

IDENTIFICAÇÃO DE *HELICOBACTER PYLORI* NA SALIVA E BIOFILME DENTAL*HELICOBACTER PYLORI IDENTIFICATION IN SALIVA AND DENTAL PLAQUE*

Sérgio Adriane Bezerra de Moura¹
 Marleny Gerbi²
 Ana Míryam Costa de Medeiros³
 Maíra Fanha Souto⁴
 Gustavo Barbalho Guedes Emiliano⁵
 Jacira Maria Andrade de Sousa⁶

Endereço para correspondência
 Avenida Miguel Castro, 1550, apto 303, Lagoa Nova,
 Natal RN CEP 59062-000
 sergioabm@walla.com

- 1 - Doutor em Estomatologia (UFPB/UFBA),
 2 - Doutora em Laser (UFPB/UFBA), Professora do curso de Odontologia (UFPE – Recife PE),
 3 - Doutora em Patologia Oral (UFRN), Professora do curso de Odontologia (UFRN, UNP – Natal RN)
 4 - Cirurgiã-Dentista (UFRN – Natal RN), Aluna do curso de Especialização em Radiologia e Imaginologia Odontológica (APCD – São Paulo SP)
 5 - Aluno do curso de graduação em Odontologia (UFRN – Natal RN)
 6 - Doutora em Imunologia (UFBA), Professora do departamento de Bioquímica (UFRN – Natal RN)

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa, microaerófila, móvel, que vive na mucosa gástrica na superfície de células epiteliais. A infecção do estômago por este microorganismo causa a inflamação da mucosa gástrica que pode conduzir à gastrite, úlcera duodenal ou gástrica e em casos raros ao carcinoma ou ao linfoma gástrico (MALT). Aproximadamente a metade da população mundial é infectada com *H pylori* mas a transmissão e a fonte desta infecção ainda não são claras. A maioria de infecções é adquirida provavelmente na infância, e especula-se que o biofilme dental possa abrigar o *H pylori* e, conseqüentemente, ser uma fonte da infecção gástrica. Uma rota de transmissão oral-oral da infecção do *H pylori* foi postulada e é suportada pela observação de que o *H pylori* está presente na saliva e no biofilme dental. Embora possa ser transmitida através da boca, é desconhecida se esta age como um reservatório permanente para a bactéria. Diversos métodos para detectar o *H pylori* são usados no presente. A maioria destes testes de diagnóstico é executada em amostras de biópsias gástricas e a bactéria pode ser identificada nestes espécimes por um teste de hidrólise da urease, métodos de coloração e cultura. Uma vez que os métodos invasivos são caros, os métodos não invasivos tais como o exame sorológico do sangue e do teste da respiração da uréia estão se tornando mais popular. O método PCR provou ser altamente sensível e específico e é considerado como o método da escolha para detectar o DNA do *H pylori* na boca.

UNITERMOS: *Helicobacter pylori*, Saliva, Biofilme

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a gram-negative, microaerophilic, motile bacterium that lives beneath the gastric mucous layer, on the surface of epithelial cells. Stomach infection with this organism causes inflammation of the gastric mucosa, which can lead to gastritis, duodenal or gastric ulcer and even in rare cases to gastric carcinoma or MALT lymphoma. About half of the world population is infected with *H. pylori*, but the transmission and the source of this infection are still unclear. Most infections is probably acquired in childhood, and It has been speculated that dental plaque might harbour *H. pylori* and, therefore, might be a source of gastric infection. An oral-to-oral route of transmission of *H. pylori* infection has been postulated, which is supported by the observation that *H. pylori* is present in the saliva and in dental plaque. Although it may be transmitted through the oral cavity, it is unknown whether the oral cavity acts as a permanent reservoir for this bacterium. Several methods for detecting *H. pylori* are used at present. Most of these diagnostic tests are performed on gastric biopsy samples, and the bacterium can be identified in these specimens by a urea hydrolysis test, staining techniques, and culturing. Since invasive methods are expensive, less-invasive methods such as serologic examination of blood and the urea breath test are becoming more popular. PCR assays have proved to be highly sensitive and specific and are regarded as the method of choice for detecting *H. pylori* DNA in the oral cavity.

