

(11) Número de Publicação: **PT 752473 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/31 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)
A61K 39/106 (2006.01) **A61K 39/40** (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) **C07H 21/00** (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01) **C07K 14/195** (2006.01)
C07K 14/205 (2006.01) **C07K 14/41** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) **C12N 1/20** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **C12N 15/01** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
C12Q 1/10 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01) **C12N 9/80** (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01) **C12R 1/91** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.06.28**

(30) Prioridade(s): **1995.07.04 FR 9508068**

(43) Data de publicação do pedido: **1997.01.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.11.05**
026/2009

(73) Titular(es):

INSTITUT PASTEUR
25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS
CÉDEX 15 **FR**
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) **FR**

(72) Inventor(es):

AGNÈS LABIGNE **FR**
SEBASTIAN SUERBAUM **DE**

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE FLBA DE H. PYLORI; PRODUÇÃO DE ESTIRPES AFLAGELADAS**

(57) Resumo:

Resumo

"Clonagem e caracterização do gene flbA de *H. pylori*; produção de estirpes aflageladas"

A presente invenção diz respeito a sequências nucleotídicas que regulam a biossíntese das proteínas dos flagelos de Helicobacter pylori, diz respeito as proteínas codificadas por estas sequências, assim como a estirpes bacterianas aflageladas. A invenção diz também respeito à utilização destes meios para a detecção de uma infecção por H. pylori ou para a protecção contra uma tal infecção.

Descrição

"Clonagem e caracterização do gene flbA de *H. pylori*; produção de estirpes aflageladas"

O Helicobacter pylori (igualmente designado pela expressão H. pylori) é uma bactéria gram negativa encontrada até hoje exclusivamente à superfície da mucosa do estômago do ser humano.

Como na maior parte das bactérias, o H. pylori é sensível a um meio de pH ácido, mas pode no entanto tolerar a acidez na presença de teores fisiológicos de ureia (Marshall et al (1990) Gastroenterol. 99: 697-702). Na hidrólise da ureia sob a forma de dióxido de carbono e de amoníaco que são libertadas no microambiente da bactéria, a urease de H. pylori permite a sobrevivência da bactéria no meio ácido do estômago. Recentemente os estudos efectuados sobre os modelos animais forneceram elementos que sugerem que a urease é um factor importante na colonização da mucosa gástrica (Eaton et al. (1991) Infec. Immun. 59: 2470-2475). Suspeita-se igualmente que a urease provoque quer danos directos, quer danos indirectos à mucosa gástrica.

Actualmente o Helicobacter pylori (H. pylori) é reconhecido como agente etiológico das gastrites antrais, e aparece como um dos cofactores necessários para o desenvolvimento de úlceras. Além disso, parece que o desenvolvimento dos carcinomas gástricos possa estar associado à presença de H. pylori.

Com o objectivo de desenvolver meios novos sensíveis e específicos para a detecção in vitro de infecções por bactérias da espécie Helicobacter pylori os inventores interessaram-se no sistema de regulação da mobilidade destas bactérias.

Com este objectivo eles interessaram-se em diferentes modificações de estirpes de H. pylori, modificações que não afectaram o reconhecimento destas bactérias pelos soros de doentes infectados, mas que permitem contudo uma reacção do tipo "falso positivo" em particular com as bactérias da família de Campylobacter e por exemplo, Campylobacter jejuni.

Os inventores constataram além disso que as bactérias modificadas obtidas podiam ser eventualmente utilizadas no âmbito do fabrico de composições imunogénicas ou de vacinas. Neste contexto, a invenção propõe em particular estirpes bacterianas vivas atenuadas.

Numa primeira etapa, os inventores identificaram e isolaram o gene flbA que está implicado na regulação da biossíntese dos flagelos de H. pylori e consequentemente, na regulação da mobilidade da bactéria. A biossíntese dos flagelos compreende a síntese das flagelinas A e B, e da bainha. O gene flbA regula tanto a síntese das flagelinas A e B, e a síntese da bainha contendo estas flagelinas. Os inventores estabeleceram que o gene flbA era igualmente interessante porque regulava a biossíntese da proteína de ancoragem da bactéria, ainda chamada "gancho".

O presente documento descreve por isso uma sequência nucleotídica do gene flbA que regula a biossíntese das proteínas dos flagelos de Helicobacter pylori, caracterizada por ser capaz de se hibridizar em condições de elevada severidade com uma sonda correspondente a um fragmento de nucleótidos de H. pylori amplificados com o auxílio de dois nucleótidos que respondem às sequências seguintes:

OLFlbA-1; ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG

OLFlbA-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou capaz de se hibridizar em condições de elevada severidade com os seus nucleótidos.

Uma tal sequência pode ser obtida através das etapas de :

-pesquisa de um banco genómico contendo o ADN cromossómico de uma estirpe de H. pylori com uma sonda correspondente a um fragmento de nucleótidos de H. pylori amplificado com o auxílio de dois oligonucleótidos que correspondem às sequências seguintes:

OLFlbA-1; ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG

OLFlbA-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, ou capaz de se hibridizar em condições de elevada severidade com os seus nucleótidos.

-recuperação das sequências de ADN que hibridizam com a dita sonda,

-subclonagem das sequências de ADN obtidas num vector adequado do tipo plasmídeo e selecção destes vectores modificados que se hibridizam em condições de elevada severidade com a sonda correspondente ao fragmento de ADN de H. pylori amplificado com o auxílio dos oligonucleótidos OLFlbA-1 e OLFlbA-2

-sequenciação dos fragmentos de ADN contidos nos vectores plasmídicos que se hibridizam com a sonda referida acima e determinação da fase aberta de leitura contida naqueles fragmentos.

De forma vantajosa vai-se utilizar estes fragmentos de ADN para reconstituir a sequência de codificação do gene flbA que corresponde a uma fase aberta de leitura que comporta cerca de 2196 nucleótidos.

O banco genómico contendo ADN cromossómico de H. pylori pode ser obtido a partir de qualquer estirpe de H. pylori. Pode-se também preparar um banco cosmídico a partir do ADN cromossómico de H. pylori.

Uma estirpe utilizável para a realização deste banco é por exemplo a estirpe N6 depositada na NCIMB em 26 de Junho de 1992, sob o número NCIMB40512.

Os dois iniciadores oligonucleótidos utilizados para preparar a sonda destinada à hibridização do ADN investigado presente na banda de ADN de H. pylori são escolhidos entre as regiões conservadas das diferentes proteínas da família LcrD/FlbF.

Os dois iniciadores oligonucleótidos OLFlbA-1 e OLFlbA-2 permitiram amplificar um fragmento utilizável como sonda de 130 pares de bases correspondente à sequência seguinte:

**ATG CCA GGA AAG CAA ATG GCG ATT GAT GCG GAT TTA AAT TCA GGG
CTT ATT GAT GAT AAG GAA GCT AAA AAA CGG CGC GCC GCT CTA AGC
CAA GAA GCG GAT TTT TAT GGT GCG ATG GAT GGC GCG TCT AAA TTT**

As condições de severidade elevada de que se fala acima são as seguintes: a hibridação é realizada a 42°C na presença de 50% de formamida num tampão 2XSSC contendo 0,1% de SDS (1XSSC correspondendo a 0,15 M de NaCl mais 15 mM de citrato de sódio - pH 7,0). As lavagens são realizadas com 2XSSC mais 0,1 % de SDS a 68°C por exemplo duas vezes durante uma hora.

Uma sequência nucleotídica particularmente interessante para obter uma estirpe bacteriana recombinante de acordo com a invenção resulta na mutação da sequência do gene flbA correspondente ao encadeamento de nucleótidos representado na figura 2, ou que codifica para a proteína representada na figura 2.

Uma sequência nucleotídica descrita no presente documento é caracterizada por codificar para uma proteína correspondente à sequência de aminoácidos representada na figura 2 ou para uma sequência de aminoácidos que possui as mesmas propriedades reguladoras em relação à biossíntese das proteínas dos flagelos de H. pylori que a sequência referida acima.

A invenção tem como objectivo a utilização para a detecção in vitro de uma infecção por H. pylori numa amostra de fluido biológico retirada de um doente, de uma estirpe bacteriana recombinante de Helicobacter pylori possuindo um fenótipo aflagelado resultante da mutação por supressão, substituição ou inserção de bases, ou de um fragmento na sequência de nucleótidos do gene flbA que participa na regulação da biossíntese das proteínas dos flagelos de H. pylori, hibridizando-se a dita sequência nucleotídica do gene flbA em condições severas com uma sonda correspondente a um fragmento de nucleótidos de H. pylori amplificado com o auxílio de dois oligonucleótidos OLFbA-1 e OLFbA-2, de modo a que:

- o gene flbA deixe de ser expresso num hospedeiro celular,
- a expressão do gene flbA num hospedeiro celular não permita a biossíntese das flagelinas A e B nem da bainha que as contém e eventualmente não permita a síntese da proteína de ancoragem de H. pylori ou de gancho.

A modificação sofrida pela sequência nucleotídica utilizada na invenção deve ser tal de modo a ser irreversível e em particular que permaneça irreversível e em particular que ela permaneça irreversível quando esta sequência se recombina com o gene flbA presente numa bactéria que seria transformada com uma sequência

nucleotídica modificada deste modo. Esta recombinação é por exemplo do tipo "double crossing over". De preferência, a modificação da sequência nucleotídica não deve arrastar uma modificação substancial - após a substituição por esta sequência modificada do fragmento correspondente ao gene flbA normal numa determinada estirpe de H. pylori - das funções dos genes vizinhos.

O documento descreve também sequências nucleotídicas que constituem um fragmento do gene flbA que corresponde aos critérios anteriores. A título de exemplo, os fragmentos comportam pelo menos 6 nucleótidos, de preferência pelo menos 50, ver pelo menos 100 nucleótidos.

Tais fragmentos são por exemplo escolhidos seja devido ao seu carácter específico do gene flbA, seja por pertencerem a regiões conservadas de vários genes que codificam para proteínas da família LcrD/FlbF.

O documento descreve também fragmentos do gene flbA limitados pelos locais de restrição presentes sobre o gene. Alguns destes locais são definidos a título de exemplo na figura 1 B.

Um outro fragmento descrito é um fragmento de pelo menos 1000 pb originários duma qualquer região do gene flbA e compreendendo de preferência um local de restrição ou susceptível de acolher um local de restrição.

Outras sequências nucleotídicas descritas são por exemplo os ácidos nucleicos recombinantes compreendendo uma sequência nucleotídica, tal como aquelas que são descritas acima, ela própria modificada por inserção de uma cassette que contém um marcador, por exemplo, um gene de resistência a um antibiótico ou um gene de resistência a um metal pesado, tal como o descrito no pedido de patente de invenção FR 9406202 depositado em 20/05194.

Pode ser assim efectuada uma inserção com uma cassette de resistência à canamicina. Neste contexto podem ser

desenvolvidas diferentes técnicas e vai-se referir em particular à publicação de Labigne A. et al (J. of Bacteriology, vol. 170, 1988, p. 1704-1708) e à publicação de Labigne A. et al (Res. Microbiol 1992, 143, 15-26).

O pedido de patente de invenção descreve igualmente os oligonucleótidos específicos de uma sequência nucleotídica determinada anteriormente e caracterizados por corresponderem a uma das sequências seguintes:

OLFlbA-1; ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG

OLFlbA-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC

OLFlbA-7 CGGGATCCGTGGTTACTAATGGTTCTAC

OLFlbA-8: CGGGATCCTCATGGCCTCTTCAGAGACC

De acordo com uma outra variante descrita uma sequência de aminoácidos da proteína FlbA de H. pylori é caracterizada por ser codificada por uma sequência nucleotídica, tal como a determinada anteriormente.

Uma determinada sequência de aminoácidos da proteína FlbA de H. pylori é apresentada na figura 2.

Deste modo, no âmbito da invenção, o gene flbA e a proteína expressa por este gene pode apresentar interesse, em particular para a utilização em composições imunogénicas ou em vacinas.

A invenção descreve assim estirpes bacterianas de Helicobacter pylori possuindo um fenótipo aflagelado resultante da mutação por substituição, adição e/ ou da supressão de bases ou de um fragmento nucleotídico da sequência nucleotídica definida acima do gene flbA que participa na regulação da biossíntese das proteínas dos flagelos de H. pylori.

A modificação do gene flbA permite a obtenção de uma estirpe do tipo aflagelada i.e. que deixa de exprimir as

proteínas FlaA e FlaB e de preferência deixando de exprimir as proteínas da bainha.

De acordo com uma concretização desta estirpe bacteriana, a estirpe obtida estará ainda desprovida da proteína do gancho de H. pylori.

Preferencialmente uma estirpe bacteriana correspondente aos critérios anteriores é caracterizada por ser obtida a partir da estirpe N6 depositada na NCIMB em 26 de Junho de 1992 sob o número NCIMB 40512.

A título de exemplo a invenção tem por objectivo uma estirpe aflagelada recombinante de H. pylori designada por N6flbA e depositada na NCIMB a 30 de Junho de 1995 sob o n° NCIMB 40747.

As estirpes aflageladas de H. pylori descritas no documento são particularmente interessantes para utilizações em sorologia e consequentemente para a detecção *in vitro* de uma infecção por H. pylori. Vantajosamente estas estirpes são do tipo recombinante.

Estas estirpes apresentam em particular a vantagem de permitir uma detecção *in vitro* específica e sensível da infecção por H. pylori. Noutros termos, a invenção permite vantajosamente detectar especificamente uma infecção por H. pylori evitando em particular os resultados "falsos positivos" por exemplo com as estirpes de bactérias, tal como a Salmonella ou Campylobacter.

Sabendo que as estirpes de H. pylori do tipo aflagelado definidas deste modo podem possuir igualmente outras aplicações e serem por exemplo desenvolvidas no âmbito da preparação de composições de vacinas poder-se-à ter interesse em preparar as estirpes bacterianas recombinantes aflageladas possuindo uma segunda modificação ou mutação e por exemplo poder-se-ia recorrer a uma estirpe bacteriana aflagelada caracterizada por ela ser além disso mutada de modo a produzir uma urease atenuada, isto é a

deixar de produzir urease, a mutação consiste por exemplo numa mutação da sequência nucleotídica de um ou vários genes escolhidos entre os genes ureA, ureB, ureC, ureD, ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI. Os genes de estrutura da urease designados por ureA, ureB, ureC, ureD da urease foram descritos na publicação (Labigne et al. (1991) J. Bacteriol. 173: 1920-1931). Os outros genes foram descritos no pedido de patente de invenção EP 0610322.

A invenção tem como objecto estirpes bacterianas recombinantes caracterizadas por elas serem obtidas por mutação, por substituição, adição e/ ou supressão de bases ou de um fragmento nucleotídico na sequência nucleotídica do gene flbA que participa na regulação da biossíntese das proteínas dos flagelos de H. pylori a dita sequência hibridiza-se em condições severas com uma sonda correspondente a um fragmento de nucleótidos de H. pylori amplificado com o auxílio de dois oligonucleótidos degenerados seguintes: OLFlbA-1: ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG e OLFlbA-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC sendo a dita mutação tal que tanto o gene flbA deixa de ser expresso na dita estirpe bacteriana recombinante como o gene flbA não permite a síntese dos flagelos de H. pylori, a dita mutação é efectuada na estirpe N6 depositada na NCIMB a 26 de Junho 1992 sob o número NCIMB40512.

As estirpes bacterianas descritas no pedido de patente de invenção podem ser utilizadas tal e qual ou sob a forma de extracto e em particular de um extracto bacteriano total da estirpe obtida a partir das estirpes descritas no pedido de patente de invenção.

Um tal extracto bacteriano pode ser preparado por extracção de N-Octil Glucósido. Neste caso, a técnica de preparação utilizada é a descrita por LELWALA-GURUGE. J. (Scand. J. Infec. Dis. 1992, 24:457-465).

Um outro extracto bacteriano pode ser obtido por extracção com PBS ou da glicina de acordo com as técnicas descritas respectivamente por BAZILLOU M. et al. (Clin. Diagn. Lab. Immuno.1994, 1:310-317) e AGUIRRE P. M. (Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1992, 11:634-639).

A invenção diz respeito a um extracto bacteriano obtido a partir de estirpes que são objecto da invenção obtidas a partir da estirpe NCIMB40512 ou da estirpe NCIBMB40747.

A invenção diz respeito a uma composição para a detecção in vitro de uma infecção por H. pylori numa amostra de fluido biológico num doente, em particular numa amostra de soro, compreendendo como princípio activo uma estirpe bacteriana ou um extracto bacteriano de acordo com a descrição fornecida no pedido de patente de invenção.

As amostras biológicas utilizadas podem ser de todos os tipos em particular podem tratar-se de todos os fluidos biológicos como por exemplo o soro, a saliva ou a urina.

De igual forma, as técnicas desenvolvidas para a detecção são todas técnicas que fazem intervir reacções do tipo imunológico e em particular do tipo antigénio - anticorpo. Utiliza-se por exemplo as técnicas do tipo de transferência de Western, ELISA..

A invenção diz por isso igualmente respeito a um processo de detecção in vitro de uma infecção por H. pylori numa amostra de fluido biológico num doente, em particular numa amostra de soro, compreendendo as etapas:

-fazer contactar uma amostra testada com uma estirpe bacteriana definida no pedido de patente de invenção ou extracto bacteriano definido mais acima.

-detecção de uma reacção imunológica entre a dita estirpe bacteriana e anticorpos dirigidos contra H. pylori, presentes numa amostra testada.

A título de exemplo uma detecção in vitro numa amostra biológica para pesquisar uma infecção por *H. pylori* pode ser realizada efectuando as etapas seguintes:

- as placas são cobertas de antigénio utilizado para a detecção, quer se trate de uma proteína pura ou recombinante, ou ainda de uma estirpe aflagelada ou dum extracto bacteriano em particular extracto de NOG (N-octil glucosido) da estirpe N6flbA- (a título de exemplo, a quantidade de extracto poderia ser de 3 pg/ml ou a quantidade de antigénio poderia ser de 2 µg/ml),
- foi utilizada uma gama de controlos negativos e positivos (o controlo positivo foi preparado com diluições diferentes) e em paralelo, testa-se os soros dos doentes diluídas de 1/100 (volume depositado 100 µl),
- é de seguida efectuada uma etapa de incubação por exemplo durante uma hora a 37°C, etapa seguida de várias lavagens sucessivas e de uma incubação posterior, por exemplo durante 1 hora a 37°C, com um conjugado monoclonal (do tipo IgG humano marcado com peroxidase) utilizado a diferentes diluições (por exemplo a uma diluição de 1/32000 para um antigénio e a uma diluição de 1/64000 para um extracto bacteriano), o volume depositado é de 100 µl,
- após a incubação com o conjugado monoclonal são praticadas diferentes lavagens (por exemplo 4) e a revelação da reacção enzimática pelo "OPD + substrato" é efectuada durante 30 minutos na obscuridade. A reacção enzimática é de seguida parada por adição de H₂SO₄ e depois leitura das densidades ópticas DO a 492 nm/620 nm.

A invenção tem além disso como objectivo a utilização para obter anticorpos contra H. pylori de uma estirpe bacteriana ou de um extracto desta estirpe bacteriana, definida no pedido de patente de invenção.

