

Genotipos de *Helicobacter pylori* y su asociación con la respuesta inmune del hospedero

Dra. Elvira Garza-González,* Dr. Guillermo I Pérez-Pérez,** Dr. Rolando Tijerina-Menchaca,*
Dr. Héctor J Maldonado-Garza,*** Francisco J Bosques-Padilla***

* Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León. México. ** New York University School of Medicine, New York, NY. USA. *** Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León. México.

Correspondencia: Dra. Elvira Garza-González. Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Av. Madero y Gonzalitos s/n, colonia Mitras Centro. Monterrey, Nuevo León, México. C.P. 64460. Teléfono y Fax: 8333 3664. E-mail: fbosques58@hotmail.com

Recibido para publicación: 12 de septiembre de 2001.

Aceptado para publicación: 23 de noviembre de 2001.

RESUMEN Antecedentes: el estudio del fenotipo y genotipo de *H. pylori* se ha centrado en dos factores de virulencia, la isla de patogenicidad *cag* (PAI) para la cual *cagA* es un marcador y la toxina formadora de vacuolas (VacA). Algunos estudios han mostrado la relevancia clínica de la determinación de anticuerpos anti-CagA. **Objetivo:** evaluar la relación entre los genotipos de *H. pylori* y la presencia de anticuerpos específicos anti-CagA. **Métodos:** se estudiaron 50 pacientes (media 53 años, de 15 a 92). La PCR de las regiones *m* y *s* de *vacA* se llevó a cabo usando los iniciadores descritos previamente (J Biol Chem 1995; 270: 17771). Para la PCR de *cagA* se utilizaron los iniciadores reportados por Rugge y cols. (Cancer 1999; 85: 2506) y la determinación de anticuerpos IgG anti-CagA se llevó a cabo de acuerdo al método desarrollado por Blaser y Pérez (Cancer Res 1995; 55: 2111). **Resultados:** un total de 50 pacientes fueron evaluados, todos positivos para *H. pylori*. De las 50 cepas de *H. pylori* estudiadas, 7(14%) fueron aisladas de pacientes con úlcera gástrica y 43(86%) de pacientes con DNU. El genotipo de *vacA* más frecuente fue el *s2/m2*, el cual correlacionó con las cepas CagA negativas ($p < 0.01$). Como se esperaba, la presencia de cepas de *H. pylori* *cagA+* correlacionó con la presencia de anticuerpos anti-CagA ($Kappa = 0.680$). La determinación de anticuerpos anti-CagA tuvo una sensibilidad de 77.4%, especificidad de 94.7%, valor predictivo positivo de 96% y valor predictivo negativo de 72% cuando se comparó con la técnica de PCR. **Conclusiones:** el genotipo *vacA s2/m2*, *cagA-* fue el más frecuente en cepas de *H. pylori* aisladas en el Noreste de México. Este resultado concuerda con la baja proporción de pacientes con enfermedad úlcero péptica descrita en esta población. La correlación entre la presencia de anticuerpos específicos para CagA y la demostración del gen *cagA*

SUMMARY Background data: The study of *Helicobacter pylori* phenotypes and genotypes is mainly focused on two groups of putative bacterial virulence factors: the *cag* pathogenicity island (PAI), for which *CagA* is a marker, and the vacuolating cytotoxin *VacA*. Several studies have shown the clinical relevance of the determination of IgG anti-CagA antibodies. **Objective:** To assess the prevalence of *vacA* and *cagA* genotypes of *H. pylori* and the association with IgG anti-CagA antibodies in symptomatic patients. **Methods:** We studied 50 patients (mean age 53 years, range 15-92). PCR amplification of the *vacA s* and *m* regions was performed using the primers described (J Biol Chem 1995; 270: 17771). For *cagA* PCR, primers described by Rugge et al. were used (Cancer 1999; 85: 2506) and determination of IgG anti-CagA antibodies was done according to the method described by Blaser and Perez (Cancer Res 1995; 55: 2111). **Results:** All 50 patients studied were positive for *H. pylori*. Of the 50 *H. pylori* strains, 7 (14%) were isolated from patients with peptic ulcer disease and 43 (86%) from patients with non-ulcer dyspepsia. The most frequent *vacA* genotype was *s2/m2*, associated with *cagA-* *H. pylori* strains ($p < 0.01$). Presence of *cagA+* *H. pylori* strains correlated with the presence of IgG antibodies ($Kappa = 0.680$). Determination of IgG anti-CagA antibodies showed a sensitivity of 77.4%, specificity of 94.7%, positive value of 96% and negative predictive value of 72%. **Conclusions:** The most frequent *H. pylori* genotype found in northeastern Mexico was *vacA s2/m2*, *cagA-*. The presence of this genotype correlated with the clinical presentations observed in these patients. In addition, CagA serology showed a great specificity and good sensitivity that allow us to use this assay to assess the prevalence of CagA+ strains in Mexico.

sugiere que este método puede ser usado en la población mexicana para determinar la prevalencia de cepas CagA+.

