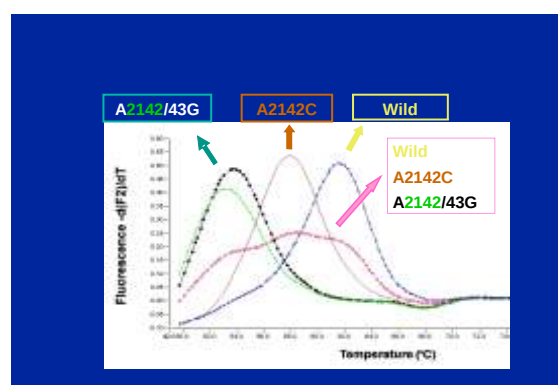


Figure 5- Detection of different specific mutations in the DNA strain, of the *H. pylori*, control by melting curve analysis.

A PCR em tempo real é dotada de uma grande sensibilidade e especificidade, rapidez de obtenção de resultados o que aliado à sua capacidade de detecção de mutações responsáveis pela resistência dos microrganismos aos antibióticos faz com que esta técnica seja a metodologia do futuro no diagnóstico das doenças infecciosas.

The real-time PCR presents a great sensitivity, specificity and rapidity in obtaining results which when allied to its detection capacity of the point mutations responsible for the microorganisms' resistance to antibiotics turns this technique into a methodology for the future in the diagnosis of infectious diseases.

Referências / References

- [1].Duarte C., Lopes T, Monteiro L. “Diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*.”. In Guerreiro S., Monteiro L. Eds. “*Helicobacter pylori. da Infecção à Clínica*” - Permanyer Portugal, 2001, 41-58.
- [2].Goodwin CS, Armstrong JA, Chivers T et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustalae* to *Helicobacter* gen.nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov. an *Helicobacter mustalae* comb.nov., respectively. Int J Syst Bacteriol.1998; 39:397-405.
- [3].Marshall B.,Warren J.”Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients with Gastritis and Peptic Ulceration”. Lancet, 1984, 1331-1314
- [4].Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA,Unusual Cellular fat acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa.J Med Microbiol 1985; 19:257-67
- [5].Forman D.,Newell D., Fullerton F. et al “Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation”. Br Med J, 1991;302:1302-1305.
- [6].Malfertheiner P.,Leodolter A. “*Helicobacter pylori*. Conceitos actuais”. In Quina MG., Ed.Gastroenterologia Clínica. Lidel, 2000 , 351-375.
- [7].Ricci C,holton J, Vaira D, Diagnosis of *Helicoacter pylori*:Invasive and non Invasive tests, Best Practive Reserch Clinical Gastroentererology, Vol 21, No 2; 2007:299-313
- [8].Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA et al Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. 9ª ed. Baltimore, Maryland 21202, USA: Williams and Wilkins 1994.
- [9].Buckley, Martin JM, O,Morain et al *Helicobacter* Biology- discovery .Br Med Bull 1998; 1: 7-16
- [10].Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, Megraud F. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1):397-402.
- [11].Gerrits, M.M., Schuijffel, D., Van Zwet, A.A., Kuipers, E.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Kusters, J.G. 2002. Alterations in Penicillin-binding protein 1A confer resistance to -lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 46(7):2229-2233
- [12].Hulten K, Gibree A, Skold O et al Macrolides Resistance in *Helicobacter pylori* :mechanism and stability in strains from claritromycintreated patients.Amtimicrob Agents Chemother 1997;41:2550-3