De acordo com um modo de realização particular da invenção, uma composição imunogénica para a obtenção de anticorpos contra H. pylori é caracterizada por compreender uma sequência de aminoácidos da proteína FlbA.

Está igualmente incluído no âmbito da presente invenção a utilização para a preparação de uma composição para vacinas através da obtenção de anticorpos protectores contra uma infecção por H. pylori de uma estirpe bacteriana ou de um extracto bacteriano de acordo com as definições do pedido de patente de invenção.

Uma tal utilização para preparar uma composição para vacinas para obter anticorpos contra uma infecção por H. pylori, para preparar o princípio activo, os antigénios do tipo urease, em particular os antigénios codificados pelos genes ureA, ureB, ureC ou ureD e uma proteína que corresponde a uma sequência de aminoácidos definida acima.

A invenção tem igualmente como objectivo soros policlonais dirigidos contra uma estirpe de H. pylori obtida a partir da estirpe NCIMB 40512 de acordo com a definição acima, ou contra a estirpe NCIMB 40747.

Estes anticorpos são obtidos através de técnicas conhecidas e em particular, através da imunização de um animal com o antigénio escolhido, seguido da produção e da recuperação dos anticorpos produzidos e da selecção daqueles entre eles que reconhecem especificamente H. pylori.

Outros anticorpos monoclonais ou soros policlonais de acordo com a invenção são dirigidos contra uma estirpe de H. pylori aflagelada, tal como a descrita nas páginas anteriores.

Além disso, a invenção diz respeito ainda a uma composição para a detecção in vitro de uma infecção por H. pylori numa amostra biológica compreendendo como princípio activo um soro policlonal obtido contra uma estirpe de H. pylori de fenótipo aflagelado descrito no pedido de patente de invenção.

Figura 1

1A: Mapa de restrição do plasmídeo pLL570 e do mini transposição Tn3 contendo a cassette do gene de resistência à canamicina.

1B: Mapas de restrição lineares de plasmídeos recombinantes pSUS39 e pSUS207. Os números indicados correspondem à dimensão dos fragmentos de restrição expressos em pares de bases. H: HindIII; Bg: BgIII. A presença de um asterisco indica que o local de restrição foi modificado no decurso da clonagem e que deixa de ser reconhecido pela enzima de restrição correspondente.

Figura 2: Sequência nucleotídica do gene flbA de H. pylori e sequência de aminoácidos deduzida indicada pelo código de uma letra.

Figura 3: Alinhamento múltiplo da proteína FlbA de H. pylori com cinco outros membros diferentes da família LcrD/FlbF. CjFlbA: Campylobacter jejuni FlbA; CcFlbF: Caulobacter crescentus FlbF; YpLcrD: Yersinia pestis LCrD; StInvA: Salmonella typhimurium InvA; SfMxiA: Shigella flexneri MxiA. Os asteriscos indicam a posição dos aminoácidos conservados em todos os homólogos da família LcrD/FlbF; os pontos indicam a posição dos aminoácidos conservados em pelo menos 5 das 6 proteínas homólogas; as sequências de aminoácidos conservados utilizadas para a síntese dos oligonucleótidos degenerados (OLFlbA-1 e OLFlbA-2) encontram-se sublinhadas. De notar em particular

o grau de conservação do domínio N-terminal destas proteínas homólogas que contrasta com o grau de variabilidade do domínio hidrófilo da região C-terminal.

Figura 4: representação esquemática da árvore filogenética de seis proteínas que pertencem à família LcrD/FlbF. As proteínas implicadas na regulação da expressão da mobilidade, FlbA de H. pylori (HpFlbA), e de Campylobacter jejuni (Cj FlbA), e FlbF de (Caulobacter crescentus (Cc FlbF) formam um ramo distinto daquele das proteínas implicadas na secreção de proteínas de virulência (InvA, MxiA e LcrD de Salmonella, Shigella e Yersinia, respectivamente). Os números indicados representam a distância evolucionária relativa.

Figura 5: representação esquemática da estratégia seguida para construir os mutantes isogénicos da estirpe de H. pylori N6, mutantes nos quais o gene que codifica para a proteína FlbA foi inativado por inserção de um gene que codifica para a resistência à canamicina.

Figura 6: análise por imunotransferência (Western blot) das proteínas de um mutante N6-flbA com o auxílio de um antisoro AK179 (3) dirigido especificamente contra os flagelos purificados de H. pylori: 1: mutante N6-flbA; 2: mutante duplo flaA/flaB; 3: mutante flaB(8); 4: mutante flaA (8); 5: estirpe selvagem N6.

Figuras 7 a 11: resultados comparativos da serologia realizada por H. pylori. Figuras 12 e 13: Extracções a partir da estirpe aflagelada N6flbA-: as extracções foram realizadas com glicina, PBS ou NOG.

Figura 12: as curvas foram construídas a partir dos dados seguintes:

		NET	CALC	COEFFS:			
		ABS					
Desv.	Conc	750,0	Conc	Diff	P2=2,0324	P1=2,2753	PO=-0
Pad#							
1	0,0000	0,0020	-0,008	0,0080			
2	0,1660	0,0760	0,1721	-0,006			
3	0,3300	0,1400	0,3459	-0,016			
4	0,6650	0,2390	0,6474	0,0176			
5	1,3300	0,4280	1,3336	-0,004			
					Média:	-1,0356E-07	
					Desv.	0,0130	
					Pad.		

Figura 13: Dosagens proteicas no método mino (BIO RAD)
glicina: diluição a 1/2; glucósido: diluição a 1/10;
sobrenadante 1: diluição a 1/4; sobrenadante 2: não
diluído.

As curvas foram construídas a partir dos dados
seguintes:

		NET ABS	CALC	COEFFS:			
Desv.	Conc	750,0	Conc	Diff	P2=144,63	P1=314,31	PO=2,4815
Pad#							
1	0,0000	-0,003	1,5398	-1,540			
2	25000	0,0600	21,861	3,1392			
3	50000	0,1470	51,810	-1,810			
4	100,00	0,2750	99,855	0,1454			
5	200,00	0,5090	199,94	-0,0636			

Exemplos

Identificação do gene flbA e preparação de estirpes
aflageladas

Entre as proteínas conhecidas por desempenharem um papel na regulação da expressão da mobilidade nas bactérias as proteínas que pertencem à família LcrD/FlbF recentemente identificada, e que inclui a proteína LcrD das bactérias do género Yersinia (6), a proteína InvA de Salmonella (2) MxiA de Shigella (1), FlbF de Caulobacter crescentus (7) e FlbA de Campylobacter jejuni (4) são proteínas interessantes. As proteínas LcrD, InvA e MxiA estão implicadas na regulação e/ ou secreção de proteínas associadas à virulência das bactérias que as exprimem, enquanto que as proteínas FlbF de Caulobacter crescentus e FlbA de Campylobacter jejuni estão implicadas na regulação da biossíntese de flagelos e portanto na mobilidade. Os homólogos conhecidos até hoje da família LcrD/FlbF possuem domínios muito conservados sobretudo na parte N-terminal destas proteínas, e duas destas regiões conservadas (MPGKQM, aminoácidos 151 a 156 da proteína de LcrD de Yersinia) e MDGAMKF (aminoácidos 189 a 195 de LcrD) puderam assim ser utilizadas para a definição de dois oligonucleótidos degenerados (OLFlbA-1 e OLFlbA-2, tabela 1) que foram sintetizados e utilizados como iniciadores nucleotídicos em experiências de amplificação génicas realizadas a partir do ADN cromossómico de Helicobacter pylori. Um fragmento de 130 pares de bases (pb) pode assim ser amplificado e a determinação da sua sequência nucleotídica mostrou que este fragmento codificava para um segmento de uma proteína muito homóloga às proteínas da família LcrD/FlbF. Este fragmento amplificado foi então marcado radioactivamente e utilizado como sonda para pesquisar um banco de cosmídeos de H. pylori.

Este fragmento corresponde à sequência compreendida entre os nucleótidos 575 e 707 da sequência representada na figura 2.

Um dos cosmídeos da banca genómica foi codificado como codificando para o homólogo LcrD/FlbF de H. pylori e foi de seguido submetido a uma digestão parcial por Sau3A de forma a efectuar um mini banco (200 sub-clones) do cosmídeo no vector pILL570 contendo os fragmentos inseridos possuindo uma dimensão compreendida entre 2 e 5 (kilobases). O vector de pILL570 foi descrito na publicação de Labigne A et al (Institut Pasteur/Elsevier Paris 1992. Res. Microbiol. 1992, 143, 15-26). O seu mapa de restrição é fornecido na figura 1A. Estes 200 clones foram hibridizados com a sonda de 130 pb e os clones que albergavam os plasmídeos pSUS39 e PSUS207 deram uma hibridização positiva. A carta de restrição linear destes dois plasmídeos recombinantes encontra-se representada na figura 1B e mostra que as duas inserções destes clones possuem sequências de sobreposição. A determinação da sequência nucleotídica destas duas inserções tem revelado que nenhum dos dois continha o gene flbA na sua totalidade. O gene de flbA de H. pylori designado deste modo derivado da sua homologia com o gene flbA de Campylobacter jejuni corresponde a uma fase aberta de leitura de 2196 nucleótidos que codifica para uma proteína de massa molecular calculada de 80,1 kilodaltons. A sequência nucleotídica de flbA e a sequência de aminoácidos de FlbA são fornecidas na figura 2. Não foi detectado a montante nem a jusante da fase aberta de leitura de sequências consensus características de sequências promotoras ou de terminação.

A proteína FlbA apresenta semelhanças com as proteínas FlbA de Campylobacter jejuni e de FlbF de Caulobacter crescentus, ambas implicadas na mobilidade (51,7% e 40,4% de identidade respectivamente) enquanto que estas percentagens são menos elevadas com os membros da família proteica LcrD/FlbF que não se encontram implicados na mobilidade: 32,8% de identidade com o LcrD de Yersinia,

30,5% com MxiA de Shigella e 29,3% com InvA de Salmonella. Uma alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos destas proteínas com a de FlbA de H. pylori é fornecida na figura 3. As regiões mais conservadas dos homólogos da família LcrD/FlbF encontram-se na parte N-terminal das proteínas.

A evolução filogenética das proteínas implicadas na mobilidade (FlbA e FlbF) e a das proteínas implicadas na regulação da expressão e/ou na secreção das proteínas associadas à virulência encontra-se representada esquematicamente por uma árvore filogenética (figura 4). São visíveis dois ramos distintos; FlbA de H. pylori que pertence sem ambiguidade ao ramo correspondente às proteínas de regulação implicadas na biossíntese dos flagelos.

Construção e caracterização de mutantes isogénicos de H. pylori deficientes na síntese da proteína FlbA

Um fragmento de 1600 pares de bases foi amplificado a partir do plasmídeo pSUS39 com o auxílio dos oligonucleótidos OLFlbA-7 e OLFlbA-8 (tabela 1), contendo cada um na sua extremidade 5' locais de restrição BamHI. Este fragmento amplificado contém na sua região central um local único de restrição pela endonuclease HindIII e foi clonado no vector pSUS33, um derivado do plasmídeo pUC19 no qual o local situado no local de policlonagem HindIII foi suprimido. Para obter pSUS33, o plasmídeo pUC19 foi restringido por HindIII; as extremidades colantes resultantes desta restrição foram tratadas com a enzima de Klenow e com o ADN T4 polimerase de forma a produzir extremidades livres; o fragmento resultante foi novamente ligado com a ADN T4 ligase e introduzido em E. coli DH5x para produzir pSUS33. O plasmídeo recombinante resultante da integração do fragmento de 1600 pares de bases em pSUS33

foi designado como pSUS42; foi linearizado por HindIII, as suas extremidades foram transformadas em extremidades de terminais livres e a cassette smal-canamicina proveniente do plasmídeo pILL600 (Labigne A et al., 1988, J. Bact., 170, 1704-1708) foi clonada neste local único dando origem ao plasmídeo pSUS42. O plasmídeo pSUS42 foi de seguida introduzido por electroporação na estirpe "N6" de H. pylori. A electroporação foi realizada seguindo a técnica descrita por Ferrero R. L. et al (Journal of Bacteriology, Julho de 1992, p. 4212-4217, vol. 174, nº 13). Os transformantes obtidos após selecção sobre um meio selectivo contendo a canamicina (25 µg/ml) foi de seguida caracterizado do ponto de vista do seu genótipo e do seu fenótipo. A figura 5 mostra um esquema do procedimento seguido para efectuar a construção de mutantes. A caracterização do genotipo destes mutantes por amplificação génica e hibridização do tipo de Southern mostrou que o genoma dos transformantes resistentes à canamicina continha o gene de resistência inserido no meio do gene flbA e portanto que teve lugar a substituição alélica por crossing-over duplo da cópia selvagem do gene flbA pelo cópia inactivada de flbA-Km com perda de sequências nucleótídicas do vector pSUS33. A caracterização fenotípica dos mutantes flbA de H. pylori demonstrou que eles não eram móveis; além disso, a sua análise por microscopia electrónica revelou que havia a ausência total dos elementos do flagelo, e a ausência da bainha do flagelo. As experiências de imunotransferência (Western blots) efectuadas com os anticorpos dirigidos contra as proteínas dos flagelos totais de H. pylori (Figura 6) mostrou a ausência de duas bandas peptídicas correspondentes às sub-unidades flagelares FlaA e FlaB, assim como uma banda correspondente a um polipéptido de uma massa aparente de 90 kilodaltons, proteína que foi recentemente identificada

como proteína do gancho (ou proteína de ancoragem) do flagelo por O'Toole e colaboradores (5).

O conjunto destes resultados sugere que a proteína FlbA de H. pylori é essencial para a biossíntese de todas as estruturas flagelares e que a activação do gene que codifica para esta proteína resulta na paragem completa da síntese de toda a estrutura que entra na constituição do flagelo e não na interrupção da exportação dos constituintes destas estruturas.

Tabela 1: Oligonucleótidos utilizados neste estudo

Oligonucleótidos	Posição	Cadeia	Sequência nucleotídica
OLFibA-1	AS 151-156(LcrD)	+	ATGCCTCGAGGTCGAAAAGCAAGATG
OLFibA-2	AS 189-195 (LcrD)	-	GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC
OLFibA-7	515-534	+	CGGGATCCGTGGTTACTAATGGTTCTAC
OLFibA.8	2092-2111	-	CGGGATCCTCATGGCCTCTTCAGAGACC

II Sorologia de H. pylori

- modelos estudados

1) HspAmaIE proteína recombinante de 47,5 kD (HspA=13 kD). Na população designada como população 1 de soros documentados foram obtidas uma sensibilidade de 41% e uma especificidade de 96%.

2) N6flbA - estirpe aflagelada de Helicobacter pylori foram realizadas 3 extracções: -N-Octil Glucosido

-PBS

-Glicina

3)-N6 A extracção com N-octil Glucósido (NOG) parece ser de momento a melhor estirpe selvagem correspondente. Foi efectuada uma extracção ao N-octil glucósido.

Uma segunda população de soros foi preparada (população II). Trata-se de uma centena de soros bem documentados do ponto de vista clínico, endoscópico, histológico, bacteriológico e anatomopatológico. É graça a esta população II que os desempenhos dos diferentes modelos estudados foram apreciados. Foram testadas cinco populações diferentes.

-5 Populações de soros testadas:

-300 soros de qualquer proveniência (FNTS)

-18 soros positivos por serologia (WHITTAKER (CBMS)

-92 soros bem documentados designados como soros da população II

-87 soros documentados do ponto de vista bacteriológico e anatomopatológico, os ditos soros da população I.

- 23 soros que podem apresentar reacções cruzadas:

-10 soros positivos anti-Legionella

-10 soros anti-Chlamydia positivos

-3 soros anti-Campylobacter positivos

Em paralelo foram testados dois kits concorrentes que de acordo com os estudos bibliográficos apresentam desempenho.

-2 kits comerciais testados:

-Cobas Core (ROCHE)

-Pylori Stat (WHITTAKER)

-Resultados

Os soros de qualquer origem (FNTS) (Figuras 8 a 11, tabela 2).

-300 soros foram passados nos modelos seguintes:

-Hsp A male

-N6flBa-

-N6

Os estudos epidemiológicos dão prevalências sorológicas em França, entre 20 e 25%. A repartição de 300 soros de doadores de sangue foi estudada e calculou-se a prevalência da positividade para diferentes valores de patamar, de modo a validar o valor do patamar previamente definido na seroteca do CBMS (serologia WHITTAKER).

Este estudo permite comparar os diferentes testes com a mesma prevalência de soro.

-Os primeiros 43 soros foram igualmente passados nos modelos seguintes:

-Cobas Core (ROCHE)

-Pylori Stat (WHITTAKER)

-sorologia dita JLF (teste ELISA, baseado num extracto aquoso de várias estirpes bacterianas)

Os resultados são expressos numa unidade arbitrária, e para diferentes valores de patamar, um resultado positivo é marcado como 1, um resultado negativo é marcado como 0. Comparando estes 43 soros em relação aos diferentes testes pode-se constatar que:

-a estirpe aflagelada N6flbA e o teste Cobas Core (ROCHE) possuem prevalências sorológicas comparáveis da ordem de 20%.

-HspA possui uma prevalência sérica muito fraca (7%) o que deixa supor uma falta de sensibilidade entrando em linha de conta com os resultados anteriores.

-a serologia JLF parece muito específica, uma vez que a prevalência sérica é só de 14%, tendo em conta os resultados anteriores.

-o teste Pylori Stat (Whittaker) dá uma prevalência sorológica elevada (29%) que mostraria uma falta de especificidade, ou um valor de patamar demasiado baixo.

