

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA SUSTENTÁVEL,
PORTÁTIL, RÁPIDA E NÃO INVASIVA ASSOCIADA À INTELIGÊNCIA
ARTIFICIAL PARA DETECÇÃO SALIVAR DE *Helicobacter pylori***

Ghabriel Honório da Silva

Uberlândia – MG
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA SUSTENTÁVEL,
PORTÁTIL, RÁPIDA E NÃO INVASIVA ASSOCIADA À INTELIGÊNCIA
ARTIFICIAL PARA DETECÇÃO SALIVAR DE *Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas (PPGIPA) como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre

Discente: Ghabriel Honório da Silva
Orientador: Robinson Sabino da Silva

Uberlândia – MG
2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2023	Silva, Ghabriel Honório da, 1998- DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA SUSTENTÁVEL, PORTÁTIL, RÁPIDA E NÃO INVASIVA ASSOCIADA À INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA DETECÇÃO SALIVAR DE Helicobacter pylori [recurso eletrônico] / Ghabriel Honório da Silva. - 2023. Orientador: Robinson Sabino da Silva. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.368 Inclui bibliografia. 1. Imunologia. I. Silva, Robinson Sabino da, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título. CDU: 612.017
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, nº 288 do PPGIPA				
Data:	trinta e um de julho de dois mil e vinte e três	Hora de início:	12:00	Hora de encerramento:	14:20
Matrícula do Discente:	12022IPA003				
Nome do Discente:	Ghabriel Honório da Silva				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de plataforma biofotônica sustentável, portátil, rápida e não invasiva associada à Inteligência Artificial para detecção salivar de <i>helicobacter pylori</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das Interações entre Patógenos e Seus Hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Bases Celulares e Moleculares da Resposta Imune em Doenças Infecto-Parasitárias e Crônico-Degenerativas em Humanos e Modelos Experimentais				

Reuniu-se, por video conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Rui Miguel Pinheiro Vitorino - Universidade de Aveiro (UA) - Portugal; Douglas Carvalho Caixeta - UFU/FAMED; Robinson Sabino da Silva - UFU/ICBIM/PPIPA (Presidente) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a).Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Douglas Carvalho Caixeta, Usuário Externo**, em 31/07/2023, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rui Miguel Pinheiro Vitorino, Usuário Externo**, em 31/07/2023, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4670323** e o código CRC **6BBC8794**.

*Dedico essa dissertação ao professor Dr. Luiz
Ricardo Goulart, o precursor deste projeto e meu
orientador inicial, que infelizmente fez sua
passagem no início da execução do trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, em específico aos meus pais, Neivaldo e Luciana, e aos meus irmãos, Vinícius e Wilker, pelo apoio, aprendizado, acolhimento, paciência e incentivo em todos esses anos. Sou, e sempre serei, eternamente grato pelo carinho, amor, compreensão, encaminhamentos e conselhos. Dedico esse trabalho completamente a eles, sendo isso o mínimo que posso fazer como retribuição do que foi feito por mim até hoje, essa conquista não é individualmente minha, essa vitória é o reconhecimento da dedicação de vocês para a minha formação. Essa vitória é nossa!

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (*in memoriam*), meu primeiro e eterno orientador nesse trabalho, que infelizmente nos deixou de maneira precoce em 2021, nos desdobramentos iniciais da execução do que apresento aqui. Luiz sou grato por todo o apoio e pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva pela orientação, confiança, apoio paciência e aprendizados adquiridos durante o convívio do meu curso de mestrado. Agradeço pelo acolhimento e apoio que tive do professor Robinson após o falecimento do professor Luiz.

Ao Prof. Dr. Murillo Carneiro e sua equipe pela parceria na execução dos algoritmos aplicados nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Thulio Marquez Cunha pelo suporte e empenho na elaboração e desse projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Martins e sua equipe do Laboratório de Ensaaios Antimicrobianos (LEA) pela parceria na execução do projeto, por meio do fornecimento e manutenção das culturas bacterianas.

A toda a equipe do Laboratório Nanobiotecnologia Dr. Luiz Ricardo Goulart, inicialmente ao Dr. Tafarel Andrade que me recebeu e me apresentou tecnologias do laboratório, as técnicas Dra. Luciana Bastos e Dra. Natássia Corrêa e a pós-doutoranda Dra. Fernanda Van Petten, por todo apoio durante o meu período do curso e nos momentos de afastamento iniciais do professor Luiz. Cultivei várias amizades nos 3 anos de convívio que tive com a equipe do laboratório e agradeço a todos que me apoiaram e me proporcionaram momentos de risadas e descontração, aliviando assim a tensão e o cansaço do trabalho em várias situações.

Ao Grupo de Inovação em Diagnóstico Salivar e Nanobiotecnologia, pelo apoio, acolhimento e auxílio durante todos os momentos da realização do trabalho. Agradeço

por todo o conhecimento compartilhado durante as nossas reuniões, conselhos e momentos de descontração.

Aos fantásticos companheiros de trabalho que tive durante a execução desse trabalho, Marco Guevara e Nagela Bernadelli, que muito me ensinaram, apoiaram, forneceram suporte e paciência para que esses resultados fossem possíveis.

A todos os meus amigos pessoais, tanto os da graduação, os que vem desde a escola e os que fiz em outros momentos da minha jornada, que me apoiaram, forneceram carinho, me escutaram e me deram conforto para a todos os momentos de alegria e frustrações que tive durante a execução desse curso. Agradeço por estarem presentes na minha vida.

Agradeço em específico aos meus amigos Youry e Líris, que em especial atuaram como âncoras e pontes de desabafo, me incentivando a superar cada momento de questionamento e dificuldade. Agradeço pela amizade e companheirismo de vocês.

Aos Instituto de Ciências Biomédicas, Instituto de Biotecnologia e Faculdade de Computação pela infraestrutura para realização das pesquisas e análises envolvidas nesse trabalho.

A CAPES e a FAPEMIG pelo incentivo financeiro para o desenvolvimento do projeto e ao CNPq pela concessão da bolsa.

*“Permita que eu fale
Não as minhas cicatrizes
Elas são coadjuvantes
Não, melhor, figurantes
Que nem devia tá aqui*

*Permita que eu fale
Não as minhas cicatrizes
Tanta dor rouba nossa voz
Sabe o que resta de nós?
Alvos passeando por aí”*

(Emicida, Majur e Pabllo Vittar – AmarElo)

RESUMO

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) pode aumentar o risco de úlceras pépticas e neoplasias gastrointestinais. A detecção do *H. pylori* no tecido epitelial gástrico coletado por Endoscopia Digestiva Alta (EDA) é um procedimento invasivo, caro e de execução complexa, o que reduz o acesso de populações isoladas. A detecção de *H. pylori* pelo teste de ar exalado (*Urea Breath Test* - UBT) apresenta alto custo e acesso limitado em países de baixo e médio Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Nesse contexto, é fundamental desenvolver novas plataformas alternativas não invasivas para a detecção portátil, rápida e sem reagentes do *H. pylori*. Nesse trabalho, foi usada a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR) acoplada a algoritmos de aprendizado de máquina, para identificar modos vibracionais de infravermelho exclusivos do *H. pylori* diluído na saliva humana. Para isso, a saliva foi diluída em 4 concentrações diferentes (10^8 UFC/mL, 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL e 10^5 UFC/mL) de *H. pylori* e aplicadas a espectroscopia ATR-FTIR para realizar uma análise sem reagentes, rápida e sustentável das assinaturas espectrais geradas, para identificar modos vibracionais exclusivos. Os espectros obtidos foram aplicados aos algoritmos de Análise Discriminante Linear (*Linear Discriminant Analysis* - LDA) e Máquina de Vetor de Suporte (*Support Vector Machine* - SVM) para realizar a detecção do *H. pylori*. Os melhores desempenhos de discriminação obtidos a partir das concentrações apresentaram acurácia entre 85% e 94%, especificamente 89% para 10^8 UFC/mL, 93% para 10^7 UFC/mL, 94% para 10^6 UFC/mL e 85% para 10^5 UFC/mL. Os resultados demonstram que este estudo de prova-de-conceito apresenta significativo potencial para detecção não-invasiva do *H. pylori* por meio de plataforma biofotônica apoiada por inteligência artificial sem uso de reagentes com amostras de saliva humana obtida por auto-coleta.

Palavras-chave: ATR-FTIR; *Helicobacter pylori*; Infecção gastrointestinal; Teste de triagem; Diagnóstico salivar; Saliva; Testes não-invasivos; Algoritmos de aprendizado de máquina.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection can increase the risk of peptic ulcers and gastrointestinal neoplasms. *H. pylori* detection in gastric epithelial tissue collected by esophagogastroduodenoscopy (EGD) is an invasive, expensive, and a complex execution procedure, reducing access for isolated populations. *H. pylori* detection by Urea Breath Test (UBT) presents high-cost with limited access in low- and middle-income countries. In this context, it is critical to develop novel alternative non-invasive platforms for the portable, fast, and reagent-free detection of *H. pylori*. Here, we used attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) supported by Machine Learning algorithms to identify infrared vibrational modes of *H. pylori* diluted in human saliva. To perform it, saliva was diluted in 4 different *H. pylori* concentrations (10^8 CFU/mL, 10^7 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, and 10^5 CFU/mL). Then, diluted saliva was applied to ATR-FTIR spectroscopy to perform a reagent-free, fast, and sustainable analysis of spectral signatures to identify unique vibrational modes. The obtained spectra were applied to Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) algorithms to perform the *H. pylori* detection. The best discrimination performances obtained from the concentrations ranged from 85% to 94% of accuracy, reaching 89% for 10^8 CFU/mL, 93% for 10^7 CFU/mL, 94% for 10^6 CFU/mL, and 85% for 10^5 CFU/mL. The data demonstrate that this proof-of-concept study has significant potential for the non-invasive detection of *H. pylori* using a biophotonic platform supported by artificial intelligence without the use of reagents with human saliva samples obtained by self-collection.

Key-Words: ATR-FTIR; *Helicobacter pylori*; Gastrointestinal infection; screening test; salivary diagnostics; saliva, non-invasive test; machine learning algorithms

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 - Panorama mundial da distribuição mundial da prevalência da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	17
Figura 2 - Patogenicidade e resposta inflamatória da infecção por <i>H. pylori</i>	20

LISTA DE ABEVIATURAS E SÍMBOLOS

APC's	Células Apresentadoras de Antígeno
ATR	Reflexão total atenuada
ATR – FTIR	Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier
<i>babA</i>	<i>Blood Group Antigen Adhesin</i>
DAC	Doença Aguda Coronariana
DCV's	Doenças Cardiovasculares
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPI	Equipamento de Proteção Individual
IAM	Infarto Agudo do Miocardio
IBP	Inibidores de Bomba de Prótons
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL - 10	Interleucina 10
IL - 4	Interleucina 4
IL – 5	Interleucina 5
IL-17	Interleucina 17
IL-1 β	Interleucina 1-beta
INF- γ	Interferon- Gama
MALT	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico

SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TAF	Teste do Antígeno Fecal
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRFM-LFIA	Time-Resolved Fluorescent Microsphere- Lateral Flow Immunoassay
TRU	Teste Rápido de Urease
UBT	<i>Urea Breath Test</i>

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	14
1.1- <i>Helicobacter pylori</i>	14
1.2 - Transmissão e Epidemiologia.....	15
1.3 – Resposta Imune e Fisiopatologia da Infecção.....	17
1.4 – Diagnóstico	21
1.5 – Relação entre <i>H. pylori</i> e a cavidade bucal.....	25
1.6 - Diagnóstico Salivar	25
1.7 – Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	27
2.0 – OBJETIVO	29
2.1 - Objetivo geral	29
2.2 - Objetivos específicos.....	29
3.0 –APRESENTAÇÃO.....	30
4.0 – ARTIGO	31
5.0 –CONCLUSÃO.....	47
6.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1.0 – INTRODUÇÃO

1.1- *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa, de metabolismo microaerófilo, morfologia helicoidal, possuindo de 2 a 4 micrômetros (μm) de comprimento e 0,5 a 1 μm de diâmetro, é detentora ainda de um conjunto de 4 a 6 flagelos polares com 3 μm de comprimento. *H. pylori* pode ser colonizadora da mucosa gástrica e do epitélio duodenal humano apresentando ampla distribuição secundária (IERARDI et al., 2020; YAMAOKA; GRAHAM, 2014). Esse microrganismo é descrito como o principal agente etiológico da gastrite crônica, além de possuir ligação direta com uma série de outras doenças gástricas, como a úlcera péptica e o câncer gástrico (CAVALEIRO-PINTO et al., 2011; TSUGANE; SASAZUKI, 2007; YAMAOKA; GRAHAM, 2014).

Estima-se que o *H. pylori* está presente como infecção humana a mais de 50.000 anos, porém os estudos caracterizando a colonização da mucosa gástrica por microrganismos foram registrados somente no final do século XIX com trabalhos inicialmente relatando a presença de “espiroquetas” em amostras caninas e, posteriormente, em amostras humanas (LEONTIADIS; MOAYYEDI; FORD, 2023; MÉGRAUD; LEHOURS; VALE, 2016). Subsequentemente, outros pesquisadores descreveram uma maior relação entre a presença de bactérias e pacientes submetidos a tratamentos por problemas gástricos (MÉGRAUD; LEHOURS; VALE, 2016).

