

Associação entre *cagA* e alelos do *vacA* de *Helicobacter pylori* e úlcera duodenal em crianças no Brasil

Recebido em 10/09/01
Aceito para publicação em 06/11/01

VacA alleles, cagA, and duodenal ulcer in children in Brazil

Abdussalam Ali Ramadam Ashour^{1,5}
Valquíria Ribeiro de Gusmão¹
Paula Prazeres Magalhães²
Guilherme Birchal Collares³
Edilberto Nogueira Mendes⁴
Dulciene Maria de Magalhães Queiroz⁶
Gífone Aguiar Rocha⁶
Andreia Maria Camargos Rocha⁶
Anfrisina Sales Teles Carvalho⁷

unitermos	resumo
<i>H. pylori</i>	<p><i>Helicobacter pylori</i> é o principal agente de gastrite em seres humanos e fator de risco para úlcera péptica e câncer gástrico. A evolução da infecção está relacionada a diversos fatores, inclusive bacterianos, como presença de <i>cagA</i> e genótipo s1-m1 do <i>vacA</i>, associados com o desenvolvimento de úlcera e adenocarcinoma gástrico. O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre <i>cagA</i> e alelos do <i>vacA</i> em <i>H. pylori</i> isolado de crianças e relacionar os achados com a doença apresentada pelo paciente. Foram estudadas 65 crianças (24 com úlcera duodenal e 41 sem úlcera gástrica ou duodenal). A pesquisa de <i>cagA</i> e de alelos do <i>vacA</i> foi feita por PCR em amostras da bactéria isoladas do estômago dos pacientes. Infecção mista foi identificada em dez (15,4%) crianças. Entre os pacientes com monoinfecção, o alelo s1 foi detectado em amostras isoladas de 40 (72,7%), e o m1 em 34 (61,8%). <i>CagA</i> foi identificado em <i>H. pylori</i> isolado de 38 (69,1%) pacientes. Foi observada associação entre presença de <i>cagA</i> e de genótipo s1-m1 ($p = 10^{-7}$) e entre <i>cagA</i> e padrão s1-m1 com úlcera duodenal ($p = 0,073$ e $p = 0,037$, respectivamente). Em conclusão, infecção mista por <i>H. pylori</i> é comum em crianças brasileiras, e amostras da bactéria apresentando o alelo s1 e <i>cagA</i> são as mais prevalentes no nosso meio. A concomitância do alelo s1 do <i>vacA</i> e de <i>cagA</i> foi freqüentemente observada, e a associação de amostras positivas de s1 e de <i>cagA</i> com úlcera duodenal foi confirmada neste trabalho.</p>
<i>vacA</i>	
<i>cagA</i>	
Úlcera duodenal	
Gastrite	

abstract

Helicobacter pylori is now accepted as the most important agent of gastritis in humans and as a risk factor for ulcer disease and gastric carcinoma ethiopathogenesis. The outcome of the infection is associated with several factors, among them bacterial ones such as *cagA* and *vacA* s1 genotype. We aimed to investigate the association between *cagA* and *vacA* genotypes in *H. pylori* strains isolated from children and to correlate these findings with patient's disease. A total of 65 children (24 with duodenal ulcer and 41 without gastric or duodenal ulcer) were included in the study. *CagA* and *vacA* alleles were identified by PCR in bacterium strains isolated from the gastric mucosa of the studied group. Multiple-strain infection was detected in 10 (15.4%) patients. Among children with nonmixed infection, s1 allele was found in *H. pylori* strains isolated from 40 (72.7%), and m1 allele in strains obtained from 34 (61.8%). *CagA* was found in bacterium strains isolated from 38 (69.1%) patients. Association between *cagA* and s1-m1 genotype ($p = 10^{-7}$), and between these genotypes and duodenal ulcer ($p = 0.073$ and $p = 0.037$, respectively) was observed. In conclusion, multiple-strain infection is frequent in Brazilian children. *H. pylori* strains harbouring, simultaneously, *cagA* and *vacA* s1-m1 genotypes are the most frequent in our pediatric population and are associated to ulcer disease.