Tabela 2A Comparação de 43 soros FNTS em relação a :

N°	HepA	150	CS0+H	CS0+H	C.C. Core	P	P-Stat	NETEA										Nº	Nº	100
								PES	100	50	50	NOG	100	50	50	NOG	100	50	50	100
1	0	0	1	1	170	1	0.70	3380	1	1	1	1	1	1	1	3105	1	1	1	1
2	0	0	0	0	0	0	0.23	6	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
3	0	0	0	0	3	0	0.23	8	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
4	0	0	0	0	4	0	0.18	4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
5	0	0	0	0	3	0	0.28	12	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
6	1	0	0	0	2	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	3	0	0.32	41	0	0	0	0	0	0	0	35	0	0	0	0
8	29	0	0	0	137	1	0.57	3381	1	1	1	1	1	1	1	3108	1	1	1	1
9	0	0	0	0	3	0	0.33	23	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0
10	0	0	0	0	1	0	0.34	20	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0
11	0	0	0	0	3	0	0.23	61	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0.19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	1	0	0.18	51	0	0	0	0	0	0	0	39	0	0	0	0
14	0	0	0	0	3	0	0.25	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
15	1	0	0	0	1	0	0.27	4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0.37	82	0	0	0	0	0	0	0	51	0	0	0	0
17	0	0	0	0	1	0	0.22	5	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	0	0.25	13	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0.27	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1	0	0.21	23	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0
21	0	0	0	0	18	1	0.48	54	0	0	0	0	0	0	0	204	1	1	1	1

Tabela 2B Comparação de 43 soros FNTS em relação a :

Nº	HspA 150	CSO+H	C12+H	C.Coxa	P. 9ml	0.34	N8/IEA										sãoJLF 0.30	N8
							100	MS	80	INDG	100	80	40	20	0	0		
22	1	0	0	1	0	0.43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.05	21
23	0	0	1	25	1	0.48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.37	>828
24	9	0	1	125	1	0.55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.47	>828
25	0	0	0	0	0	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	51
26	0	0	0	2	0	0.28	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.04	105
27	0	0	1	10	1	0.23	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.07	359
28	0	0	1	7	0	0.21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	27
29	3	0	0	0	0	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0
30	1	0	0	2	0	0.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	4
31	0	0	0	1	0	0.21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0
32	0	0	0	2	0	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	30
33	0	0	0	1	0	0.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	6
34	0	0	0	3	0	0.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	2
35	1293	1	1	170	1	0.84	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.06	>828
36	0	0	0	4	0	0.36	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	68
37	0	0	0	5	0	0.22	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.02	227
38	13	0	0	4	0	0.47	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.07	108
39	1	0	0	4	0	0.34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	34
40	0	0	0	2	0	0.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	4
41	0	0	0	0	0	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	30
42	0	0	0	170	1	0.58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.47	>828
43	0	0	1	3	0	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0
n5 de +		1	5	7	8	12	12	8	8	12	8	8	10	10	10	10	6	11
% de +		2%	14%	16%	10%	20%	10%	21%	26%	21%	21%	21%	23%	23%	23%	14%	14%	28%

Os soros positivos em serologia WHITTAKER (CBMS) (Tabela 3)

Três soros revelaram-se positivos unicamente com o teste Pylori Stat (Whittaker). Eles não foram confirmados por nenhum outro teste.

Pode-se supor que se trata de uma falta de especificidade deste teste. Se se tomar como referência o teste Cobas Core (Roche) que é um dos melhores actualmente no mercado podemos comparar os nossos diferentes modelos em relação a Cobas Core.

- A estirpe aflagelada N6flbA encontra-se perfeitamente correlacionada com Cobas Core.

- Os 3 soros negativos Cobas Core correlacionam-se igualmente com N6flbA-

- Os 15 soros positivos Cobas Core correlacionam-se igualmente com N6flbA-

-A estirpe selvagem N6 mostra os mesmos desempenhos que a estirpe aflagelada

-A HspA falta também sensibilidade, uma vez que 9 soros positivos Cobas Core são negativos com HspA.

Os 3 soros negativos Cobas Core também o são com HspA.

Tabela 3

19 soros positivos do CBMS positivos por serologia
WHITTAKER (Pylori Stat)

Nºsérum	DO	HspA	160	C. Core	8	NGRBA-					N6	
						PBS	60	NOG	60	GLY	NOG	100
1	1.8	0	0	33	1	130	1	289	1	494	830	1
2	2.41	807	1	>80	1	471	1	3257	1	6587	>928	1
3	2.9	875	1	30	1	472	1	3283	1	1183	>928	1
4	1.4	146	0	42	1	156	1	407	1	625	358	1
5	1	179	1	44	1	59	0	81	1	317	276	1
6	2.6	183	1	>80	1	472	1	3260	1	1054	>928	1
A	0.7	19	0	4	0	13	0	8	0	33	12	0
B	2.6	5	0	>80	1	471	1	3255	1	6600	>928	1
C	3.1	1352	1	>80	1	470	1	3246	1	8582	>928	1
D	1.3	3	0	18	1	121	1	506	1	448	>928	1
E	0.6	7	0	1	0	23	0	45	0	150	0	0
F	2.1	0	0	75	1	138	1	3258	1	260	>928	1
G	0.2	0	0	8	0	3	0	4	0	28	0	0
H	1.4	25	0	15	1	127	1	178	1	343	159	1
I	2.3	960	1	>80	1							
J	1.9	5	0	38	1	91	1	117	1	57	101	1
K	1.38	4	0	52	1	88	1	182	1	167	>928	1
L	2.08	855	1	>80	1	471	1	588	1	943	>928	1
M	2.88	0	0	51	1	471	1	3255	1	1200	>928	1

Os soros da população II

Foram seleccionados 92 soros e repartem-se por 3 grupos:

-34: doentes dispépticos

diagnóstico de úlcera (duodenal ou gástrica) por endoscopia e histologia

presença de Helicobacter pylori por cultura e/ ou anapat; foi também realizado um teste rápido à ureia.

Este grupo será designado Hp+/U+

-27: doentes dispépticos

diagnóstico diferente de úlcera (gastrite...) por endoscopia e histologia
presença de Helicobacter pylori por cultura e/ou anapat;
foi também realizado um teste rápido à ureia.
Este grupo será designado Hp+/U-

-31: doentes dispépticos ou não
gastro-duodeno normal por endoscopia e histologia
ausência de Helicobacter pylori por cultura e/ou anapat;
foi também igualmente realizado um teste rápido à ureia.
Este grupo será designado Hp-

Para cada doente são indicados os dados clínicos, endoscópicos, histológicos, bacteriológicos e anatomopatológicos.

Esta população bem documentada permitiu definir critérios de Sensibilidade e Especificidade.

-HpA: Nota-se sempre uma grande falta de sensibilidade como constatado com a população I. A sensibilidade é de 59% para uma especificidade de 100.

-N6flbA-: Observa-se uma sensibilidade de 100% para o extracto de N-Octil Glucosido com uma especificidade de 90%. O comportamento é comparável ao teste de Cobas Core da Roche (sensibilidade de 98% para uma especificidade de 94%).

-N6: A estirpe selvagem é exactamente comparável à estirpe aflagelada na população II.

Nenhum dos 31 soros negativos não é positivo com a estirpe selvagem; nenhuma reacção cruzada devido ao flagelo foi detectada nesta população II.

Tabela 6- Soros da população II em relação à presença de Hp (cultura e/ ou anapat) e úlcera

			Sensibilidade		Especificidade
Em relação a Hp+ e UD/UG ou seja 34Hp+/U+	HspA malE		VS=100	44.1% (15/34)	100% (31/31)
			VS=50	52.9% (18/34)	100% (31/31)
			VS=20	64.7% (22/34)	73.8% (25/31)
	N6flbA-	NOG	VS=100	94.1% (32/34)	96.8% (30/31)
			VS=80	94.1% (32/34)	93.6% (29/31)
			VS=60	100% (34/34)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100	82.4% (28/34)	(29/31) 93.6%
			VS=80	94.1% (32/34)	93.6% (29/31)
			VS=60	97.1% (33/34)	83.9% (26/31)
	Séro JLF		VS=0.30	82.4%(28/34)	96.8% (30/31)
	Pylori Stat			94.1% (32/34)	90.3% (28/31)
	Cobas Core			100% (34/34)	93.6% (29/31)

Tabela 7- Soros da população II em relação à presença de Hp (cultura e/ ou anapat.)

			Sensibilidade		Especificidade
Em relação a Hp+ 34 UD/UG-27 GNU ou seja 61Hp+ 31Hp-	HspA malE		VS=100	45.9% (28/61)	100% (31/31)
			VS=50	59% (36/61)	100% (31/31)
			VS=20	80.7% (45/61)	73.8% (25/31)
	N6flbA-	NOG	VS=100	95.1% (58/61)	96.8% (30/31)
			VS=80	95.1% (58/61)	93.6 % (29/31)
			VS=60	100% (61/61)	90.3% (28/31)
		PBS	VS=100	85.3% (52/61)	93.6% (29/31)
			VS=80	93.4% (57/61)	93.6% (29/31)
			VS=60	96.7% (59/61)	83.9% (26/31)
	Séro JLF		VS=0.30	78.7%(48/61)	96.8% (30/31)
	pylori Stat			93.4% (57/61)	90.3 % (28/31)
	Cobas Core			93.3% (60/61)	93.6% (29/31)
*Soro=VS					

Tabela 8- Soros da população II em relação à presença de Hp (cultura e/ ou anapat) e ausência de ulcera

		Sensibilidade		Especificidade	
Em relação a Hp+ e GNU ou seja 27Hp+/U-	HspA malE		VS=100	48.2% (13/27)	100% (31/31)
			VS=50	66.7% (18/27)	100% (31/31)
			VS=20	85.2% (23/27)	73.8% (26/31)
	NGfiba-	NOG	VS=100	96.3% (28/27)	96.8% (30/31)
			VS=80	93.6% (26/27)	93.6% (29/31)
			VS=60	100% (27/27)	92.3% (28/31)
		PBS	VS=100	88.8% (24/27)	93.5% (29/31)
			VS=80	92.6% (25/27)	93.6% (29/31)
			VS=60	96.3% (26/27)	93.9% (28/31)
	Séro JLF		VS=0.30	74.1% (20/27)	96.8% (30/31)
	Pylori Stat			92.6% (25/27)	90.3% (28/31)
	Cobas Core			96.3% (26/27)	93.6% (29/31)

O local da sorologia

A sorologia é colocada a dois níveis:

-Sorologia muito sensível: com o objectivo de despistar o transporte da bactéria nos indivíduos novos que se queixavam de dores epigástricas. Se se verifica que a sorologia é negativa o sujeito não será submetido a endoscopia nem a biópsia e será pesquisa de outra causa para as suas dores.

-Sorologia específica de risco: trata-se de evidenciar o risco de fazer uma infecção grave por *Helicobacter pylori*, isto é uma úlcera, um cancro, ou um linfoma gástrico (linfoma de MALT).

-Seja utilizando uma molécula específica do risco em questão.

-Seja utilizando um patamar específico de risco

(valor de patamar mais elevado nos sujeitos em risco do que nos sujeitos que não estão em risco).

Esta serologia específica pode ser utilizada para fazer uma pesquisa da população em geral e despistar deste modo, os cancros e os linfomas, ligados a *Helicobacter pylori* que não seriam despistados por falsos sintomas. (Só os sujeitos que se queixam de dores é que vão consultar um gastroenterologista).

A resposta à questão da sensibilidade é boa.

Tabela 9: Média e desvio padrão das U A nos três grupos de doentes

		Hp- (n=31)	Hp+/U- (n=27)	Hp+/U+ (n=34)
Hsp A	<u>Média</u>	<u>10,61</u>	<u>775,72</u>	<u>770,32</u>
	<u>Desvio padrão</u>	<u>8,81</u>	<u>1312,56</u>	<u>1666,52</u>
N6flBA	<u>Média</u>	<u>17,16</u>	<u>895,50</u>	<u>944,85</u>
	<u>Desvio padrão</u>	<u>26,69</u>	<u>818,57</u>	<u>915,27</u>

Tabela 10: Média e desvio padrão das U. A em função da histologia gástrica

Intensidade		Atrofia			Inflamação			Actividade		
		Hsp A	NOG	P. Stat	Cag. A	Hsp A	NOG	Hsp A	NOG	P. Stat
0	Média (Desvio padrão)							977 2052	712 680	0,31 0,08
1	Média (Desvio padrão)	410 1004	412 390	0,26 0,07	93 122	437 889	677 468	478 1117	938 876	0,32 0,09
2	Média (Desvio padrão)	423 984	730 707	0,30 0,08	188 200	1838 1855	876 780	733 1382	796 753	0,31 0,07
3	Média (Desvio padrão)	1321 2059	1403 1012	0,38 0,08	654 607	2468 1742	2176 1132	1302 1628	1402 1174	0,35 0,12

81Hp+

Repartição	Atrofia	Inflamação	Actividade
0	0	0	15
1	10	21	25
2	28	33	12
3	22	7	9
4	1	0	0

Correlação entre a intensidade da gastrite e o teor em anticorpos

A gastrite é definida por 3 parâmetros:

- Atrofia (representada pelo 1º número a seguir a G); a sua intensidade é indicada de 1 a 4.
 - A inflamação global corresponde à infiltração de neutrófilos polinucleares e de monócitos (representada pelo segundo número a seguir a G). A sua intensidade é indicada de 1 a 3.
 - A actividade corresponde ao número de neutrófilos polinucleares (representada pelo 3º número a seguir a G); a sua intensidade é indicada de 0 a 3.
- Determinadas formas foliculares são indicadas por F.

Normalmente pode-se observar a correlação seguinte:

A actividade encontra-se muito bem correlacionada com Helicobacter pylori.

A inflamação encontra-se muito bem correlacionada com Helicobacter pylori.

Calculou-se assim em função destes 3 parâmetros e da sua intensidade, a média dos títulos observados em cada grupo.

Interpretação dos resultados:

A utilização de um teste t permitirá pôr em evidência uma diferença significativa, ou não, entre 2 médias observadas com um risco de 5%. A hipótese sobre a qual é fundada o teste t é a igualdade de variâncias colocada em evidência por um teste F (teste de Fisher).

Determinadas variâncias não eram iguais não se poderá portanto comparar todas as médias entre elas. A comparação das médias, quando isso é possível não permite colocar em evidência diferenças significativas, ou não nos diferentes grupos.

-Diferença significativa:

No grupo "inflamação", entre as médias dos "2" e "3" de HspA e de NOG.

-Diferença não significativa:

Ao nível da actividade, não se colocou em evidência uma diferença significativa entre os dois níveis de intensidade:

-HspA: não existe diferença	0 e 2
significativa entre os dois	0 e 3
níveis	1 e 2
	1 e 3
	2 e 3
-NOG: não existe diferença	0 e 1
significativa entre os dois	0 e 2
níveis	1 e 2
	1 e 3
	2 e 3

Pode-se contudo constatar uma tendência de aumento dos teores em função da intensidade da gastrite:

-ao nível da atrofia, as médias passam para o dobro, quando se passa do nível 1 ao 2 e do nível 2 a 3 para o HspA e para o extracto de NOG da estirpe aflagelada.

-ao nível da inflamação, as médias passam para o dobro, quando se passa do nível 1 ao 2.

O número de efectivos em cada grupo é relativamente fraco (<30) para se poder concluir que existem diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 11: Média e desvio padrão das U. A em função da histologia gástrica

Intensidade	Em Hp+/U+	Atrofia			Inflamação			Atividade		
		Hsp A	NOG	P. Stat	Hsp A	NOG	P. Stat	Hsp A	NOG	P. Stat
0	Média (Desvio padrão)							1282 2619	676 697	0,32 0,09
1	Média (Desvio padrão)	121 118	326 218	0,25 0,05	438 759	511 451	0,30 0,08	599 1298	1015 1050	0,34 0,10
2	Média (Desvio padrão)	304 507	793 784	0,32 0,09	586 1820	845 813	0,33 0,09	219 329	827 835	0,32 0,09
3	Média (Desvio padrão)	2004 2858	1722 1080	0,41 0,07	2133 1889	2184 1006	0,43 0,08	911 1502	1316 1040	0,36 0,12

34Hp+/U+

Repartição	Atrofia	Inflamação	Atividade
0	0	0	9
1	7	10	13
2	17	19	8
3	9	5	8
4	1	0	0

Os soros podem apresentar reacções cruzadas

Foram utilizados 2 tipos de soros

20 soros (10 anti-Legionella+ e 10 anti-Chlamydia+) que podem apresentar reacções cruzadas com HspA, uma vez que estas 3 bactérias possuem "Heat shock proteins" numa vizinhança muito próxima umas das outras.

3 soros positivos de anti-Campylobacter com o objectivo de evidenciar reacções cruzadas com a estirpe aflagelada N6 que desapareceria com a estirpe aflagelada N6flbA-. É muito difícil arranjar soros anti-Campylobacter positivos é por isso que só há 3 soros.

HspA não apresenta nenhuma reacção cruzada nem com os 10 soros anti-Legionella positivos nem com os 10 soros anti-Chlamydia positivos.

Alguns destes soros possuem títulos positivos em anticorpos anti-Helicobacter pylori tanto na estirpe flagelada como na estirpe aflagelada, mas o contexto clínico destes soros não é conhecido.

Tabela 12: Soros que podem apresentar reacções cruzadas

Legionella+	Título	N6	VS=100	N6flbA-	VS=60	HspA	VS=100
A	P2 P3 =256	0	0	4	0	47	0
B	P4 P5 =64	>928	1	641	1	42	0
C	P2 P3 =128	212	1	87	1	68	0
D	P2 P3 =64	70	0	19	0	15	0
E	P1=256/P2=512	>928	1	239	1	258	1
F	P2 P3 P4 P5 =128	322	1	121	1	41	0
G	P1=512/P5=1024	>928	1	193	1	121	1
H	P4 P5 =64	>928	1	479	1	18	0
I	P2=128/P3=64	33	0	17	0	25	0
J	P2=256/P3=128	16	0	8	0	32	0

Chlamydia+	Título	N6	VS=100	N6flbA	VS=60	HspA	VS=100
A	256	6	0	8	0	25	0
B	256	7	0	9	0	34	0
C	64	636	1	290	1	39	0
D	256	367	1	225	1	19	0
E	32	>928	1	855	1	19	0
F	128	>928	1	783	1	27	0
G	32	115	1	55	0	15	0
HTwar	16	19	0	10	0	14	0
I	32	>928	1	592	1	>928	1
JTwar	64	610	1	280	1	44	0
Campylobacter+		N6	VS=100	N6flbA-	VS=60	HspA	VS=100
A		35	0	28	0	17	0
B		13	0	4	0	27	0
C		50	0	68	1	89	0

Conclusão

HspA maIE

Esta molécula não pode ser sempre utilizada isoladamente, uma vez que lhe falta também sensibilidade, mas poderá ser interessante se se associar a outras moléculas.

De qualquer maneira ela apresenta um risco de reacções cruzadas devido à importante conservação das suas "Heat shock proteins" entre as diferentes espécies bacterianas.

N6flbA-

Esta variante aflagelada parece ser muito interessante, a sensibilidade e a especificidade obtidas com a população II de soros mostra um comportamento muito interessante.

N6

De momento a estirpe flagelada parece interessante. No entanto, as reacções cruzadas relativas ao flagelo foram pouco estudadas devido à dificuldade de arranjar soros bem documentados em serologia Campylobacter.

Teste JLF

Foi desenvolvido um teste sorológico baseado na extracção aquosa com (PBS) de várias estirpes de Helicobacter pylori. Este teste parece ter um desempenho muito bom.

Um extracto NOG da variante aflagelada foi utilizado para testar a população I de soros.

87 soros documentados apenas sob o ponto de vista bacteriológico e anatomopatológico foram testados com o extracto bacteriano aflagelado.

Um soro é positivo se a cultura for positiva, ou se o anapat. e o teste rápido da ureia são positivos.

Um soro é negativo se os 3 testes (cultura, anapat. e o teste rápido da ureia) são negativos.

Encontra-se uma sensibilidade de 90,3% (28/31) para uma especificidade de 71,4% (40/56).

Em 16 soros falsos positivos num primeiro testes, 9 são positivos tanto por serologia JLF, como por Wester Blot JLF, tanto como pelos dois.

Nos 3 soros falsos negativos num primeiro teste, os três são negativos tanto por serologia JLF, como por Western Blot JLF e um soro é negativo com os dois sistemas.