Os pioneiros no isolamento do *H. pylori* foram Marshall e Warren a partir de fragmentos de biópsia de pacientes com úlcera gástrica. Estudos em modelos experimentais comprovaram a relação direta da infecção com as patologias gástricas (MARSHALL; WARREN, 1984). Inicialmente a bactéria foi classificada como *Campylobacter like organisms*, modificado inicialmente para *Campylobacter pyloridis*, nome que foi posteriormente novamente modificado para *Campylobacter pyloris*. O enquadramento equivocado do *H. pylori* como pertencente ao gênero “*Campylobacter sp.*” esteve difundido desde a década de 1960, grupo este relacionado a outras bactérias helicoidais causadoras de doenças do trato gastrointestinal (GOODWIN et al., 1989; MÉGRAUD; LEHOURS; VALE, 2016). Contudo, após uma série de estudos que

analisaram diferenças morfofisiológicas e confirmação por meio de análises genéticas, foram evidenciadas diferenças entre o do *H. pylori* e bactérias da classificação anterior, sendo então caracterizado em uma nova família denominada “*Helicobacteraceae*” e um novo gênero “*Helicobacter sp.*” (MÉGRAUD; LEHOURS; VALE, 2016). O patógeno foi descrito, como está atualmente, em 1989 como uma nova espécie recebendo a nomenclatura de “*Helicobacter pylori*” por Goodwin e colaboradores em parceria de Marshall e Warren, os pesquisadores pioneiros na identificação e isolamento do agente (GOODWIN et al., 1989).

1.2 - Transmissão e Epidemiologia

A transmissão do *H. pylori* ocorre tradicionalmente pelas vias fecal-oral e oral-oral, sendo também demonstrada por meio da ingestão e contato com alimentos e fontes de água contaminadas. Desta forma, sua presença é proporcionalmente mais recorrente e prevalente em localidades onde os hábitos de higiene e infraestrutura relacionada ao saneamento básico são considerados precários, como em países de baixo nível de desenvolvimento social e industrialização (BURUCOA; AXON, 2017; HOOI et al., 2017; MENTIS; LEHOURS; MÉGRAUD, 2015). Outra via de contaminação, considerada menos convencional para o *H. pylori*, é a “gastro-oral”, sugerida devido ao registro de elevadas taxas de prevalência entre os profissionais envolvidos nos procedimentos de endoscopia e também na potencial contaminação de pacientes submetidos ao exame de endoscopia. Destaca-se que nesta via o contágio ocorre pela manipulação errônea de materiais, procedimentos ineficientes de desinfecção dos equipamentos, principalmente em lavagens manuais, e também ao uso inadequado de Equipamentos de Proteção Individuais (EPI), em destaque as luvas pelos profissionais de saúde (KAYALI et al., 2018).

A infecção por *H. pylori* apresenta maior taxa de contágio durante a infância até os dois primeiros anos de vida, fenômeno atribuído em razão do maior contato interpessoal entre os sujeitos nesse período (HOOI et al., 2017; KAYALI et al., 2018; LEONTIADIS; MOAYYEDI; FORD, 2023). São considerados também fatores de risco aspectos relacionados a etnia, qualificado pela menor prevalência do microrganismo em indivíduos de etnia branca em comparativo às estatísticas para populações negras e hispânicas, fatores ambientais também são citados destacando o tabagismo, hábitos

relacionados a dieta e o perfil de consumo de álcool, além da exposição ocupacional a situações que influenciam na aquisição da infecção, principalmente os relacionados a infraestrutura sanitária (LEONTIADIS; MOAYYEDI; FORD, 2023). O gênero do hospedeiro não apresenta perfil de interferência como fator de influência na infecção, tendo números semelhantes para homens e mulheres (KAYALI et al., 2018).

Os dados epidemiológicos referentes a este patógeno apresentam problemáticas devido a falta de aplicação similar do método de diagnóstico e a análise em populações com presença de infecções assintomáticas. Porém, aceita-se mundialmente que o *H. pylori* é uma bactéria que causa infecções em larga-escala e apresenta grande importância médica (BURUCOA; AXON, 2017; HOOI et al., 2017; LI et al., 2023; MENTIS; LEHOURS; MÉGRAUD, 2015). Os índices atuais indicam uma prevalência do *H. pylori* em cerca de 43,1% da população mundial, embora apresente perfil heterogêneo em cada continente (LI et al., 2023). Embora este recente estudo apresente uma mudança de paradigma na indicação da prevalência mundial da infecção pelo *H. pylori*, muitos países não possuem dados epidemiológicos precisos, fazendo com que as informações relativas à quantidade total dos indivíduos portadores desta bactéria sejam limitadas (BURUCOA; AXON, 2017; MENTIS; LEHOURS; MÉGRAUD, 2015). A relação entre o contágio e características pertinentes ao saneamento básico interfere diretamente na dinâmica epidemiológica do agente, gerando uma concentração de ocorrência em maior volume em países internacionalmente considerados subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como evidenciado no mapa de prevalência mundial da infecção por *H. pylori*. Na análise da figura 1 é nítida a discrepância evidenciando maiores números em países como África do Sul e o Brasil e menores em países considerados como desenvolvidos, com exemplos do Canadá e da Austrália (HOOI et al., 2017).

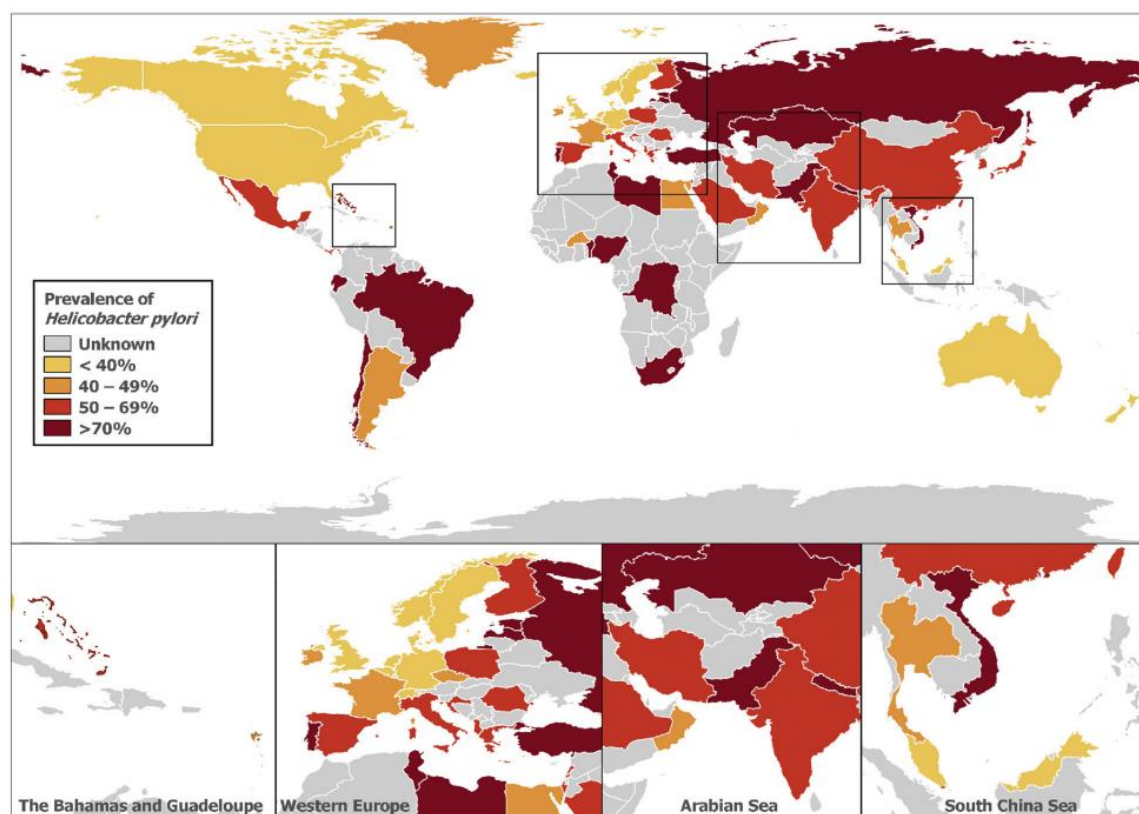


Figura 1. Panorama da distribuição mundial da prevalência da infecção por *H. pylori*. Relação da concentração de infectados por países que apresentam dados epidemiológicos oficiais para a infecção por *H. pylori*. Fonte: HOOI et al., 2017.

1.3 – Resposta Imune e Fisiopatologia da Infecção

O *H. pylori* pode ser enquadrado como um dos poucos agentes infecciosos que consegue efetivamente colonizar a mucosa gástrica humana, um sítio apontado como um ambiente inóspito para microrganismos (CAMILO; SUGIYAMA; TOUATI, 2017a; YAMAOKA; GRAHAM, 2014). O *H. pylori* pode habitar esse ambiente ácido do estômago devido a atividade da enzima uréase, que pode promover neutralização do ambiente gástrico, degradando a ureia em amônia causando elevação no pH em regiões imediatamente ao redor da bactéria (ANSARI; YAMAOKA, 2022; LEONTIADIS; MOAYYEDI; FORD, 2023). Com a presença da atividade enzimática da uréase, ocorre a formação de lesões gástricas durante a colonização gástrica do *H. pylori*, desencadeando um processo de resposta imune tanto inflamatória quanto humoral (CHONWERAWONG; FERRERO, 2021; PATEL; TROMBLY; KURT-JONES, 2012).

O primeiro fator destacado para o sucessibilidade da instalação da bactéria no sítio específico para início da infecção é a motilidade apresentada pelo microrganismo, devido

ao seu alto grau de atividade flagelar (GU, 2017), o que permite movimentação do *H. pylori* no suco e muco gástrico, atuando como fator físico de facilitação da penetração na mucosa e sobrevivência do organismo no estômago humano (ABADI, 2017; GU, 2017).

Desta forma, quando ocorre o contágio por meio da ingestão oral da bactéria, que primeiramente penetra na camada de muco, o agente atinge então o revestimento estomacal e inicia um processo de multiplicação sobre as células epiteliais dessa mucosa (CHEOK et al., 2021; GU, 2017; KAYALI et al., 2018). Subsequentemente, o *H. pylori* realiza a secreção, sobre esse epitélio gástrico, de uma série de agentes quimiotáticos, fazendo com que ocorra o estímulo de migração de Leucócitos polimorfonucleares (PMN) para a região do tecido lesionado (CHEOK et al., 2021; YAMAOKA; GRAHAM, 2014).

O *H. pylori* possui proteínas de membrana externa, que promovem a degranulação de mastócitos realizando a liberação dos fatores naturais pró-inflamatórios e na ação de citocinas como IL-17, TNF- α e INF- γ , gerando respostas inflamatórias clássicas como o aumento da permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão de leucócitos às células endoteliais, assim como uma migração considerável dessas células ao sítio da infecção (CHONWERAWONG; FERRERO, 2021; HOLMSTRÖM et al., 2020).

Os mecanismos inatos são considerados como os principais atores na resposta imune frente ao *H. pylori*, porém não são os únicos, visto que ocorre também a participação dos mecanismos humorais de imunidade na resposta à infecção, principalmente com produção inicialmente de IgG e subseqüentemente de IgA. Os anticorpos produzidos não apresentam capacidade de neutralizar a infecção, atuando na verdade de forma contrária, podendo gerar danos no epitélio gástrico (BUTT et al., 2019, 2020).

Ainda nos processos adaptativos de resposta frente ao *H. pylori*, tem-se a ação direta de células T auxiliares específicas contra o agente. No estágio inicial da infecção, células Th1 liberam TNF- α e INF- γ que atuam para realizar lise celular por meio da ativação de linfócitos T CD8⁺ (BUTT et al., 2020; CHEOK et al., 2021; XU et al., 2022). Desta forma, ocorre a atuação na defesa celular contra patógenos intracelulares, entretanto, o exacerbado estímulo de liberação destes fatores pode resultar em danos teciduais na mucosa estomacal (CHEOK et al., 2021). A atuação da resposta imunológica frente a infecções mais avançadas contra a bactéria também gera respostas paralelas por meio de células Th1 e Th2, sendo que as Th2 possuem papel de secretar IL-4 e IL-5, desempenhado papel regulatório negativo das células Th1 e eventos inflamatórios que

também facilitam a produção de anticorpos pelas células B (BUTT et al., 2019).

A regulação da resposta imune pela infecção ocorre adicionalmente pela atuação nas Células Apresentadoras de Antígeno (APCs), por meio de sinalização de IL-10, que estimulam a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ naive em T reguladores (Treg), aumentando ainda mais a expressão de IL-10, citocina essa que atua na regulação negativa de células Th1, macrófagos e na produção de anticorpos pelas células B (BUTT et al., 2020; CAMILO; SUGIYAMA; TOUATI, 2017a; XU et al., 2022; YAMAOKA; GRAHAM, 2014). Contudo, considera-se que o estímulo da secreção de IL-10 impacta na supressão da apresentação de antígenos de *H. pylori* pelas APCs. (OLDANI et al., 2009)

Os mecanismos de escape às respostas do hospedeiro também ocorrem pela atuação de enzimas, já que além da urease, o *H. pylori* também promove outras reações enzimáticas para o curso da instalação na mucosa gastrointestinal (WANG et al., 2023b; YAMAOKA; GRAHAM, 2014). O *H. pylori* secreta as enzimas catalase e a superóxido dismutase (SOD) específica de *H. pylori*, relacionada ao gene *sodB*, que tem função de neutralizar a ação oxidativa tóxica de radicais livres, ofertando assim proteção química à bactéria frente ao potencial lítico de macrófagos e neutrófilos, tendo-se então mais um fator de resistência frente a resposta inflamatória do hospedeiro (CHEOK et al., 2021).

O *H. pylori* apresenta ainda diversos fatores de virulência como o gene *CagA*, que está relacionado a “citotoxina A” que tem ligação com uma maior expressão de citocinas, tais como IL-1 β e IL-8. Outro fator de virulência é o gene *VacA* ligado a expressão da “citotoxina vacuolizadora” responsável por induzir a formação e abertura de canais seletivos de ânions nas células do epitélio gástrico, promovendo a passagem de ureia para a luz da mucosa gástrica, e o gene *picB* que expressa fatores com função de estímulo a indução da produção de IL-8 pelas células da mucosa gástrica (LI et al., 2021; OLDANI et al., 2009; YAMAOKA; GRAHAM, 2014). Destaca-se também o fator de aderência *blood group antigen adhesin (babA)* que atua como meio facilitador do contato entre a bactéria e o epitélio afim de facilitar a liberação de outros fatores de virulência como *cagA* e *vacA* (OLDANI et al., 2009; POP et al., 2022; SENCHUKOVA, 2022; YAMAOKA; GRAHAM, 2014). Além de todos esses fatores o *H. Pylori* promove a liberação de adesinas, como a hemaglutinina fibrilar e a fimbria, que são dispostas como parte da etapa terminal da associação do agente com a mucosa gástrica (POP et al., 2022). (Figura 2).