UNITERMS: *Helicobacter pylori*, Saliva, Biofilm

INTRODUÇÃO

A infecção por *Helicobacter pylori* é a mais comum doença infecciosa crônica gástrica em humanos provocada por bactérias e é a principal causa de gastrite crônica, úlcera péptica, carcinoma e linfoma gástricos, bem como, possíveis manifestações extra-intestinais^{2,13,14}. Os estudos epidemiológicos relacionados a esse tipo de infecção sugerem a disseminação oro-fecal como importante meio de transmissão⁴ e a prevalência varia entre 25 e 90% aumentando com a idade¹³ (Megraud). Há evidências de que grande parte da população adquire a infecção por *H pylori* durante a infância, dessa forma, os estudos que envolvem crianças são importantes na determinação da epidemiologia desse tipo de infecção e são relevantes para o estudo da história natural da doença¹².

Há muitos métodos úteis para o diagnóstico de infecção por *H pylori*, alguns deles se utilizam da endoscopia gastrointestinal superior como meio de obtenção de material para exame, no entanto, outros métodos não invasivos podem ser utilizados para esse fim, utilizando-se para isso de matérias como a saliva e o biofilme dental^{2,5,17}.

O mecanismo de ação do *H pylori* é dado pelos fatores de virulência que facilitam a sua penetração na mucosa gástrica uma vez que apresenta forma espiralada, presença de flagelos e pela atividade da enzima urease. Além disso, há uma atuação dos produtos dos genes vacA (vacuolating toxin A), cagA (cytotoxin-associated gene A) e iceA (induced by contact with epithelium)¹. O gene cagA faz parte de uma ilha de patogenicidade (PAIcag), estrutura genética que contém múltiplos genes relacionados à virulência e patogenicidade de cepas de *H pylori*. O outro fator é a citotoxina vacuolizante (vacA), responsável pela criação de vacúolos nas células epiteliais e apresenta variabilidade que confere maior ou menor patogenicidade à bactéria^{6,15}.

A forma de transmissão do *H pylori* não está clara e são reportadas as vias oral-oral e oral-fecal como as mais importantes. Uma das evidências que confirmam este tipo de transmissão é a detecção da bactéria na saliva, biofilme dental e fezes¹⁶.

O diagnóstico da infecção por *H pylori* pode ser feito por meio de cultivos microbiológicos, análises histopatológicas, teste de respiração, teste da uréase, testes sorológicos e através de tecnologias moleculares utilizando DNA e RNA^{4,7,8}. Atualmente o diagnóstico definitivo da infecção por *H pylori* tem se baseado no isolamento da bactéria em cultivos microbiológicos ou na detecção do microorganismo em preparações histológicas, ambos os métodos provenientes de amostras de biópsias gástricas obtidas nos processos invasivos como a endoscopia. Métodos não invasivos também podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção por *H pylori*, através de exames sorológicos que se baseiam na detecção de um anticorpo específico (anti-*H pylori*) como resultado de uma resposta imune onde surgem anticorpos IgG no soro no indivíduo¹⁵.

O surgimento dos testes moleculares permitiu se detectar *H pylori* em amostras que não são obtidas por meio de biópsias gástricas, dessa forma, pode-se determinar essa bactéria na saliva, no biofilme dental, nas secreções gástricas, nas fezes, possibilitando o diagnóstico clínico e o entendimento dos mecanismos de transmissão⁹.

A reação em cadeia da polimerase (PCR), uma ferramenta biotecnológica útil no diagnóstico de bactérias e vírus de difícil cultivo *in vitro*, tem a finalidade de amplificar ou reproduzir *in vitro* um número de cópias de uma região específica do DNA com a finalidade de reproduzir quantidade suficiente de um fragmento para sua avaliação. A técnica de PCR que apresenta graus elevados de especificidade e sensibilidade tem sido útil no estudo de microorganismos de difícil cultivo como é o caso da *H pylori*, um bacilo espiralado Gram negativo, móvel e que requer condições microaeróbias a 37° C e pH fisiológico para ser cultivado¹⁹.