Tabela 13. 87 soros da população I testados com o extracto de N-Octil Glucosido da estirpe aflagelada

Nºsérum	HspA	VS 150	sérDJLF	VS 35	WB JLF	interp	WB Bioprim	Hp	NGIBA	
									NOG	VS=50
572	35	0	21	0	2p	-	+	0	128	1
573	11	0	46	1	3p	+	-	1	229	1
574	11	0	3	0	1p	-	-	0	9	0
575	0	0	63	0	3p	-	-	0	168	1
576	121	0	19	0	3p	-	+	0	246	1
577	0	0	1	0	0	-	-	0	3	0
578	6	0	4	0	0	-	-	0	24	0
579	2030	1	114	1	3p	+	-	1	>464	1
580	721	1	125	1	4p	+	-	1	>464	1
581	0	0	2	0	0	-	-	0	2	0
582	0	0	2	0	1p	-	-	0	6	0
583	0	0	3	0	2p	-	-	0	27	0
584	35	0	1	0	2p	-	-	0	12	0
585	2114	1	125	1	4p	+	+	1	>464	1
587	19	0	2	0	2p	-	-	0	11	0
588	1368	1	58	1	3p	+	-	1	>464	1
589	323	1	3	0	4p	+	+	0	>464	1
591	4	0	4	0	2p	-	-	0	9	0
592	6	0	0	0	2p	-	+	0	9	0
593	44	0	26	0	3p	-	-	1	3	0
595	76	0	78	1	4p	+	+	1	>464	1
597	0	0	0	0	0	-	-	0	9	0
598	49	0	125	1	4p	+	+	1	>464	1
600	0	0	3	0	0	-	-	0	3	0
601	6	0	1	0	0	-	-	0	6	0
602	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
605	11	0	0	0	0	-	-	0	10	0
608	5	0	5	0	0	-	-	0	9	0
609	308	1	8	0	0	-	-	0	13	0
610	2370	1	111	1	4p	+	-	1	>464	1
612	477	1	34	0	4p	+	+	0	422	1
613	46	0	0	0	0	-	-	0	3	0
616	741	1	73	1	4p	+	+	1	>464	1
617	1725	1	125	1	4p	+	-	1	285	1
618	426	1	101	1	4p	+	+	1	>464	1
621	0	0	82	1	4p	+	+	1	>464	1
622	15	0	6	0	2p	-	-	0	25	0
624	411	1	110	1	4p	+	+	0	>464	1
626	46	0	11	0	1p	-	-	1	53	0
627	0	0	48	1	1p	-	-	1	27	0
628	6	0	2	0	0	-	-	0	2	0
631	31	0	21	0	2p	-	-	0	92	0
632	0	0	3	0	0	-	-	0	22	0
633	285	1	104	1	3p	+	+	1	>464	1
634	48	0	69	1	4p	+	-	1	>464	1
636	523	1	33	0	2p	-	-	1	71	1

Tabela 14. 87 soros da população I testados com o extracto de N-Octil Glucosido da estirpe aflagelada

Nºsoro	HspA	VS 150	soro JLF	VS 35	WB JLF	interp	WB Bioplin	Hp	N609A	
									NOG	VS=50
538	822	1	36	1	3p	+	+	1	>464	1
841	0	0	6	0	1p	-	-	0	8	0
845	29	0	8	0	1p	-	-	0	29	0
847	0	0	2	0	1p	-	-	0	4	0
849	5	0	5	0	0	-	-	0	12	0
850	6	0	0	0	0	-	-	0	3	0
854	0	0	1	0	0	-	-	0	4	0
855	49	0	59	1	2p	-	-	1	229	1
858	0	0	3	0	0	-	-	0	8	0
857	363	1	105	1	4p	+	+	1	>464	1
858	0	0	6	0	1p	-	-	0	8	0
859	0	0	3	0	0	-	-	0	3	0
862	73	0	3	0	2p	-	-	0	40	0
863	25	0	21	0	2p	-	-	0	103	0
867	88	0	28	0	4p	-	-	0	86	0
888	32	0	88	1	4p	+	+	1	>464	1
889	283	1	118	1	3p	+	+	1	>464	1
870	734	1	77	1	2p	+	+	0	>464	1
871	214	1	100	1	4p	+	+	1	>464	1
872	4	0	5	0	0	-	-	0	0	0
873	1023	1	55	1	3p	+	-	1	>464	1
874	12	0	10	0	0	-	-	0	21	0
875	9	0	13	0	0	-	+	0	210	0
878	2611	1	74	1	4p	+	+	1	>464	1
878	0	0	0	0	0	-	-	0	1	0
879	175	1	9	0	4p	+	-	0	348	1
880	0	0	1	0	0	-	-	0	7	0
881	800	1	82	1	3p	+	+	1	425	1
882	0	0	1	0	0	-	-	0	8	0
883	0	0	39	1	3p	+	+	1	>464	1
884	0	0	3	0	0	-	-	0	20	0
885	0	0	1	0	0	-	-	0	11	0
888	0	0	2	0	0	-	-	0	8	0
725	0	0	7	0	0	-	-	0	198	0
730	180	1	45	1	1p	-	-	0	372	0
732	0	0	10	0	1p	-	-	0	145	0
735	0	0	30	0	2p	-	-	1	143	1
736	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
737	25	0	102	1	4p	+	-	1	155	1
738	2233	1	125	1	4p	+	-	1	>464	1
739	79	0	33	0	1p	-	+	0	274	0

Técnica

Placas revestidas com

2 µg/ml em antígeno Hsp A

3 µg/ml em extracto NOG de NflbA e N6

Gama

5 pontos da gama controlo negativo

controlo positivo utilizado

	com 4 diluições
Soro dos doentes	Diluição de 1/100
	Volume depositado 100 μ l
Incubação;	1 hora a 37°C
3 lavagens	
Conjugado monoclonal	1/32000 para HspA
(IgG toxo) utilizado em	1/64000 para N6flbA-
	1/56000 para N6
Volume depositado	100 μ l

- Incubação do conjugado durante 1 hora a 37°C
- 4 lavagens
- Revelação da reacção enzimática com o substracto OPD+ durante 30 minutos na obscuridade
- Paragem da reacção enzimática por H_2SO_4^-
- Leitura das D. O a 492 nm/620 nm.

Conversão das D. O em unidades arbitrárias (UA).

Tabela 15: Soros documentados da população I
42 soros Hp+

			Anatomopatologia			Bacteriologia									
N° soro	Sexo	DDN	Endos.	Glansa	Histo	Gram	Ure ia	Cul t.	Hp	SoroJLF	VS=0,3	NOG	VS=60		
952253	1	01/10/60	G, H	0	G	1	1	1	1	1	1	>464	1		
236174	1	02/05/60	G	0	G	1	1	1	1	10.42	1	216	1		
974107	2	18/02/62	G (mini)	0	G	1	1	1	1	1.39	1	272	1		
34812	1	10/12/52	G, B	0	G	1	1	1	1	0.82	1	452	1		
229712	2	11/08/53	G	0	G	1	1	1	1	0.11	1	148	1		
45511	1	17/01/70	G	0	G	1	0	1	1	1.26	1	213	1		
180334	2	14/01/59	G	0	U	1	1	1	1	0.83	1	>464	1		
189005	2	23/10/25	U	0	U	1	1	1	1	0.87	1	>464	1		
49060	1	06/07/64	U	0	U	1	1	1	1	2	1	>464	1		
168332	1	06/11/60	G	1	G	1	1	1	1	0.23	1	394	1		
195282	1	11/08/46	G	1	G	1	0	1	1	0.81	1	180	1		
176859	1	24/04/50	G	1	G	1	1	1	1	1.39	1	>464	1		
987898	1	13/05/58	G	1	G	1	1	1	1	0.69	1	297	1		
954498	2	01/12/45	G	1	G	1	1	1	1	1.12	1	>464	1		
185175	2	01/08/08	G	1	G	0	0	1	1	2.7	1	>464	1		
156007	2	27/09/56	G, B	1	G	1	1	1	1	1.68	1	437	1		
18018	1	19/12/63	G, B	1	G	1	1	1	1	0.38	1	45	1		
215979	2	04/05/19	H, G, B	1	G	1	1	1	1	1.2	1	>464	1		
25322	2	12/02/16	G	1	G	1	1	1	1	2.5	1	>464	1		
26558	1	09/11/65	U, H	1	G	1	1	1	1	2.4	1	>464	1		
183295	1	24/01/16	Ubu ant	1	G	1	1	1	1	2.5	1	>464	1		
237220	1	01/06/65	Ubulb.	1	G	1	0	1	1	0.14	1	328	1		

Legenda

G= Gastrite ; H= hérnia lateral ; U=úlcera (UD=úlcera duodenal) ; (UG= úlcera gástrica)

D= Duodenite; B/Bulb = Bulbite; O= Esofagite

Tabela 15 bis: Soros documentados da população I
42 soros Hp+

Nº soro	Sexo	DDN	Endos.	Anatomopatologia		Bacteriologia			SoroJLF	VS=0,3	NOG	VS=60
				Glensa	Histo	Gra m	Ure ia	Cul t.	H p			
237191	1	06/05/42	U bulb.	1	G	1	0	1	1	1,16	1	>464
238683	1	13/09/30	G, U bulb.	1	G	1	1	1	1	1,73	1	>464
78163	1	06/07/72	G	1	G	1	1	1	1	0,46	1	312
87951	1	15/04/41	G	1	G	1	1	1	1	0,7	1	>464
93773	1	12/03/49	G	1	G	0	0	1	1	1,05	1	>464
97478	1	04/05/55	G	1	G	1	1	1	1	0,42	1	>464
83438	1	06/11/74	G	1	G	1	1	1	1	0,84	1	183
68502	1	02/10/45	G	1	G	1	1	1	1	0,78	1	>464
42230	2	12/06/58	G	1	G	1	1	1	1	0,81	1	>464
51105	2	12/08/45	G, UD	1	G	1	1	1	1	1,1	1	>464
58531	1	21/08/43	G	1	G	1	1	1	1	0,8	1	214
78106	2	28/01/51	G, UD	1	G	1	1	1	1	1,25	1	>464
89121	1	28/10/59	G	1	G	1	1	1	1	0,9	1	449
216778	1	08/04/47	G, U	1	G, U	1	1	1	1	0,25	1	283
986070	1	29/01/47	G	1	G, préulcer	1	1	1	1	0,31	1	121
72420	1	15/05/55	G, UD	1	G, UD	1	1	1	1	1,2	1	>464
205110	1	10/06/51	UD	1	U	1	1	1	1	0,3	1	386
62720	1	18/10/56	UG	1	U	1	1	1	1	0,68	1	>464
67767	2	01/10/44	UGD	1	U	1	1	1	1	1,2	1	>464
205855	1	09/07/38	G, U	1	UD	1	1	1	1	0,25	1	71

Legenda

G= Gastrite

H= hérnia lateral

U=úlcera (UD=úlcera duodenal)

(UG= úlcera gástrica)

D= Duodenite

B/Bulb = Bulbite

O= Esófagite

Tabela 16: Soros documentados da população I
55 soros Hp-

Nº soro	Sexo	DDN	Endos.	Anatomopatologia		Bacteriologia				SorodJLF	VS=0,3	NOG	VS=60
				Glensa	Histo	Gra m	Ure ia	Cul t.	H P				
79476	1	23/06/31	G	0	Adenome ulcére	0	0	0	0	0,02	0	6	0
75439	2	14/05/32	G	0	G	0	0	0	0	1,19	0	>464	0
97286	2	03/01/37	G	0	G	0	0	0	0	0,45	0	56	0
68053	1	02/05/48	G	0	G	0	0	0	0	1,02	0	304	0
71300	2	14/10/63	G	0	G	0	0	0	0	0,89	0	>464	0
844990	1	01/10/54	G	0	G	0	0	0	0	0,04	0	4	0
957659	2	28/01/46	G	0	G	0	0	0	0	0,01	0	5	0
985409	2	26/07/20	U min	0	G	0	0	0	0	0,21	0	69	0
985551	2	18/08/09	G, U, B	0	G	0	0	0	0	0,05	0	14	0
992025	1	22/03/32	G	0	G	0	0	0	0	0,07	0	65	0
998792	2	11/04/44	G	0	G	1*	0	0	0	0,08	0	26	0
16479	1	13/07/83	RAS	0	G	0	0	0	0	0,02	0	0	0
77183	2	24/08/14	G, U	0	G	0	0	0	0	0,03	0	9	0
77566	1	25/01/32	G	0	G	0	0	0	0	0,01	0	22	0
991337	1	24/10/80	G	0	G + Hyperplasic	0	0	0	0	0,07	0	26	0
78471	2	15/12/15	G	0	G + mélapl. intest.	0	0	0	0	0,07	0	106	0
63356	1	10/07/21	U cicat.	0	G min	0	0	0	0	0,37	0	>464	0
936515	2	05/05/81	RAS	0	G min	0	0	0	0	0,02	0	0	0
991386	2	22/01/73	G	0	G min	1*	0	0	0	0,17	0	3	0
8130	1	05/05/72	G	0	G min	0	0	0	0	0,06	0	0	0
81415	1	23/08/31	G	0	G min	0	0	0	0	0,03	0	5	0
82175	1	13/01/49	U cicat.	0	G min	0	0	0	0	0,03	0	34	0
78652	1	01/08/18	G, U	0	Hypotrophie gastr.	0	0	0	0	0,04	0	10	0
69819	2	16/02/42	Normale	0	Normale	0	0	0	0	0,88	0	>464	0
942184	2	09/02/67	G	0	Normale	0	0	0	0	0,1	0	52	0
961000	2	10/10/47	G	0	Normale	0	0	0	0	0,06	0	19	0
1613	1	11/01/26	G, B, O	0	Normale	0	0	0	0	0,68	0	195	0

Tabela 16 bis: Soros documentados da população I

55 soros Hp-

Nº soro	Sexo	DDN	Endos.	Anatomopatologia		Bacteriologia			SoroJLF	VS=0,3	NOG	VS=60
				Glensa	Histo	Gra m	Ure ia	Cul t.	H p			
984979	2	23/04/78	UG	0	Normale	0	0	0	0	0	3	0
58767	2	19/12/93	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0	0	0
79861	2	26/07/63	G.O	0	Normale	0	0	0	0	0	16	0
85290	2	26/04/63	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0	2	0
91423	1	13/02/39	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0	0	0
93252	2	26/08/86	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0	10	0
94430	1	06/04/62	RAS	0	Normale	0	0	0	0	0	>484	0
890363	2	03/05/56	G.B	0	Normale + I-	0	0	0	0	0	42	0
87467	1	07/10/50	UGD	0	U	0	0	0	0	0	60	0
239085	1	05/02/45	Bulb. UG	0	U	0	0	0	0	0	73	0
3473	1	08/02/46	G.U	1	G	0	0	0	0	0	>484	0
78505	1	14/05/83	U bulb.	1	G	0	0	0	0	0	>484	0
83721	1	21/01/85	G	1	G	0	0	0	0	0	245	0
90169	1	18/04/38	G.B	1	G	0	0	0	0	0	>484	0
91081	2	08/01/43	G.O	1	G	0	0	0	0	0	>484	0
43127	1	24/02/41	G	1	G	0	0	0	0	0	>484	0
928133	2	25/03/71	G	1	G	0	0	0	0	0	>484	0
9128	1	08/03/77	G	1	G	0	0	0	0	0	3	0
974895	1	11/05/38	B.G	1	G	0	0	0	0	0	0	0
26697	1	23/08/44	H.O.U	1	G	0	0	0	0	0	2	0
78414	1	06/02/21	G.B.U	1	G	0	0	0	0	0	8	0
78451	1	26/11/45	G	1	G	0	0	0	0	0	5	0
79500	1	01/03/50	U oesoph.	1	G	0	0	0	0	0	19	0
78880	1	02/01/74	UG.B	1	G	0	0	0	0	0	3	0
416	1	18/02/71	G.G	1	G min	0	0	0	0	0	5	0
74548	1	25/02/45	UGD	1	U	0	0	0	0	0	1	0
99538	1	02/04/58	U bulb.	1	U	0	0	0	0	0	371	1
98953	2	18/12/16	U	1	U	0	0	0	0	0	>484	1

Tabela 17: População documentada da população I 55 soros de Hp-42 soros Hp+

	Sensibilidade	Especificidade
Soro JLF	85,7% (36/42)	70,9% (39/55)
NOG 60	97,8% (41/42)	61,8% (34/55)

Protocolos de extracção a partir da estirpe aflagelada N6flbA-.

Quantidade fornecida 800 mg de bactérias recolhidas com PBS centrifugadas

3 extracções testadas.

Extracções da estirpe aflagelada

	Extracção com Glicina	Extracção com N-octil glucosido	Extracção com PBS
Recuperação	PBS	PBS 0,01 M	PBS pH 7,4
Lavagem	2 vezes em PBS 8000 rpm/12 min	2 vezes em PBS 8000 rpm/12 min	
Extracção	Tampão glicina ácido 0,2 M pH 2,2 15 min. Tp ambiente, agitação suave 100 mg (peso húmido) para 2,5 ml	PBS contendo: 1% N-octil glucosido pH 7,2 (Sigma Chemical Co.) 20 min Tp ambiente	Colocação em vortex durante 1 min.
Centrifugação	11000 g 15 min.	23500 g 20 min.	5000 g 10 min.
Neutralização	NaOH 1 M		
Diálise	PBS pH 7,2 24 h a +4°C limite de corte 10000	PBS pH 7,2 24 h a +4°C valor de corte 10000	PBS pH 7,2 24 h a +4°C valor de corte 10000
Conservação	Determinação da concentração. Conservação a -20°C	Eliminação das partículas insolúveis conservação a -20°C	Determinação da concentração. Conservação a -20°C

SDS PAGE dos Diferentes Extractos da Estirpe Aflagelada N6
FLBA-

N° Poços	Tipo de amostra	Concentração µg/ml	Volume da amostra /Volume de tampão	Volume depositado
1	Padrão PM		5+5/190	10
2	Extracto de glicina	202,9	60/60	60
3				
4	Extracto de N-octil glucosido	874	51/39	60
5				
6	Extracto de PBS 1	539,2	60/20	60
7				
8	Extracto de PBS 2	77,9	60/20	60
9				
10	Padrão PM		5+5/190	10
11	Resíduo do extracto de glicina	2778,7	20/20	20
12				
13	Resíduo do extracto de glucosido	972,9	40/40	60
14				
15	Extracto de glicina sedimentado	309,3	60/20	60

(continuação)

N° Poços	Tipo de amostra	Concentração µg/ml	Volume da amostra /Volume de tampão	Volume depositado
16				
17	HspA Mal E	3000	20/20	20
18				
19				
20	Caleidos-cópio			20

Referências Bibliográficas

1. Andrews, G.P., Maurelli, A.T. : mxiA of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of the low-calcium-response protein, LcrD of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 60: 3287-3295 (1992).
2. Galan, J.E., Ghocchlo, C. Oosteen, P. : Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA* : homology of *invA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174, 4338-4349 (1992).
3. Leying, H., Suerbaum, S. Geis, G., Haas, R. : Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* 6. 2563-2574 (1993).
5. O'Toole, P.W., Kozlzyńska, M., Trust, T.J. : Non-mobile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. *Mol. Microbiol.* 14,691-703 (1994).
6. Plano, G.V., Barve, S.S., Straley, S.C. : LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J. Bacteriol.* 173. 7293-7303 (1991).
7. Ramakrishna, G., Zhao, J-L., Newton, A. : The cell cycle-regulated gene *flbF* of *Caulobacter crescentus* is homologous to a virulence locus of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 173, 7283-7292 (1991).
8. Suerbaum, S., Josenhans, C., Labigne, A. : Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange, *J. Bacteriol.* 175, 3278-3286 (1993).