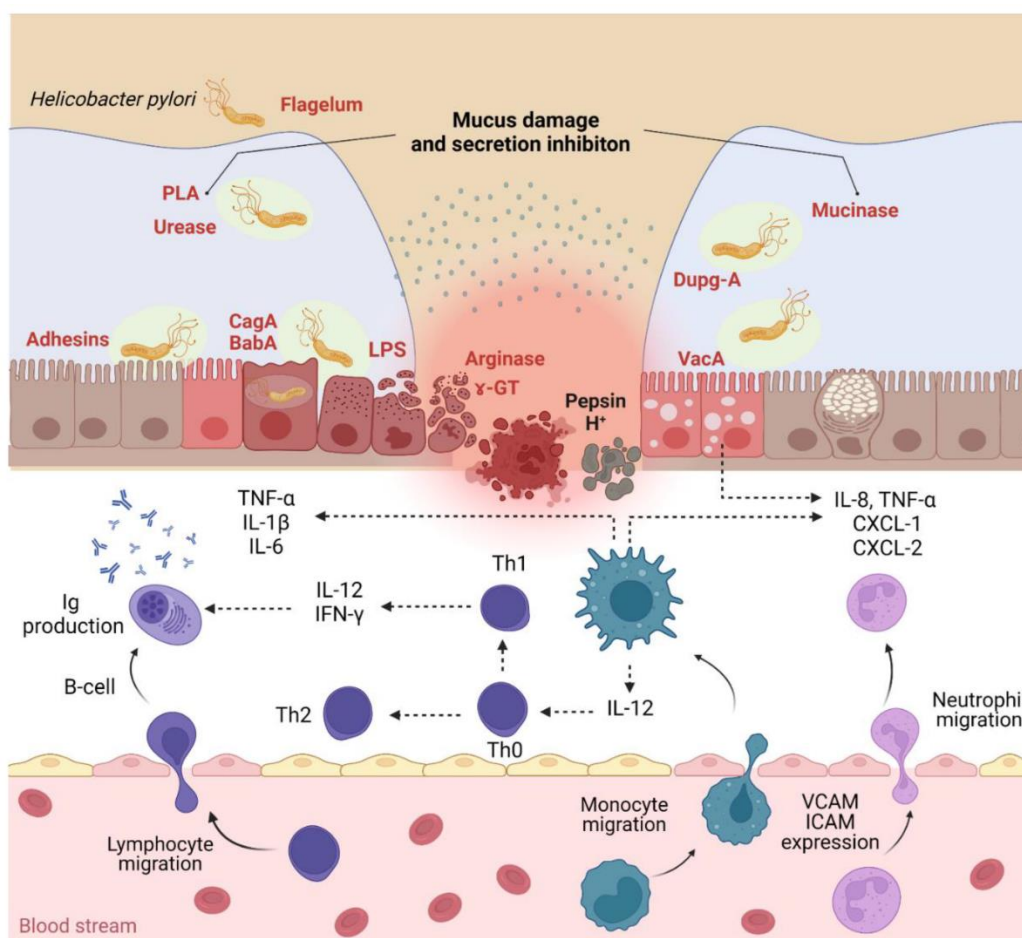


Figura 2 - Patogenicidade e resposta inflamatória da infecção por *H. pylori*: Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na ação de resposta imune para *H. pylori*. Fonte: POP et al., 2022

Frente as diferentes formas de contágio e os fatores de interferência, as manifestações das doenças dispostas como consequências da infecção podem surgir em um curto período após a contaminação pela bactéria ou podem permanecer assintomáticas por um longo período (KAYALI et al., 2018; POP et al., 2022). Exemplos clássicos para essa ausência de sintomas da infecção pode ser observado com as contaminações efetivadas ainda na infância, quando grande parte dos hospedeiros não apresenta sintomas durante um longo período, porém normalmente essas infecções evoluem para um quadro crônico de gastrite na vida adulta em consequência da ação do *H. pylori* (SEO; BORTOLIN; JONES, 2020).

As alterações teciduais causadas na mucosa gástrica durante o curso de inserção do *H. pylori* no epitélio estomacal, juntamente aos fatores de inflamação secretados durante este processo, são os principais fatores causais para os quadros de gastrite crônica. A ação da urease gera ainda uma interferência na acidez do estômago, gerando assim

desregulação fisiológica do suco gástrico (SENUKOVÁ, 2022). O somatório das lesões causadas, o status inflamatório e a desregulação química pode acarretar no surgimento de lesões com erosão do revestimento protetor da cavidade gástrica ou do duodeno caracterizando assim o quadro de úlcera péptica ou gastroduodenal. O status crônico dessas condições pode levar ao desencadeamento de um processo de displasia gástrica, podendo evoluir ainda para metaplasia intestinal e consequentemente o câncer gastrointestinal. (CAVALEIRO-PINTO et al., 2011; XU et al., 2022; YAMAOKA; GRAHAM, 2014).

A infecção por *H. pylori* foi a primeira manifestação bacteriana a ser considerada como um fator carcinógeno tipo I (nível máximo) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) por sua relação com o adenocarcinoma gástrico (VENERITO et al., 2019). Este patógeno é considerado também o principal fator de risco para o Linfoma de MALT (*Mucosa-associated lymphoid tissue*), caracterizado como uma neoplasia do tecido linfático da zona marginal do trato digestivo, evidenciando-se a regressão majoritária da doença em pacientes que finalizaram o tratamento para erradicação da bactéria (ASANO et al., 2015; SALAR, 2019).

Além das patologias diretamente ligadas ao trato gastrointestinal, caracteriza-se a infecção por este microrganismo como fator de risco para várias doenças extra digestivas, sendo então o *H. pylori* considerado um agente infeccioso que pode causar alterações sistêmicas, como as doenças cardiovasculares (DCV) (GRAVINA et al., 2018; SANTOS et al., 2020). Urticária crônica, rosácea, aterosclerose, anemia e púrpura trombocitopênica idiopática também se caracterizam como enfermidades que apresentam relação já estabelecida com o *H. pylori*. (RAŽUKA-EBELA; GIUPPONI; FRANCESCHI, 2018).

1.4 – Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *H. pylori* é realizado por métodos não-invasivos e invasivos, sendo os invasivos feitos por meio de Endoscopia Digestiva Alta (EDA) (ANSARI; YAMAOKA, 2022; CHATRANGSUN; VILAICHONE, 2021). Dentre os exames relacionados à EDA destacam-se o Teste Rápido de Urease (TRU), a cultura microbiana em condições de anaerobiose, a reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), que utilizam bases moleculares para realizar a detecção de material genético da bactéria no tubo gastrointestinal, tem-se também detecção definida por meio de análise histológica. Todos os procedimentos citados como invasivos se dão

por meio de utilização de amostras coletadas de material de mucosa gastrointestinal obtidos durante a realização da endoscopia (ANSARI; YAMAOKA, 2022).

O TRU, é tido comumente como um teste pré diagnóstico, realizado pelo próprio endoscopista durante o processo de endoscopia. Consiste basicamente em um diagnóstico indireto da urease por meio da utilização de um substrato contendo ureia. O funcionamento é baseado no mecanismo básico da reação da urease, visto que caso a enzima esteja presente, ocorrerá a hidrólise da ureia, convertendo o substrato em amônia, gerando então conversão de um meio ácido em alcalino (HUH; KIM, 2018; LEE; DORE; GRAHAM, 2022). Com ação de indicador de pH, verifica-se se ocorreu alteração no perfil de conversão alcalina entre amostra e o substrato. Quando se evidencia alteração no pH o exame é positivo para presença de *H. pylori* e o restante das amostras coletadas são levadas para análises de cultura, PCR ou processos histológicos. O uso prévio de fármacos a base de Inibidores de Bomba de Prótons (IBP), sais de bismuto e antimicrobianos podem gerar resultados falsos-negativos ao teste, frente a ação de interferência destes compostos sobre a ação da urease (DUQUESNE et al., 2023). Atenta-se ainda para interferências de detecção errônea frente a presença de urease por motivos externos a presença de *H. pylori*, já que bactérias como *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus* também secretam a urease (PARIHAR; MCNAMARA, 2021).

A realização de procedimento de cultura microbiana é o método considerado como o mais específico para identificação do *H. pylori*, porém apresenta baixa sensibilidade, com índices entre 40-80% e complexa realização (GUEVARA; COGDILL, 2020). O método apresenta uma vantagem, visto que fornece ainda a determinação da suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos (HU; ZHU; LU, 2017). Ressalta-se que o *H. pylori* é uma bactéria metabolismo microaerófilo, que demanda suprimento específico de condições especiais para seu crescimento, gerando assim um perfil de difícil manutenção das condições ideais para o cultivo do microrganismo, limitando a realização do procedimento e restringindo assim a execução dessa metodologia a centros de pesquisas com maior infraestrutura. O uso de antibióticos e fármacos a base de IBP e bismuto também é demonstrado como um fator de interferência sobre o teste (ANSARI; YAMAOKA, 2022).

A reação de PCR demonstra-se como tecnologia de alto valor para a detecção molecular do material genético do *H. pylori* e apresenta vantagens por detectar a presença do patógeno ainda que em mínimas concentrações, tendo seu alcance de detecção

máxima estimado em torno de 0,02 picogramas (pg) de DNA de *H. pylori*, o correspondente a apenas 10 bacilos (BÉNÉJAT et al., 2023). Para a execução da reação são utilizados principalmente duas regiões de amplificação no material genético do patógeno, sendo elas a de 16SrRNA, que corresponde a fragmentos de aproximadamente 150 pares de bases (PB) datada como uma região conservada do DNA procariótico, e a segunda é dada como sendo a do gene *ureA*, que contém 400 PB e é datado como codificante de urease. O alto valor para os kits comerciais e reagentes aplicados à metodologia são fatores limitantes (GUEVARA; COGDILL, 2020; KOTILEA; BONTEMS; TOUATI, 2019).

A análise histológica das amostras coletadas por EDA pode ser processada por meio de diversos protocolos de coloração como “Giemsa”, método de hematoxilina e eosina de “Warthin-Starry”, “Steiner” e carbolfucsina. São analisados fragmentos de mucosa gastrointestinal do paciente e por meio da técnica é possível além da realização da detecção do *H. pylori* mensurar o grau de inflamação e lesão tecidual da mucosa (CAMILO; SUGIYAMA; TOUATI, 2017a; LEONTIADIS; MOAYYEDI; FORD, 2023). A distribuição irregular do *H. pylori* pelo epitélio intestinal e a coleta feita de maneira incorreta podem gerar resultados falso-negativos para o exame. Atualmente dispõe-se de uma combinação do TRU, confirmado por análise histológica, como método “padrão ouro” para a detecção de *H. pylori* (PARIHAR; MCNAMARA, 2021).

Dentre os métodos não invasivos são realizados o *Urea Breath Test* (UBT), que é o modelo de detecção por meio de ureia marcada, o Teste De Antígeno Fecal (TAF) e detecção sorológica de anticorpos contra *H. pylori*. (CHEN et al., 2022; QIU; LI; HAN, 2021).

O UBT é baseado na ingestão pelo paciente de compostos de ureia marcados com dois diferentes isótopos, o carbono 13 (não radioativo) ou carbono 14 (radioativo), que sofre ação da urease bacteriana e gera amônia e gás carbônico (CO₂), e por meio da captação do CO₂ exalado na expiração do paciente faz-se a detecção por equipamento específico da molécula marcada, inferindo-se assim a presença da urease e consequentemente a do *H. pylori* (CHEN et al., 2022; GUEVARA; COGDILL, 2020). Um dos problemas envolvendo a análise indireta do *H. pylori* pela metodologia do ar exalado é a redução na sensibilidade em casos de uso prévio de antibióticos, fármacos IBP e com sais de bismuto, além ainda da utilização de compostos de ação nos receptores H₂ da histamina, sendo necessário a interrupção previa da oferta da medicação para a realização do exame. Assim como no TRU, tem-se possibilidade ainda de equívoco na

detecção por meio da presença de urease de outras bactérias gástricas como *P. mirabilis* e *S. aureus* (CHEN et al., 2022; PARIHAR; MCNAMARA, 2021).

A dependência direta que o exame apresenta do reagente de carbono marcado gera alto grau de restrição ao acesso, já que o substrato reativo eleva significativamente o custo do procedimento. No Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) não ocorre a disponibilização deste teste devido as restrições existentes para aquisição dos isótopos e do alto custo dos equipamentos envolvidos (COELHO et al., 2018).

O Teste de Antígeno Fecal (TAF) apresenta baixo custo e é realizado por meio de uma reação de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). O TAF também pode ser feito por meio de método imunocromatográfico (QIU; LI; HAN, 2021). As implicações limitantes para a técnica estão relacionadas principalmente ao alto grau de variabilidade genética apresentado pelo *H. pylori*, ocasionando em uma diversidade de antígenos a serem analisados durante a reação. Desta forma, é necessária uma adaptação regional para a cepa predominante em cada região para melhorar a acurácia do teste. A baixa colonização bacteriana no estômago e o uso de IBP's são fatores que geram resultados “falso-negativos” (GUEVARA; COGDILL, 2020; KOTILEA; BONTEMS; TOUATI, 2019; QIU; LI; HAN, 2021). A não diferenciação do teste em discriminar organismos ativos e inativos gera ainda limitação para o diagnóstico, por não apontar corretamente o status correto da infecção. O TAF atualmente tem alto grau de aplicabilidade no acompanhamento do tratamento da infecção, já que a concentração de antígenos nas fezes indica a efetividade da eliminação do patógeno da cavidade gástrica (QIU; LI; HAN, 2021).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos são realizados normalmente com amostras de sangue ou soro, tendo como principal método a reação de ELISA. No entanto, sabe-se que os níveis séricos dos anticorpos IgG e IgA continuam elevados por longos períodos mesmo após a eliminação da infecção (GUEVARA; COGDILL, 2020; KOTILEA; BONTEMS; TOUATI, 2019). Mundialmente os testes sorológicos de *H. pylori* são empregados como mecanismos de estudos epidemiológicos populacionais pois apresentam dados que indicadores ou risco desta doença (CAMILO; SUGIYAMA; TOUATI, 2017; KOTILEA; BONTEMS; TOUATI, 2019).