Palabras clave: *Helicobacter*, vacA, cagA, anticuerpos anti-CagA.

Key words: *Helicobacter pylori*, vacA, cagA, anti-CagA antibodies

INTRODUCCIÓN

En aproximadamente 10% de los casos, la presencia de *Helicobacter pylori* está relacionada con diversos síndromes clínicos como son la dispepsia no ulcerosa (DNU) y la enfermedad úlcero péptica (EUP). Además, la colonización con *H. pylori* representa un riesgo seis veces mayor al desarrollo de cáncer gástrico y se ha asociado con el linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosas.^{5,6,10}

Diferentes factores bacterianos se han relacionado a esta diversidad clínica, en particular la citotoxina formadora de vacuolas (VacA). Se han demostrado diferencias en el gen *vacA* como es el caso de la combinación en mosaico de las secuencias señal [s] y la región media [m]. El genotipo s1/m1 ha sido asociado a presentaciones clínicas más graves y algunos estudios han mostrado diferencias en los genotipos en relación con diferentes regiones geográficas.^{2,7-9,11,13-16}

Entre los factores bacterianos se ha estudiado también la isla de patogenicidad (PAI) de la cual el gen *cagA* es un marcador y codifica para CagA. La gran mayoría de las cepas de *H. pylori* cagA+ produce la proteína, que es inmunogénica. La presencia de PAI se ha asociado con incremento en la producción de interleucina-8, con mayor inflamación gástrica y se ha demostrado que las personas que están infectadas por cepas CagA+ tienen riesgo mayor al desarrollo de cáncer gástrico.^{3,6} Estudios recientes han mostrado que esta proteína penetra a las células epiteliales y altera la fisiología de las células afectadas.¹

Los diferentes genotipos de *H. pylori* pueden ser identificados por métodos moleculares usando cepas obtenidas por procedimientos invasivos. El desarrollo y validación de métodos serológicos para la determinación de anticuerpos específicos contra las proteínas de *H. pylori* es también de gran utilidad clínica, porque permite la detección de cepas de *H. pylori* potencialmente virulentas sin los inconvenientes de un procedimiento endoscópico. El objetivo de este trabajo es evaluar la relación entre los genotipos de *H. pylori* y la presencia de anticuerpos específicos anti-CagA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio. Se examinaron 50 pacientes mexicanos (femenino:masculino, 2; media de edad, 53 ± 17.7 años; margen, 15-92) que se sometieron a endoscopia gastroduodenal en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" en Monterrey, Nuevo León, México. Todos los pacientes integrados a este estudio nacieron en el Noreste de México y tienen ascendencia mexicana de al menos dos generaciones. De las cepas de *H. pylori* estudiadas 7 (14%), se aislaron de pacientes con EUP y 43 (86%) de pacientes con DNU. Ninguno de los pacientes había recibido antibióticos o inhibidores de la bomba de protones durante las cuatro semanas previas a la endoscopia. Todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento informado. Durante la endoscopia se obtuvieron cuatro biopsias (dos de antro y dos de cuerpo del estómago) para cultivo, las cuales fueron colocadas en medio de transporte de Stuart (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD) y transportadas inmediatamente al laboratorio para cultivo.

Cultivo de *H. pylori*. Las biopsias fueron sembradas en agar Columbia (Becton Dickinson Microbiology Systems) con sangre al 10%. Una vez inoculadas, las placas fueron incubadas en microaerobiosis usando el sistema Campy Pouch (Becton Dickinson Microbiology Systems).

Las colonias se identificaron por la morfología de las colonias, tinción de Gram y las reacciones de catalasa, oxidasa y ureasa. Cada cepa se transfirió a un tubo de microcentrífuga con 500 µL de agua estéril y se centrifugó a 8,000 r. p. m. durante cinco min.