key words

H. pylori

vacA

cagA

Duodenal ulcer

Gastritis

1. Mestre; Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Departamento de Propeidética Complementar (PRO), Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FMUFMG).
2. Mestre; Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia (LPB), PRO, FMUFMG; Faculdade de Fisioterapia, Universidade de Itaiúna; Doutoranda pelo Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
3. Bolsista de iniciação científica (CNPq); residente em Patologia Clínica no Hospital das Clínicas da UFMG.
4. Doutor; LBM, PRO, FMUFMG.
5. Doutoranda pela Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
6. Doutor; LPB, PRO, FMUFMG.
7. Mestre; Departamento de Pediatria, FMUFMG.
Este trabalho é parte da tese de doutorado de Abdussalam Ali Ramadam Ashour, a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina - Unifesp, e foi apresentado no IV Congresso Brasileiro de Patologia Clínica (Florianópolis-SC - 5 a 8/9/2000).
Apoio financeiro: CNPq e Fapemig.

Introdução

Desde sua descoberta, na década de 80, *Helicobacter pylori*, bactéria espiralada gram-negativa, tem sido associada à etiopatogenia de diversas doenças do aparelho digestivo (17). Atualmente, o microrganismo é considerado o mais importante agente etiológico de gastrite em seres humanos, um fator essencial na gênese da úlcera péptica (20) e um fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (13), sendo considerado, pela Organização Mundial de Saúde, carcinógeno do tipo 1 (31). Há, ainda, evidências de sua associação com linfoma gástrico do tipo Malt e com linfoma não-Hodgkin gástrico (11). A evolução da infecção está associada a diversos fatores, entre eles tempo de infecção (13), fatores do hospedeiro (4) e fatores de patogenicidade da bactéria (1-3, 6, 7, 10, 15, 19, 23-25, 28, 30-32). Acredita-se que a aquisição da bactéria precocemente na infância e a conseqüente infecção de longa duração sejam fatores importantes associados ao desenvolvimento de carcinoma gástrico (13). Fatores do hospedeiro incluem resposta imune celular e humoral, genética HLA e grupo sanguíneo (4). Entre os fatores de patogenicidade da bactéria podem-se citar a produção de grande quantidade de urease, os fatores de adesão e a produção de citotoxina vacuolizante, entre outros (1-3, 6, 7, 10, 12, 15, 16, 23-26, 28, 30-32). Nos últimos anos vem se intensificando a pesquisa de marcadores de patogenicidade, por técnicas moleculares, na tentativa de detectar amostras da bactéria especificamente associadas a cada uma dessas doenças. Entre estes marcadores, o *cagA* e os alelos do *vacA* têm sido amplamente estudados (1-3, 6, 12, 15, 16, 18, 19, 22-24, 27-30, 32, 33).

O *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*) foi o primeiro marcador genético detectado em amostras da bactéria. Codifica a proteína *cagA* e está presente, mais freqüentemente, em amostras isoladas de pacientes com úlcera péptica do que nas obtidas de pacientes com gastrite (9). Uma das explicações para o fato é que o *cagA* é um marcador de uma ilha de patogenicidade, composta por mais de 30 genes, que está associada à indução de resposta inflamatória mais intensa (7). Assim, o *cagA* é um marcador de um grupo de amostras mais virulentas de *H. pylori* associadas, mais comumente, com úlcera péptica e câncer gástrico (9, 12, 16, 19, 23, 24, 28, 30, 32, 33), e sua detecção tem se mostrado clinicamente relevante, ao menos na maioria dos países do Ocidente (12, 16, 24, 28, 32).

