

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

Diversidad en los genes *cagA* y *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de niños y adultos.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA

M. en C. GERARDO GONZALEZ VALENCIA

COMITE ASESOR:
DOCTOR FRANCISCO JAVIER TORRES LOPEZ
DOCTOR CARLOS ESLAVA CAMPOS
DOCTORA YOLANDA LOPEZ VIDAL

CIUDAD UNIVERSITARIA
MEXICO D. F. 2004

2004
GONZALEZ VALENCIA GERARDO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

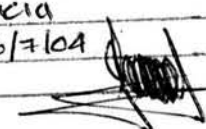
Este trabajo se realizo en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas, Coordinación de Investigación Médica, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Contribuciones importantes a este trabajo fueron realizadas durante estancias de uno a 3 meses de duración en:

- Department of Infectious Diseases, School of Medicine. Vanderbilt University. Nashville, Tennessee, USA mayo de 1998 bajo la supervisión del Doctor Guillermo Pérez-Pérez.
- Division of Gastroenterology and Institute of Infection and Immunity, University Hospital. Queen's Medical Centre, Nottingham UK, 4 de octubre al 17 de diciembre de 1999 bajo la supervisión del Doctor John Christopher Atherton.
- Department of Human Biology. Fred Hutchinson Cancer Research Center. Seattle Washington, 30 de junio al 29 de agosto de 2002 bajo la supervisión de la Doctora Nina Salama

Durante la realización del trabajo conté con el apoyo de Beca Doctorado de CONACYT

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gerardo González
Valencia
FECHA: 6/7/04
FIRMA: 

JURADO

PRESIDENTE:	DOCTOR ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
SECRETARIO:	DOCTOR JAVIER TORRES LOPEZ
VOCAL:	DOCTOR JOSE LUIS PUENTE GARCIA
VOCAL	DOCTOR RAUL MANCILLA JIMÉNEZ
VOCAL	DOCTOR JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
SUPLENTE	DOCTOR MAURICIO CORAL VAZQUEZ
SUPLENTE	DOCTOR CARLOS ESLAVA CAMPOS

Dedicada a:

Mi Familia, con todo mi amor:

Rosario

Gerardo y Diego

Nada hubiera sido posible... en especial sin ti

A mis Padres:

Carmen y Everardo

México D.F. 2004

INDICE

Resumen.....	1
INTRODUCCION.....	1
Antecedentes históricos.....	1
Microbiología.....	2
Epidemiología.....	2
Respuesta del huésped a la infección.....	3
Enfermedades asociadas.....	3
Patogénesis.....	4
Diversidad genética.....	8
Métodos usados para establecer diversidad genética en <i>H. pylori</i>	9
Infección mixta.....	11
PRIMERA PARTE.....	13
OBJETIVOS.....	13
HIPOTESIS.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	13
<i>Pacientes.....</i>	<i>13</i>
<i>Procesamiento de las biopsias para cultivo de H. pylori.....</i>	<i>14</i>
<i>Extracción de DNA.....</i>	<i>15</i>
<i>Métodos para determinar microdiversidad.....</i>	<i>15</i>
<i>PCR para tipificar vacA y detectar cagA.....</i>	<i>15</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>17</i>
RESULTADOS.....	17
<i>Frecuencia de infección múltiple.....</i>	<i>17</i>
<i>Frecuencia de alelos s y m en grupos con diferente enfermedad.....</i>	<i>19</i>
<i>Detección de cagA en grupos con diferente enfermedad.....</i>	<i>20</i>
SEGUNDA PARTE.....	22
OBJETIVOS.....	22
HIPOTESIS.....	22
MATERIAL Y METODOS.....	22
<i>Pacientes.....</i>	<i>22</i>
<i>Procesamiento de las biopsias para cultivo de H. pylori.....</i>	<i>23</i>
<i>Extracción de DNA.....</i>	<i>23</i>
<i>Caracterización genotípica.....</i>	<i>23</i>
<i>Microdiversidad.....</i>	<i>24</i>
<i>PCR para tipificar vacA con primers conservados y detectar cagA, picB y cag PAI.....</i>	<i>24</i>

Macrodiversidad	26
<i>RAPD fingerprinting</i>	26
<i>Características fenotípicas</i>	27
<i>Pruebas de sensibilidad</i>	27
<i>Antígenos Lewis</i>	27
RESULTADOS	28
<i>Genotipificación de colonias aisladas de cuatro regiones del estómago</i>	28
<i>Caracterización fenotípica</i>	
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	45
INDICE DE TABLAS Y FIGURA	53
ARTICULO	54

Diversidad en los genes *cagA* y *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de niños y adultos.