Extracción del DNA. El DNA se extrajo utilizando el método que utiliza bromuro de hexadecil-trimetil amonio (CTAB).¹² El sedimento bacteriano se resuspendió en 560 µL de amortiguador TE 1X (TrisHCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0), 30 µL de 10% dodecil sulfato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) y 6 µL de una solución de 10-mg/mL de proteinasa K (Sigma Chemical Co.). La suspensión bacteriana se incubó por 45 min a 37 °C y después de la adición de 100 µL de NaCl 5 M y 80 µL de CTAB al 10% (Sigma Chemical Co.)/NaCl 0.7 M, la mez-

cla fue incubada a 65 °C por 10 min. El DNA se extrajo con 700 µL de cloroformo-isopropanol (24:1) y con una mezcla fenol-cloroformo (1:24). El DNA se precipitó con 0.6 mL de isopropanol, se lavó con etanol al 70% y dejó secar al aire. El sedimento seco se disolvió en 50 µL de amortiguador TE IX y el DNA se cuantificó por emisión fluorescente a 460 nm luego de excitación a 365nm (DyNA Quant Fluorometer, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA). Se ajustó la concentración de DNA a 100 ng/µL para la investigación de la presencia del gen *cagA* gen y los alelos s y m del gen *vacA* s por PCR.

Detección de los genes *vacA* y *cagA*. La PCR se llevó a cabo para la amplificación de las secuencias señal y media usando los iniciadores descritos por Atherton y cols.² Las cepas fueron caracterizadas como tipo s1a, s1b o s2 y m1 o m2. Los iniciadores para la tipificación de *cagA* fueron los descritos por Rugge y cols.¹³ Para la PCR de cada muestra se preparó una mezcla de reacción en un volumen de 50 µL y con una concentración 25 pmolar de cada iniciador, 100 ng de DNA genómico, cada desoxinucleósido trifosfato (Qiagen, Santa Clarita, CA) a una concentración de 100 µM y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Qiagen).

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador automatizado (Perkin-Elmer Corporation, Wellesley, MA) con 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, apareamiento a 52 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min.

Detección de los productos de PCR. Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y detectados bajo luz ultravioleta de onda corta. Se usaron estándares de 100 pares de bases como marcadores de peso molecular (Life Technologies, Ontario, Canada). Se obtuvo una fotografía de cada gel con el equipo Eagle eye II Still Video System (Stratagene, La Jolla, CA).

Determinación de anticuerpos IgG anti-CagA. La determinación de anticuerpos IgG anti-CagA se realizó con la técnica de ensayo inmunoabsorbente con enzima unida (ELISA) de acuerdo con el método previamente descrito por Blaser y Pérez.⁴ Se preparó una suspensión de antígeno CagA (OraVax, Inc), se ajustó a una concentración de proteínas de 1 mg/mL y con esta suspensión se bloquearon placas de titulación (Dynex Technologies, Chantilly, VA) con 250 ng de antígeno por celda. La dilución de suero fue de 1:100 y se usaron anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa (Biosource International, Camarillo, CA). El desarrollo de color fue en ácido 2.2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (Sigma Chemical Company). Posteriormente se tomó lectura de la absorbancia a

405 nm y la información se analizó con el programa Revelation 2.0. Los resultados se expresaron como razón de densidad óptica (RDO) en relación con los valores obtenidos en cuatro sueros estándar. Una RDO ≥ 0.35 se consideró positivo, mientras que un valor de RDO < 0.35 se consideró negativo. Todos los ensayos se llevaron a cabo para cada muestra al menos dos veces en días diferentes.

Pruebas estadísticas. Las asociaciones entre los genotipos de *H. pylori* se analizaron con las pruebas de χ^2 con la corrección de continuidad de Yates o la prueba de Fisher cuando fue apropiado. Un valor de $p < 0.05$ fue aceptado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Análisis molecular de las cepas de *H. pylori*. Para cada cepa de *H. pylori* se determinaron los alelos para las regiones señal y media del gen *vacA* y el genotipo de *cagA*. Se detectaron las seis posibles combinaciones de la secuencia señal y la secuencia media, incluyendo el tipo s2/m1, el cual ha sido descrito previamente en la población mexicana (Figura 1). Entre los genotipos de *vacA* obtenidos, el más frecuente es s2/m2. De todas las cepas analizadas, siete no amplificaron para la región s y una cepa no amplificó para la región m. Las cepas que no se pudieron tipificar en la región s fueron m1 y la cepa que no se pudo tipificar en la región media fue s2.

