

Aplicações da Biologia Molecular no Diagnóstico de *Helicobacter Pylori*: Revisão da Literatura

Gabriela de Lima Menezes¹
Roger Luiz Rodrigues¹
Hemelly Faria Nascimento¹
Andressa Rodrigues Lopes¹
Wanessa Cristina Soares¹
Jéssica Coraiola Nevoa²
Silvana Barbosa Santiago³
Mônica Santiago Barbosa⁴

RESUMO: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa que acomete aproximadamente 90% população mundial e apresenta maior prevalência em países em desenvolvimento. Essa bactéria é responsável por desencadear patologias no estômago humano tais como gastrite, úlcera e adenocarcinoma gástrico. Atualmente destacam-se os métodos de diagnóstico utilizando tecnologias da biologia molecular tais como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH). O diagnóstico por PCR convencional, assim como suas variantes, consiste na amplificação de uma sequência específica de DNA da bactéria. Por outro lado, a técnica de FISH é baseada na hibridização de sequências específicas de rRNA da bactéria com sondas de DNA marcadas por fluorescência. Os métodos moleculares são usados no diagnóstico de infecções por *H. pylori* por serem os métodos mais sensíveis, específicos e rápidos, além de permitir análises de sua virulência e resistência a medicamentos. Nesse sentido, o presente trabalho tem o objetivo de destacar a aplicação da biologia molecular no diagnóstico de *H. pylori* com enfoque na PCR, visto que o emprego dessa ferramenta permite um diagnóstico mais rápido, simples e eficaz. O estudo trata-se de uma revisão bibliográfica descritiva. A pesquisa foi realizada em bases de dados científicas utilizando como principais descritores: *H. pylori*; ferramentas moleculares; diagnóstico. Foi possível observar uma anuência progressiva do uso das ferramentas moleculares para detecção e caracterização de *H. pylori*, determinando uma nova fase para o diagnóstico laboratorial do micro-organismo.

PALAVRAS CHAVES: *H. pylori*. ferramentas moleculares. diagnóstico.

ABSTRACT: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a gram-negative bacterium which affects approximately 90% of the population worldwide and it has a higher prevalence in developing countries. This bacterium is responsible for causing diseases in the human stomach such as gastritis, ulcers and gastric adenocarcinoma. Currently we highlight the diagnostic methods using technologies of molecular biology such as PCR (*Polymerase Chain Reaction*) and fluorescence in situ hybridization (FISH). The conventional PCR diagnosis, as well as its variants, is the amplification of a specific DNA sequence of a bacterium. On the other hand, the FISH technique is based on hybridization of specific rRNA sequences of a bacterium with DNA probes marked with

¹ Graduando(a) em Biomedicina, Universidade Federal de Goiás- Regional Jataí.

² Biomédica graduada pela Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí.

³ Docente Faculdade Alfredo Nasser.

⁴ Docente Adjunto IV da Universidade Federal de Goiás.

fluorescence. The molecular techniques are used on *H. pylori* infection diagnosis because they are the most sensitive, specific and rapid methods and they also allow virulence and drug resistance analysis. Thus, this article aims to highlight the application of molecular biology focusing in PCR, since the use of this tool enables faster, simple and effective diagnosis. The study deals with a descriptive literature review. The research was conducted in scientific databases using as main descriptors: *H. pylori*; molecular tools; diagnosis. It was observed a gradual approval of the use of molecular tools for the detection and characterization of *H. pylori*, determining a new phase for the laboratory diagnosis of this micro-organism.

KEY WORDS: *H. pylori*. molecular tools. diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

H. pylori é uma bactéria microaerófila gram-negativa que coloniza o estômago humano e desencadeia algumas patologias como gastrite, úlcera péptica e até mesmo o adenocarcinoma gástrico. Sua morfologia apresenta-se na forma espiralada e extremamente móvel. Apresenta extensões de aproximadamente 0,5 µm a 1 µm de diâmetro e 2 a 4 µm de comprimento. Possui de dois a seis flagelos que partem de um único pólo, os quais auxiliam na penetração da bactéria desde o muco até na superfície das células epiteliais gástricas. (BARBOSA; SCHINONNI, 2010; RODHEN et al., 2011).