Lisboa, 27 de Janeiro de 2009

Reivindicações

1. Uso para a detecção *in vitro* de uma infecção por H. pylori numa amostra de fluido biológico retirado de um doente, de uma estirpe bacteriana recombinante de Helicobacter pylori que possui um fenótipo aflagelado que resulta de uma mutação por substituição, adição e/ou supressão de bases ou de um fragmento nucleotídico na sequência nucleotídica do gene flbA que participa na regulação da biossíntese das proteínas dos flagelos de H. pylori, hibridizando a dita sequência nucleotídica do gene flbA sob condições severas com uma amostra que corresponde a um fragmento nucleotídico de H. pylori amplificado utilizando os dois oligonucleotídeos degenerados seguintes:

OLFlbA-1: ATGCCTCGAGGTCGAAAGCAAAGATG e OLFlbA-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, e em que a dita mutação é tal que ou o gene flbA deixa de ser expresso na dita estirpe bacteriana recombinante, ou o gene flbA não permite a síntese dos flagelos de H. Pylori.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que a estirpe bacteriana recombinante é caracterizada por o fenótipo aflagelado resultar da mutação na sequência nucleotídica do gene flbA, em que a sequência não mutada corresponde à seguinte cadeia nucleotídica ou codifica para a proteína que corresponde à sequência de aminoácidos seguinte:

1
 11
 121
 131
 141
 151
 161
 171
 181
 191
 201
 211
 221
 231
 241
 251
 261
 271
 281
 291
 301
 311
 321
 331
 341
 351
 361
 371
 381
 391
 401
 411
 421
 431
 441
 451
 461
 471
 481
 491
 501
 511
 521
 531
 541
 551
 561
 571
 581
 591
 601
 611
 621
 631
 641
 651
 661
 671
 681
 691
 701
 711
 721
 731
 741
 751
 761
 771
 781
 791
 801
 811
 821
 831
 841
 851
 861
 871
 881
 891
 901
 911
 921
 931
 941
 951
 961
 971
 981
 991
 1001
 1011
 1021
 1031
 1041
 1051
 1061
 1071
 1081
 1091
 1101
 1111
 1121
 1131
 1141
 1151
 1161
 1171
 1181
 1191
 1201
 1211
 1221
 1231
 1241
 1251
 1261
 1271
 1281
 1291
 1301
 1311
 1321
 1331
 1341
 1351
 1361
 1371
 1381
 1391
 1401
 1411
 1421
 1431
 1441
 1451
 1461
 1471
 1481
 1491
 1501
 1511
 1521
 1531
 1541
 1551
 1561
 1571
 1581
 1591
 1601
 1611
 1621
 1631
 1641
 1651
 1661
 1671
 1681
 1691
 1701
 1711
 1721
 1731
 1741
 1751
 1761
 1771
 1781
 1791
 1801
 1811
 1821
 1831
 1841
 1851
 1861
 1871
 1881
 1891
 1901
 1911
 1921
 1931
 1941
 1951
 1961
 1971
 1981
 1991
 2001
 2011
 2021
 2031
 2041
 2051
 2061
 2071
 2081
 2091
 2101
 2111
 2121
 2131
 2141
 2151
 2161
 2171
 2181
 2191
 2201
 2211
 2221
 2231
 2241
 2251
 2261
 2271
 2281
 2291
 2301
 2311
 2321
 2331
 2341
 2351
 2361
 2371
 2381
 2391
 2401
 2411
 2421
 2431
 2441
 2451
 2461
 2471
 2481
 2491
 2501
 2511
 2521
 2531
 2541
 2551
 2561
 2571
 2581
 2591
 2601
 2611
 2621
 2631
 2641
 2651
 2661
 2671
 2681
 2691
 2701
 2711
 2721
 2731
 2741
 2751
 2761
 2771
 2781
 2791
 2801
 2811
 2821
 2831
 2841
 2851
 2861
 2871
 2881
 2891
 2901
 2911
 2921
 2931
 2941
 2951
 2961
 2971
 2981
 2991
 3001
 3011
 3021
 3031
 3041
 3051
 3061
 3071
 3081
 3091
 3101
 3111
 3121
 3131
 3141
 3151
 3161
 3171
 3181
 3191
 3201
 3211
 3221
 3231
 3241
 3251
 3261
 3271
 3281
 3291
 3301
 3311
 3321
 3331
 3341
 3351
 3361
 3371
 3381
 3391
 3401
 3411
 3421
 3431
 3441
 3451
 3461
 3471
 3481
 3491
 3501
 3511
 3521
 3531
 3541
 3551
 3561
 3571
 3581
 3591
 3601
 3611
 3621
 3631
 3641
 3651
 3661
 3671
 3681
 3691
 3701
 3711
 3721
 3731
 3741
 3751
 3761
 3771
 3781
 3791
 3801
 3811
 3821
 3831
 3841
 3851
 3861
 3871
 3881
 3891
 3901
 3911
 3921
 3931
 3941
 3951
 3961
 3971
 3981
 3991
 4001
 4011
 4021
 4031
 4041
 4051
 4061
 4071
 4081
 4091
 4101
 4111
 4121
 4131
 4141
 4151
 4161
 4171
 4181
 4191
 4201
 4211
 4221
 4231
 4241
 4251
 4261
 4271
 4281
 4291
 4301
 4311
 4321
 4331
 4341
 4351
 4361
 4371
 4381
 4391
 4401
 4411
 4421
 4431
 4441
 4451
 4461
 4471
 4481
 4491
 4501
 4511
 4521
 4531
 4541
 4551
 4561
 4571
 4581
 4591
 4601
 4611
 4621
 4631
 4641
 4651
 4661
 4671
 4681
 4691
 4701
 4711
 4721
 4731
 4741
 4751
 4761
 4771
 4781
 4791
 4801
 4811
 4821
 4831
 4841
 4851
 4861
 4871
 4881
 4891
 4901
 4911
 4921
 4931
 4941
 4951
 4961
 4971
 4981
 4991
 5001
 5011
 5021
 5031
 5041
 5051
 5061
 5071
 5081
 5091
 5101
 5111
 5121
 5131
 5141
 5151
 5161
 5171
 5181
 5191
 5201
 5211
 5221
 5231
 5241
 5251
 5261
 5271
 5281
 5291
 5301
 5311
 5321
 5331
 5341
 5351
 5361
 5371
 5381
 5391
 5401
 5411
 5421
 5431
 5441
 5451
 5461
 5471
 5481
 5491
 5501
 5511
 5521
 5531
 5541
 5551
 5561
 5571
 5581
 5591
 5601
 5611
 5621
 5631
 5641
 5651
 5661
 5671
 5681
 5691
 5701
 5711
 5721
 5731
 5741
 5751
 5761
 5771
 5781
 5791
 5801
 5811
 5821
 5831
 5841
 5851
 5861
 5871
 5881
 5891
 5901
 5911
 5921
 5931
 5941
 5951
 5961
 5971
 5981
 5991
 6001
 6011
 6021
 6031
 6041
 6051
 6061
 6071
 6081
 6091
 6101
 6111
 6121
 6131
 6141
 6151
 6161
 6171
 6181
 6191
 6201
 6211
 6221
 6231
 6241
 6251
 6261
 6271
 6281
 6291
 6301
 6311
 6321
 6331
 6341
 6351
 6361
 6371
 6381
 6391
 6401
 6411
 6421
 6431
 6441
 6451
 6461
 6471
 6481
 6491
 6501
 6511
 6521
 6531
 6541
 6551
 6561
 6571
 6581
 6591
 6601
 6611
 6621
 6631
 6641
 6651
 6661
 6671
 6681
 6691
 6701
 6711
 6721
 6731
 6741
 6751
 6761
 6771
 6781
 6791
 6801
 6811
 6821
 6831
 6841
 6851
 6861
 6871
 6881
 6891
 6901
 6911
 6921
 6931
 6941
 6951
 6961
 6971
 6981
 6991
 7001
 7011
 7021
 7031
 7041
 7051
 7061
 7071
 7081
 7091
 7101
 7111
 7121
 7131
 7141
 7151
 7161
 7171
 7181
 7191
 7201
 7211
 7221
 7231
 7241
 7251
 7261
 7271
 7281
 7291
 7301
 7311
 7321
 7331
 7341
 7351
 7361
 7371
 7381
 7391
 7401
 7411
 7421
 7431
 7441
 7451
 7461
 7471
 7481
 7491
 7501
 7511
 7521
 7531
 7541
 7551
 7561
 7571
 7581
 7591
 7601
 7611
 7621
 7631
 7641
 7651
 7661
 7671
 7681
 7691
 7701
 7711
 7721
 7731
 7741
 7751
 7761
 7771
 7781
 7791
 7801
 7811
 7821
 7831
 7841
 7851
 7861
 7871
 7881
 7891
 7901
 7911
 7921
 7931
 7941
 7951
 7961
 7971
 7981
 7991
 8001
 8011
 8021
 8031
 8041
 8051
 8061
 8071
 8081
 8091
 8101
 8111
 8121
 8131
 8141
 8151
 8161
 8171
 8181
 8191
 8201
 8211
 8221
 8231
 8241
 8251
 8261
 8271
 8281
 8291
 8301
 8311
 8321
 8331
 8341
 8351
 8361
 8371
 8381
 8391
 8401
 8411
 8421
 8431
 8441
 8451
 8461
 8471
 8481
 8491
 8501
 8511
 8521
 8531
 8541
 8551
 8561
 8571
 8581
 8591
 8601
 8611
 8621
 8631
 8641
 8651
 8661
 8671
 8681
 8691
 8701
 8711
 8721
 8731
 8741
 8751
 8761
 8771
 8781
 8791
 8801
 8811
 8821
 8831
 8841
 8851
 8861
 8871
 8881
 8891
 8901
 8911
 8921
 8931
 8941
 8951
 8961
 8971
 8981
 8991
 9001
 9011
 9021
 9031
 9041
 9051
 9061
 9071
 9081
 9091
 9101
 9111
 9121
 9131
 9141
 9151
 9161
 9171
 9181
 9191
 9201
 9211
 9221
 9231
 9241
 9251
 9261
 9271
 9281
 9291
 9301
 9311
 9321
 9331
 9341
 9351
 9361
 9371
 9381
 9391
 9401
 9411
 9421
 9431
 9441
 9451
 9461
 9471
 9481
 9491
 9501
 9511
 9521
 9531
 9541
 9551
 9561
 9571
 9581
 9591
 9601
 9611
 9621
 9631
 9641
 9651
 9661
 9671
 9681
 9691
 9701
 9711
 9721
 9731
 9741
 9751
 9761
 9771
 9781
 9791
 9801
 9811
 9821
 9831
 9841
 9851
 9861
 9871
 9881
 9891
 9901
 9911
 9921
 9931
 9941
 9951
 9961
 9971
 9981
 9991
 10001
 10011
 10021
 10031
 10041
 10051
 10061
 10071
 10081
 10091
 10101
 10111
 10121
 10131
 10141
 10151
 10161
 10171
 10181
 10191
 10201
 10211
 10221
 10231
 10241
 10251
 10261
 10271
 10281
 10291
 10301
 10311
 10321
 10331
 10341
 10351
 10361
 10371
 10381
 10391
 10401
 10411
 10421
 10431
 10441
 10451
 10461
 10471
 10481
 10491
 10501
 10511
 10521
 10531
 10541
 10551
 10561
 10571
 10581
 10591
 10601
 10611
 10621
 10631
 10641
 10651
 10661
 10671
 10681
 10691
 10701
 10711
 10721
 10731
 10741
 10751
 10761
 10771
 10781
 10791
 10801
 10811
 10821
 10831
 10841
 10851
 10861
 10871
 10881
 10891
 10901
 10911
 10921
 10931
 10941
 10951
 10961
 10971
 10981
 10991
 11001
 11011
 11021
 11031
 11041
 11051
 11061
 11071
 11081
 11091
 11101
 11111
 11121
 11131
 11141
 11151
 11161
 11171
 11181
 11191
 11201
 11211
 11221
 11231
 11241
 11251
 11261
 11271
 11281
 11291
 11301
 11311
 11321
 11331
 11341
 11351
 11361
 11371
 11381
 11391
 11401
 11411
 11421
 11431
 11441
 11451
 11461
 11471
 11481
 11491
 11501
 11511
 11521
 11531
 11541
 11551
 11561
 11571
 11581
 11591
 11601
 11611
 11621
 11631
 11641
 11651
 11661
 11671
 11681
 11691
 11701
 11711
 11721
 11731
 11741
 11751
 11761
 11771
 11781
 11791
 11801
 11811
 11821
 11831
 11841
 11851
 11861
 11871
 11881
 11891
 11901
 11911
 11921
 11931
 11941
 11951
 11961
 11971
 11981
 11991
 12001
 12011
 12021
 12031
 12041
 12051
 12061
 12071
 12081
 12091
 12101
 12111
 12121
 12131
 12141
 12151
 12161
 12171
 12181
 12191
 12201
 12211
 12221
 12231
 12241
 12251
 12261
 12271
 12281
 12291
 12301
 12311
 12321
 12331
 12341
 12351
 12361
 12371
 12381
 12391
 12401
 12411
 12421
 12431
 12441
 12451
 12461
 12471
 12481
 12491
 12501
 12511
 12521
 12531
 12541
 12551
 12561
 12571
 12581
 12591
 12601
 12611
 12621
 12631
 12641
 12651
 12661
 12671
 12681
 12691
 12701
 12711
 12721
 12731
 12741
 12751
 12761
 12771
 12781
 12791
 12801
 12811
 12821
 12831
 12841
 12851
 12861
 12871
 12881
 12891
 12901
 12911
 12921
 12931
 12941
 12951
 12961
 12971
 12981
 12991
 13001
 13011
 13021
 13031
 13041
 13051
 13061
 13071
 13081
 13091
 13101
 13111
 13121
 13131
 13141
 13151
 13161
 13171
 13181
 13191
 13201
 13211
 13221
 13231
 13241
 13251
 13261
 13271
 13281
 13291
 13301
 13311
 13321
 13331
 13341
 13351
 13361
 13371
 13381
 13391
 13401
 13411
 13421
 13431
 13441
 13451
 13461
 13471
 13481
 13491
 13501

1251
 AAA GAT GAA TTT TTA GAA TTG GGT TTA GGC TAT CAG CTC TAC AGC TTA GCG GAC ATG AAA
 K I E F L E L A L G Y Q L Y S L A D M K
 1321
 CAA GCG GGC GAT TTG TTA GAA AGS ATT AGG GGT ATT AGA AAA AAG ATA GCG AGC GAT TAT
 Q G G D L L E R I R S I R E H I A S D Y
 1381
 GGT TTT TTG ATG CTT CAA ATT AGG ATT AGG GAT ATT TTA CAA CTC CCG CCA AGC GAT TAT
 G P L M P Q I R I R D N L Q L P P T H Y
 1441
 GAA ATC AAG CTT AAG GGC ATT GGT ATT GGT GAA GGC ATG GTG ATC CCG GAT AAG TTT TTA
 E I K L N G I V I G E G H V M P D E F L
 1501
 GCG ATG ATT ACC GGT TTT GTG AAT AAA GAA ATT GAA GCG ATT CTT ACT AAA GAG CCG GCT
 A M N T G P V N K S I H G I P T K E F A
 1561
 TTT GGA ATG GAC GCT TTA TGG GTT GAA ACT AAA AAT AAA GAA GAA GCG ATC ATT CAA GCG
 F G M D A L N I E T E H R E E R I I Q G
 1621
 TAC ACC ATT ATT GAT CTA AGC ACC GGT ATT GCG ATG CAC ACC AGC GAA TTA GTG AAA AAA
 Y F X I D P E T V E A T S T S E L V K K
 1681
 TAC GGT GAA GAT TTT ATT ACT AAA GAT GAA GTG AAA TCT CAT TTA GAG CCG TTG GCG AAA
 Y A E D P Y T K D E V R S L L E R L R K
 1741/181
 GAC TAT CCG AGC ATT GAA GAA GAG GGT AAA AAT ATC CCG ACC GGT GCG ATC CAA TTA GTC
 S Y P T X V E E S K H I P T G A I R S V
 1801
 TTG CAA GCG TTG TTG CAT GAA AAA ATC CCG ATT AAA CAC ATG CTC ACT ATT TTA GAA AGC
 L Q A L L S E K I P I K D N L T I L E T
 1861
 ATT ACC GAT ATT GCG CTA TTA GTT CAA AAG GAT GCG AAT ATC TTA ACC GAA CAA GTG AGC
 I T D I A F L V Q N D V N T L T E Q V R
 1921
 GCG AGC CTT TCT AGG GTG ATC ACT AAC GCT TTT AAA TCT GAA GAC GCG CTT TTG AAA TTT
 A R L S R V I T N A P K S E D G R L K F
 1981
 TTA ACC TTT TCT ACC GAT AGC GAA CAA TTT TTG CTT AAT AAA TTG CAA GAA AAT GCG ACT
 L F F S T D S E Q F L L M K L R E N G S
 2041
 TCT AAG AGC CTA CTA CTC AAT GTG GCG GAA TTG CAA AAA CTC ATT GAA GCG GTT TCT GAA
 S K S L L L N Y G E L D K L I E A V S E
 2101
 GAG GCG ATG AAA GTG TTG CAA AAA GCG ATC GGT CCG GTG ATG TTG ATC CTA GAG CTT AAT
 E A M K V L Q K G I A E V I L I V E F H
 2161
 TTA AAG AAA GCG CTT TCT AAT CAA ATG GAG CAG GCT AGC ATT GAT GAA ATC GTG CTA AGC
 L R K A L S N Q N E D A R I D V I V L S
 2221
 CAT GCT GAA TTA GAT CTT AAC TCT AAT TTT GAA GCG TTA GCG AGC ATC CAT ATT AAC TTT
 H A E L D P N N N P E A L S T I H I M F
 2281
 TTA GCG AAT AAT AAT TTA TTA AAA AGG AAG ATG ATG CAA GTT TAT CAC CTT TTA CAC ATT
 2341
 GAT TTA GAC GGC TAT GCA TGC CAG CTT GTT TTA AAA CAA TTT TTT AAA AAT ATC CAA TGC
 2401
 TAT AAC GCT AAT TAC GCG GCT GAA GTT TTA GCG AAG ATT TAT GAG ATT TTA AAC GCG ATC
 2461
 GGT CAA TCT AAA GAG AAT GAA TTC CTT ATT TTG ATT AGC EA

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a estirpe bacteriana recombinante é caracterizada por lhe faltar também a proteína do gancho de H. pylori.

