

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CEPA m1 DE *HELICOBACTER PYLORI* EM PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

Fernando Francisco Pazello Mafra¹; Ivarne Luiz dos Santos Tersariol³; Douglas Mascara⁴

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: Fernando.mafra@bol.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: ivarne@umc.br³

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: dmascara@umc.br⁴

Área do Conhecimento: Genética de microorganismos

Palavras-chaves: PCR em tempo-real; densidade bacteriana; análise qualitativa

INTRODUÇÃO

A bactéria *Helicobacter pylori* (ϵ -Proteobacteria; *Helicobacteraceae*) é um patógeno responsável por diversas afecções no trato gástrico de mamíferos, principalmente humanos (COVACCI *et al.*, 1999). Este patógeno foi descrito em 1984 pelos microbiologistas Marshall & Warren em análises de fragmentos de biópsias gástricas.

Morfologicamente, a *H.pylori* é um bastonete gram-negativo, semi-curvado, apresentando de 4 a 6 flagelos, catalase-positiva, oxidase-positiva e urease-positiva. Este patógeno é capaz de colonizar o ambiente gástrico caracterizado como hostil para a sobrevivência de diferentes microorganismos, entretanto, por ser microaerófilo, o mesmo não sobrevive em ambientes com elevada concentração de oxigênio (COVACCI *et al.*, 1999).

Este microorganismo é descrito como o principal causador de patologias que acometem o trato gástrico. Dentre as patologias associadas a *H.pylori*, as mais frequentes são gastrite aguda, crônica e nodular, úlcera péptica em atividade e em cicatrização, pangastrite e carcinomas gástricos (PARSONNET *et al.*, 1993). Outras patologias não gástricas também são correlacionadas com o microorganismo, tais como dispepsia não ulcerativa, doenças coronarianas e cardiovasculares, urticária idiopática crônica, púrpura de Henoch-Shölein, trombocitopenia auto-imune, síndrome de Sjögren e enxaqueca (COVACCI *et al.*, 1999).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica precisa e eficaz para o diagnóstico de *H.pylori* em fragmentos de biópsias gástricas (DI BONAVENTURA *et al.*, 2004). Um estudo comparativo feito pelos mesmos autores demonstrou que a técnica de PCR apresenta uma eficácia de 100% da detecção de *H.pylori* quando comparada à uma eficácia de 67,8% de técnicas histológicas. No diagnóstico por PCR, *primers* específicos para os genes *urease* e *16sRNAr* são mais comumente utilizados para detecção do microorganismo, pois amplificam regiões conservadas do genoma da *H.pylori* (DI BONAVENTURA *et al.*, 2004). Além do diagnóstico da infecção, a técnica de PCR também permite a detecção de diferentes cepas de *H.pylori* de diferentes graus de virulência (ATHERTON *et al.*, 1995), porém não possibilita a identificação quantitativa do microorganismo.

A detecção quantitativa de *H.pylori* pode ser realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) (MOLNAR *et al.*, 2007). Este método permite a quantificação da densidade bacteriana no tecido analisado. Um estudo feito por Molnar *et al.* (2007) obteve sucesso na quantificação da densidade bacteriana de *H.pylori* em diferentes regiões do epitélio gástrico. Entretanto, até o momento nenhum estudo foi realizado na verificação de quantificação de densidade de *H.pylori* de cepas específicas.

OBJETIVOS

O presente estudo objetivou padronizar um método de quantificação da densidade populacional da cepa *m1* de *Helicobacter pylori* isolada em tecido epitelial gástrico. Por intermédio da análise em sistema PCR quantitativo (qPCR) (PCR tempo-real) procuramos verificar a correlação entre a densidade bacteriana e certas afecções gástricas.