O micro-organismo foi isolado pela primeira vez na Austrália, no ano de 1983, pelos pesquisadores Warren e Marshall, fato que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia do ano de 2005, apesar de já ser descrita desde o século XIX. Na época, não acreditavam que seria possível a sobrevivência de bactérias no estômago humano devido a sua alta acidez (BARBOSA; SCHINONNI, 2010; NIEDERLE; MOREIRA, 2013).

A contaminação por *H. pylori* geralmente ocorre quando o hospedeiro ainda é criança e pode sobreviver por muitos anos. A maioria dos infectados convivem com a bactéria sem desenvolver uma resposta à infecção, e apenas uma pequena parcela desenvolve a resposta e apresenta a gastrite como quadro clínico mais comum. O meio de transmissão ainda não está bem esclarecido, contudo sugere-se que são fontes potenciais de contaminação qualquer meio que permita a bactéria alcançar o tecido gástrico. Atualmente, os meios de transmissão mais aceitos são três: fecal-oral, oral-oral e iatrogênica. Acredita-se que água contaminada, geralmente em países em desenvolvimento, seja o principal meio para a contaminação fecal-oral. A oral-oral baseia-se no fato da bactéria ter sido encontrada no suco gástrico, em regurgitações e vômitos, tornando-se possíveis fontes de contaminação. A via iatrogênica se dá principalmente por equipamentos usados em exames de

peças contaminadas e são esterilizados ou manuseados incorretamente (MAZZOLENI, L. E; MAZZOLENI, F., 2010; RODHEN et al., 2011).

H. pylori tem distribuição cosmopolita e estima-se que cerca de 90% da população mundial esteja infectada, a prevalência da infecção varia com a idade e o nível socioeconômico. Apesar da infecção apresentar distribuição mundial, a prevalência é maior em países em desenvolvimento, visto que a infecção está relacionada a fatores como as precárias condições socioeconômicas e sanitárias (MITCHELL et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004; LEHOURS ; YILMAZ et al., 2007).

Os métodos para diagnóstico de *H. pylori* se dividem em invasivos e não-invasivos, dependendo se a amostra é coletada por meio de biópsia endoscópica ou não. Entre os métodos invasivos destacam-se a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), teste rápido de Urease, exame histológico, cultura e hibridização *in situ* fluorescente; e os não-invasivos incluem o exame sorológico, teste respiratório da uréia e teste do antígeno fecal.

O diagnóstico de doenças foi uma das áreas da medicina que mais avançou. Várias doenças genéticas e infecciosas podem agora ser conhecidas devido à evolução da biologia molecular que permite a manipulação dos ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Além de novos métodos de detecção de organismos, que possibilitam definir com exatidão o agente causador de uma infecção, também tem sido possível utilizar a biologia molecular para genotipagem, correlacionando-o com esquemas terapêuticos e também monitorando o nível de infecção durante o tratamento, nesse sentido o presente estudo tem como objetivo descrever a aplicação da biologia molecular no diagnóstico de *H. pylori*, por se tratar de um método rápido e sensível determinando assim uma nova era para o diagnóstico laboratorial (ROSSETTI et al., 2006).

2. METODOLOGIA

O estudo tratou-se de uma revisão bibliográfica, o levantamento de dados foi realizado através de consultas a livros e periódicos, bem como artigos científicos oriundos das bases de dados indexadas: Scientific Electronic Library Online - SciELO, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde - LILACS, Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line - MEDLINE.