De maneira geral os métodos diagnósticos empregados para o *H. pylori*, são majoritariamente dependentes diretos de procedimentos de EDA, o que gera aumento na complexibilidade, risco e custo, além disso, principalmente os modelos não invasivos,

apresentam diversas problemáticas e limitações (DE BRITO et al., 2019; GUEVARA; COGDILL, 2020). Os métodos não-invasivos já publicados apresentam incapacidade de identificação do status atual da infecção, não sendo assim métodos de excelência aplicados ao diagnóstico, considera-se o UBT o com maior potencial para aplicação na identificação da infecção, porém de acesso limitado devido ao alto custo (CHEN et al., 2022; KOTILEA; BONTEMS; TOUATI, 2019).

1.5 – Relação entre *H. pylori* e a cavidade bucal

Apesar de ser caracterizada como organismo colonizador da mucosa gástrica, diversos estudos apontam a presença do *H. pylori* em uma série de reservatórios extra gástricos como a cavidade oral, onde a bactéria é identificada no biofilme dental, sub e supra gengival, na língua, na saliva, e nas amígdalas (ZHANG et al., 2022). O *H. pylori* também foi identificado em superfícies neoplásicas orais (ESKANDARI et al., 2010).

Em estudos sobre a presença oral *H. pylori*, é frequentemente detectado a presença da bactéria em regiões do dorso da língua (ESKANDARI et al., 2010; SÁNCHEZ-ALONZO et al., 2020). Análises de aftas demonstraram associação positiva do patógeno e a presença da úlcera. Quanto a presença da bactéria em outras localidades orais, observou-se menor incidência da presença na saliva em comparativo com o biofilme dental, questão essa explicada devido a capacidade do biofilme em permitir a aderência mecânica do microrganismo a superfícies fixas (AKSIT BICAK et al., 2017).

Estudos da doença periodontal apontam uma relação diretamente proporcional entre a presença de periodontite e a ocorrência de *H. pylori* na cavidade oral. Além disso evidencia-se maiores registros de presença da bactéria em questão na microbiota oral de pacientes com periodontite frente a comparação a indivíduos sem periodontite (ESKANDARI et al., 2010; PODZIMEK et al., 2016).

1.6 - Diagnóstico Salivar

A saliva é uma secreção exócrina muco-serosa constituída majoritariamente de água com concentrações distintas de compostos orgânicos como glicídios, aminoácidos, peptídeos, proteínas, hormônios, glicoproteínas, ácidos nucleicos e enzimas como aldolase, peroxidase e amilase. Também é evidenciado a presença de elementos

inorgânicos como Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , H_2PO_4 e HPO_4^{2-} . A secreção diária de saliva por um indivíduo é de em média de 500-1500 mL (CASTAGNOLA et al., 2017; NONAKA; WONG, 2022).

Fisiologicamente a saliva desempenha uma série de funções no organismo humano. A saliva tem ação fundamental na regulação da saúde oral. Este biofluido participa da digestão inicial no bolo alimentar, dos processos de mastigação e deglutição e atua também na solubilização de substâncias alimentares. Esse fluido também desempenha papel também na limpeza da cavidade oral, é responsável pela lubrificação da mucosa bucal e mediação da fala (BOROUMAND et al., 2021). A saliva também atua na proteção dos dentes, na neutralização (regulação de pH) de compostos ácidos ingeridos, possui capacidade antibactericida e bacteriostática e desempenha ação regulatória na saturação de fosfato de cálcio relacionada à hidroxiapatita dentro do processo de desmineralização-remineralização da estrutura dental (PEDERSEN et al., 2018b). As mudanças de concentração relativa dos compostos orgânicos e inorgânicos da saliva apresentam relação com alterações fisiológicas e patológicas da cavidade oral e de alterações sistêmicas do indivíduo (PEDERSEN et al., 2018a, 2018b).

A utilização da saliva como fluido diagnóstico é capaz de indicar alterações decorrentes de patologias crônico-degenerativas e infecciosas. Desta forma, é considerada um biofluido alternativo para detecção de doenças que utilizem amostras que apresentam coleta por metodologia invasiva, como o sangue, líquido pleural e fluídos gástricos (CASTAGNOLA et al., 2017; NONAKA; WONG, 2022).

Os procedimentos para realização da coleta de saliva podem ser feitos por meio de ação não-estimulada, de forma passiva e conveniente ao paciente (KRAHEL et al., 2022). A saliva também pode ser coletada de forma estimulada baseada em técnicas com uso de materiais como o algodão ou polietileno. Ambos os processos são feitos por auto-coleta pelo paciente, sem demanda de habilitação técnica regulamentada para a coleta das amostras, diferente do que é necessário para coleta de sangue e outros biofluidos (CAIXETA et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2023).

Entre as patologias sistêmicas que apresentam testes de detecção salivar em desenvolvimento, está o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) que se baseia na quantificação da Proteína C Reativa e troponina cardíaca na saliva (REYES-RETANA; DUQUE-OSSA, 2021). A utilização de analitos presentes na saliva também é empregado

para auxílio do diagnóstico da fibrose cística (GONÇALVES et al., 2019). Para doenças infectocontagiosas destaca-se a aprovação e comercialização de testes de diagnóstico da COVID-19 baseada na detecção do SARS-CoV-2 por reações moleculares empregando PCR para detecção do material genético do vírus ou por testes imunocromatográfico para detecção qualitativa de antígenos específicos (CAIXETA et al., 2021; NGUYEN-KIM et al., 2022). Testes comerciais para diagnóstico do HIV também são aplicados por meio da detecção de anticorpos em amostra de saliva (VOHRA et al., 2020).

A presença do *H. pylori* na saliva, mesmo que em concentração inferior ao biofilme, tem sido amplamente empregada em novos estudos para detecção do patógeno (AKSIT BICAK et al., 2017). Técnicas diagnósticas que utilizam a saliva como meio de análise para diagnóstico do patógeno já são descritas, como por exemplo por metodologia aplicada a sensor eletroquímico por detecção da proteína HopQ, expressa na membrana externa do microrganismo (JARADAT et al., 2023). O teste imunocromatográfico de fluxo lateral, por meio da metodologia de “Time-Resolved Fluorescent Microsphere-Lateral Flow Immunoassay” (TRFM-LFIA) também já foi descrito como método de detecção salivar válido para *H. pylori* (WANG et al., 2023a). A técnica de PCR é demonstrada e aprovada comercialmente, como efetiva para a detecção salivar de *H. pylori*. Descreve-se concentrações salivares do agente infeccioso, muito superiores em pacientes portadores de lesões gástricas características desse agente em comparação aos índices dados para pacientes sem lesões gástricas (ESKANDARI et al., 2010; ZHANG et al., 2022). A saliva se mostra então como um fluido biológico de grande valor diagnóstico para *H. pylori* (AKSIT BICAK et al., 2017; JARADAT et al., 2023; WANG et al., 2023a).

1.7 – Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A espectroscopia utiliza a interação da radiação eletromagnética com a matéria, buscando obter informações físicas e químicas da amostra (DUTTA, 2017). Especificamente, a espectroscopia de infravermelho (IR) se destaca atualmente como uma valiosa técnica quantitativa e qualitativa para monitorar a composição molecular de biofluidos (BUNACIU et al., 2017) baseada na interação física da luz emitida pelo

equipamento com os compostos a serem analisados. O comportamento de interação entre a luz e as moléculas presentes na amostra geram um potencial de energia vibracional na molécula, fenômeno esse que é detectado pelo equipamento de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) gerando uma assinatura espectral que registra as diversas substâncias identificadas na amostra (DUTTA, 2017; PETIT; MADEJOVA, 2013). Cada estrutura molecular que compõe a amostras submetida ao procedimento apresenta um modo espectral específico, sendo assim possível realizar a identificação de cada composto que compõe o material analisado (BUNACIU et al., 2017; LEAL et al., 2018).

A Reflexão Total Atenuada (ATR) é uma técnica de amostragem aplicada em conjunto a metodologia FTIR, que permite que as amostras sejam examinadas sem necessidade de pré processamento ou utilização de reagentes, com submissão dos materiais diretamente ao procedimento independentemente do estado físico da amostra (LIU; KAZARIAN, 2022; PETIT; MADEJOVA, 2013). O emprego da análise de fluidos biológicos por técnicas de ATR-FTIR constitui um campo da ciência já bem estruturado e amplamente difundido (BUNACIU et al., 2017).

Sangue, líquido pleural, leite materno, líquido sinovial, líquido amniótico e saliva são exemplos de fluidos corpóreos que são empregados sob essa tecnologia para diferentes análises (BUNACIU et al., 2017; LEAL et al., 2018). Para a saliva, a assinatura espectral obtida com o emprego de ATR-FTIR já é bem difundida e os pontos espectrais para análise dos componentes específicos desse fluido são bem definidos (DELRUE; DE BRUYNE; SPEECKAERT, 2023). No espectro infravermelho da saliva é comum a avaliação de componentes proteicos, como a Amida I descrita em uma região média do modo vibracional 1636 cm^{-1} , a Amida II apontada em 1549 cm^{-1} e a região de Amida III que compreende de 1350 á 1244 cm^{-1} , bem como vibrações de metila de peptídeos dispostos em 1450 cm^{-1} . Os lipídios, em específico cadeias de ácidos graxos e aminoácidos podem ser detectados em 2900 cm^{-1} e 1404 cm^{-1} . Os materiais genéticos de DNA e RNA podem ser detectados no intervalo de $1080\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$ e carboidratos como glicogênio, glicose e frutose podem ser detectados a 1045 cm^{-1} (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008).

A presença de patógenos ou biomarcadores de doenças na saliva pode ser identificada pela técnica de ATR-FTIR, frente as alterações nas assinaturas espectrais decorrentes da presença de componentes (BUNACIU et al., 2017; DELRUE; DE

BRUYNE; SPEECKAERT, 2023). Estudos utilizando técnicas comparativas entre os padrões normais de assinaturas espectrais de pacientes com ausência da doença ou infecção analisada frente ao perfil espectral e de pessoas com alterações fisiopatológicas ou infecciosas estão cada vez mais sendo empregadas como propostas para novas metodologias diagnósticas. Essas técnicas empregam análises estatísticas para comparação dos espectros, muitas vezes feitas por algoritmos de aprendizado de máquinas, um ramo específico dentro da Inteligência Artificial (DUTTA, 2017; LEAL et al., 2018).

A doença renal crônica, Diabetes Mellitus e diferentes formas de neoplasias são exemplos de doenças não infecciosas que possuem trabalhos aplicados a diagnóstico salivar por emprego de ATR-FTIR com comparação de perfis espectrais por análise computacional (CAIXETA et al., 2020, 2023; RODRIGUES et al., 2019). No âmbito das patologias infecciosas, a infecção por Zika vírus também possui dados a respeito do emprego da metodologia (OLIVEIRA et al., 2023). A detecção de patologias por meio da metodologia de ATR-FTIR destaca-se por ser considerada uma tecnologia sustentável pois não demanda utilização de reagentes e não produz resíduos tóxicos. Outro fator de destaque para a técnica é o potencial de rápido processamento das amostras, conseguindo assim uma maior agilidade na liberação dos resultados ao pacientes (CAIXETA et al., 2023)

2.0 – OBJETIVO

2.1 - Objetivo geral

Desenvolver uma plataforma portátil sustentável para detecção rápida do *H. pylori* na saliva baseado em tecnologia ATR-FTIR acoplada à algoritmos de inteligência artificial.

2.2 - Objetivos específicos

- Identificar os principais modos vibracionais no espectro de infravermelho que discriminam a presença do *H. pylori*.

- Identificar os melhores algoritmos de aprendizado de máquina capazes de identificar o do *H. pylori* na saliva.

3.0 – APRESENTAÇÃO

A presente dissertação apresenta formato alternativo com os resultados dispostos em formato de manuscrito a ser submetido ao periódico “**Scientific Reports**” com fator de impacto **4.997**, cuja os critérios para submissão estão disponíveis em: <https://www.nature.com/srep/author-instructions/submission-guidelines>

4.0 – ARTIGO

Development of a novel sustainable, portable, fast, and non-invasive platform based on ATR-FTIR technology coupled with machine learning algorithms for *Helicobacter pylori* detection in human saliva

Ghabriel Honório da Silva ¹, Marco Fidel Guevara-Vega ¹, Nagela Bernadelli de Sousa Silva², Marcelo Augusto Garcia-Júnior¹, Luiz Ricardo Goulart^{3†}, Thulio Marquez Cunha⁴, Carlos Henrique Gomes Martins², Murillo Guimarães Carneiro⁵, Robinson Sabino-Silva ¹.

¹ Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

² Antimicrobial Testing Laboratory, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³ Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴ School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Faculty of Computing, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

[†] *in memoriam*.

Corresponding Author:

Robinson Sabino-Silva.

Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection can increase the risk of peptic ulcers and gastrointestinal neoplasms. *H. pylori* detection in gastric epithelial tissue collected by esophagogastroduodenoscopy (EGD) is an invasive, expensive, and complex execution procedure, reducing access for isolated populations. *H. pylori* detection by Urea Breath Test (UBT) presents high cost with limited access in low- and middle-income countries. In this context, it is critical to develop novel alternative non-invasive platforms for the portable, fast, and reagent-free detection of *H. pylori*. Here, we used attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) supported by Machine Learning algorithms to identify infrared vibrational modes of *H. pylori* diluted in human saliva. To perform it, saliva was diluted in 4 different concentrations (10^8 CFU/mL, 10^7 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, and 10^5 CFU/mL) of *H. pylori*. Then, diluted saliva with or without *H. pylori* were applied to ATR-FTIR spectroscopy to perform a reagent-free, fast, and sustainable analysis of spectral signatures to identify unique vibrational modes to identify this pathogen. The obtained spectra were applied to Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) algorithms to perform the *H. pylori* detection. The best discrimination performances obtained from the concentrations ranged from 85% to 94% of accuracy, reaching 89% for 10^8 CFU/mL, 93% for 10^7 CFU/mL, 94% for 10^6 CFU/mL, and 85% for 10^5 CFU/mL. The data demonstrate that this proof-of-concept study has significant potential for the non-invasive detection of *H. pylori* using a biophotonic platform supported by artificial intelligence without the use of reagents with human saliva samples obtained by self-collection.