O biofilme dental tem sido sugerido como um reservatório para *H pylori*, porém a hipótese de que este pode ser um nicho permanente para a bactéria é muito controversa. Berroterán et al³ (2002) realizaram um estudo com os objetivos de detectar a presença de *H pylori* no biofilme dental de um grupo de indivíduos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e investigar a relação existente entre a infecção por este microorganismo e alguns índices orais. O grupo experimental desse estudo foi composto por 32 indivíduos com indicação para exame endoscópico e o grupo controle formado por 20 indivíduos assintomáticos. O biofilme supra-gengival foi analisado usando a PCR para o gene da urease. O *H pylori* foi identificado em 12 (37,5%) dos indivíduos, sete dos quais apresentava gastrite crônica. No grupo controle, três indivíduos foram positivos para PCR. Este estudo não demonstrou correlação de *H pylori* com higiene bucal, cárie dentária, doença periodontal ou uso de dentadura e concluiu-se que a boca pode ser um reservatório para *H pylori* e que as secreções orais são vias importantes de transmissão.

O uso da saliva como meio para diagnóstico da infecção por *H pylori* parece ser uma possibilidade atrativa para estudos epidemiológicos da infecção em crianças quando se considera a natureza não invasiva do exame.

A resposta específica do anticorpo para *H pylori* pode ser detectada usando uma variedade de métodos, mas ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) e imunoblotting (western blotting) específico para IgG são os mais confiáveis².

O imunoblotting é um método sensível e qualitativo para determinação da presença de anticorpos. É vantagem ser usado por ser hábil na detecção de anticorpos para cagA e vacA, proteínas que são marcadoras da virulência do *H pylori*. O uso do western blotting na saliva é útil no diagnóstico de infecção por *H pylori* e apresenta resultados com confiabilidade superior àquela proporcionada pelo ELISA².

Luzza et al¹⁰ (1997) estudaram a infecção por *H pylori* em crianças, através do método ELISA, onde os níveis salivares de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina A (IgA) específicas para *H pylori* foram comparados com exame histopatológico (coloração Giemsa) e teste bioquímico (urease) obtidos em espécimes de biópsias gástricas. Também foram avaliados os níveis de IgG no soro. Os resultados mostraram que a sensibilidade e especificidade do teste de IgG salivar foram de 93 e 82% respectivamente. Dessa forma, o teste salivar para IgG pode ser considerado útil para estudo de infecção por *H pylori* em crianças.

DISCUSSÃO

A ligação entre *H pylori* e um número significativo de doenças gastrointestinais constituiu fator importante para que se desenvolvessem métodos eficazes para detectar a presença de infecções. O exame considerado eficaz nesse processo de diagnóstico se baseia no exame histopatológico da mucosa e isso requer a realização de procedimentos de endoscopia, onde, particularmente em crianças se faz necessário o uso de sedação e até mesmo anestesia geral para a obtenção de biópsias gástricas^{4,12,14,17}.

O uso de sangue ou saliva para detecção de imunoglobulina G (IgG) para *H pylori* como indicador de infecção anterior ou atual tem sido usado de forma que procedimentos não invasivos são usados em substituição àqueles invasivos^{2,6,7,15}.

O diagnóstico da infecção por *H pylori* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstra uma sensibilidade e especificidade de 95% e a principal vantagem é que pode detectar o microorganismo sem a necessidade da viabilidade da bactéria nas amostras¹¹. A especificidade da técnica é dada pelo uso de oligonucleotídeos sintéticos, específicos para determinado gen e que facilita a amplificação de uma sequência nucleotídica que por sua vez é específica para *H pylori*¹⁵.

O uso de PCR é útil no diagnóstico do *H pylori* na boca através da saliva ou biofilme dental. A identificação desse microorganismo na boca não poderia ser feita por meio do método da urease uma vez na microbiota bucal há outras bactérias produtoras dessa enzima. A identificação do *H pylori* na boca sugere a importância na reinfecção gástrica inclusive após terapêutica com antibióticos. Além disso, é importante a identificação no microorganismo na boca para que sejam feitas recomendações no sentido de se prevenir transmissão via oral-oral¹⁵ (premoli).