Os grupos de palavras-chave empregadas para busca nas bases de dados foram: *H. pylori*; ferramentas moleculares; diagnóstico. Os critérios de inclusão foram pesquisas e evidências que abordassem o diagnóstico clínico laboratorial de *H. pylori*, sendo excluídos os estudos não pertinentes ao diagnóstico laboratorial molecular de *H. pylori*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

O gênero *Helicobacter* (do grego: *helix*, helicoidal; *bacter*, bactéria) pertence à superfamília VI da classe *Proteobacteria* da divisão *Gracillicutes* definidas por Vandamme *et al.* (1991). Este gênero é composto por no mínimo 27 espécies, onde podem localizar-se no fundo e no corpo do corpo estomacal, mas o principal local é o antro, onde é possível encontrar uma maior densidade do organismo no trato gastrointestinal (BLASER; BERG, 2001).

A *H. pylori* possui fatores de virulência que estão intimamente associados a uma maior agressividade no desenvolvimento da infecção. Os principais fatores são o *CagA*, *Vac A* e Adesinas. O gene *cagA* induz a produção da proteína Cag A que é altamente imunogênica. Sabe-se que pacientes que possuem cepas de linhagem *cagA*-positivas desenvolvem uma resposta inflamatória maior, havendo um alto risco de desenvolver um quadro sintomático, sendo esta linhagem associada a úlcera péptica e câncer gástrico. O gene *vacA* é responsável por induzir uma vacuolização e atividades celulares que inclui a formação de canais de membrana, liberação do citocromo c da mitocôndria que desencadeia a apoptose e ligação aos receptores de membrana levando à uma resposta pró-inflamatória. Há diferenças entre a atividade vacuolizante das cepas de *H. pylori* principalmente devido a diferenças nas estruturas do *vacA* nas regiões sinais (s1 e s2) e nas regiões médias (m1 e m2). São possíveis quatro combinações de *vacA* pelas regiões s e m. Experimentos demonstraram que as cepas s1m1 são mais citotóxica, pois este genótipo produz uma maior quantidade de toxina e induz uma vacuolização maior no epitélio gástrico. Em seguida, as cepas s1m2 são a de segunda maior atividade citotóxica. As cepas s2m2 não possuem essa atividade e a s2m1 são raras. O gene *babA* está relacionado com a produção de uma adesina, que é uma proteína responsável pela adesão da bactéria ao epitélio gastrointestinal. A presença de um alelo *babA* funcional está associado ao desenvolvimento de úlcera duodenal e adenocarcinoma gástrico (MATSUNARI, 2012; BARBOSA ; SCHINONNI, 2010).

A PCR é uma técnica muito utilizada que permite a detecção da bactéria através de pequena quantidade de amostra, onde o material genético é amplificado *in vitro*, gerando milhares de cópias do fragmento desejado de DNA. O teste rápido de urease baseia-se no fato da *H. pylori* sintetizar a enzima urease, que é responsável em degradar a uréia em amônia e dióxido de carbono, responsável pelo aumento do pH. No teste, insere-se a amostra em um meio contendo uréia e um marcador de pH. Caso o marcador mude de cor, sinalizando uma alteração no pH do meio, o resultado é dado como positivo. É um teste rápido, econômico e possui uma alta disponibilidade. Isso pode fazer com que o tratamento para *H. pylori* seja encaminhado em tempo hábil. A histologia é uma técnica que fornece informações sobre a condição da mucosa do paciente. Para a análise, a coloração