4. Estirpes bacterianas recombinantes caracterizadas por serem obtidas por mutação, por substituição, adição e/ou

supressão de bases de um fragmento nucleotídico na sequência nucleotídica do gene flbA que participa na regulação da biossíntese das proteínas dos flagelos de H. pylori, hibridizando a dita sequência em condições severas com uma sonda correspondente a um fragmento de nucleótidos de H. pylori amplificado utilizando dois oligonucleótidos degenerados:

OLFlbA-1: ATGCCTCGAGGTCGAAAGCAAGATG e OLFlbA-2: GAAATCTTCATACTGGCAGCTCCAGTC, e em que a dita mutação é tal que ou o gene flbA deixa de ser expresso na dita estirpe bacteriana recombinante, ou o gene flbA não permite a síntese dos flagelos de H. Pylori, sendo a dita mutação efectuada na estirpe N6 depositada no NCIMB a 26 de Junho de 1992 com o número NCIMB 40512.

5. Estirpe bacteriana recombinante de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por ser a estirpe N6flbA-, depositada na NCIMB a 30 de Junho de 1952 com o NCIMB 40747.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 em que a estirpe bacteriana é caracterizada por ser também mutada de modo a produzir uma urease atenuada, ou mesmo até deixar de produzir urease, consistindo a mutação, por exemplo, numa mutação da sequência nucleotídica de um ou vários genes escolhidos a partir dos genes ureA, ureB, ureC, ureD, ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI.

7. Estirpe bacteriana recombinante de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizada por ser também mutada de modo a produzir uma urease atenuada, ou mesmo até deixar de produzir urease, consistindo a mutação, por exemplo, numa mutação da sequência nucleotídica de um ou vários

genes escolhidos a partir dos genes ureA, ureB, ureC, ureD, ureE, ureF, ureG, ureH ou ureI.

8. Uso para a detecção in vitro de uma infecção por H. pylori numa amostra de fluido biológico retirado de um doente de um extracto bacteriano caracterizado por ser um extracto de uma estirpe bacteriana definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 6.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8 de um extracto bacteriano sendo o dito extracto caracterizado por ser obtido após uma extracção com N-Octil Glucosido.

10. Uso de acordo com a reivindicação 8 de um extracto bacteriano sendo o dito extracto caracterizado por ser obtido após uma extracção com PBS ou com glicina.

11. Extracto bacteriano, caracterizado por ser um extracto de estirpes bacterianas de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 5.

12. Extracto bacteriano de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por ser obtido após uma extracção com N-Octil glucosido.

13. Extracto bacteriano de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por ser obtido após uma extracção com PBS ou com glicina.

14. Método para a detecção in vitro de uma infecção com H. pylori numa amostra de um fluido biológico retirado de um doente, em particular numa amostra de soro, compreendendo os passos que consistem em:

-colocar a amostra testada em contacto com a estirpe bacteriana definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou com um extracto bacteriano definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 10,
- detecção de uma imunoreacção entre a dita estirpe bacteriana e anti-corpos dirigidos contra H. pylori presentes na amostra testada.

15. Uso para obter anticorpos contra H. pylori de uma estirpe bacteriana definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou de um extracto bacteriano definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, para a preparação de uma composição para vacina para obter anticorpos que protegem contra uma infecção por H. pylori.

17. Soro policlonal dirigido contra uma estirpe de H. pylori de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 5.

18. Uso para a detecção in vitro de uma infecção por H. pylori numa amostra biológica de uma composição compreendendo como princípio activo um soro policlonal obtido contra uma estirpe de H. pylori que possui um fenótipo aflagelado definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

19. Kit para o diagnóstico de anticorpos de doentes infectados com H. pylori, compreendendo uma estirpe bacteriana definida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou um extracto bacteriano definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, e

reagentes necessários para demonstrar uma reacção do tipo antigénio/anticorpo.

Lisboa, 27 de Janeiro de 2009

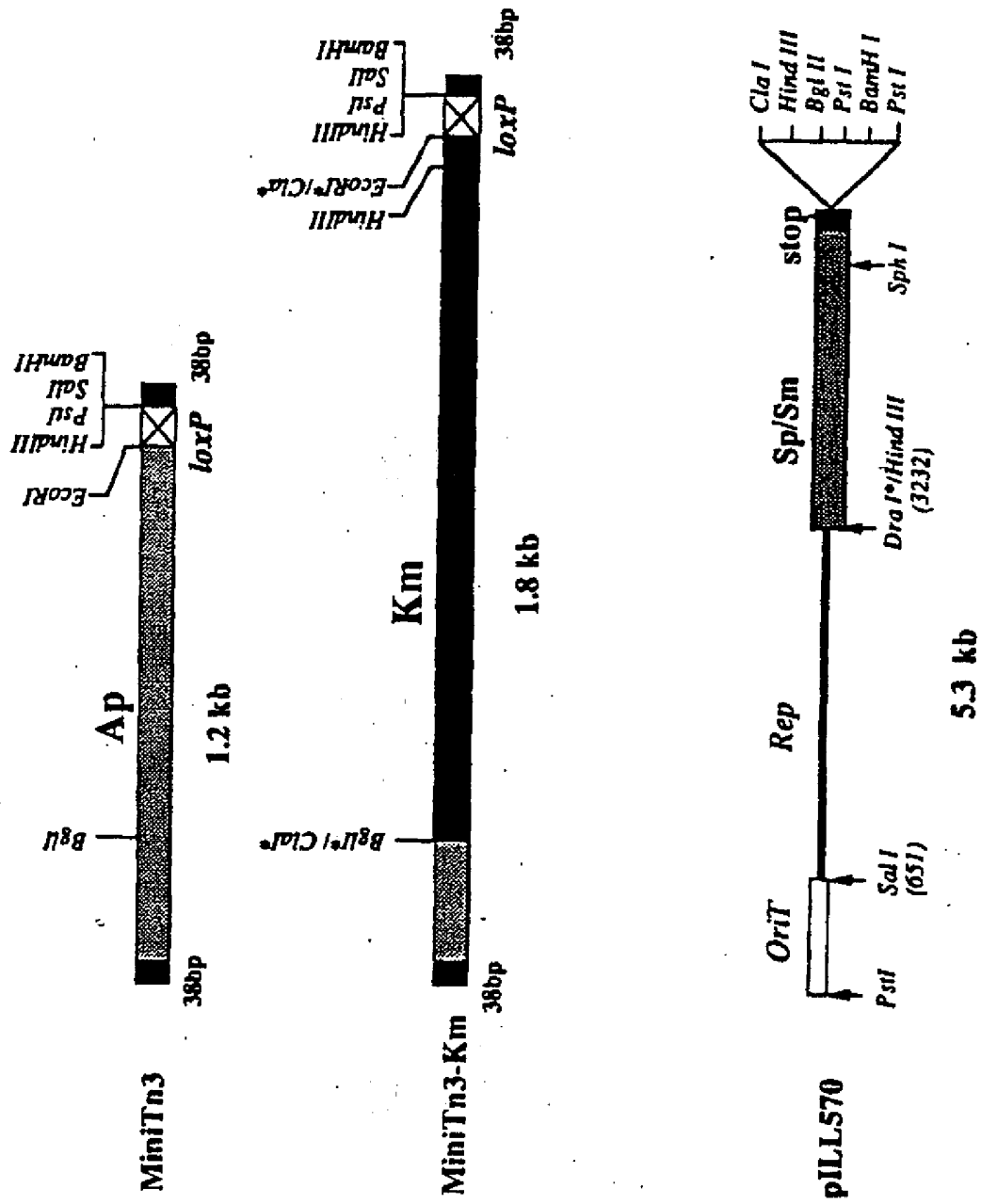


FIGURA 1A

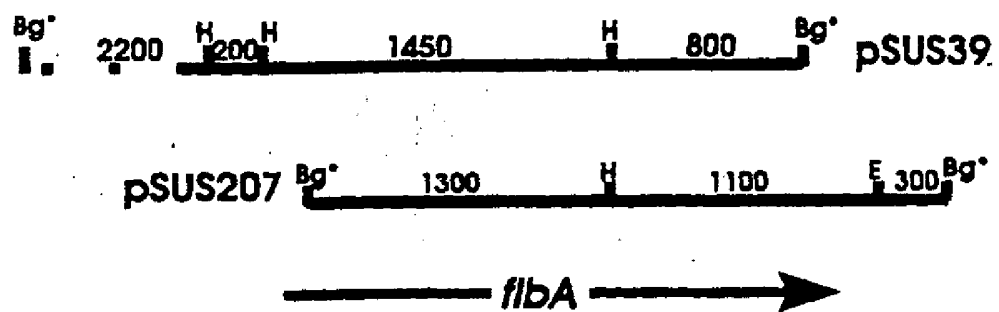


FIGURA 1B

1
 AGC TTT TTT GTG CCA TAC TTT TAA ACT TTA TAT TAT AAT AAG AGA CAA ACA CAC CTA CCA
 61
 AAA TTA AGG CAT TGA TTT TAG ATT ATG GCA AAC GAA CGC TCC AAA TTA GCT TTT AAA AAG
 121
 ACT TTC CCT GTC TTT AAA CGC TTC TTG CAA TCC AAA GAC TTA GCC CTT GTG GTC TTT GTG
 181
 ATA GCG ATT TTA GCG ATC ATT ATC GTG CCG TTA CCG CCT TTT GTG TTG GAT TTT TTA CTC
 241
 ACG ATT TCT ATC GCG CTA TCG GTG TTG ATT ATT TTA ATC GGG CTT TAT ATT GAC AAA CCG
 301
 ACT GAT TTT AGC GCT TTC CCC ACT TTA TTA CTC ATT GTA ACC TTA TAC CGC TTG GCT TTA
 361
 AAT GTC GCC ACC ACT AGA ATG ATT TTA ACC CAA GGC TAT AAA GGG CCT AGC GCG GTG AGC
 421
 ATT ATT ATC ACG GCG TTT GGG GAA TTT AGC GTG AGC GGG AAT TAT GTG ATT GGG GCT ATT
 481
 ATC TTT AGT ATT TTA GTG CTG GTG AAT TTA TTA GTG GTT ACT AAT GGT TCT ACT AGG GTT
 541
 ACT GAA GTT AGG GCG CGA TTT GCC CTA GAC GCT ATG CCA GGA AAG CAA ATG GCG ATT GAT
 601
 GCG GAT TTA AAT TCA GGG CTT ATT GAT GAT AAG GAA GCT AAA AAA CGG CGC GCC GCT CTA
 661
 AGC CAA GAA GCG GAT TTT TAT GGT GCG ATG GAT GGC GCG TCT AAA TTT GTC AAA GGC GAT
 721
 GCG ATC GCT TCT ATC ATT ATC ACG CTT ATC AAT ATC ATT GGG GGT TTT TTA GTG GGC GTG
 781
 TTC CAA AGG GAT ATG AGC TTG AGC TTT AGT GCT AGC ACT TTC ACT ATC TTA ACC ATT GGC
 841
 GAT GGG CTT GTA GGG CAA ATC CCT GCC TTA ATC ATT GCG ACA CGG ACC GGT ATT GTC GCC
 901
 ACT CGC ACC ACG CAA AAC GAA GAA GAG GAC TTT GCT TCT AAG CTC ATC ACA CAG CTC ACC
 961
 AAT AAA AGC AAA ACT TTA GTG ATT GTG GGG GCG ATT TAT TGC TTT TGC ACC ATT CCT GGA
 1021
 CTC CCT ACC TTT TCT TTA GCG TTT GTA GGG GCT CTC TTT TTA TTC ATC GCA TGG CTG ATT
 1081
 AGC AGG GAG GGA AAG GAC GGG TTG CTC ACT AAA TTA GAA AAT TAT TTG AGT CAA AAA TTC
 1141
 GGC TTG GAT TTG AGC GAA AAA CCC CAC AGC TCC AAA ATC AAA CCC CAC GCC CCC ACC ACA
 1201
 AGG GCT AAA ACC CAA GAA GAG ATT AAA AGA GAA GAA GAG CAA GCC ATT GAT GAA GTG TTA
 1261
 R A K T Q E E I K R E E E Q A I D E V L

FIGURA 2A

1261 AAA ATT GAA TTT TTA GAA TTG GCT TTA GGC TAT CAG CTC TAC AGC TTA GCG GAC ATG AAA
 K I E F L E L A L G Y Q L Y S L A D M K
 1321 CAA GGG GGC GAT TTG TTA GAA AGG ATT AGG GGT ATT AGA AAA AAG ATA GCG AGC GAT TAT
 Q G G D L L E R I R G I R K K I A S D Y
 1381 GGT TTT TTG ATG CCT CAA ATT AGG ATT AGG GAT AAT TTA CAA CTC CCC CCA ACG CAT TAT
 G F L M P Q I R I R D N L Q L P P T H Y
 1441 GAA ATC AAG CTT AAG GGC ATT GTG ATT GGT GAA GGC ATG GTG ATG CCG GAT AAG TTT TTA
 E I K L K G I V I G E G M V M P D K F L
 1501 GCC ATG AAT ACC GGT TTT GTG AAT AAA GAA ATT GAA GGC ATT CCT ACT AAA GAG CCG GCT
 A M N T G P V N K E I E G I P T K E P A
 1561 TTT GGA ATG GAC GCT TTA TGG ATT GAA ACT AAA AAT AAA GAA GAA GCC ATC ATT CAA GGC
 F G M D A L W I E T K N K E E A I I Q G
 1621 TAT ACC ATT ATT GAT CCA AGC ACC GTT ATT GCG ACG CAC ACC AGC GAA TTA GTG AAA AAA
 Y T I I D P S T V I A T H T S E L V K K
 1681 TAC GCT GAA GAT TTT ATC ACT AAA GAT GAA GTG AAA TCC CTT TTA GAG CGC TTG GCC AAA
 Y A E D F I T K D E V K S L L E R L A K
 1741/581 GAC TAT CCT ACG ATT GTA GAA GAG AGT AAA AAA ATC CCC ACC GGT GCG ATC CGA TCA GTC
 D Y P T I V E E S K K I P T G A I R S V
 1801 TTG CAA GCC TTG TTG CAT GAA AAA ATC CCC ATT AAA GAC ATG CTC ACT ATT TTA GAA ACG
 L Q A L L H E K I P I K D M L T I L E T
 1861 ATT ACC GAT ATT GCG CCA TTA GTT CAA AAC GAT GTG AAT ATC TTA ACC GAA CAA GTG AGG
 I T D I A P L V Q N D V N I L T E Q V R
 1921 GCG AGG CTT TCT AGG GTG ATC ACT AAC GCT TTT AAA TCT GAA GAC GGG CGT TTG AAA TTT
 A R L S R V I T N A F K S E D G R L K F
 1981 TTA ACC TTT TCT ACC GAT AGC GAA CAA TTT TTG CTT AAT AAA TTG CGA GAA AAT GGC ACT
 L T F S T D S E Q F L L N K L R E N G T
 2041 TCT AAG AGC CTA CTA CTC AAT GTG GGC GAA TTG CAA AAA CTC ATT GAA GCG GTC TCT GAA
 S K S L L L N V G E L Q K L I E A V S E
 2101 GAG GCC ATG AAA GTC TTG CAA AAA GGG ATC GCT CCG GTG ATT TTG ATC GTA GAG CCT AAT
 E A M K V L Q K G I A P V I L I V E P N
 2161 TTA AGA AAA GCC CTT TCT AAT CAA ATG GAG CAG GCT AGG ATT GAT GTA ATC GTG CTA AGC
 L R K A L S N Q M E Q A R I D V I V L S
 2221 CAT GCT GAA TTA GAT CCT AAC TCT AAT TTT GAA GCC TTA GGC ACG ATC CAT ATT AAC TTT
 H A E L D P N S N F E A L G T I H I N F
 2281 TAA GGG ATA AAT AAT TGA TAA AAA AGG AGA ATG ATG CAA GTT TAT CAC CTT TCA CAC ATT
 *
 2341 GAT TTA GAC GGC TAT GCA TGC CAG CTT GTT TCA AAA CAA TTT TTT AAA AAT ATC CAA TGC
 2401 TAT AAC GCT AAT TAC GGG CGT GAA GTC TCA GCG AGA ATT TAT GAG ATT TTA AAC GCG ATC
 2461 GCT CAA TCT AAA GAG AGT GAA TTC CTT ATT TTG ATT AGC GA
 1291 TAT CAG CTC TAC AGC TTA GCG GAC ATG AAA
 Y Q L Y S L A D M K
 1351 GGT ATT AGA AAA AAG ATA GCG AGC GAT TAT
 G I R K K I A S D Y
 1411 GAT AAT TTA CAA CTC CCC CCA ACG CAT TAT
 D N L Q L P P T H Y
 1471 GAA GGC ATG GTG ATG CCG GAT AAG TTT TTA
 E G M V M P D K F L
 1531 ATT GAA GGC ATT CCT ACT AAA GAG CCG GCT
 I E G I P T K E P A
 1591 AAA AAT AAA GAA GAA GCC ATC ATT CAA GGC
 K N K E E A I I Q G
 1651 GCG ACG CAC ACC AGC GAA TTA GTG AAA AAA
 A T H T S E L V K K
 1711 GTG AAA TCC CTT TTA GAG CGC TTG GCC AAA
 V K S L L E R L A K
 1771 AAA ATC CCC ACC GGT GCG ATC CGA TCA GTC
 K I P T G A I R S V
 1831 ATT AAA GAC ATG CTC ACT ATT TTA GAA ACG
 I K D M L T I L E T
 1891 GAT GTG AAT ATC TTA ACC GAA CAA GTG AGG
 D V N I L T E Q V R
 1951 TTT AAA TCT GAA GAC GGG CGT TTG AAA TTT
 F K S E D G R L K F
 2011 TTG CTT AAT AAA TTG CGA GAA AAT GGC ACT
 L L N K L R E N G T
 2071 TTG CAA AAA CTC ATT GAA GCG GTC TCT GAA
 L Q K L I E A V S E
 2131 GCT CCG GTG ATT TTG ATC GTA GAG CCT AAT
 A P V I L I V E P N
 2191 CAG GCT AGG ATT GAT GTA ATC GTG CTA AGC
 Q A R I D V I V L S
 2251 GAA GCC TTA GGC ACG ATC CAT ATT AAC TTT
 E A L G T I H I N F
 2311 ATG ATG CAA GTT TAT CAC CTT TCA CAC ATT
 2371 TCA AAA CAA TTT TTT AAA AAT ATC CAA TGC
 2431 GCG AGA ATT TAT GAG ATT TTA AAC GCG ATC
 2491

FIGURA 2B

1 MANERS-KLAFKKTFFPVFKRFLQSKDLALVVFVIAILAIIVPLPPFVLDFFLLTISIALS HpFlba
 1 MAKNKIVDLVFPFLGPLIAPVLKAKSLTIVGFLVCILAIIVPLPSPILDFFLALSIALS CjFlba
 1 MADAAAPNASSMPSAKSLLDGLMRGEMGLALGVVGIIIVLLIIPVPAPLLDVLLAISLTGS CcFlbf
 1 -----MNPDLLEWLNRIKERKDIMLAVLLAVVFMVVLPLPPLVLDILIAVNMTIS YpLcrd
 1 -----MLLSLLNSARLRPELLILVLMVMIISMFVIPLPTYLVDFLIALNIVLA StInva
 1 -----MVMIIAMLIIPPTYLVDFLIGLNIVLA SfmXia