M. en C. Gerardo González Valencia

Resumen

H. pylori es una de las bacterias genéticamente más diversas. No se conoce la relación de esta diversidad con edad, gravedad de la enfermedad y nicho en el estómago. Para simplificar; este trabajo se dividió en dos partes:

Primera parte. La mayoría de los estudios previos, de asociaciones de *H. pylori* y marcadores de virulencia y enfermedad se habían concentrado en adultos. Este parte incluyo además niños. Se estudiaron 90 pacientes, 56 adultos (37 con ulcera y 19 sin ulcera) y 34 niños (todos con dolor abdominal recurrente y sin ulcera). Se genotipificaron alelos de *vacA* y de *cagA* por PCR de aislados múltiples de *H. pylori* de biopsias de antro. Los tipos *vacA* múltiples fueron más comunes en adultos con ulcera (95%) que en adultos sin ulcera (37%; $P < .001$) o en niños (52%; $P < .01$). Las cepas *vacA* s1 y *cagA*⁺ tuvieron frecuencias similares entre los adultos con y sin ulceras. Se concluyó que la infección con múltiples cepas de *H. pylori* (diferentes-tipos *vacA*) es común en México y parece estar asociada a enfermedad ulcerosa. Las cepas que infectan a niños y adultos parecen ser diferentes.

Segunda parte. La diversificación genética y su asociación con enfermedad encontrada, principalmente en adultos en la primera parte, motivo que para esta parte se estudiaran de 6-7 colonias de *H. pylori* aisladas de 4 regiones (antro-cuerpo-fondo-incisura) del estómago de 8 adultos con enfermedad gastróduodenal. Seis de los pacientes presentaron colonias con idénticos patrones RAPD, tipos *cagA* y alelos de *vacA*. Otro presento colonias con un mismo patrón RAPD aunque distintos tipos *cagA* y *vacA* y un último presento colonias con distintos patrones RAPD y tipos *cagA* y *vacA*. Se demostró la infección simultánea con más de una cepa en el estómago de un mismo individuo.

INTRODUCCION

Antecedentes históricos. Por mucho tiempo se consideró que el estómago era una cavidad estéril a pesar de que casi un siglo atrás se publicaron comunicaciones esporádicas sobre la presencia de bacterias espirilares en mucosa gástrica. Sin embargo la incapacidad para cultivarlas y la suposición de que se trataba de contaminantes ocasiono que los hallazgos no fueran interpretados adecuadamente y no se les concediera importancia. Fue hasta 1983, en que los gastroenterólogos Australianos Warren y Marshall (1984) lograron cultivarlas y relacionarlas con gastritis crónica y enfermedad ulcerosa, que se reconoció el papel de

Helicobacter pylori (*H. pylori*) como agente etiológico de diferentes grados de enfermedad ulcero péptica. Originalmente *H. pylori* fue descrito como *Campylobacter*-like organisms por su similitud morfológica con miembros del género *Campylobacter*. Posteriormente y debido principalmente a diferencias en ácidos grasos y estructurales se consideraron como una especie aparte a la que se llamo *Campylobacter pyloridis* (Goodwin y cols., 1986). Fue hasta 1989 en que un Comité taxonómico internacional, basado en diferencias ultra estructurales y genéticas decidió excluirla de este género, denominándolo finalmente por su nombre actual. Desde 1989 se le considera la especie tipo de un nuevo género, *Helicobacter*, en el que existen al menos otras 19 especies (Versalovic y Fox, 2001).

Microbiología. *H. pylori* es una bacteria gram-negativa de 2.5 a 5 μm de largo y de 0.5 a 1 μm de ancho, de morfología celular bacilar, espiral, en "s", en cultivos viejos cocoide, que presenta de 4 a 6 flagelos unipolares que le dan su movilidad característica. Entre sus características metabólicas más notables destacan la producción de enzimas como catalasa, oxidasa y sobre todo de la ureasa que le permite neutralizar el medio ambiente ácido del estómago. La bacteria requiere para su crecimiento *in vitro* de una atmósfera microaerofílica.