Correlación de subtipos de *vacA* con el genotipo de *cagA* de las cepas estudiadas. Los subtipos de *vacA* se correlacionaron con el genotipo de *cagA* (Cuadro 1)

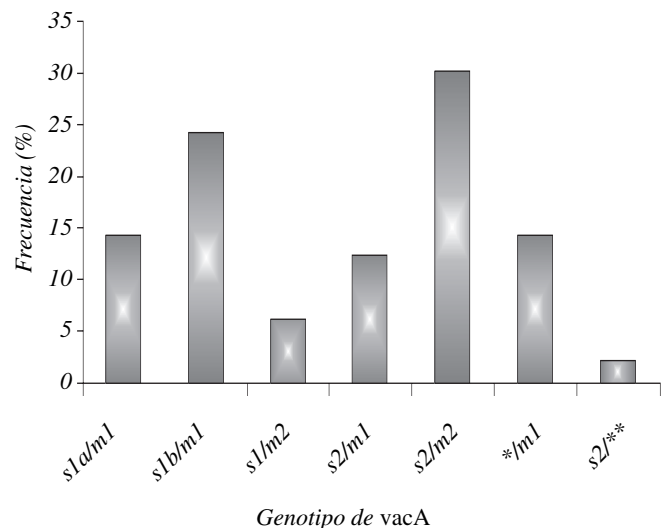


Figura 1. Genotipos de *vacA* en las cepas estudiadas. *No amplificaron para [s]. **No amplificaron para [m].

CUADRO 1
CORRELACIÓN DE SUBTIPOS DE *vacA* CON EL GENOTIPO DE *cagA* DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

Genotipo		<i>cagA</i> ¹	n	%
<i>vacA</i> s1	<i>vacA</i> m			
s1	m1	+	16	32
s1	m1	-	2	4
s1	m2	+	3	6
s2	m1	+	4	8
s2	m1	-	2	4
s2	m2	+	2	4
s2	m2	-	13	26
No tipificable	m1	+	7	14
s2	No tipificable	-	1	2

¹ El genotipo *cagA*⁺ está asociado con el genotipo *vacA* s1/m1 ($p < 0.05$, χ^2) y el genotipo *cagA*⁻ está asociado con el genotipo *vacA* s2/m2 ($p < 0.01$, χ^2).

CUADRO 2
ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO DE *cagA* Y LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*CagA*

IgG anti- <i>cagA</i> por ELISA	Gen <i>cagA</i>	
	Positivo	Negativo
Positivo	24	1
Negativo	7	18

y se encontró que el genotipo s1/m1 estuvo asociado a las cepas *cagA*⁺ ($p < 0.05$) y el genotipo s2/m2 está fuertemente asociado a las cepas *cagA*⁻ ($p < 0.01$). No se encontró otra correlación estadísticamente significativa entre los genotipos de *vacA* o *cagA*.

Correlación entre la detección del gen *cagA* y la detección de anticuerpos anti-*CagA*. Se determinó la asociación entre el genotipo de *cagA* y la presencia de anticuerpos anti-*CagA* (Cuadro 2). Se detectaron solamente anticuerpos anti-*CagA* en un paciente, en él se aisló *H. pylori*

CUADRO 3
UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*CagA* POR LA TÉCNICA DE ELISA

	Valor	IC 95% alto	IC 95% bajo
Kappa	0.680	0.403	0.756
Sensibilidad	77.4	66.2	80.5
Especificidad	94.7	76.5	99.7
Valor predictivo positivo	96.0	0.821	99.8
Valor predictivo negativo	72.0	58.1	75.8

cagA- y, por el contrario, no se detectaron anticuerpos en siete pacientes en los cuales se detectó *H. pylori cagA*+

Con los resultados obtenidos se determinó la asociación entre la detección del gen *cagA* en *H. pylori* y la determinación de anticuerpos anti-CagA (Cuadro 3). Además, se determinó la utilidad diagnóstica de la determinación de anticuerpos anti-CagA por la técnica de ELISA.

DISCUSIÓN

Se obtuvieron todas las combinaciones posibles de la región *s* y la región *m* de *vacA*. Esta diversidad alélica ha sido reportada previamente en población mexicana.¹¹

En un estudio previo en la Ciudad de México se reportó que el genotipo más frecuente es el *s1b/m1*¹¹ y en este estudio el genotipo más frecuente es el *s2/m2*. Debido a que las cepas *s1/m1* son más frecuentemente asociadas a enfermedad que las cepas *s2/m2*,^{2,3,15} estos resultados sugieren que las cepas que infectan la población del Noreste de México son menos virulentas que las descritas en el centro del país, donde las cepas *s1/m1* fueron las más frecuentes.