KEY-WORDS: ATR-FTIR; *Helicobacter pylori*; Gastrointestinal infection; screening test; salivary detection; saliva, non-invasive test; machine learning algorithms.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a gram-negative, highly prevalent bacterium, commonly found in the internal mucosa of human stomach. This pathogen is of great medical importance since it is the main etiological agent of chronic gastritis, directly linked to peptic ulcer disease, gastric cancer, and several other gastrointestinal diseases^{1,2}. Although there is a considerable degree of heterogeneity in different regions, the estimated global *H. pylori* prevalence was 43,1% in 2022³. The statistics may be even higher since there are limitations in epidemiologic survey conduction and large-scale *H. pylori* diagnosis in several countries. There is a significant challenge in mapping accurate epidemiological data on the occurrence of *H. pylori* infection due to economic and geographic limitations in low- and middle-income countries (LMICs)^{3,4}. The economic and social development differences are further evidenced by the higher *H. pylori* prevalence in LMICs compared to high-income countries³⁻⁵.

H. pylori produces large amounts of urease in gastric tissues, which is critical for *H. pylori* survival in the stomach despite the acidic milieu⁶. The currently employed diagnostic methods are usually performed by primarily detecting products of urease reaction. This evaluation can be performed by rapid indirect detection tests, such as the rapid gastric urea test, obtained by esophagogastroduodenoscopy (EGD)^{7,8}. Besides, direct detection tests are also used to confirm the results of indirect rapid tests. Polymerase Chain Reaction (PCR) or bacterial culture of gastric tissues are confirmatory methods for *H. pylori* detection with samples collected by EGD^{9,10}. Alternatively, fecal antigen tests are also applied in follow-up treatment and diagnosis. The Urea Breath Test (UBT) is a non-invasive alternative test that performs indirect urea detection through exhaled air, however, this test presents a high cost for LMIC. The gastric infection with urease-positive bacteria and other gastrointestinal bacteria that produce urease also induces a false-positive reaction in UBT⁵. Therefore, it is critical to develop novel low-cost diagnostic strategies for non-invasive *H.pylori detection*¹⁰⁻¹².

The attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) has been applied to perform novel detection tests for several systemic diseases¹³. ATR-FTIR is a fast-processing platform, highly sensitive, and reagent-free, thus providing a sustainable and environmentally friendly method for the identification of spectral signatures from unique molecules in biofluids for each specific disease^{14,15}. Saliva offers a non-invasive, low-cost, and simple method of collection for the patient¹⁶. The application of saliva on the ATR-FTIR platform permits the detection of several

compounds¹⁷ protein components such as amide I (~1636 cm⁻¹), amide II (1549 cm⁻¹), and amide III (1350 and 1244 cm⁻¹), as well as methyl vibrations of peptides (1450 cm⁻¹). Besides, lipids (fatty acids) can also be detected at ~2900 and 1404 cm⁻¹, nucleic acids at 1080-1070cm⁻¹ and carbohydrates such as glycogen, glucose, and fructose can be detected at 1045cm⁻¹^{17,18}. ATR-FTIR technology associated with multivariate analysis of saliva spectra can be potentially used in diagnostic and prognostic applications in several other infections¹⁴. Salivary diagnostics based on ATR-FTIR have been effectively applied in tests for infectious and chronic diseases such as COVID-19, diabetes mellitus, and chronic kidney disease for animal models and human samples¹⁹⁻²¹.

It has been reported that the oral cavity becomes an extra gastric reservoir for *H. pylori* and detection of the pathogen in oral fluids such as saliva and dental biofilm has been recorded²². PCR and antibody identification tests are examples of diagnostic applications for the detection of *H. pylori* in saliva, however, alternative techniques involving electrochemical sensors and lateral flow immunoassays are also described for this pathogen detection^{23,24}.

In the present study, experimental procedures were performed to test the hypothesis that infrared spectroscopy coupled with machine learning is accurate for *H. pylori* detection in human saliva. Therefore, this study aimed to evaluate the accuracy, sensitivity, and specificity of the ATR-FTIR platform coupled with machine learning algorithms for salivary detection of *H. pylori* in different concentrations. Thus, developing a novel sustainable, portable, fast, and non-invasive detection platform for *H. pylori*.

Materials and Methods

Bacterial strain

The strain used in this study was provided by the American Type Culture Collection (ATCC) - *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) and it is part of the culture collection of the Laboratory of Antimicrobial Testing (LEA) at the Federal University of Uberlândia (UFU). Bacteria were kept under cryopreservation (-80°C) in Brucella broth (Difco Labs, Detroit, MI, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum. For the tests, *H. pylori* (ATCC 43504) was seeded on Brucella agar (Difco) supplemented with 5% defibrinated horse blood, 10% fetal bovine serum, and Brucella broth (Difco) supplemented with 10% fetal bovine serum. Then, bacteria were incubated in a CO₂

incubator (Panasonic Biomedical, Netherlands, Amsterdam) at 37°C for 72 hours in an atmosphere containing 10% CO₂.

Saliva Collection

Experimental procedures were carried out following the Declaration of Helsinki and were approved by the Ethical Committee at the Federal University of Uberlândia (CAAE: #58115222.5.0000.5152). Written informed consent was obtained from the participants of the present study before sample collection. The non-stimulated saliva collections from human participants were performed using a standard 15 mL polypropylene tube for 5 minutes²⁰. The collections were performed at the Nanobiotechnology Laboratory at UFU. Saliva was collected from 10 different sources, and then all the material obtained was mixed in the form of pooled saliva, which was used to prepare the samples. Among the participants who donated saliva were 3 men and 7 women, all in the age group of 20 - 44 years.

Sample Preparation

The samples were prepared through a serial dilution process of *H. pylori* in saliva according to the standards of McFarland's microbiological scale, following the values of 10⁸, 10⁷, 10⁶, and 10⁵ Colony Forming Units (CFU/mL). For the initial dilution of the first sample at 10⁹ CFU/mL of *H. pylori*, a volume of sterile Ultrapure Type 1 water was added to the sample for optical compensation and possible confirmation of the scale. Thus, containing an initial volume of 2mL, consisting of 1mL of water and 1mL of saliva, this sample was used only as a starting medium for the initial serial dilution process and was not used as a sample.

The samples for the next concentrations, which were used as data for result computation, were obtained through a standard procedure of serial dilution. 100 µL of the first sample were transferred into a serial sequence to the next tubes, where at the end 100 µL were discarded, obtaining the following concentrations: 10⁸, 10⁷, 10⁶ and 10⁵ (CFU/mL) of *H. pylori*. The dilution was performed using pure saliva and to prepare the vehicles samples as controls for the statistical comparisons, the same procedures were performed, however, without the incorporation of bacteria.

The spectrum collection was performed on different days following this protocol, using the same pool of saliva, in all dilutions, to avoid external problems related to pipetting and external errors. A total of nine equal dilution procedures were performed, and each sample obtained was applied in triplicate, thus 27 spectra were collected for each concentration and vehicle sample, totaling 216 spectra obtained and submitted to the algorithms analysis. The representative scheme of the dilutions performed is shown in Figure 1:

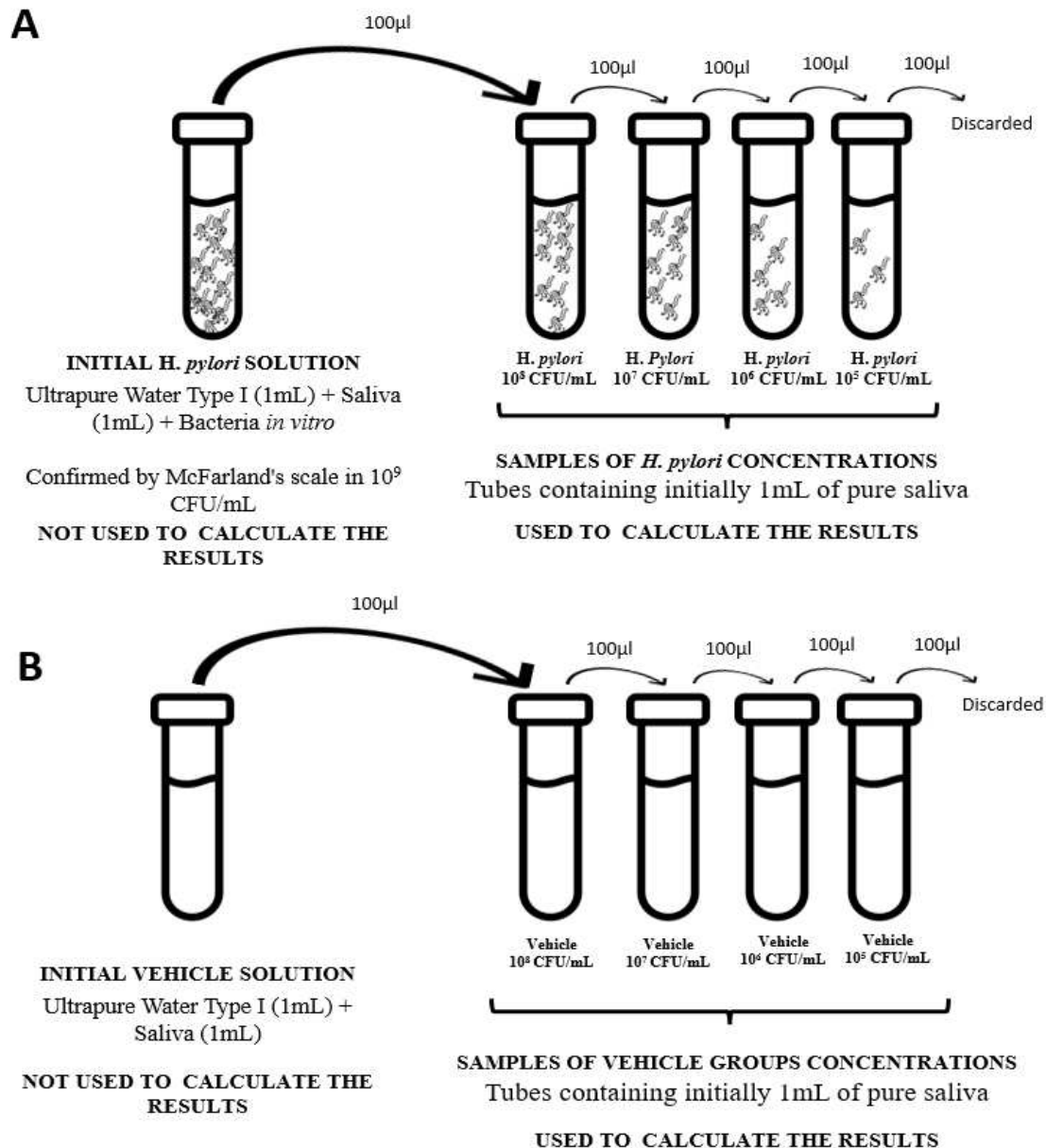


Figure 1. Schematic demonstration of the performed serial dilution and identification of the samples. (A) Dilutions with *H. pylori* at 10^8 , 10^7 , 10^6 , and 10^5 CFU/mL samples were used for the analysis. (B) Dilutions without *H. pylori* with the preparation of the vehicle samples.

ATR-FTIR spectroscopy

The FTIR Benchtop System Cary 630 FTIR Spectrometer coupled to a diamond ATR was used for infrared analysis. The spectra were acquired using an FTIR mode over the range $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ in which $2\mu\text{L}$ of each sample were inserted directly into the crystal. The applied samples were allowed to dry at room temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) in a laminar compartment with activated airflow for 5 minutes. Each sample was analyzed in triplicate, in nine rounds for each bacterial concentration and respective matched-control sample.

Data Analysis with Machine Learning

The infrared vibrational profile was analyzed coupled to machine learning computational methodology in different concentrations of *H. pylori* in saliva samples. Firstly, the spectral data were truncated with the biofingerprint region ($1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$). Three configurations of data preparation and pre-processing were then considered: (i) raw data, (ii) Savitzky-Golay filter methods (four-order polynomial in an twenty five points window and first-order derivative) followed by vector normalization, and (iii) rubberband baseline correction followed by amide I normalization. Two supervised learning techniques were considered for spectra analysis: Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM). A five-fold stratified cross-validation was performed to evaluate the prediction power of LDA and SVM over different *H. pylori* concentrations. In such procedure, the spectra were grouped into five subsets, then four subsets were used to train the algorithm and one was used exclusively to analyze its sensitivity, specificity, and accuracy. This strategy was repeated three times using different subset configurations to obtain a robust predictive performance of the algorithm.¹⁸.

RESULTS

The averages of the spectra obtained from the samples of different concentrations were plotted in graphs for both *H. pylori* and matched-control samples in Figure 2, which shows the spectra after the vector normalization. In the graphs, the regions of amide I (1636 cm^{-1}); amide II (1549 cm^{-1}); amide III ($1350\text{--}1244\text{ cm}^{-1}$); methyl vibrations of

peptides (1450 cm^{-1}); regions of lipids (fatty acids) and amino acids (1404 cm^{-1}), nucleic acids and carbohydrates (glycogen glucose, fructose) ($1080\text{-}1045\text{ cm}^{-1}$) were discriminated.