O *vacA* (*vacuolating cytotoxin gene A*) é o gene que codifica a produção da citotoxina vacuolizante, conside-

rada importante fator na etiopatogênese da úlcera péptica (1, 10, 25). Apesar de o gene estar presente em todas as amostras da bactéria, apenas aproximadamente metade delas produz vacuolização celular *in vitro* (1, 10), o que sugere a existência de diversidade genética. De fato, Atherton *et al.* (1) demonstraram, em 1995, a existência de duas famílias de seqüências sinalizadoras (*s1* e *s2*) e duas de seqüências médias (*m1* e *m2*) do *vacA*. Os autores demonstraram que o alelo *s1* está relacionado à produção de citotoxina, e o alelo *m1*, à produção de maior quantidade da proteína. Assim, os genótipos *s1-m1* e *s1-m2* codificam a produção de citotoxina, e o *s2-m2* está presente em amostras não-citotóxicas (1). Os genótipos *s1-m1* e *s1-m2* são mais freqüentemente detectados em amostras de *H. pylori* isoladas de pacientes com úlcera péptica, e amostras *s2-m2* são mais comumente isoladas de pacientes com gastrite (1, 3, 12, 15, 28, 32, 33). De forma semelhante ao *cagA* (22, 32, 33), a investigação do padrão de alelos do *vacA* tem se mostrado clinicamente relevante, exceto em pacientes de origem oriental (28, 32, 33).

Nos últimos anos, a associação entre presença de *cagA*, seqüência sinalizadora *s1* do *vacA* e ocorrência de úlcera péptica tem sido demonstrada por alguns autores (3, 28, 33). A ligação entre *cagA* e atividade citotóxica não é bem explicada, mas a maioria das amostras *cagA* positivas apresenta o alelo *s1* do *vacA* (28, 33). Por outro lado, amostras *cagA* negativas geralmente têm o alelo *s2* do *vacA*. Entretanto a razão para a existência desta associação ainda não é clara (5), uma vez que não existe ligação física entre os dois genes no cromossomo bacteriano. Não se sabe, também, se a associação está presente em amostras isoladas de pacientes de diferentes regiões do mundo.

Estudos sobre a freqüência destes marcadores e sua relação com as diversas doenças do aparelho digestivo em crianças são escassos em todo o mundo. No Brasil, onde a aquisição de *H. pylori* ocorre, na maioria das vezes, precocemente na infância, em especial na população de baixo nível socioeconômico, estudos desta natureza são praticamente inexistentes (15). Além disto, não existem relatos sobre a associação entre a presença de *cagA* e dos alelos *s1* e *m1* do *vacA* em amostras de *H. pylori* isoladas no Brasil, tanto em crianças como em adultos.

Objetivos

Os objetivos deste estudo foram investigar a prevalência de *cagA* e de alelos *vacA* em amostras de *H. pylori* isoladas

de crianças com e sem úlcera duodenal, relacionar estes achados com as doenças apresentadas pelos pacientes e pesquisar a existência de associação entre os dois marcadores moleculares de patogenicidade.

Pacientes e métodos

Foram estudados 65 pacientes (33 do sexo feminino, faixa etária de 1 a 17 anos, média de idade de 10,2 anos), com cultura positiva para *H. pylori*, que haviam sido encaminhados, entre 1993 e 1997, ao Serviço de Endoscopia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG para esclarecimento de manifestações clínicas relativas ao trato digestivo alto. Consentimento informado foi obtido dos pais de todos os pacientes. Nenhuma criança encontrava-se em uso de antiinflamatórios não-esteróides, antagonistas de receptores H2, inibidores de bomba de prótons ou drogas antimicrobianas nos 30 dias anteriores à obtenção do material. Pacientes com distúrbios de coagulação ou sangramento ativo à endoscopia, com perfuração e/ou hemorragia gástrica, com impedimento anatômico à endoscopia, encaminhados para esclerose de varizes ou dilatação de estenose de esôfago, com sedação insuficiente ou apresentando reações colaterais graves às drogas utilizadas para sedação ou anestesia, ou com doenças ou disfunções graves não foram submetidos a endoscopia.

Entre os 65 pacientes estudados, 24 apresentavam úlcera duodenal à endoscopia; ulcerações gástricas ou duodenais não foram observadas ao exame endoscópico de 41 crianças.