METODOLOGIA

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de biópsias gástricas analisadas em estudo anterior nas quais foram identificadas as cepas *m1*, através de PCR convencional. As amostras selecionadas correspondem a 18 pacientes analisados sendo cinco (8) homens e (10) mulheres, entre 18 e 59 anos, com diferentes patologias gástricas: úlcera péptica gástrica e bulbar, gastrite aguda, pangastrite, esofagite e pólipos.

A sequência *m1* do loco *vacA*, descrito por Atherton *et al.* (1995), foi utilizado como marcador específico de cepa *H. pylori* durante o processo de amplificação em sistema qPCR. O sistema qPCR, ABI 7500 (Applied biosystem®) foi realizado a partir de cada amostra, no qual foram utilizados os protocolos de amplificação quantitativa SYBR green conforme protocolo do fabricante (Invitrogen – Califórnia). O programa de amplificação e a detecção dos produtos de PCR foram realizados conforme programa convencional de amplificação do aparelho ABI 7500 (Applied biosystem®).

A verificação do produto amplificado foi realizada por dissociação das sequências amplificadas, sendo consideradas sem contaminação aquelas que apresentaram temperatura de melting™ entre 79,4 °C a 80,4 °C para o marcador *m1*.

Inicialmente, a concentração de DNA foi estimada e normalizada para todas as amostras em espectrofotômetro (Nanodrop) por absorvância na faixa de comprimento de onda de 260nm. Diluições seriadas (1:1 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) iniciadas a partir de 200ng de DNA inicial foram realizadas para a sequência *m1* da cepa de *H. pylori*, para determinação da integridade do material e a da concentração relativa de DNA por intermédio da análise do valor limiar do ciclo de amplificação (Cycle Threshold - CT) da amostra. A densidade bacteriana é inversamente proporcional ao número de CT obtido, de modo que cada ciclo correspondente ao dobro do valor do ciclo anterior. O valor de CT foi normalizado para todas as amostras de modo a excluir indução de resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O marcador *m1* amplificado a partir das amostras de biópsia conservada apresentou alta eficiência na amplificação. As curvas de amplificação obtidas a partir da diluição seriada do material quando plotadas em gráfico apresentaram distância entre si de aproximadamente 3,16 ciclos, condizente com o esperado para as diluições. Para verificação da especificidade do produto amplificado utilizando o *primer m1* através do sistema SYBR Green (Invitrogen), foi realizada a dissociação do produto amplificado da amostra. As amostras dissociadas apresentaram um único pico de fluorescência relativo a especificidade da amostra amplificada. A variação da temperatura de *melting* entre 79,8°C a 80,2°C indicou que não houve amplificações inespecíficas. Para a análise qualitativa de DNA bacteriano, foram analisados indivíduos com úlcera (n = 3), gastrite (n = 8), esofagite (n = 3) pólipos (n = 1) sem patologias (n = 1) metaplasia (n = 1).

Indivíduos com úlcera em atividade apresentaram densidade bacteriana superiores a todos outros indivíduos com patologias menos severas e úlcera em cicatrização. Pacientes sem patologia apresentam densidade bacteriana drasticamente reduzida em relação às outras patologias, salvo metaplasia. Todas as demais patologias apresentam densidade bacteriana similares entre si (Figura 1).