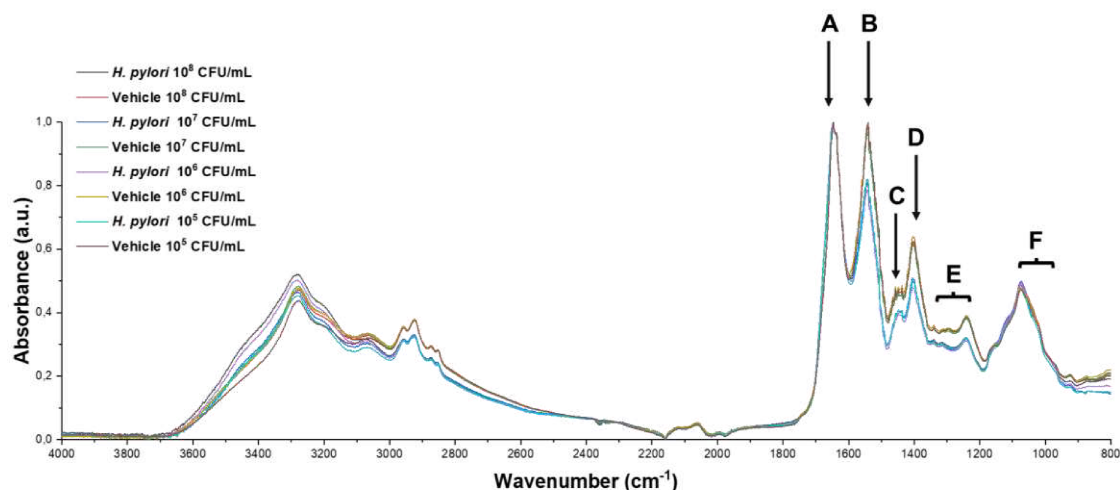


Figure 2. Mean spectra after vector normalization for all dilutions of *H. pylori* and respective vehicle groups, represented in full, with an indicative demonstration of the specific spectral registers identified and discriminated in the spectral plots: (A) amide I (1636 cm^{-1}), (B) amide II (1549 cm^{-1}) (C) methyl vibrations of peptides (1450 cm^{-1}). (D) of lipids (fatty acids) and amino acids (1404 cm^{-1}), (E) amide III ($1350\text{-}1244\text{ cm}^{-1}$), (F) nucleic acids and carbohydrates ($1080\text{ - }1045\text{ cm}^{-1}$).

Figure 3 shows the spectral mean patterns for each dilution of the samples with bacteria added, along with the respective vehicle group in spectrum ($4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$).

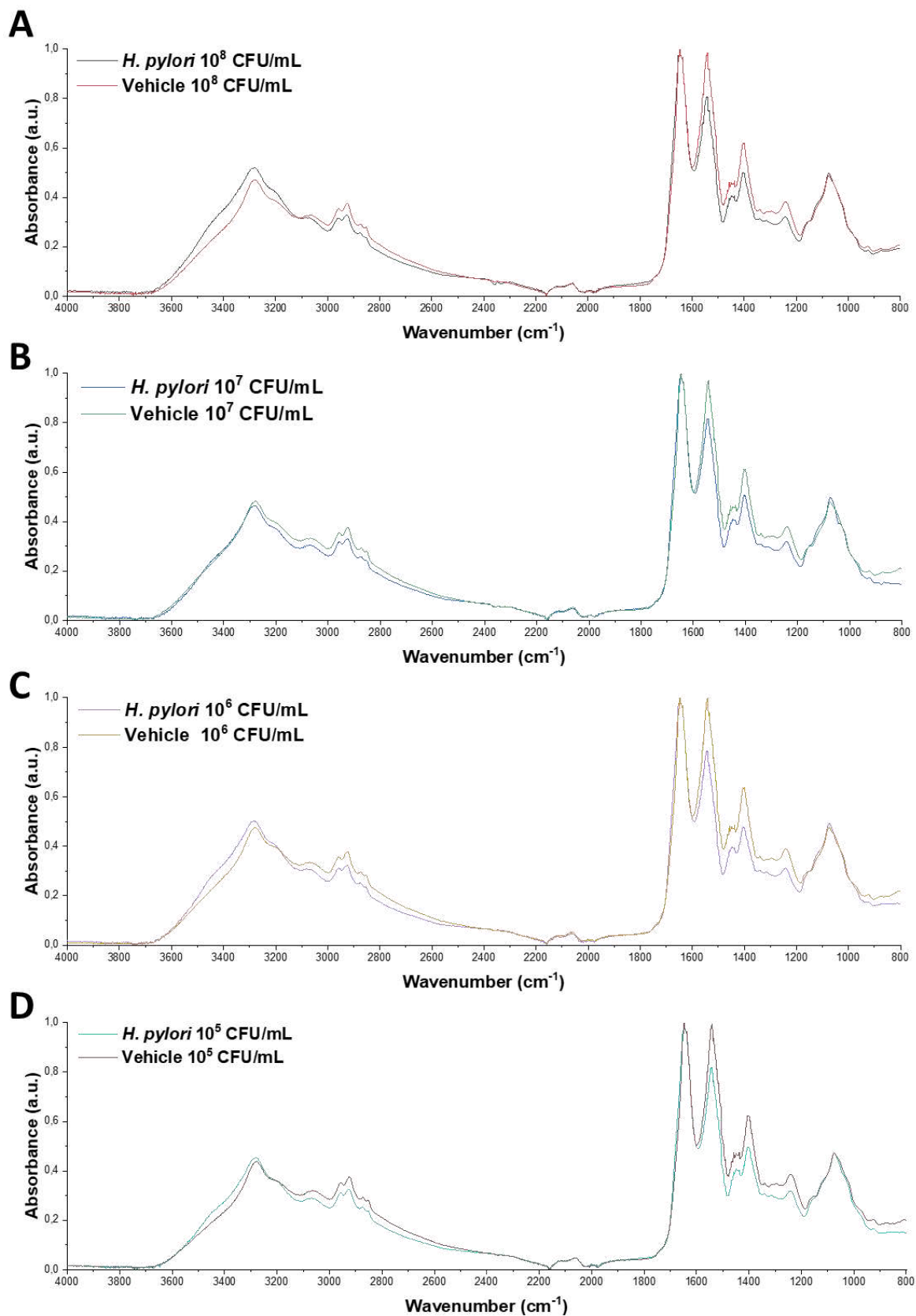


Figure 3: Original spectra after vector normalization for each dilution of *H. pylori* and its respective vehicle group, plotted to compare with the spectral: A) *H. pylori* 10⁸ CFU/mL; B) *H. pylori* 10⁷ CFU/mL; C) *H. pylori* 10⁶ CFU/mL; D) *H. pylori* 10⁵ CFU/mL.

All infrared spectra were submitted to data analysis procedures by Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) algorithms to generate the discriminatory accuracy for this salivary test. This biophotonic test to detect *H. pylori* in human saliva presented an accuracy of 94%, with a sensitivity of 100%, and specificity of 89% to the concentration of 10^8 CFU/mL of *H. pylori* under pre-processed spectra followed by Rubberband+Amide I normalization in SVM algorithm. Besides, the concentration of 10^8 CFU/mL the LDA algorithm achieved 85% of accuracy, 93% of sensitivity, and 78% of specificity to discriminate from vehicle samples.

The discrimination between the vehicle and 10^7 CFU/mL of *H. pylori* presented an accuracy of 93%, a sensitivity of 85%, and a specificity of 100% when coupled to the SVM algorithm. The discrimination between the vehicle and 10^7 CFU/mL of *H. pylori* had accuracy, sensitivity, and specificity of 93% coupled to the LDA algorithm when spectra were preprocessed in the Savitzky-Golay filter.

The discrimination performance between 10^6 CFU/mL of *H. pylori* and vehicle samples in the SVM algorithm had 89% of accuracy, 81% of sensitivity, and 96% of specificity. When we applied the LDA algorithm, the accuracy was 93% of accuracy, 96% of sensitivity, and 89% of specificity using raw data.

Finally, the performance to discriminate 10^5 CFU/mL of *H. pylori* between vehicle samples in raw spectra presented 85% of accuracy, 81% of sensitivity, and 89% of specificity in SVM for the raw data and for the Rubberband+Amide I pre-processing data. The LDA analysis for the raw data obtained similar performance of SVM algorithm. The complete data are presented in Table 1.

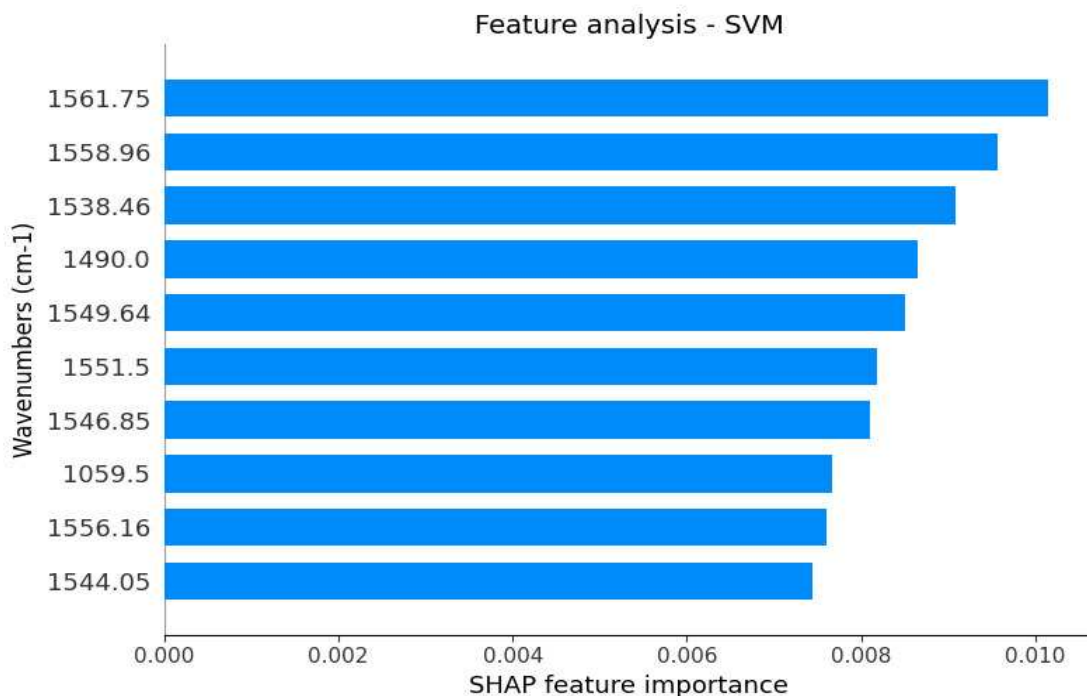
Table 1: Performance of Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) to discriminate different concentrations of diluted saliva samples with *Helicobacter pylori* by ATR-FTIR spectroscopy

Sample	Algorithm	Pre-processing	Accuracy	Sensitivity	Specificity
<i>H. pylori</i> 10 ⁸ CFU/mL	LDA	Raw data	0,65	0,56	0,74
		Rubberband+Amide I	0,63	0,67	0,59
		Savitzky-Golay	0,65	0,63	0,67
	SVM	Raw data	0,89	0,81	0,96
		Rubberband+Amide I	0,81	0,81	0,81
		Savitzky-Golay	0,78	0,56	1,00
<i>H. pylori</i> 10 ⁷ CFU/mL	LDA	Raw data	0,81	0,85	0,78
		Rubberband+Amide I	0,81	0,85	0,78
		Savitzky-Golay	0,93	0,93	0,93
	SVM	Raw data	0,93	0,85	1,00
		Rubberband+Amide I	0,87	0,89	0,85
		Savitzky-Golay	0,89	1,00	0,78
<i>H. pylori</i> 10 ⁶ CFU/mL	LDA	Raw data	0,93	0,96	0,89
		Rubberband+Amide I	0,85	0,93	0,78
		Savitzky-Golay	0,91	1,00	0,81
	SVM	Raw data	0,93	1,00	0,85
		Rubberband+Amide I	0,94	1,00	0,89
		Savitzky-Golay	0,91	1,00	0,81
<i>H. pylori</i> 10 ⁵ CFU/mL	LDA	Raw data	0,85	0,81	0,89
		Rubberband+Amide I	0,70	0,56	0,85
		Savitzky-Golay	0,61	0,52	0,70
	SVM	Raw data	0,85	0,81	0,89
		Rubberband+Amide I	0,85	0,93	0,78
		Savitzky-Golay	0,83	0,85	0,81

The SHapley Additive exPlanations (SHAP) plot explain the main vibrational modes used for the assembly of SVM algorithms in the spectra to detect *H. pylori* in human saliva as depicted in Figure 4. The vibrational modes at 1561.75 cm⁻¹, 1558.96 cm⁻¹, 1538.46 cm⁻¹, 1490 cm⁻¹, and 1549.64 cm⁻¹ were the main attributes used in those algorithms. The region of 1059.5 cm⁻¹ was also employed for this differentiation. In

general, it can be stated that the main points of discrimination of the results are present in the spectral band region of amide II.

Figure 4: SHAP plot for the main vibrational modes selected by SVM to obtain the classification of different concentrations of *H. pylori* diluted in human saliva.



DISCUSSION

The results obtained in this study suggest adequate values of accuracy, sensitivity, and specificity for the detection of *H. pylori* in human saliva samples. The best-performing SVM algorithms to detect *H. pylori* had accuracy between 81~94% to 10^8 , 10^7 , 10^6 , and 10^5 (CFU/mL) of *H. pylori*. Altogether, although a salivary analysis comparing the saliva of patients with and without contamination with *H. pylori* is necessary, it demonstrates that this biophotonic platform coupled with learning machine algorithms presents promising results for *H. pylori* detection in human saliva and could be used alternatively to identify *H. pylori* infection by detecting this bacteria in a reagent-free, fast, sustainable and non-invasive screening or diagnostic platforms.

Currently, in the perspective of the need for early identification of *H. pylori* infection, novel diagnostic alternatives are being developed. The Urea Breath Test (UBT) can indirectly detect *H. pylori* through the urease enzyme in exhaled air marked with carbon isotopes such as ^{13}C or ^{14}C ¹². However, the UBT technique requires sophisticated and high-cost equipment, and the collection procedures demand a high level of training, thus offering restricted access in LMICs that present a high prevalence of infection⁴.