Fragmentos de mucosa gástrica foram obtidos, por endoscopia, nas regiões da pequena curvatura do antro e grande curvatura do corpo gástrico, para diagnóstico da infecção por *H. pylori*, realizado por exame direto de esfregaços corados por carbolfucsina, teste da urease pré-formada e cultura em meio Belo Horizonte (24). Após identificação do microrganismo, parte do crescimento foi removido com *swab* estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 500µl de água quimicamente pura. A suspensão foi centrifugada a 6.000x g por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi mantido em *freezer* a -80°C até o momento da extração de DNA, que foi realizada por meio de tratamento com proteinase K e separação com fenolclorofórmio, como descrito por Fox *et al.* (14).

As reações de amplificação foram realizadas como descrito a seguir: 50ng a 100ng de DNA extraídos das amo-

stras bacterianas foram adicionados a uma mistura de reação de 50ml (volume final) contendo Tris-HCl 10mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, deoxinucleotídeos (200µM cada), 2,5U de Taq DNA polimerase e 0,2µM de cada *primer*, como especificado para cada reação.

Para amplificação de um fragmento de 411 pares de base do *ureA*, gene espécie-específico presente em todas as amostras de *H. pylori*, foram empregados os *primers* e a metodologia descritos por Clayton *et al.* (8). Uma amostra de *Escherichia coli* (isolada de paciente com infecção do trato urinário) foi empregada como controle negativo, a amostra de *H. pylori* ATCC 49503, como controle positivo e água destilada, como controle negativo interno da reação.

A amplificação da seqüência sinalizadora e da região média do *vacA* foi realizada utilizando-se os *primers* e a metodologia descritos por Atherton *et al.* (1, 2). As amostras de *H. pylori* ATCC 49503 (s1-m1), 435-95 (identificada no Laboratório de Biologia Molecular como s1-m2) e Tx30A (s2-m2) foram empregadas como controles para detecção dos alelos do *vacA*. Água destilada foi empregada como controle negativo interno da reação.

Para detecção do *cagA*, *primers* e metodologia propostos por Tummuru *et al.* (26), que amplificam um fragmento de 349 pares de base, foram utilizados. As amostras ATCC 49503 e Tx30A e água destilada foram empregadas como controles positivo e negativo e como controle negativo interno da reação, respectivamente.

Os produtos amplificados foram detectados, por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em transiluminador de luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio na concentração de 2,5µg/ml, empregando-se marcador de peso molecular de 50bp ou 100bp (*pharmacia biotech*).

A análise estatística foi feita empregando-se o teste de X², com correção de Yates, ou o teste exato de Fisher, quando indicado. O nível de significância foi estabelecido para $p \leq 0,05$.

Resultados

Apenas amostras *ureA* positivas foram incluídas neste estudo. Dez pacientes com infecção mista (infecção por amostras da bactéria apresentando diferentes genótipos *vacA*) não foram incluídos nesta análise.

Dos 55 pacientes com monoinfecção pelo microrganismo, 19 apresentavam úlcera duodenal e 36 não tinham úlcera gástrica ou duodenal.

O alelo s1 foi identificado em amostras obtidas de 40 pacientes (72,7%): 19 (100%) com úlcera duodenal e 21 (58,3%) sem úlcera. Amostras s2 foram detectadas apenas em pacientes sem úlcera (Tabela 1).

Amostras m1 foram detectadas em 34 (61,8%) pacientes, 16 (84,2%) com úlcera duodenal e 18 (50%) sem úlcera. O alelo m2 foi identificado em amostras obtidas de 20 (36,4%) pacientes, três (15,8%) com úlcera duodenal e 17 (47,2%) sem úlcera. Amostra híbrida m1,2 foi identificada em apenas um paciente (1,8%) (Tabela 1).

Associação estatisticamente significativa foi observada entre amostras de *H. pylori* apresentando alelo s1 ($p = 0,0029$; OR e IC95% não-calculáveis) ou alelo m1 ($p = 0,037$; OR = 5,04; IC95% = 1,11 a 30,87) e úlcera duodenal. O genótipo s1-m1 foi mais freqüentemente observado em pacientes com úlcera duodenal ($p = 0,037$; OR = 5,04; IC95% = 1,11 a 30,87) (Tabela 1).