 60 VLIILIGLYIDKPTDFSAFPTLLIVTLRLALNVATTRMILTQGYKGPSAVSIIITAFG HpFlba
 61 VLIILISIIYIPKPTDLTTFPTLILIIITLFRLSLNIATTRMILSEGONGPEAVSEIIAAGF CjFlba
 61 VLIILMTAILIKKPLEFTSFPTVLLVTTLFRGLGLNIASRLILSHGOEGTGGAGAVIEAFG CcFlbf
 52 VLLLMIAIYINSPLQFSAFPAVLLVTTLFRLLSVSTTRMILLO-----ADAGQIVYTFG YpLcrd
 49 ILVFMGSFYIDRILSFSTFPVLLITTLFRLLSISTSRILILIEA-----DAGEIITAFG StInva
 29 ILVFMGSFYIERILSFSTFPVLLITTLFRLLSISTSRILILVDADRKG-----IITTFG SfmXia

 120 EFSVSGNYVIGAIIFSILVLVNLVVTNGSTRVTEVRARFALDAMPKGQMAIDADLNSSL HpFlba
 121 EFVVGGMVIGVIVFCILVLINFMVVTGSTRVSEVQARFTLDAMPKGQMAIDADLNAGL CjFlba
 121 HLMMQGNFVIGVIVFIIILIVNFMVVTGSGRIAEVAARFTLDAMPKGQMAIDADLSTGL CcFlbf
 107 NFVVGGNLIVGIVIFLIITIVQFLVITKGSERVAEVSARFSLDAMPKGQMSIDGDMRAGV YpLcrd
 104 QFVIGDSLAVGFVFSIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDAMPKGQMSIDADLKAGI StInva
 84 QFVIGDSLAVGFVFSIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDAMPKGQMSIDADLKAGI SfmXia

 180 IDDKEAKKRRALSQEADFYGAMDGASKFVKGDALASIIITLINIIGGFLVGVFORDMSL HpFlba
 181 IDEQTARARRQEVIAEAFNYGAMDGSSKFIKGDVAGIIITIIINIIGGFLIGSFQHDML CjFlba
 181 ISQDEAKIRKKELEQUESTFFGAMDGASKFVKGDALAGLIITAINIIGGIIIGVQHKMPF CcFlbf
 167 IDVNEARERRATIEKESQMFSGMDGAMKFVKGDALAGLIIFVNILGGVTIGVTQKGLAA YpLcrd
 164 IDADAARERRSVLERESQLYGSFDGAMKFVKGDALAGLIIFVNFIGGISVGMTRHGMDL StInva
 144 IDAAGAKERRSILERESQLYGSFDGAMKFVKGDALAGLIIFVNFIGGISVGMSSQHGMSL SfmXia

 240 SFSASTFTILTIGDGLVQIPALIIATRTGIVATRTTONEEDFASKLITQLTNKSRTL V HpFlba
 241 SDAASTYTILTIGDGLVSQIPGLITSTATAIITRASKDEENFAEGTLTQLLSEYRTLLI CjFlba
 241 GDAASTYTIMTIGDGLVSQIPALIIISIAAGMVVSKAGVEGSADKALTQOLAMPVGLGMV CcFlbf
 227 AEALQLYSILTVDGMVSVQVALLIAITAGIIVTRVSSDSSDLGSDIGKQVVAQPKAML YpLcrd
 224 SSALSTYTMILTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVTRVNGDTDN-MGRNIMTQLLNPFVLV StInva
 204 SGALSTYTILTIGDGLVSQIPALLISISAGFMLTRVNGSDSN-MGRNIMSQIFGNPFVLI SfmXia

 300 IVGAIYC-FCTIPGLPTFSLAFVGLFLFIANLISREGKDGLLTLENYLSQKFGDLSE HpFlba
 301 VGFVLF-I-FALVPGLPTLSLGFMAVFLSLGYLTQVKEGKI-----DITTVKSKSPSAA CjFlba
 301 SASSG-I-IALIPGMPIFFFAAMALA-----AGALAY CcFlbf
 287 IGGVLLLLFGLIPGFPTVTFLILALLVCGCGYMLSRKQSRNDEANQDLQSILTSGSGAPA YpLcrd
 283 VTAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVLVLFFYFKFREAKRSAAPKTSKGEQPLSIEEKE StInva
 263 VTSALALAIMPLPGFPFFVFFLIAVTLTALFYKKVVEKEKSLSESDDSSGYTG----- SfmXia

 359 KPHSSKIKPHAPTTRAKTQEEIKREEEQAIDEVLKIEFLELALGYQLYSLADMKGQGDLL HpFlba
 355 VASQSGAGGTAAAPAKKSEEEILKEEEHKINDILKVEILELELGYGLIKLAE-----NELT CjFlba
 331 KRVQDAKKPKALDPADLEAAAPSEPEEPISASLAIDDVKIELGYGLLTINDLDGRKLT CcFlbf
 347 ARTKAKTSGANKGRLGEQEAFAFMTVPLLIDVDS-----SQQEALEANALN YpLcrd
 343 GSSLGLIGDLDKVSTE-----TVPLILLVPKSRREDLEKA StInva
 316 -----TFDIDNTHDSSLAMIENLDRISSETVPLILLFAENKINANDME SfmXia

FIGURA 3A

419 ERIRGIRKKIASDYGFLLMPQIRIRDNLQLPPTHYEIKLKGIVIGEGMVMPDKFLAMNTGF HpFlba
 411 ERIRSMRRSIAESLGFLMPKIRIRDNLRLKPNESFKLKGVSIAEAIYPDKYLAMDSGF CjFlba
 391 DQIRALRKTLESEYGFVMPVVRILDMRLANQGYAIRIKEMEAGAGEVRLGCLMCMDFRG CcFlbf
 392 DELVRVRALYLDLGVPPFGIHLRFNEGMEGEYIISLQSVPVARGELKAGYLLVRESVS YpLcrD
 378 QLAERLRSQFFIDYGVRLPEVLLRDGEGLLDDNSIVLLINEIRVEQFTVYFD--LMRVVNY StInva
 359 GLIERIRSQFFIDYGVRLPTILYRTSNELKVDDIVLLINEVRADSFNIYFDKVCITDENG SfmXia

479 VNKEIEGIPTKEPAF--GMDALWIETKNKEEAIQGYTIIDPSTVIATHITSELVKKYAED HpFlba
 471 ITEEIEGIATKEPAF--NSDALWIDANLKDEATLNGYIVIDPASVISTHMSELIKAHASE CjFlba
 451 GQVELPGEHVREPAF--GLPATWIADDLREEATFRGYTVVDPATVLTTHLTEILKENMAD CcFlbf
 452 QLELLGIPYEKGEHLLPDQEAFFVSVVEEERLEKSQLEFFSHSQVLTWHLSHVLYREYAED YpLcrD
 436 SDEVVSFGINPTIHQQGSSQYFWVTHEEGEKLRELGYVLRNALDELYHCLAVTVARNVNE StInva
 419 DIDALGIPVSTS--YNERVISWVDVSYTENLTNIDAKIKSAQDEFYHQLSQALLNNINE SfmXia

537 FITKDEVKSLLERLAKDYPTIVEESK-KI-PTGAIRSVLQALLHEKIPKIDMLTILETIT HpFlba
 529 LLTRQEVONLLDKVKNDYPIIVEGAL-GVAPVSLIQKILKDLLKHHIPIKIDMLTILESVS CjFlba
 509 LLSYAEVQKLLKELPETQKLVDDLIPTGTATTQVRLQSLLRERVSIRDLPQILEGVG CcFlbf
 512 FIGIQETRYLLEQMEGGYGELIKEVQR-IVFLORMTEILQRLVGEDISIRNMRSILEAMV YpLcrD
 496 YFGIQETKMLDQLEAKFPDLLKEVLRH-ATVQRISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALA StInva
 477 IFGIQETKNMLDQFENRYPDLLKEVFRHV-TIQRISEVLQRLLGGENISVRNLKLIMESLA SfmXia

595 DIAPLVQNDVNILTEQVRARLSRVITNAFKSEDGRLKFLTFSTDSEQFLNLKLRENGTSK HpFlba
 588 DIAE-VSKSFDMIIEHVRA SLARMITNMYLDDKGNLDIPILDSASSAVLMENVQFRDGSY CjFlba
 569 EAAPHTA-SVTQVLEQVRARLARQLCWANRGDDGALPIITLSADWEQAFAEALIGPGDDK CcFlbf
 571 EWGQK-EKDVVQLTEYIRSSLKRYICYKYANGNNILPAYLFDQEEVKIRSGVRQTSAGS YpLcrD
 555 LWAPR-EKDVINLVEHIRGAMARYICHKF-ANGGELRAVMVSAEVEDVIRKGIQTSGST StInva
 536 LWAPR-EKDVITLVEHVRA SLRSYICK-IAVSGEIKVVMVLSGYIEDAIRKGIQTSGGS SfmXia

655 SLLNVGELQKLI EAVSEEAMKV LQKGIAPVILIVEPNLRKALSNOEQARIDVIVLSHA HpFlba
 647 HPLSVAQTGTLVDTLRAEVA AVANGRIKPFILCVPOLRKFIADICYNFSINIVLSFA CjFlba
 628 QLALPPSRLQDFIRGVRDSFERAALAGEAPVLL-TSPGVPRPYVRSIIERFRGQTVVMSQN CcFlbf
 630 YLALEPAVTESLLEQVRKTIGDLSQIQSKP-VLIVSMDIRRYVRKLI ESEYYGLPVLSYQ YpLcrD
 613 FLSLDPEASANLMDLITLKLDDLLAH-KDLVLLTSVDVRRFIKKMIEGRFPDLEVLSPG StInva
 594 FLNMDIEVSDEVMTLAHALREL-RNAKKNFVLLVSVDIRRFVKRLIDNRFKSILVISYA SfmXia

715 ELDPNSNFEALGTI HINF HpFlba
 707 EIAENTNFNTEGIIRIEL CjFlba
 687 EIHPRARLKTVMV---- CcFlbf
 689 ELTQQINIQLGRICL-- YpLcrD
 672 EIASDKSVNVIKTI---- StInva
 653 EIDEAYTINVLT KI---- SfmXia

FIGURA 3B

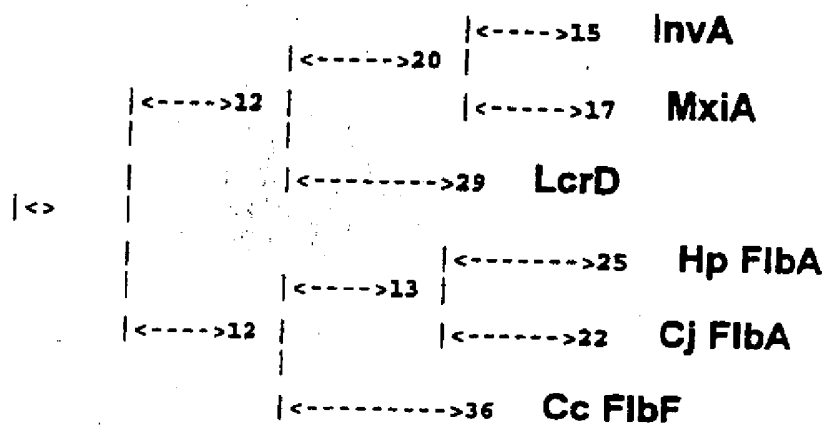


FIGURA 4

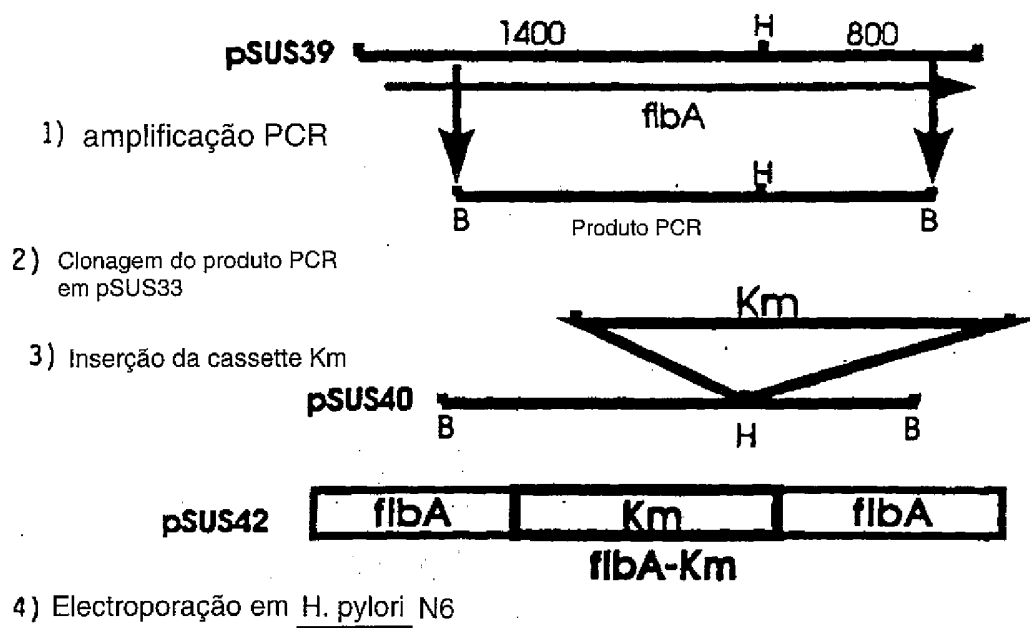


FIGURA 5

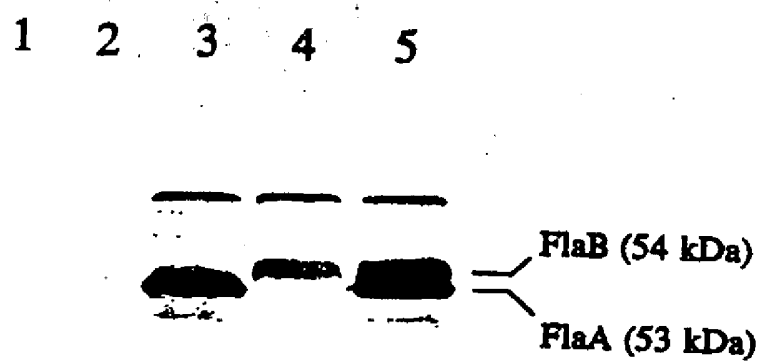


FIGURA 6

Repartição dos 300 soros FNTS em relação à estirpe aflagelada N6f1BA.
 Extração com N-Octil Glucosido

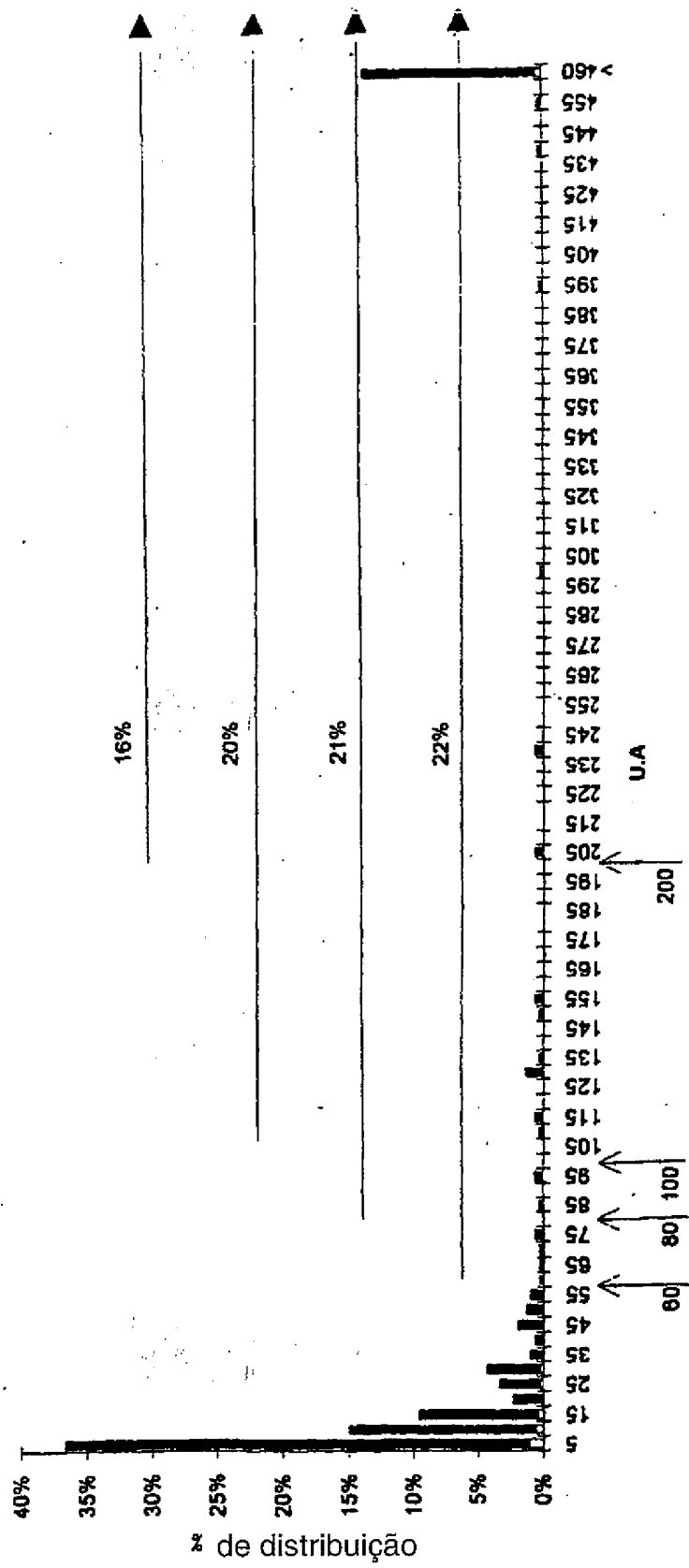


FIGURA 7

Repartição dos 300 soros FNTS em relação à estirpe flagelada N6
Extracção com N-Octil Glucosido