Thus, the development of low-cost and non-invasive techniques can be critical for countries and geographical centers that present greater demand ²⁵. In this context, the *H. pylori* detection using human saliva samples, without reagents, as presented in this study, could be an innovative alternative for this pathogen detection issue.

The EGD, the current invasive method presented as the "gold standard", presented a sensitivity, specificity, and accuracy at 90%, 100% and 93%, respectively ^{7,26}. The modern non-invasive standard UBT presents the highest sensitivity (90-96%) and specificity (88-98%), while accuracy data is estimated to be over 90%. Stool antigen tests are still used as an alternative non-invasive method, but with limitations mainly linked to the prevalence of the pathogen after treatment, indicating sensitivity, specificity, and accuracy data of 95%, 74%, and 75% respectively^{5,12,26}.

Saliva is a useful diagnostic tool because that can be easily and non-invasively collected by people with minimal training, making it a cost-effective option for large-scale screenings ²⁷. Saliva can also be used to diagnose conditions specific to individual salivary glands and microbial behavior ²⁷. The saliva collection process poses little risk of infection and is suitable for use with patients who may have difficulty with blood draws ²⁸. The association of saliva and ATR-FTIR has already been described as an effective tool for systemic disease screening ^{18,27}. Notwithstanding, saliva samples have also presented significant results for the detection of *H. pylori* genes in PCR methodology ²⁹. Novel salivary electrochemical platforms and salivary immunochromatographic assay technologies also demonstrate excellent results for detection of *H. pylori* ^{23,24}. The salivary identification of bacteria through the ATR-FTIR technology is extremely valuable since it is portable, sustainable, low cost, and possible to be done through self-collection of samples, without invasive procedures for the patient^{19,30}. Therefore, our results indicate promising data to be used in biophotonic platforms for *H. pylori* detection in self-collected saliva samples.

It is critical to consider the time to obtain and prepare the samples on the salivary biophotonic platform proposed here, this platform has the potential to reduce the time of analysis that each device can perform in a decentralized laboratory. A diagnostic platform using spectroscopy coupled to a computational algorithm was evaluated, presenting a capacity of approximately 12 analyses per hour ³². In the current methodologies, involving endoscopic processes, the processing is done with a maximum limit of 2 patients per hour for collecting and obtaining samples, not counting the test processing time ³³.

Early treatment for *H. pylori* infections is critical to reduce serious consequences of this infectious disease, such as peptic ulcer and gastrointestinal neoplasms^{3,34}. The initial control of the bacteria ensures that the patient is more resistant to possible ulcerative lesions, especially stomach ones, that *H. pylori* can cause in the host organism². In this context, the realization of a faster diagnostic process is essential to reduce the lines for more detailed detection procedures. Therefore, this proposed ATR-FTIR platform supported by artificial intelligence presents a potential for a quick and easy test detection of *H. pylori*.

CONCLUSION

These data indicate ATR-FTIR coupled with LDA and SVM algorithms as an innovative alternative to detect unique vibrational modes of *Helicobacter pylori* in human saliva samples, suggesting that this sustainable, portable, fast, and non-invasive platform needs to be tested in large-scale samples for potential early detection or screening of *H. pylori*.

REFERENCES

1. Camilo, V., Sugiyama, T. & Touati, E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1111/hel.12405> (2017).
2. Crowe, S. E. *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine* **380**, 1158–1165 (2019).
3. Li, M., Gao, N., Wang, S., Guo, Y. & Liu, Z. Bibliometric analysis of *Helicobacter pylori* resistance-from 2002 to 2022. *Helicobacter* (2023) doi:10.1111/HEL.12983.
4. Butt, J. & Epplein, M. How do global trends in *Helicobacter pylori* prevalence inform prevention planning? *Lancet Gastroenterol Hepatol* **8**, 498–499 (2023).
5. Ferwana, M. *et al.* Accuracy of urea breath test in *Helicobacter pylori* infection: meta-analysis. *World J Gastroenterol* **21**, 1305–1314 (2015).
6. Minkara, M. S., Ucisik, M. N., Weaver, M. N. & Merz, K. M. Molecular Dynamics Study of *Helicobacter pylori* Urease. *J Chem Theory Comput* **10**, 1852–1862 (2014).
7. Horiuchi, A. & Nakayama, Y. Unsedated ultrathin EGD by using a 5.2-mm-diameter videoscope: evaluation of acceptability and diagnostic accuracy. *Gastrointest Endosc* **64**, 868–873 (2006).

8. Lei, W.-Y. *et al.* Eradicating *Helicobacter pylori* via ¹³C-urea breath screening to prevent gastric cancer in indigenous communities: a population-based study and development of a family index-case method. *Gut* **0**, gutjnl-2023-329871 (2023).
9. Huh, C. W. & Kim, B. W. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi* vol. 72 229–236 Preprint at <https://doi.org/10.4166/kjg.2018.72.5.229> (2018).
10. Wang, Y. K. *et al.* Diagnosis of *helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol* **21**, 11221–11235 (2015).
11. Ansari, S. & Yamaoka, Y. *Helicobacter pylori* Infection, Its Laboratory Diagnosis, and Antimicrobial Resistance: a Perspective of Clinical Relevance. *Clin Microbiol Rev* **35**, e0025821 (2022).
12. Best, L. M. J. *et al.* Non-invasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Cochrane Database Syst Rev* **2018**, (2018).
13. Liu, G. L. & Kazarian, S. G. Recent advances and applications to cultural heritage using ATR-FTIR spectroscopy and ATR-FTIR spectroscopic imaging. *Analyst* **147**, 1777–1797 (2022).
14. Caixeta, D. C. *et al.* Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One* **15**, e0223461 (2020).
15. Theophilou, G., Lima, K. M. G., Martin-Hirsch, P. L., Stringfellow, H. F. & Martin, F. L. ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometric analysis discriminates normal, borderline and malignant ovarian tissue: classifying subtypes of human cancer. *Analyst* **141**, 585–594 (2016).
16. Bravo, C. G. A. dos S. *et al.* Saliva as a non-invasive material for early diagnosis. *Acta Biochim Pol* **66**, (2019).
17. Movasaghi, Z., Rehman, S. & Rehman, I. U. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043> **43**, 134–179 (2008).
18. Ferreira, I. C. C. *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *J Oncol* **2020**, (2020).
19. Oliveira, S. W. *et al.* Salivary Detection of Zika Virus Infection Using ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Machine Learning Algorithms and Univariate Analysis: A Proof-of-Concept Animal Study. *Diagnostics* **13**, 1443 (2023).
20. Caixeta, D. C. *et al.* Monitoring glucose levels in urine using FTIR spectroscopy combined with univariate and multivariate statistical methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **290**, 122259 (2023).
21. Sanchez-Brito, M. *et al.* Attenuated total reflection FTIR dataset for identification of type 2 diabetes using saliva. *Comput Struct Biotechnol J* **20**, 4542–4548 (2022).

22. Eskandari, A., Mahmoudpour, A., Abolfazli, N. & Lafzi, A. Detection of *Helicobacter pylori* using PCR in dental plaque of patients with and without gastritis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **15**, (2010).
23. Wang, Y. *et al.* A time-resolved fluorescent microsphere-lateral flow immunoassay strip assay with image visual analysis for quantitative detection of *Helicobacter pylori* in saliva. *Talanta* **256**, (2023).
24. Jaradat, H., Al-Hamry, A., Ibbini, M., Fourati, N. & Kanoun, O. Novel Sensitive Electrochemical Immunosensor Development for the Selective Detection of HopQ *H. pylori* Bacteria Biomarker. *Biosensors* 2023, Vol. 13, Page 527 **13**, 527 (2023).
25. Burucoa, C. & Axon, A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **22**, (2017).
26. Nieuwenburg, S. A. V. *et al.* Accuracy of *H. pylori* fecal antigen test using fecal immunochemical test (FIT). *Gastric Cancer* **25**, 375–381 (2022).
27. Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K. & Punyadeera, C. Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clin Chem* **57**, 675–687 (2011).
28. Caixeta, D. C. *et al.* Salivary SARS-CoV-2 RNA for diagnosis of COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy. *Japanese Dental Science Review* (2023) doi:10.1016/j.jdsr.2023.06.004.
29. Aksit Bıçak, D. *et al.* The investigation of *Helicobacter pylori* in the dental biofilm and saliva samples of children with dyspeptic complaints. *BMC Oral Health* **17**, 67 (2017).
30. Sabino-Silva, R., Jardim, A. C. G. & Siqueira, W. L. Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis. *Clinical Oral Investigations* vol. 24 1619–1621 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03248-x> (2020).
31. Gonciarz, W., Lechowicz, Ł., Urbaniak, M., Kaca, W. & Chmiela, M. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Artificial Neural Networks Applied to Investigate Quantitative Changes of Selected Soluble Biomarkers, Correlated with *H. pylori* Infection in Children and Presumable Consequent Delayed Growth. *J Clin Med* **9**, 3852 (2020).
32. Motta, O., De Caro, F., Quarto, F. & Proto, A. New FTIR methodology for the evaluation of ¹³C/¹²C isotope ratio in *Helicobacter pylori* infection diagnosis. *Journal of Infection* **59**, 90–94 (2009).
33. Sousa Sampaio, P. N. & Calado, C. R. C. Antimicrobial evaluation of the *Cynara cardunculus* extract in *Helicobacter pylori* cells using mid-infrared spectroscopy and chemometric methods. *J Appl Microbiol* **133**, 1743–1756 (2022).
34. Barauna, V. G. *et al.* Ultrarapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Infection Using Simple ATR-FTIR Spectroscopy and an Analysis Algorithm: High Sensitivity and Specificity. *Anal Chem* **93**, 2950–2958 (2021).

35. Chatrangsun, B. & Vilaichone, R. K. Endoscopic Diagnosis for *H. pylori* Infection: White Light Imaging (WLI) vs. Image-Enhanced Endoscopy (IEE). *Asian Pac J Cancer Prev* **22**, 3031–3038 (2021).
36. Rodrigues, R. P. C. B. *et al.* Salivary changes in chronic kidney disease and in patients undergoing hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. *J Nephrol* **35**, 1339–1367 (2022).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to pay our respects to Luiz Ricardo Goulart (in memoriam), who passed away in 2021 due to complications from COVID-19. Goulart was a brilliant scientist who supported a hundred young scientists in the nanobiotechnology field.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.H.S., M.F.G.V, N.B.S.S. and R.S.S. designed the project, planned the experiments, and wrote the manuscript. L.R.G.F, C.H.G.M. and T.M.C contributed to the structuring of the project. M. G. C developed and role the machine learning algorithms. M.A.G.J. provide important suggestions about manuscript writing. All authors reviewed the manuscript.

5.0 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no trabalho indicam que o ATR-FTIR, associado aos algoritmos LDA e SVM, é uma alternativa inovadora para detectar modos vibracionais exclusivos do *Helicobacter pylori* em amostras de saliva humana, sugerindo que essa plataforma sustentável, portátil, rápida e não invasiva precisa ser testada em amostras de grande escala para possível detecção precoce ou triagem do *H. pylori*.

6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADI, A. T. B. Different Look in to the Role of Flagella in Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. **Current Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 1490–1491, 1 dez. 2017.
- AKSIT BICAK, D. et al. The investigation of *Helicobacter pylori* in the dental biofilm and saliva samples of children with dyspeptic complaints. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 67, 21 dez. 2017.

ANSARI, S.; YAMAOKA, Y. Helicobacter pylori Infection, Its Laboratory Diagnosis, and Antimicrobial Resistance: a Perspective of Clinical Relevance. **Clinical microbiology reviews**, v. 35, n. 3, p. e0025821, 1 set. 2022.

ASANO, N. et al. Helicobacter pylori-negative gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: A review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 26, p. 8014–8020, 14 jul. 2015.

BARAUNA, V. G. et al. Ultrarapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Infection Using Simple ATR-FTIR Spectroscopy and an Analysis Algorithm: High Sensitivity and Specificity. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 5, p. 2950–2958, 9 fev. 2021.

BÉNÉJAT, L. et al. RIDA®GENE Helicobacter pylori PCR on the ELITE InGenius System. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, 1 maio 2023.

BEST, L. M. J. et al. **Non-invasive diagnostic tests for Helicobacter pylori infection. Cochrane Database of Systematic Reviews** John Wiley and Sons Ltd, , 15 mar. 2018a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29543326/>>. Acesso em: 18 maio. 2021

BEST, L. M. J. et al. Non-invasive diagnostic tests for Helicobacter pylori infection. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2018, n. 3, 15 mar. 2018b.

BOROUMAND, M. et al. Saliva, a bodily fluid with recognized and potential diagnostic applications. **Journal of separation science**, v. 44, n. 19, p. 3677–3690, 1 out. 2021.

BRAVO, C. G. A. DOS S. et al. Saliva as a non-invasive material for early diagnosis. **Acta biochimica Polonica**, v. 66, n. 4, 2019.

BUNACIU, A. A. et al. Vibrational Spectroscopy in Body Fluids Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 67–75, 2 jan. 2017.

BURUCOA, C.; AXON, A. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, v. 22, 1 set. 2017.

BUTT, J. et al. Serologic Response to Helicobacter pylori Proteins Associated With Risk of Colorectal Cancer Among Diverse Populations in the United States. **Gastroenterology**, v. 156, n. 1, p. 175- 186.e2, 1 jan. 2019.

BUTT, J. et al. Antibody Responses to Helicobacter pylori and Risk of Developing Colorectal Cancer in a European Cohort. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 29, n. 7, p. 1475–1481, 1 jul. 2020.

BUTT, J.; EPPLEIN, M. How do global trends in Helicobacter pylori prevalence inform prevention planning? **The lancet. Gastroenterology & hepatology**, v. 8, n. 6, p. 498–499, 1 jun. 2023.

CAIXETA, D. C. et al. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0223461, 2020.