O *cagA* foi identificado em 38 (69,1%) amostras de *H. pylori*, sendo 18 (94,7%) isoladas de crianças com úlcera duodenal e 20 (55,6%) de pacientes sem úlcera. Das 17 (30,9%) amostras *cagA* negativas, uma (5,3%) foi isolada de paciente com úlcera duodenal e 16 (44,4%), de pacientes sem úlcera (Tabela 2).

Foi observada associação significativa entre úlcera duodenal e infecção com amostras *cagA* positivas ($p = 0,073$; OR = 14,40; IC95% = 1,80 a 636,67) (Tabela 2).

Entre os 55 pacientes com monoinfecção, o alelo s1 foi identificado em todas as 38 amostras *cagA* positivas da bactéria e em duas (11,8%) amostras *cagA* negativas. O alelo s2 foi detectado apenas em amostras *cagA* negativas ($n = 15$; 88,2%). Associação estatisticamente significativa foi observada entre a presença de *cagA* e a região sinalizadora s1 do *vacA* ($p = 10^{-7}$; OR não-calculável) (Tabela 3).

O alelo m1 foi detectado em 32 (84,2%) amostras *cagA* positivas e em duas (11,8%) *cagA* negativas. O alelo m2 foi encontrado em 15 (88,2%) amostras *cagA* negativas e em cinco (13,2%) *cagA* positivas. Foi observada associação estatisticamente significativa entre presença do alelo m1 e de *cagA* ($p = 10^{-7}$; OR = 48; IC 95% = 7,06 a 492,9) (Tabela 3).

Entre os 19 pacientes com úlcera duodenal, 18 (94,7%) mostraram-se colonizados por amostras *cagA* positivas e que apresentavam o alelo s1 do *vacA*. Nas crianças sem úlcera, apenas 20 (55,6%) apresentaram amostras com o genótipo *cagA* positivo/alelo s1 do *vacA*. Associação estatisticamente significativa foi observada entre amostras de *H. pylori* s1/*cagA* positivas e presença de úlcera duodenal ($p = 0,005$).

Tabela 1

Genótipos do *vacA* em amostras de *H. pylori* isoladas de 19 crianças com úlcera duodenal e de 36 sem úlcera

Genótipo	Com úlcera duodenal - N° (%)	Sem úlcera N° (%)	Total N° (%)
s1-m1	16 (84,2)	18 (50)	34 (61,8)
s1-m2	3 (15,8)	2 (5,5)	5 (9,1)
s1-m1,2	-	1 (2,8)	1 (1,8)
s2-m2	-	15 (41,7)	15 (27,3)

Tabela 2

Distribuição de *cagA* em amostras de *H. pylori* isoladas de 19 crianças com úlcera duodenal e de 36 sem úlcera

Genótipo <i>cagA</i>	Com úlcera duodenal - N° (%)	Sem úlcera N° (%)	Total N° (%)
Positivo	18 (94,7)	20 (55,6)	38 (69,1)
Negativo	1 (5,3)	16 (44,4)	17 (30,9)
Total	19 (100)	36 (100)	55 (100)

Discussão

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma das infecções bacterianas mais freqüentes em todo o mundo, estando consistentemente acompanhada por reação inflamatória

Tabela 3

Associação entre *cagA* e alelos do *vacA* em amostras de *H. pylori* isoladas de crianças com monoinfecção

Alelos <i>vacA</i>	<i>cagA</i> positivo N° (%)	<i>cagA</i> negativo N° (%)
Região sinalizadora		
s1	38 (100)	2 (11,8)
s2	-	15 (88,2)
Total	38	17
Região média		
m1	32 (84,2)	2 (11,8)
m1,2	1 (2,6)	-
m2	5 (13,2)	15 (88,2)
Total	38	17

da mucosa gástrica. Uma vez adquirida, a infecção persiste, na maior parte dos indivíduos, por anos, décadas, ou, possivelmente, por toda a vida se não tratada com drogas antimicrobianas (13). Na maioria das vezes, a infecção é assintomática ou o paciente apresenta apenas manifestações clínicas discretas. Apenas uma minoria desenvolve úlcera péptica (20), importante causa de morbidade em todo o mundo, ou gastrite crônica atrófica, considerada um fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (13, 31).