O método western blotting apresenta uma especificidade maior que o ELISA na detecção de anticorpos para *H pylori* na saliva de crianças e é comparável com o teste ELISA que utiliza soro. O uso da saliva pode apresentar algumas desvantagens quando comparado com o soro; a quantidade de partículas contaminantes presentes na saliva requer procedimento de centrifugação prévia. Outros inconvenientes que podem comprometer a

sensibilidade do teste western blotting na saliva são as condições de coleta, onde preferencialmente se deve optar pelo método não estimulado e a ação do congelamento e descongelamento da amostra em casos onde o teste não é realizado imediatamente após a coleta².

Com os avanços na microbiologia, imunologia e bioquímica, os testes envolvendo saliva como material biológico útil no diagnóstico têm avançado e proporcionado um maior espectro de possibilidades de utilização desse material^{2,10,16,17}. Dessa forma, métodos invasivos de exames são substituídos por meios não invasivos, facilitando sobremaneira o processo de diagnóstico e reduzindo os inconvenientes principalmente quando se considera a aplicação na população pediátrica¹⁰. Aliado a isso, o avanço nos métodos de biologia molecular têm facilitado a identificação de microrganismos de difícil cultivo *in vitro*^{1,2,3,4,6,18}.

REFERÊNCIAS

- 1 - Akopvants N, Fradkor A, Diatchenko L, Hill J, Subert P, Lukvanov S et al. PCR-based subtractive hybridization and difference in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci, 1998; 13108-13
- 2 - Ballam LD, Mendall MA, Asante M, Morris J, Strachan DP, Whincup PH et al. Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol, 2000; 53:314-317.
- 3 - Berroterán A, Perrone M, Correnti M, Cavazza ME, Tombazzi CV, Goncalvez R. Prevalência de *Helicobacter pylori* em muestras de placa dental de un grupo de pacientes venezolanos, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Acta Odontol Venez, ago. 2002; 40(2):45-51.
- 4 - Debognie J, Pauwels S, Raat A, de Meius Y, Haot J, Mainguet P. Quantification of *Helicobacter pylori* infection in gastritis and ulcer disease with a simple and rapid carbon-14-urea breath test. J Nucl Med, 1991; 32:1192-1198.
- 5 - Fernández, S. C., Ramirez, I. L., Quintero, E. A., Ballestas, M. H. Aislamiento de *Helicobacter pylori* em placa dental. Trib. Méd. 93(4):169-179, abr. 1996.
- 6 - Han S, Schneider T, Loos M, Bhakdi S, Maeurer M. One-step polymerase chain reaction-based typing of *Helicobacter pylori* vacA gene: association with gastric histopathology. Med Microbiol Immunol (Berl), 1999; 188:131-138.
- 7 - Kosunen T, Seppala K, Sarna S, Sippone P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet, 1992; 339:893-895.
- 8 - Lu J, Perno C, Shyu R, Chen C. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol, 1999; 37:772-774.
- 9 - Lu Y, Redlinger T, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated Municipal wastewater. Appl Environ Microbiol, 2002; 68:1436-1439.
- 10 - Luzza F, Oderda G, Maletta M, Imeneo M, Mesuraca L, Chiboli E et al. Salivary immunoglobulin G assay to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children. J Clin Microbiol, Dec. 1997; 35(12):3358-3360.
- 11 - Madinier IM, Fosse TM, Monteil RA. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. J Periodontol, Jan. 1997; 68(1):2-6.

12 - Malaty, H. M., Graham, D. Y. Importance of childhood socio-economic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 35:742-745, 1994.

13 - Megraud, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin N Am*, 22:73-88, 1993.

14 - Peterson, W. L. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med*, 324:1043-1048, 1991.

15 - Premoli G, González A, Millán-Mendoza B, Percoco T, Vielma A. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop*, 2004; 56(2):85-90.

16 - Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ, Karczewska E, Bielanski W. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potencial source of reinfection. *J Physiol Pharmacol*, 1996; 47:2142-2149.

17 - Relilly, T. G., Poxon, V., Sanders, D. S. A., Elliott, T. S. J., Walt, R. P. Comparison of serum, salivary, and rapid whole blood diagnostic tests for *Helicobacter pylori* and their validation against endoscopy based tests. *Gut*, 40:454-458, 1997.

18 - Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y, Hayashi J, Morotome-Hayashi Y, Yano K et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J Periodontol*, Jan. 2003; 74(1):129-134.

19 - Valentine J, Arthur R, Mobley H, Dick J. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1991; 29:689-695.