- CAIXETA, D. C. et al. One-Year Update on Salivary Diagnostic of COVID-19. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 21 maio 2021.
- CAIXETA, D. C. et al. Monitoring glucose levels in urine using FTIR spectroscopy combined with univariate and multivariate statistical methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 290, p. 122259, 5 abr. 2023.
- CAMILO, V.; SUGIYAMA, T.; TOUATI, E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 22 Suppl 1, 1 set. 2017a.
- CAMILO, V.; SUGIYAMA, T.; TOUATI, E. **Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection**. **Helicobacter** Blackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2017b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28891130/>>. Acesso em: 18 maio. 2021
- CASTAGNOLA, M. et al. Salivary biomarkers and proteomics: Future diagnostic and clinical utilities. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 37, n. 2, p. 94–101, 2017.
- CAVALEIRO-PINTO, M. et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric cardia cancer: Systematic review and meta-analysis. **Cancer Causes and Control**, v. 22, n. 3, p. 375–387, mar. 2011.
- CHATRANGSUN, B.; VILAICHONE, R. K. Endoscopic Diagnosis for *H. pylori* Infection: White Light Imaging (WLI) vs. Image-Enhanced Endoscopy (IEE). **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 22, n. 9, p. 3031–3038, 1 set. 2021.
- CHEN, Z. et al. ¹³C-Urea Breath Test for the Diagnosis of *H. pylori* Infection in Patients after Partial Gastrectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research**, v. 35, n. 5, p. 1125–1134, 2022.
- CHEOK, Y. Y. et al. An Overview of *Helicobacter pylori* Survival Tactics in the Hostile Human Stomach Environment. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2021.
- CHONWERAWONG, M.; FERRERO, R. L. Analysis of Innate Immune Responses to *Helicobacter pylori*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2283, p. 191–214, 2021.
- COELHO, L. G. V. et al. IVTH BRAZILIAN CONSENSUS CONFERENCE ON *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, n. 2, p. 97–121, 16 abr. 2018.
- CROWE, S. E. *Helicobacter pylori* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 12, p. 1158–1165, 2019.
- DE BRITO, B. B. et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 37, p. 5578–5589, 7 out. 2019.
- DELRUE, C.; DE BRUYNE, S.; SPEECKAERT, M. M. Unlocking the Diagnostic Potential of Saliva: A Comprehensive Review of Infrared Spectroscopy and Its Applications in Salivary Analysis. **Journal of personalized medicine**, v. 13, n. 6, p. 907, 28 maio 2023.

DUQUESNE, A. et al. Diagnostic Testing Accuracy for Helicobacter pylori Infection among Adult Patients with Dyspepsia in Cuba's Primary Care Setting. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2023.

DUTTA, A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization**, v. 2, p. 73–93, 1 jan. 2017.

ESKANDARI, A. et al. Detection of Helicobacter pylori using PCR in dental plaque of patients with and without gastritis. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 15, n. 1, jan. 2010.

FERREIRA, I. C. C. et al. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. **Journal of oncology**, v. 2020, 2020.

FERWANA, M. et al. Accuracy of urea breath test in Helicobacter pylori infection: meta-analysis. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1305–1314, 28 jan. 2015.

GONÇALVES, A. C. et al. Chloride and sodium ion concentrations in saliva and sweat as a method to diagnose cystic fibrosis. **Jornal de pediatria**, v. 95, n. 4, p. 443–450, 1 jul. 2019.

GONCIARZ, W. et al. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Artificial Neural Networks Applied to Investigate Quantitative Changes of Selected Soluble Biomarkers, Correlated with H. pylori Infection in Children and Presumable Consequent Delayed Growth. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 12, p. 3852, 27 nov. 2020.

GOODWIN, C. S. et al. Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov., respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 4, p. 397–405, 1 out. 1989.

GRAVINA, A. G. et al. Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 29, p. 3204–3221, 7 ago. 2018.

GU, H. Role of Flagella in the Pathogenesis of Helicobacter pylori. **Current microbiology**, v. 74, n. 7, p. 863–869, 1 jul. 2017.

GUEVARA, B.; COGDILL, A. G. Helicobacter pylori: A Review of Current Diagnostic and Management Strategies. **Digestive diseases and sciences**, v. 65, n. 7, p. 1917–1931, 1 jul. 2020.

HOLMSTRÖM, M. O. et al. Evidence of immune elimination, immuno-editing and immune escape in patients with hematological cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 2, p. 315–324, 2020.

HOOI, J. K. Y. et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 420–429, 1 ago. 2017.

HORIUCHI, A.; NAKAYAMA, Y. Unsedated ultrathin EGD by using a 5.2-mm-diameter videoscope: evaluation of acceptability and diagnostic accuracy. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 64, n. 6, p. 868–873, 1 dez. 2006.

HU, Y.; ZHU, Y.; LU, N. H. Novel and effective therapeutic regimens for helicobacter pylori in an era of increasing antibiotic resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. MAY, 5 maio 2017.

HUH, C. W.; KIM, B. W. **Diagnosis of Helicobacter pylori Infection. The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi**NLM (Medline), , 25 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30642138/>>. Acesso em: 18 maio. 2021

IERARDI, E. et al. The puzzle of coccoid forms of helicobacter pylori: Beyond basic science. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 1 jun. 2020.

JARADAT, H. et al. Novel Sensitive Electrochemical Immunosensor Development for the Selective Detection of HopQ H. pylori Bacteria Biomarker. **Biosensors 2023, Vol. 13, Page 527**, v. 13, n. 5, p. 527, 8 maio 2023.

KAYALI, S. et al. Helicobacter pylori, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. **Acta bio-medica : Atenei Parmensis**, v. 89, n. 8- S, p. 72–76, 2018.

KOTILEA, K.; BONTEMS, P.; TOUATI, E. Epidemiology, Diagnosis and Risk Factors of Helicobacter pylori Infection. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1149, p. 17–33, 2019.

KRAHEL, A. et al. Saliva as Diagnostic Material and Current Methods of Collection from Oral Cavity. **Clinical laboratory**, v. 68, n. 10, p. 2072–2080, 1 out. 2022.

LEAL, L. B. et al. Vibration spectroscopy and body biofluids: Literature review for clinical applications. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 24, p. 237–244, 1 dez. 2018.

LEE, Y. C.; DORE, M. P.; GRAHAM, D. Y. Diagnosis and Treatment of Helicobacter pylori Infection. **Annual review of medicine**, v. 73, p. 183–195, 2022.

LEI, W.-Y. et al. Eradicating Helicobacter pylori via 13C-urea breath screening to prevent gastric cancer in indigenous communities: a population-based study and development of a family index-case method. **Gut**, v. 0, p. gutjnl-2023-329871, 17 maio 2023.

LEONTIADIS, G. I.; MOAYYEDI, P.; FORD, A. C. HARLES. Helicobacter pylori infection. **Nature Reviews Disease Primers 2023 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–1, 20 abr. 2023.

LI, M. et al. Bibliometric analysis of Helicobacter pylori resistance-from 2002 to 2022. **Helicobacter**, 2023.

LI, Y. et al. Genotyping Helicobacter pylori antibiotic resistance – and virulence-associated genes in patients with gastric cancer in Wenzhou, China. **Arab Journal of Gastroenterology**, jun. 2021.

LIU, G. L.; KAZARIAN, S. G. Recent advances and applications to cultural heritage using ATR-FTIR spectroscopy and ATR-FTIR spectroscopic imaging. **Analyst**, v. 147, n. 9, p. 1777–1797, 30 mar. 2022.

MARSHALL, B.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.

- MÉGRAUD, F.; LEHOURS, P.; VALE, F. F. **The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology.** *Clinical Microbiology and Infection* Elsevier B.V., 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27451940/>>. Acesso em: 18 maio. 2021
- MENTIS, A.; LEHOURS, P.; MÉGRAUD, F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, v. 20, p. 1–7, 2015.
- MOTTA, O. et al. New FTIR methodology for the evaluation of ¹³C/¹²C isotope ratio in *Helicobacter pylori* infection diagnosis. *Journal of Infection*, v. 59, n. 2, p. 90–94, ago. 2009.
- MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>, v. 43, n. 2, p. 134–179, 2008.
- NGUYEN-KIM, H. et al. COVID salivary diagnostics: A comparative technical study. *Journal of Medical Virology*, v. 94, n. 9, p. 4277–4286, 1 set. 2022.
- NIEUWENBURG, S. A. V. et al. Accuracy of *H. pylori* fecal antigen test using fecal immunochemical test (FIT). *Gastric Cancer*, v. 25, n. 2, p. 375–381, 1 mar. 2022.
- NONAKA, T.; WONG, D. T. W. Saliva Diagnostics. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, v. 15, n. 1, p. 107–121, 2022.
- OLDANI, A. et al. *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. *PLoS pathogens*, v. 5, n. 10, 2009.
- OLIVEIRA, S. W. et al. Salivary Detection of Zika Virus Infection Using ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Machine Learning Algorithms and Univariate Analysis: A Proof-of-Concept Animal Study. *Diagnostics*, v. 13, n. 8, p. 1443, 17 abr. 2023.
- PARIHAR, V.; MCNAMARA, D. Endoscopic Detection of *Helicobacter pylori* by the Rapid Urease Test. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 2283, p. 37–43, 2021.
- PATEL, M. K.; TROMBLY, M. I.; KURT-JONES, E. A. Innate Immune Responses to *Helicobacter pylori* Infection: An Overview. p. 205–207, 2012.
- PEDERSEN, A. M. L. et al. Salivary secretion in health and disease. *Journal of oral rehabilitation*, v. 45, n. 9, p. 730–746, 1 set. 2018a.
- PEDERSEN, A. M. L. et al. Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral Diseases*, v. 24, n. 8, p. 1399–1416, 1 nov. 2018b.
- PETIT, S.; MADEJOVA, J. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Developments in Clay Science*, v. 5, n. C, p. 213–231, 1 jan. 2013.
- PODZIMEK, S. et al. Salivary Markers for Periodontal and General Diseases. *Disease Markers*, v. 2016, p. 1–8, 2016.

- POP, R. et al. Helicobacter Pylori-Induced Gastric Infections: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Approaches Using Silver Nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 1463, 1 jul. 2022.
- QIU, E.; LI, Z.; HAN, S. Methods for detection of Helicobacter pylori from stool sample: current options and developments. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 4, p. 2057–2062, 1 dez. 2021.
- RAŽUKA-EBELA, D.; GIUPPONI, B.; FRANCESCHI, F. Helicobacter pylori and extragastric diseases. **Helicobacter**, v. 23, p. 45–48, 2018.
- REYES-RETANA, J. A.; DUQUE-OSSA, L. C. Acute Myocardial Infarction Biosensor: A Review From Bottom Up. **Current problems in cardiology**, v. 46, n. 3, 1 mar. 2021.
- RODRIGUES, R. P. C. B. et al. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. **Brazilian dental journal**, v. 30, n. 5, p. 437–445, 1 set. 2019.
- RODRIGUES, R. P. C. B. et al. Salivary changes in chronic kidney disease and in patients undergoing hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Nephrology**, v. 35, n. 5, p. 1339–1367, 1 jun. 2022.
- SABINO-SILVA, R.; JARDIM, A. C. G.; SIQUEIRA, W. L. **Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis. Clinical Oral Investigations**Springer, , 1 abr. 2020.
- SALAR, A. Gastric MALT lymphoma and Helicobacter pylori. **Medicina clinica**, v. 152, n. 2, p. 65–71, 18 jan. 2019.
- SÁNCHEZ-ALONZO, K. et al. Detection of Helicobacter pylori in oral yeasts from students of a Chilean university. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, n. 11, p. 1509–1514, 2 dez. 2020.
- SANCHEZ-BRITO, M. et al. Attenuated total reflection FTIR dataset for identification of type 2 diabetes using saliva. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 4542–4548, 1 jan. 2022.
- SANTOS, M. L. C. et al. Helicobacter pylori infection: Beyond gastric manifestations. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 28, p. 4076–4093, 28 jul. 2020.
- SENUCHUKOVA, M. A. Helicobacter Pylori and Gastric Cancer Progression. **Current microbiology**, v. 79, n. 12, 1 nov. 2022.
- SEO, J. H.; BORTOLIN, K.; JONES, N. L. Review: Helicobacter pylori infection in children. **Helicobacter**, v. 25 Suppl 1, n. S1, 1 set. 2020.
- SOUSA SAMPAIO, P. N.; CALADO, C. R. C. Antimicrobial evaluation of the Cynara cardunculus extract in Helicobacter pylori cells using mid-infrared spectroscopy and chemometric methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 1743–1756, 1 set. 2022.

- THEOPHILOU, G. et al. ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometric analysis discriminates normal, borderline and malignant ovarian tissue: classifying subtypes of human cancer. **Analyst**, v. 141, n. 2, p. 585–594, 4 jan. 2016.
- TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the risk of gastric cancer: Review of epidemiological evidence. **Gastric Cancer**, v. 10, n. 2, p. 75–83, jun. 2007.
- VENERITO, M. et al. Review: Gastric cancer—Clinical aspects. **Helicobacter**, v. 24, n. S1, 1 set. 2019.
- VOHRA, P. et al. Evaluation and diagnostic usefulness of saliva for detection of HIV antibodies: A cross-sectional study. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 9, n. 5, p. 2437, 2020.
- WANG, Y. et al. A time-resolved fluorescent microsphere-lateral flow immunoassay strip assay with image visual analysis for quantitative detection of *Helicobacter pylori* in saliva. **Talanta**, v. 256, 1 maio 2023a.
- WANG, Y. K. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 40, p. 11221–11235, 28 out. 2015.
- WANG, Z. et al. *Helicobacter pylori* and gastric microbiota homeostasis: progress and prospects. <https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0102>, v. 18, n. 2, p. 137–157, 23 jan. 2023b.
- XU, W. et al. The relationship between *Helicobacter pylori* and pancreatic cancer: a meta-analysis. **Translational cancer research**, v. 11, n. 8, p. 2810–2822, 1 ago. 2022.
- YAMAOKA, Y.; GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. **Future Oncology**, v. 10, n. 8, p. 1487–1500, 2014.
- ZHANG, L. et al. *Helicobacter pylori* in the Oral Cavity: Current Evidence and Potential Survival Strategies. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 21, 1 nov. 2022.