Algumas características das amostras de *H. pylori* parecem estar associadas à evolução da infecção para doença mais grave. Entre elas, alguns genótipos, como alelos s1 e m1 de *vacA* e *cagA*, têm sido considerados marcadores de patogenicidade por estarem associados à produção de citotoxina e à indução de lesão epitelial e de reação inflamatória mais intensas, estando freqüentemente associados, na maioria dos países, com evolução da infecção para o desenvolvimento de doenças mais graves, como doença ulcerosa péptica e adenocarcinoma gástrico (3, 9, 24, 30, 33).

A distribuição geográfica dos alelos do *vacA* não é uniforme (27). A freqüência de s1 observada na população examinada neste estudo (72,7%) é semelhante à encontrada no leste e no norte da Europa (73,5%) e nas Américas Central e do Sul (71,4%) (27, 32). Na França, na Itália, no Canadá e nos Estados Unidos a freqüência do alelo é de, aproximadamente, 60%, e, no Japão, na África do Sul e no México, de 85% a 90% (19, 27, 32, 33). Por outro lado, a distribuição dos alelos m é mais homogênea e, de uma maneira geral, metade das amostras é m1 e a outra metade, m2 (27). No nosso meio, entretanto, amostras m1 (61,8%) são mais comuns que as do tipo m2 (36,4%).

Resultados de estudos realizados na década de 90 sugerem que o genótipo s1-m1 do *vacA* possa ser usado como um marcador de amostras mais virulentas de *H. pylori* (1, 3), em conformidade com o fato de que o alelo s1 está relacionado à produção da citotoxina vacuolizante e que o alelo m1 está associado com produção de maior quantidade da toxina (1). No presente estudo, foi observada associação entre presença de amostras s1-m1 e úlcera duodenal ($p = 0,037$), confirmando resultados descritos por Evans *et al.* (12) para amostras de *H. pylori* obtidas de adultos brasileiros. Temos conhecimento de apenas dois estudos, desenvolvidos em pacientes pediátricos com úlcera duodenal, que caracterizam o *vacA*, por PCR, em suas seqüências sinalizadora e média (6, 15). Çelik *et al.* (6)

estudaram a freqüência dos alelos s1, s2, m1 e m2 em amostras de *H. pylori* obtidas de 29 crianças com gastrite e três com úlcera duodenal. O genótipo s1-m1 foi observado em 66,7% das crianças com úlcera duodenal e em 41,4% dos pacientes com gastrite, não tendo sido observada associação entre o genótipo e úlcera duodenal, provavelmente devido ao pequeno número de crianças com úlcera duodenal incluídas no estudo. Diferentemente, Gusmão *et al.* (15) observaram a associação do genótipo s1-m1 com o desenvolvimento de úlcera duodenal; os autores, entretanto, não fazem referência ao *cagA*.

De forma semelhante ao que se observa na população adulta para *vacA*, a freqüência de amostras *cagA* positivas varia de uma região geográfica para outra. Embora praticamente todas as amostras isoladas de pacientes colonizados por *H. pylori* apresentem o gene nos países asiáticos (22, 32, 33), no restante do mundo esta distribuição é heterogênea. Em grande parte dos países da Europa Ocidental e nos Estados Unidos, a freqüência de amostras *cagA* positivas varia entre 59% e 75% (28, 30); na Itália e em Portugal, as taxas são superiores a 80% (28) e, no México, praticamente 100% dos indivíduos apresentam-se colonizados por amostras que carregam o gene (19).