hematoxilina eosina (HE) é usada e na maioria dos casos, é suficiente para o diagnóstico. Geralmente a distribuição da *H. pylori* é desigual no tecido, o que faz surgir uma necessidade de amostras de diferentes partes da mucosa gástrica, sendo este um inconveniente da técnica. Contudo, é considerado o teste “padrão” para detectar a *H. pylori*. A cultura é uma técnica que é geralmente feita a partir de amostra da mucosa. É um método que possui alta especificidade e alta sensibilidade se feita em condições ideais. Esse, apesar das suas vantagens, é pouco disponível, demorado e ultimamente mais utilizado somente para testar a sensibilidade das bactérias a determinados antibióticos. A sorologia busca detectar anticorpos que agem contra a bactéria, presentes no sangue ou nas fezes do paciente. Grande parte do teste imunoenzimático, o mais utilizado, baseia-se na detecção de anticorpos do tipo IgG. A sensibilidade desse teste é alta, variando entre 90% a 100%. Porém, sua especificidade cai para 76% a 96%. O teste respiratório de uréia é um teste que possui uma sensibilidade entre 96% a 98% e baseia-se na capacidade da bactéria produzir CO₂ através da degradação da ureia. Nesse caso, o paciente ingere uma solução de uréia com carbono marcado (¹⁴C ou ¹³C). Em caso de infecção por *H. pylori*, após a degradação da uréia marcada, esse carbono é expelido na forma de CO₂ pela respiração e pode ser detectado através de equipamentos. A Hibridização *in situ* fluorescente é um método novo que permite a detecção da bactéria, assim como a sua resistência a claritromicina em cerca de três horas. Essa técnica consiste em uma sonda (na maioria das vezes um oligonucleotídeo com uma molécula fluorescente na porção terminal 5') que se liga na sequência-alvo do DNA da bactéria. A análise é feita através de um microscópio epifluorescente (RODHEN et al., 2011; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010; MAZZOLENI, L. E. ; MAZZOLENI, F. , 2010; NEVES ; GUEDES, 2012).

O diagnóstico molecular está associado com amplificação gênica. Desde a seu desenvolvimento nos anos 80 por Kary Mullis, a PCR (Polymerase Chain Reaction) tem ajudado bastante no desenvolvimento científico quanto ao sequenciamento gênico, expressão gênica de proteínas e principalmente no diagnóstico mais rápido e preciso de doenças infecciosas. Esta técnica é baseada na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA utilizando iniciadores (*primers*) que definem a sequência a ser replicada, formando milhões de cópias de fragmentos de DNA, o qual possibilita a sua detecção (MULLIS, 1990).

Atualmente, a PCR tem sido cada vez mais empregada na detecção da bactéria *H. pylori*, principalmente em pesquisas científicas devido ao seu emprego em diversas amostras biológicas como tecido gástrico, saliva, placa dental e fezes, por possuir uma alta especificidade e sensibilidade, além de ser possível identificar o tipo de cepa presente no tecido e também a sua resistência a antibióticos. Porém esta técnica ainda não é expandida como método de diagnóstico padrão, isso ocorre principalmente devido ao custo e a dificuldade na padronização da técnica

(KANNA et al, 2013).

Diversas variações da PCR estão disponíveis no meio científico, todas a fim de aperfeiçoar as amplificações dos diferentes materiais genéticos. Dentre estas destacam-se a PCR em tempo real, *Hot Start* PCR, *Touch-down* PCR, *Nested* PCR, RT-PCR e *Multiplex* PCR.

Como na PCR convencional, a técnica de PCR em tempo real também é baseada na amplificação de materiais genéticos como DNA e RNA, mas de forma mais precisa e mais reprodutível. Através da análise exponencial da fluorescência emitida pelos ácidos nucleicos, faz-se possível a quantificação exata e em cada ciclo do produto amplificado, além de ser totalmente automatizada o que reduz o tempo de análise e diminui possíveis contaminações (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A PCR *Hot Start* é utilizada principalmente a fim de diminuir a possibilidade de se formar produtos inespecíficos durante a amplificação, que ocorre geralmente devido ao anelamento inespecífico dos primers. Durante a reação, a enzima Taq-polimerase é separada dos demais componentes, entrando em atividade apenas na desnaturação das fitas. Outra variação do diagnóstico molecular, é a PCR *Touch-down*, é utilizada particularmente quando não se sabe qual a temperatura ideal de anelamento dos *primers*, nessa metodologia o termociclador é programado para diminuir a temperatura de forma sequencial (ROSSETTI et al., 2006).