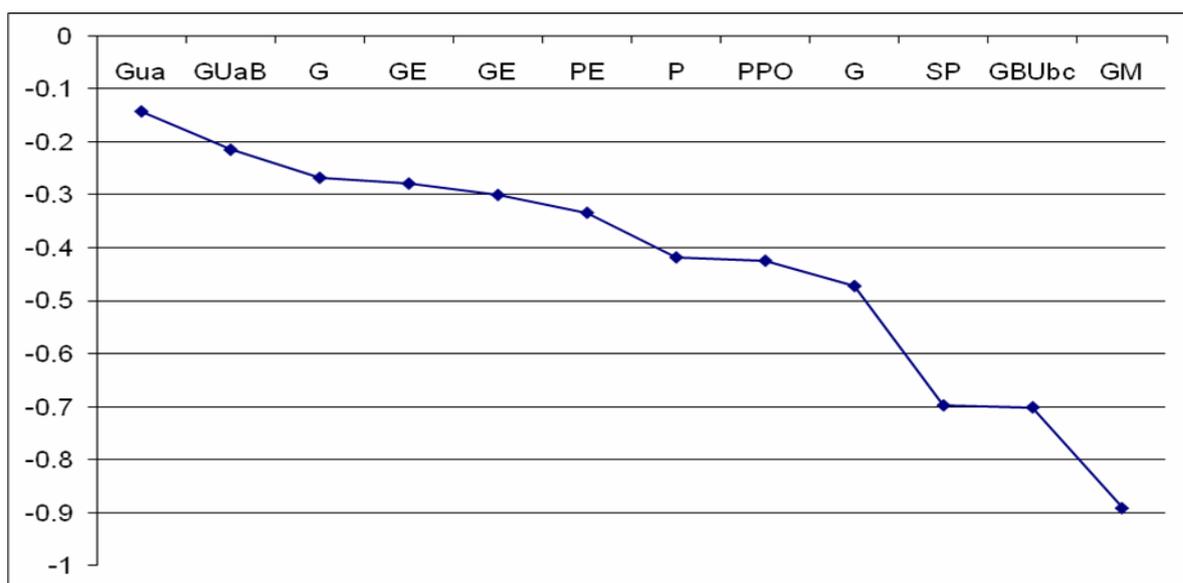


Figura 1: Distribuição do coeficiente de densidade bacteriana relativa em relação ao valor limiar, entre os pacientes portadores de diferentes afecções gástricas, atendidos no serviço de endoscopia do Hospital das Clínicas Luzia Pinho Melo, Mogi das Cruzes/SP. Gua – Gastrite e úlcera gástrica em atividade; GUaB – Gastrite, úlcera gástrica em atividade e bulbite; G – gastrite; GE – gastrite e esofagite; PE – Pangastrite e esofagite; P – Pangastrite; PPO – Pangastrite e pólipos; ASS – sem patologias; GBUbc – Gastrite e úlcera bulbar em cicatrização; GM – Gastrite e metaplasia. Coeficiente de Densidade Relativa limiar = 0.

CONCLUSÕES

Através do presente estudo, foi possível concluir que a sequência *ml* do loco *vacA* apresentou resultados satisfatórios para uso como marcador em PCR em tempo real. Existem diferenças entre densidade bacteriana entre indivíduos com diferentes patologias. Densidade bacteriana mais elevada ocorre em pacientes com patologias ulcerativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;**270**:17771-7.

Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**:1328–1333.

Di Bonaventura, G., Neri, M., Angelucci, D., Rosini, S., Piccolomini, M., Piccolomini R. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR on gastric biopsy specimens taken for CP test: comparison with histopathological analysis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. Jan-Apr; **17**(1): 77-82. 2004

Molnar, B., Szoke, D., Ruzsovics, A., Tulassay, Z. Significantly elevated *Helicobacter pylori* density and different genotype distribution in erosions as compared with normal gastric biopsy specimen detected by quantitative real-time PCR. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **20**: 305-313. 2008

Parsonnet, J., Samloff, I.M., Nelson, L.M., Orentreich, M., Vogelman, J.H., Friedman, G.D. 1993. *Helicobacter pylori*, Pepsinogen, and Risk for Gastric Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*: 461-466.

AGRADECIMENTOS

A Deus; Minha mãe meu pai e meu irmão pelo amor e constante apoio; Ao meus amigos do laboratório de Genética Aplicada à Hospedeiros e Simbiontes – Núcleo de Ciências Ambientais (NCA) – especialmente meu orientador, prof^o Douglas Mascara, e Érika Gonçalves de Oliveira; A equipe do setor de endoscopia do Hospital das Clínicas Luzia de Pinho Melo.