No paciente pediátrico, a presença do gene, demonstrada de forma direta ou por meio de reações sorológicas, foi observada em 89% das crianças com gastrite grave na França (16), em aproximadamente 80% das crianças assintomáticas na China (18) e em 100% das crianças com úlcera péptica na Austrália (18) e no Brasil (23). Apesar das diferenças observadas pelos autores, que podem estar relacionadas à amostragem e à região geográfica, entre outros motivos, a maioria dos resultados demonstra maior freqüência de amostras *cagA* positivas em pacientes com úlcera péptica ou carcinoma gástrico (12, 24, 32).

No presente estudo, amostras *cagA* positivas foram identificadas em 69,1% das crianças, freqüência similar à observada em adultos em diversos países ocidentais. Nas crianças com úlcera duodenal, o gene foi detectado em 94,7% das amostras estudadas, confirmando a observação de diferentes autores, em diversas regiões do mundo, de que amostras *cagA* positivas são mais freqüentemente isoladas de pacientes com esta afecção (16, 19, 23, 24, 28, 30, 32).

Em algumas populações, o *cagA* ou o genótipo s1-m1 do *vacA* não podem ser usados como marcadores de amostras mais virulentas de *H. pylori* (18, 21, 22, 32, 33). Assim, uma análise de vários fatores de virulência bacterianos, além de fatores relacionados ao ambiente e ao hospedeiro,

deve ser realizada para se avaliar o risco de desenvolvimento de doenças graves associadas à infecção pelo microrganismo.

Recentemente, Van Doorn *et al.* (28) relataram que, em adultos holandeses, amostras de *H. pylori* com genótipo s1/*cagA* positivo podem ser consideradas mais virulentas, uma vez que tais amostras são predominantemente encontradas em pacientes com úlcera péptica, resultado que vem sendo confirmado por outros autores em pacientes adultos (12, 19, 32). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo: a presença do genótipo s1/*cagA* positivo foi observada em cerca de 95% dos pacientes com úlcera duodenal ($p = 0,005$). No que se refere à região média do gene, grande parte dos autores não faz referência à existência de associação dos alelos m1 ou m2 com *cagA*. Alta frequência do genótipo m1/*cagA* positivo foi observada neste estudo (89,5%), como relatado por Atherton *et al.* (1) e Evans *et al.* (12), para adultos.

A relação entre os genótipos discutidos acima é ainda pouco conhecida. Embora vários estudos tenham demonstrado a existência de relação entre *cagA* e *vacA*, a razão pela qual estes dois elementos genéticos, que não apresentam qualquer ligação física no cromossomo de *H. pylori* (5), estão tão fortemente associados não é, ainda, clara. A associação pode ser epidemiológica, existindo populações clonais de *H. pylori* cuja distribuição não é casual (27). É possível, ainda, que tais associações tenham uma base funcional ainda não-explicada.

Finalizando, a investigação do padrão genotípico de amostras de *H. pylori* em crianças, no nosso meio, é importante por apresentar relevância clínica, uma vez que a maioria dos pacientes com úlcera duodenal apresenta-se

colonizada por amostras de *H. pylori* carregando o genótipo s1/*cagA* positivo. Além disso, como demonstrado por Van Doorn *et al.* (29), a resposta ao tratamento com antimicrobianos está relacionada ao genótipo do microrganismo: pacientes que carregam amostras do tipo s1/*cagA* positivo apresentam taxas de cura da infecção mais elevadas.

Conclusões

Os alelos s1 da sequência sinalizadora e m1 da região média do *vacA* são os mais frequentemente observados, no nosso meio, nas amostras de *H. pylori* isoladas de crianças. De forma semelhante, o *cagA* está presente na maioria das amostras isoladas, especialmente naquelas obtidas de pacientes com úlcera duodenal.

O genótipo *cagA* positivo está fortemente associado com a presença dos alelos s1 e m1 do *vacA*, como observado em outras regiões do mundo.