Na reação de *Nested* PCR, o DNA-molde é o produto de uma amplificação anterior (amplicon), e seu uso é útil para aumentar a especificidade e sensibilidade da reação, ou quando a quantidade de material genético é muito pequena. No caso de utilizar apenas um primer interno e um amplicon na reação, denomina-se *Semi-nested* PCR (FERREIRA, 2013).

PCR multiplex é uma reação em que várias regiões diferentes de DNA são amplificadas ao mesmo tempo e no mesmo tubo, devido à utilização simultânea de vários pares de primers específicos para todos os loci a ser identificado. Foi desenvolvida com os objetivos de diminuir o custo da reação e aumentar a velocidade do diagnóstico. A PCR Multiplex é caracterizada pela detecção de dois ou mais genótipos simultaneamente, onde os mais comuns são *vacA* e *cagA*. Outro uso é na investigação de cepas mutantes e resistentes a antibióticos (ROSSETTI et al., 2006; SANTOS et al., 2008; KANNA et al., 2013).

A RT-PCR é uma variação da técnica de PCR, cujo molde inicial é o RNA mensageiro, transcrito por meio da enzima transcriptase reversa para um DNA complementar (cDNA). A partir do cDNA, segue-se a reação de amplificação por PCR, formando-se múltiplas fitas duplas de DNA.

A técnica de RT-PCR é amplamente utilizada quando se deseja analisar a expressão de um determinado gene em um processo patológico ou em um processo fisiológico. É um método sensível e específico para a detecção da expressão de genes *in vivo* e contribui para a acuracidade do diagnóstico e compreensão da patogênese da infecção (ROSSETTI et al., 2006; LOPES, 2006).

Outra alternativa também empregada como diagnóstico de *H. pylori* é o método de hibridização fluorescente *in vitro* (FISH), o qual é baseado em sondas de DNA marcadas com fluorescência que são hibridizados com sequências específicas de rRNA da bactéria. Esta técnica permite a visualização direta e específica de *H. pylori*. Sua desvantagem consiste no fato de ser uma laboriosa que exige muito trabalho e possui um alto custo, sendo assim, essa é uma prática pouco viável nas clínicas (TAJBAKHSI et al., 2008; CERQUEIRA et al., 2013; GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção por *H. pylori* acomete grande parte da população mundial, com índices maiores em países em desenvolvimento. Sabe-se que o tempo de infecção é um fator importante para o avanço de doenças causadas pela bactéria. Com isso, surge uma necessidade de um diagnóstico rápido, simples, de baixo custo e alta precisão.

A técnica de PCR já é um método amplamente utilizado tanto por pesquisadores, quanto na prática clínica. Uma vantagem do seu uso é a variedade de amostras biológicas que podem ser utilizadas para a detecção da bactéria, seja por métodos invasivos (biópsia gástrica) ou não-invasivos (saliva e fezes). É uma técnica que permite detectar genes específicos da *H. pylori* que servem para conhecimento quanto ao tipo de cepa, à patogenicidade e também análises de mutações gênicas, as quais podem estar associadas a resistência à antibióticos, sendo assim possível indicar de forma mais eficaz um tratamento ao paciente. Como essa técnica amplifica trechos específicos do DNA bacteriano, pode ocorrer diagnósticos falsos-positivos de pacientes já submetidos ao tratamento, onde amplifica-se DNA de bactérias já mortas, sendo este um inconveniente da técnica. Além disso, este método exige qualificação e local próprio, uma vez que a amplificação é uma técnica sensível e qualquer contaminação pode produzir resultados falso-positivos ou reações cruzadas.