Para el diagnóstico invasivo de *H. pylori* es necesaria la realización de una endoscopia, la cual representa molestias y un mayor costo para los pacientes,⁶ además, en algunas ocasiones este procedimiento no puede llevarse a cabo por la condición clínica del paciente. Las pruebas serológicas son una herramienta valiosa en la práctica clínica, porque para su realización no es necesario recurrir a procedimientos invasivos y en general representan pocas molestias para los pacientes. Entre las pruebas serológicas, la técnica de ELISA tiene algunas ventajas, puesto que es sencilla, de bajo costo y no requiere equipos sofisticados.

El diagnóstico preciso de la presencia de *H. pylori* es un aspecto importante en el manejo de pacientes con síntomas gastrointestinales y recientemente está tomando relevancia no sólo la determinación de la presencia de la bacteria, sino también la detección de los factores de virulencia potenciales descritos en *H. pylori*.

En la población mexicana se ha descrito la infección por múltiples cepas de *H. pylori*.⁸

Además, en algunos pacientes la bacteria tiene una distribución irregular en la mucosa gástrica, por lo que es probable que se tomen biopsias de sitios donde no se encuentra el microorganismo y no se tomen muestras de sitios en que *H. pylori* sí está presente. Por lo anterior, la determinación de anticuerpos específicos contra las pro-

teínas de la bacteria podría ser más sensible que la determinación del genotipo en cepas de *H. pylori* recuperadas a partir de biopsias.

Los resultados de este trabajo muestran que sólo en un paciente en que se aisló *H. pylori cagA*- se detectaron anticuerpos circulantes contra esta proteína de *H. pylori*. Es probable que este paciente estuviera infectado además por otra cepa *cagA*+ que no fue recuperada durante el cultivo. Por el contrario, en siete pacientes se aislaron cepas de *H. pylori cagA*+ y no se detectaron anticuerpos anti-CagA en el suero de los pacientes. Esto podría ser explicado por las variaciones antigénicas en la proteína CagA que han sido reportadas.¹⁷

En este trabajo se estudió la correlación de los genotipos de *H. pylori* y la respuesta inmune del hospedero contra una de las proteínas relacionadas con la virulencia de la bacteria. Los resultados muestran una buena correlación entre la detección del gen *cagA* y la detección de anticuerpos anti-CagA por la técnica de ELISA (Kappa 0.680, IC 95% 0.403-0.756) y una especificidad y un valor predictivo positivo superior al 94%, por lo que un resultado positivo prácticamente confirma la infección por cepas de *H. pylori cagA*+

REFERENCIAS

- Asahi M, Azuma T, Ito S, et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 2000; 191: 593-602.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: Association of specific *vacA* types with cytotoxin. Production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-7.
- Audibert C, Janvier B, Grignon B, et al. Correlation between IL-8 induction, *cagA* status and *vacA* genotypes in 153 French *Helicobacter pylori* isolates. *Res Microbiol* 2000; 151: 191-200.
- Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, Kleianthous H, et al. A infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-5.
- Cremonini F, Gasbarrini A, Armizzi A, Gasbarrini G. *Helicobacter pylori* related diseases. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 431-7.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-41.
- Gold BD, van Doorn LJ, Guarner J, et al. Genotypic, clinical, and demographic characteristics of children infected with *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1348-52.
- González-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, et al. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis* 2000; 182: 1450-5.
- Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatiño B, et al. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol* 2000; 182: 3210-8.
- McNulty AM, Wyatt J. *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1999; 52: 338-44.
- Morales-Espinoza R, Castillo-Rojas G, González-Valencia G, et al. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3001-4.

12. Peek RM, Miller GG, Tham KT, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995; 73: 760-70.
13. Rugge M, Busatto G, Cassaro M, et al. Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. *Cancer* 1999; 85: 2506-11.
14. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2597-603.
15. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66.
16. van Doorn LJ, Figueiredo C, Megráud F, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116: 823-39.
17. Vaucher C, Janvier B, Nousbaum JB, et al. Antibody response of patients with *Helicobacter pylori*-related gastric adenocarcinoma: Significance of anti-CagA antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 463-7.