O genótipo s1-m1/*cagA* positivo foi o mais frequentemente observado nas crianças estudadas e mostrou-se associado à presença de úlcera duodenal. Assim, a genotipagem de amostras do microrganismo parece ser clinicamente relevante no nosso meio, podendo contribuir para prever tanto a evolução da infecção por *H. pylori* como a resposta do paciente ao tratamento com antimicrobianos.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos ao prof. dr. Evanguedes Kalapothakis, que cedeu a Taq DNA polimerase empregada neste estudo.

Referências

1. Atherton, J.C. *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol. Chem.*, 270: 17771-7, 1995.
2. Atherton, J.C. *et al.* Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2979-82, 1999.
3. Atherton, J.C. *et al.* Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 112: 92-9, 1997.
4. Boren, T. *et al.* Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262: 1892-5, 1993.
5. Bukanov, N.O. & Berg, D.E. Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain. *Mol. Microbiol.*, 11: 509-23, 1994.
6. Çelik, J.; Su, B. & Trén, U. Virulence and colonization-associated properties of *Helicobacter pylori* isolated from children and adolescents. *J. Infect Dis.*, 177: 247-52, 1998.
7. Censini, S. *et al.* Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 14648-53, 1996.
8. Clayton, C.L. *et al.* Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 192-200, 1992.

9. Covacci, A. et al. Molecular characterization of 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5791-95, 1993.
10. Cover, T.L.; Halter, S. & Blaser, M.J. Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. *Human Pathol.*, 23: 1004-10, 1992.
11. Eidt, S.; Stolte, M. & Fischer, R. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Pathol.*, 47: 436-9, 1994.
12. Evans, D.G. et al. *Helicobacter pylori cagA* status and s and m alleles of *vacA* in isolates from individuals with a variety of *H. pylori*-associated gastric disease. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 3435-7, 1998.
13. Forman, D. et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br. Med. J.*, 302: 1302-5, 1991.
14. Fox, J.G. et al. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 1229-37, 1994.
15. Gusmão, V.R. et al. *VacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2853-7, 2000.
16. Husson, M.O. et al. Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 3300-3, 1995.
17. Marshall, B.J. & Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1 (8390): 1311-5, 1984.
18. Mitchell, H.M. et al. The prevalence of antibody to *cagA* in children is not a marker for specific disease. *J. Pediatr. Gastroenterol.*, 28: 71-5, 1999.
19. Morales-Espinosa, R. et al. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 3001-4, 1999.
20. National Institute of Health Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*, 272: 65-9, 1994.
21. Ogura, K. et al. High prevalence of cytotoxin positive *Helicobacter pylori* in patients unrelated to the presence of peptic ulcers in Japan. *Gut*, 41: 463-8, 1997.
22. Pan, Z.J. et al. Equally high prevalence of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 1344-7, 1997.
23. Queiroz, D.M.M. et al. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. *J. Infect. Dis.*, 181: 626-30, 2000.
24. Queiroz, D.M.M. et al. *cagA* positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int. J. Cancer*, 78: 135-9, 1998.
25. Tee, W.; Lambert, J.R. & Dwyer, B. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1203-5, 1995.
26. Tummuru, M.K.R.; Cover, T.L. & Blaser, M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.*, 61: 1799-1809, 1993.
27. Van Doorn, L.J. et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 116: 823-30, 1999.
28. Van Doorn, L.J. et al. Clinical relevance of *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 115: 58-66, 1998.
29. Van Doorn, L.J. et al. Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for efficacy of antibiotic treatment. *Gut*, 46: 321-6, 2000.
30. Warburton, V.J. et al. Clinical and histological association of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J. Clin. Pathol.*, 51: 55-61, 1998.
31. World Health Organization. *The evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1994. Monograph nº 61.
32. Yamaoka, Y. et al. Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2274-9, 1999.
33. Yamaoka, Y. et al. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter*, 3: 241-53, 1998.

Endereço para correspondência

Edilberto Nogueira Mendes
 Laboratório de Biologia Molecular
 Faculdade de Medicina da UFMG
 Av. Alfredo Balena 190/sala 6018
 CEP 30130-100 – Belo Horizonte-MG
 Tel.: (31) 3248-9775/9949-1511
 e-mail: enmendes@medicina.ufmg.br