A Hibridização fluorescente *in situ* é um método novo que permite a detecção da bactéria, assim como a sua resistência a claritromicina em cerca de três horas. Essa técnica consiste em

sondas de oligonucleotídeos fluorescentes que marcam um gene específico. Esse método também vem sendo utilizado para detectar a localização da bactéria na mucosa gástrica de forma precisa. Já que a incerteza da localização é um inconveniente que pode gerar alterações no resultado de alguns testes os quais dependem da biópsia da mucosa gástrica, isso é uma vantagem muito útil dessa técnica. Sua desvantagem consiste no fato de ser uma técnica que exige muito trabalho e possui um alto custo, sendo assim, essa é uma prática pouco viável nas clínicas.

Entre os tipos de diagnóstico molecular disponíveis para detectar *H. pylori*, a técnica de PCR é a mais vantajosa, tanto a convencional quanto as suas variantes. Sua facilidade e agilidade em dar um diagnóstico, faz dela uma ótima opção para detectar a presença da *H. pylori* em diversas amostras. Contudo, devido aos possíveis erros relacionados à padronização da técnica, recomenda-se que esse teste seja realizado em conjunto com algum outro método que já é altamente presente na prática clínica, tal como o teste rápido de urease ou o exame histológico.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J. A.; SCHINONNI, M. I. *Helicobacter pylori*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 254-262. 2011.
- CEQUEIRA, L. et al. Validation of a Fluorescence In Situ Hybridization Method Using Peptide Nucleic Acid Probes for Detection of *Helicobacter pylori* Clarithromycin Resistance in Gastric Biopsy Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1887-1893, jun. 2013
- FERREIRA, Antônio Walter. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- GARZA-GONZÁLEZ, E. et al. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 6, p. 1438-1449. 2014.
- KANNA, S.; MARADEY-ROMERO, C.; FASS, R. Diagnostic Testes for *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology & Endoscopy News**, p. 51-58, out. 2013
- MATSUNARI, O. et al. Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 3, p. 876-883, mar. 2012.
- MAZZOLENI, L. E.; MAZZOLENI, F. Tratamento e retratamento do *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, n. 5, p. 153-164, mai. 2010.
- MEINE, G. C., ROTA, C., DIETZ, J. SEKINE, S., PROLLA, J. C. Relationship between cagA-positive *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer: a case control study in Porto Alegre, RS, Brazil. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 41-45. 2011.

MONCAYO-ORTIZ, J. I. et al . EVALUACIÓN DE DIFERENTES PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE H. PYLORI. **Investig. andina**, Pereira , v. 13, n. 23, set. 2011.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis the polymerase chain reaction. **Ann Biol Clin**, v. 48, n. 8, p. 579-582. 1990.

NEVES, S. M. N.. GUEDES, R. M. C. Fluorescent in situ hybridization: basic principles and perspectives for diagnosing infectious diseases in veterinary medicine. **Arq. Insti. Biol.**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 627-632, oct./dez. 2012.

NIEDERLE, R.; MOREIRA, A. C. O PERIGO PODE ESTAR NO ESTÔMAGO: Helicobacter pylori–Aspectos Epidemiológicos, Patológicos, de Tratamento e Preventivos. **Revista Contexto & Saúde**, Ijuí, v. 10, n. 19, p. 59-66, jul./dez. 2013.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13. 2004.

PAIVA-CAVALCANTI, M; REGIS-DA-SILVA, CG; GOMES, YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of Leishmania (Leishmania) infantum infection: a mini-review. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, Botucatu , v. 16, n. 4, p. 537-542. 2010.

RAMIS, I. B. et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 903-908, jul./dez. 2012.

RODHEN, G, CHIELLE, E. O., CASAGRANDA, L. C. Prevalência de Helicobacter pylori em pacientes dispépticos submetidos à endoscopia digestiva alta por meio do teste de urease em consultório médico no município de São Miguel do Oeste, SC. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 83-90. 2011.

ROSSETTI, M.L. et al., **Doenças infecciosas : Diagnóstico Molecular**. 1ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2006 236p. SAMBROOK,J.; FRITSCH,E.F.; & MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, vols. I,II and III, 1989