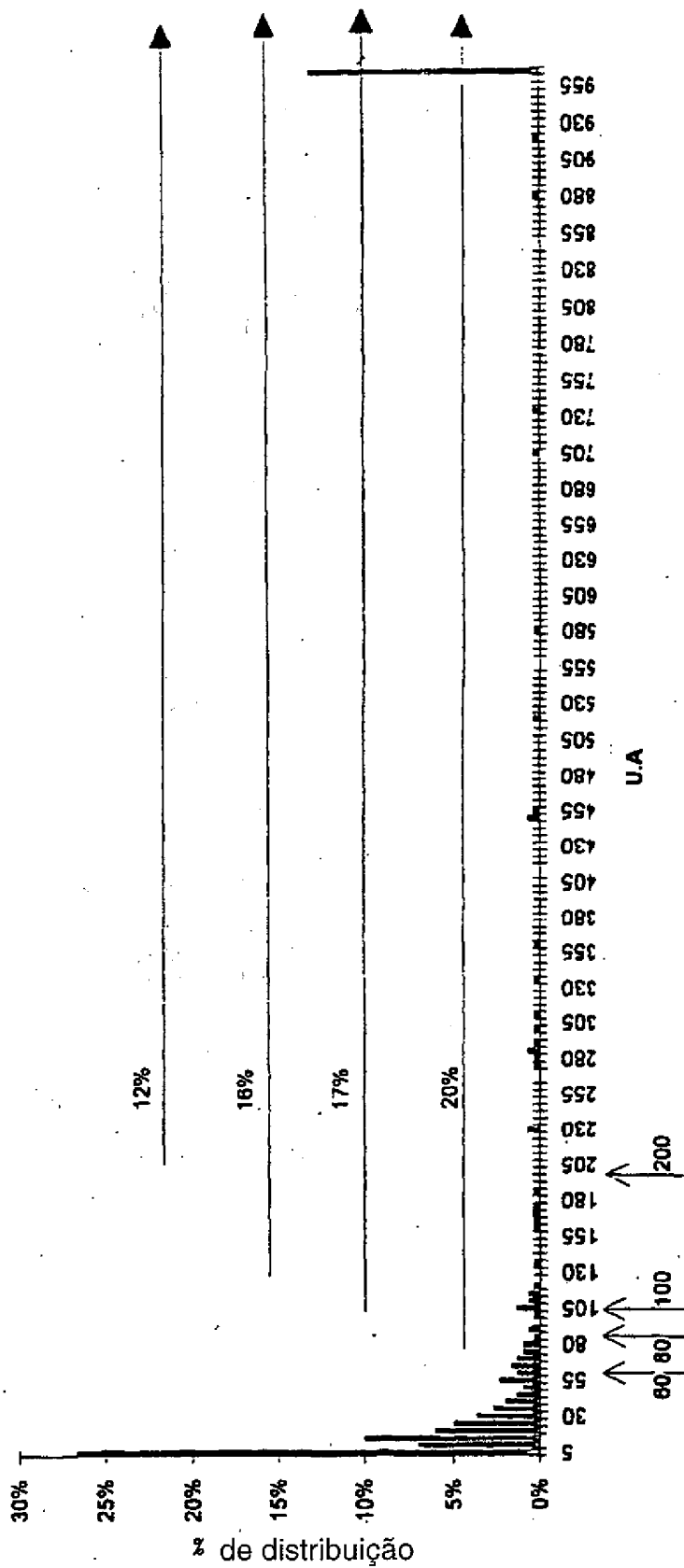


FIGURA 8

Repartição dos 300 soros FNTS em relação à estirpe aflagelada N6. F1BA
Extracção com PBS

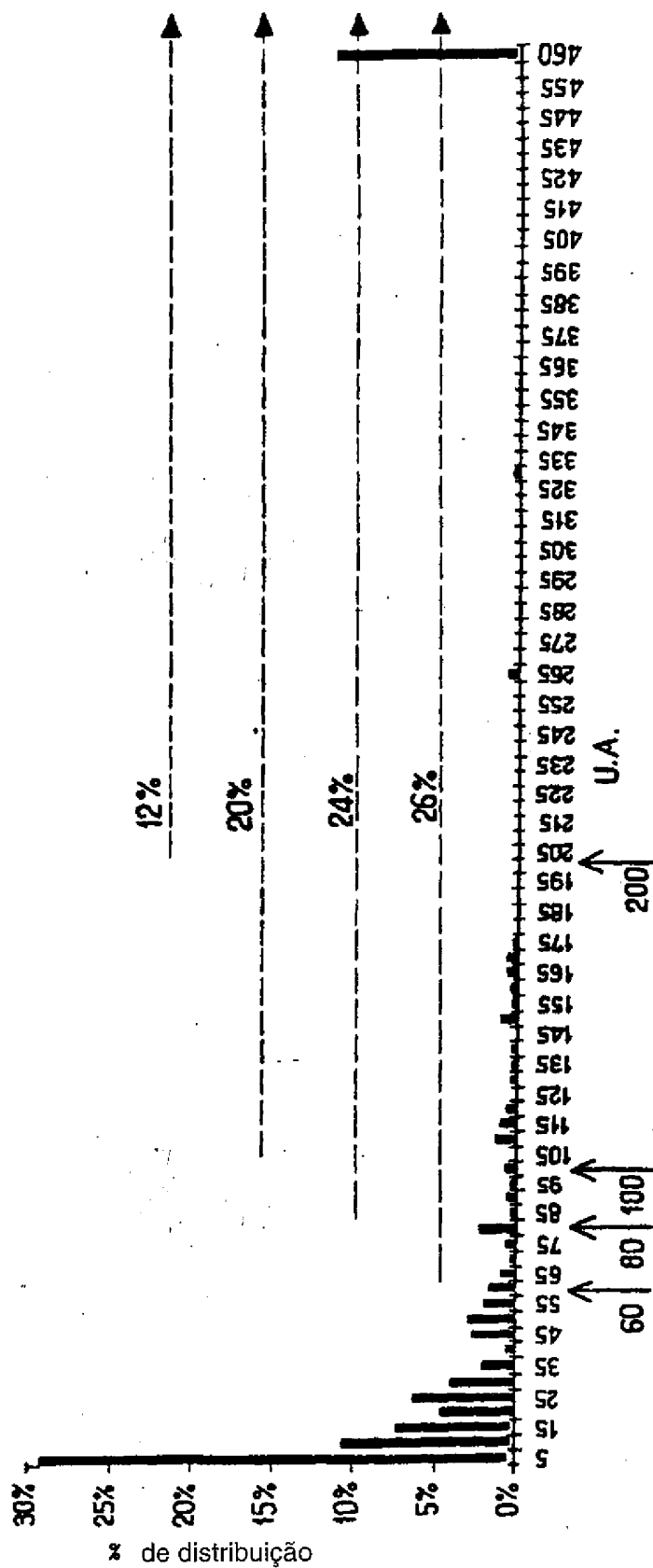


FIGURA 9

Prevalência de positividade em 43 soros FNTS

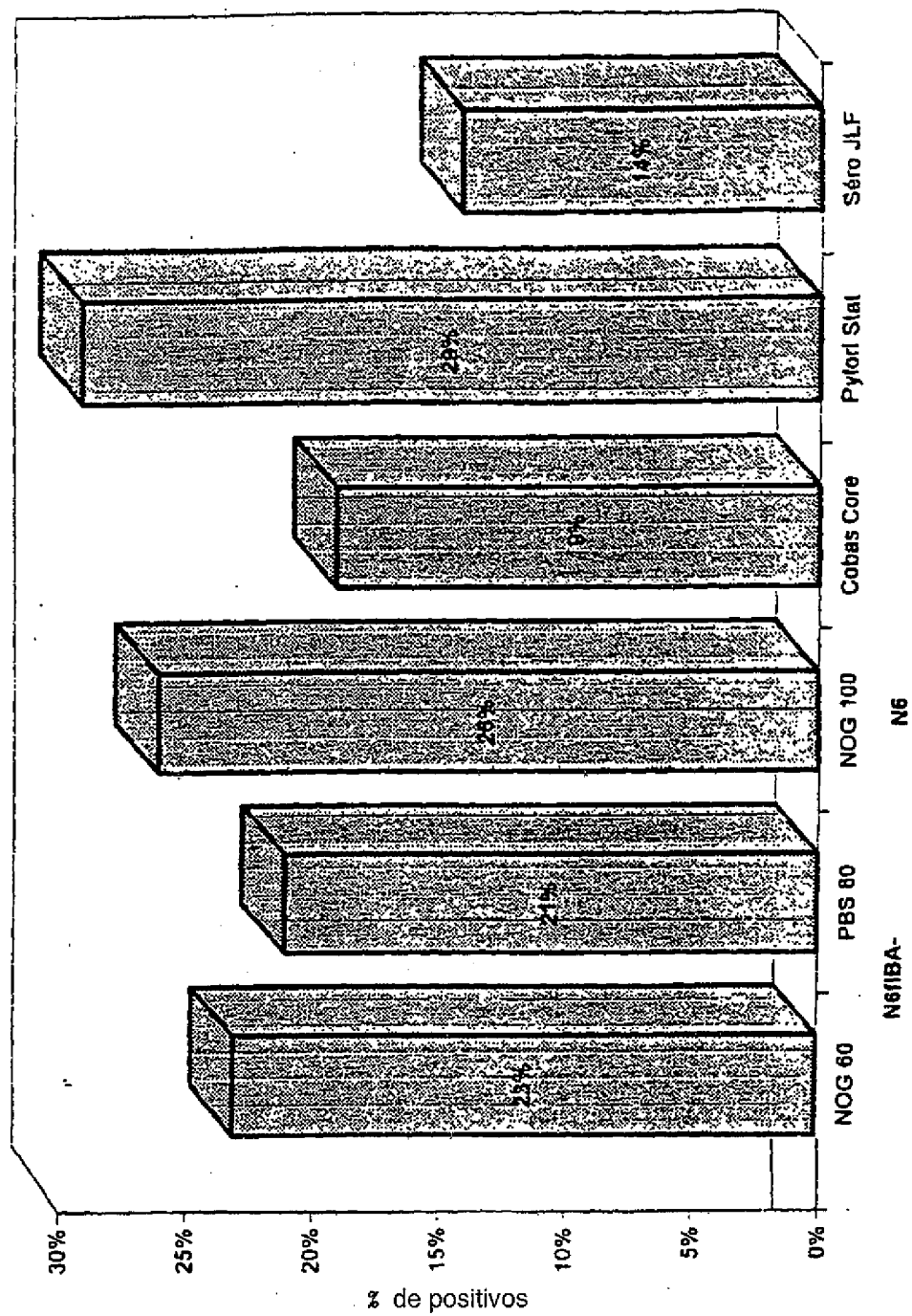


FIGURA 10

Curva ROC do extracto de N-Octil Glucosido de N6fIBA-

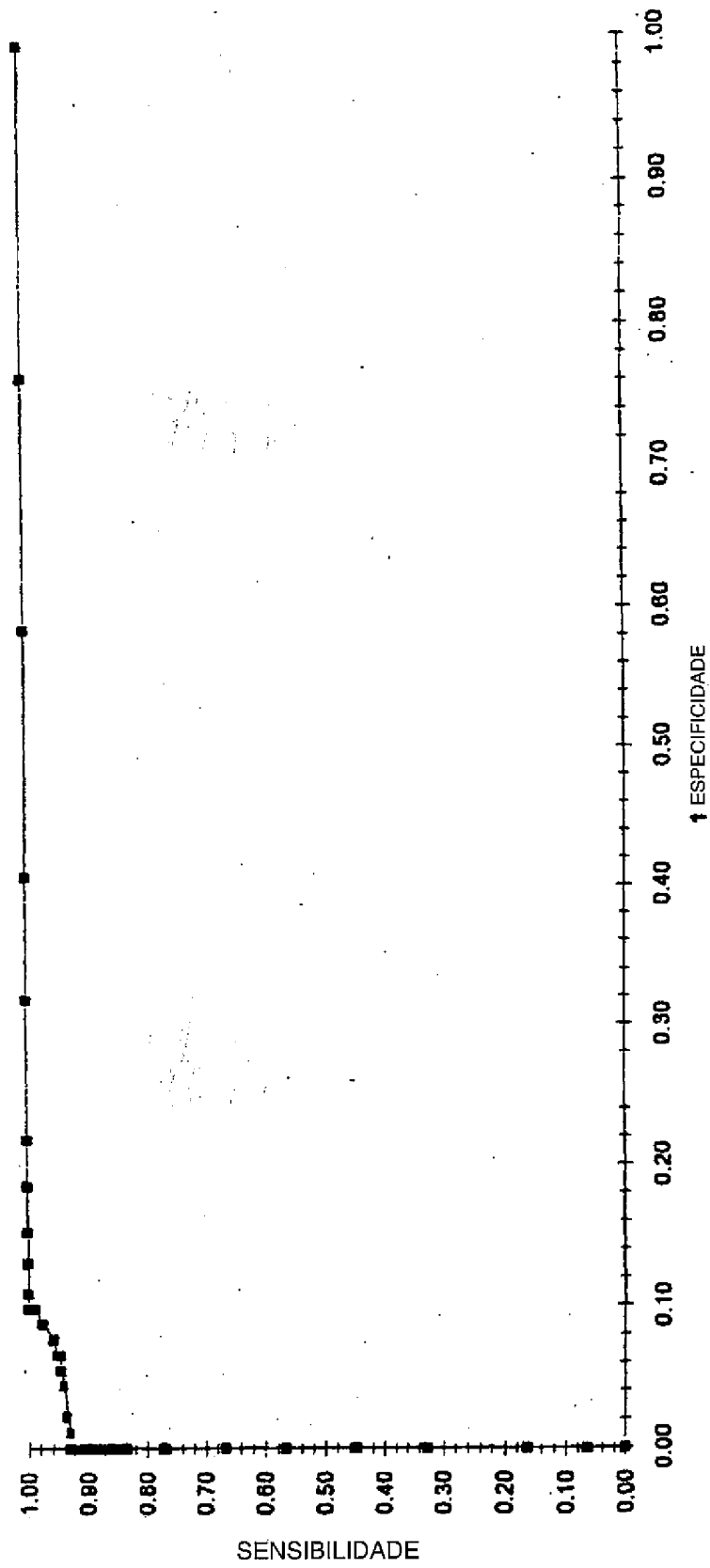
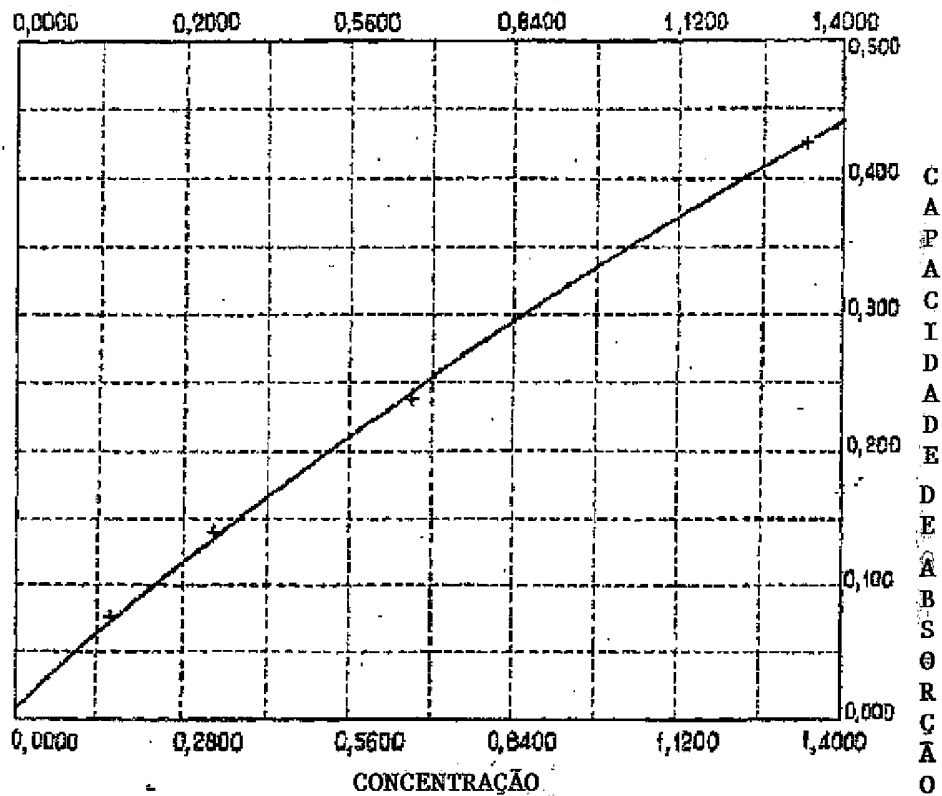


FIGURA 11

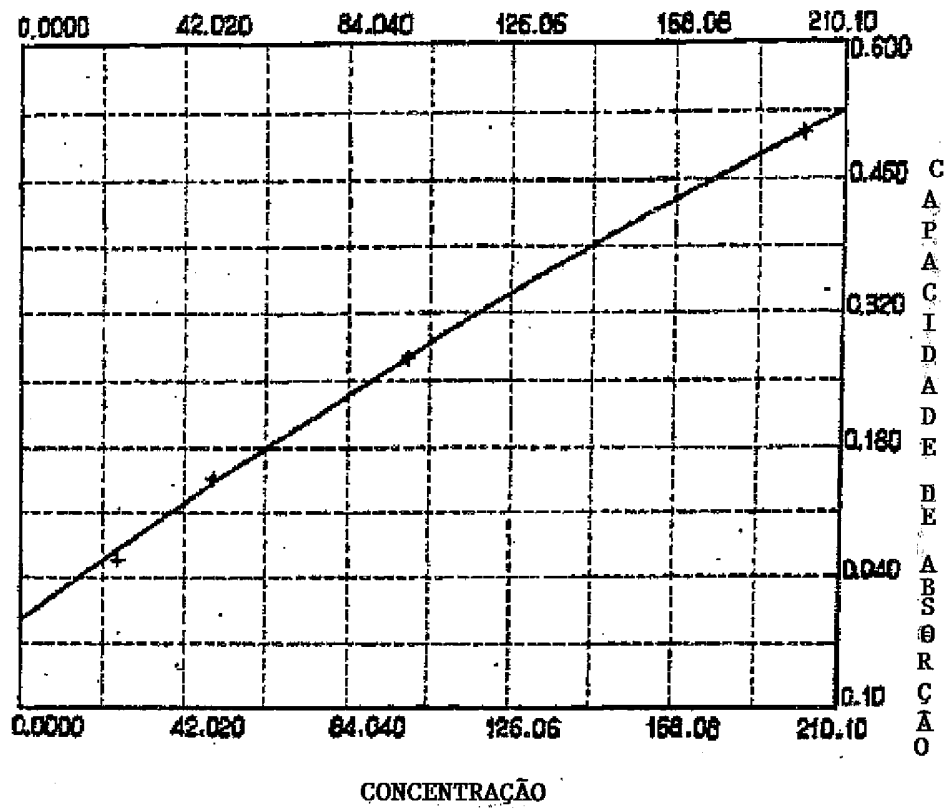
FIG. 12

QUANTIDADE II



Tipo de Extracto	DO a 750 nm	Concentração em mg/ml
Glicina (após centrifugação durante 15 min a 3000 g)	0,028	0,284
N-Octil Glucosido	0,087	1,004
Sobrenadante 1 (após 1ª lavagem com PBS)	0,059	0,844
Sobrenadante 2 (após 2ª lavagem com PBS)	0,015	0,1105

FIG. 13 (A)



Tipo de Extracto	DO a 760 nm	Concentração em µg/ml
<u>Glicina</u> (após centrifugação a 15 min. a 3000 g)	0,279	202,86
<u>N-Octil Glucosido</u>	0,243	873,99
<u>Sobrenadante 1</u> (após 1ª lavagem com PBS)	0,361	539,2
<u>Sobrenadante 2</u> (após 2ª lavagem com PBS)	0,218	77,875

Tipo de Extracto	DO a 760 nm	Concentração em µg/ml
<u>Resíduo de Glicina</u> (após centrifugação a 15 min. a 3000 g)	0,099	297,5
<u>Resíduo de Glicina</u> (após extracção)	0,093	2778,7
<u>Resíduo de N-Octil Glucosido</u> (após extracção)	0,275	972,0

Figura 13B