Epidemiología. Los humanos son el reservorio natural de *H. pylori* al cual infectan por lo regular a edades tempranas (Torres J y cols. 2000). Se estima que más de la mitad de la población mundial esta infectada y que la prevalencia de la infección es mucho mayor en países en desarrollo (70-90%) que en desarrollados (25-30%) y se incrementa con la edad. En México a la edad de 10 años el 50% de los niños se encuentran ya infectados y globalmente el 66% de la población esta infectada (Torres J y cols. 1998). La mucosa en el estómago es el nicho principal de *H. pylori* aunque algunos estudios muestran que puede encontrarse también a bajas concentraciones en saliva, placa dental e inclusive en materia fecal (Suerbaum y

Michetti, 2002). Además de los humanos, solo algunos primates y gatos pueden albergar *H. pylori*. Recientemente se publicó que la bacteria puede aislarse también de una fuente medioambiental (**Yingzhi y cols. 2002**). Por ello continúa proponiéndose que la bacteria se transmite de persona a persona por 3 posibles rutas: iatrogénica, fecal-oral y oral-oral; sin embargo no se conocen con precisión los mecanismos de transmisión de la infección (**Dunn y cols., 1997; Suerbaum y Michetti, 2002**).

Respuesta del huésped a la infección. Prácticamente todas las personas infectadas con *H. pylori* presentan una respuesta inflamatoria gástrica crónica. Durante la fase temprana de la infección, la adherencia de la bacteria a las células epiteliales en particular a través de BabA (adhesina del antígeno Le^b, “Lewis^b binding adhesin”) y por cepas portadoras de la “isla de patogenicidad de *cag*” o *cag* PAI (que se describe más adelante) resulta en la producción de interleucina 8 (IL-8). IL-8 atrae y activa neutrófilos, que a su vez liberan otros mediadores de inflamación que atraen macrófagos y células plasmáticas. La mucosa gástrica de individuos infectados presenta niveles elevados de citocinas tales como TNF α que es citotóxico o como IL-6, IL-8 o IL-12 que son proinflamatorios. La respuesta inflamatoria provoca cambios en la fisiología del estómago y duodeno ya sea por daño directo a las células o porque algunas de estas citocinas actúan sobre células que regulan la producción de ácido.

Enfermedades asociadas. Aunque mucha gente puede estar infectada con *H. pylori* solo una pequeña proporción de ellas presentan algún tipo de manifestación clínica. El curso de la infección es altamente variable y es influenciado tanto por la bacteria como por el huésped. El patrón y distribución de la gastritis que provoca, correlaciona fuertemente con el riesgo de secuelas clínicas, principalmente úlceras gástricas o duodenales, atrofia de mucosa, carcinoma gástrico o linfoma gástrico. Pacientes con gastritis predominantemente antral, la forma más

común de gastritis asociada a *H. pylori*, están predispuestos a úlceras duodenales, en tanto que los pacientes con gastritis predominante en cuerpo y atrofia multifocal tienen más probabilidad de sufrir úlceras gástricas, atrofia gástrica, metaplasia intestinal y finalmente carcinoma gástrico. *H. pylori* es responsable de la mayoría de las úlceras gástricas y duodenales. El cáncer gástrico es la segunda causa más frecuente de muerte relacionada a cáncer. Existe una fuerte evidencia de que *H. pylori* incrementa el riesgo de cáncer gástrico. *H. pylori* ha sido clasificado como carcinógeno de tipo I. La infección con la bacteria también incrementa significativamente el riesgo de un desorden linfoproliferativo conocido como MALT linfoma o MALToma (por sus siglas en inglés mucosa-associated lymphoid tissue) y de un 72 a un 98% de los pacientes que lo padecen están infectados. En algunos padecimientos el papel de la infección con *H. pylori* es controvertido, por ejemplo en dispepsia no asociada con úlceras, a pesar de la elevada frecuencia de *H. pylori* relacionada a esta condición, la cura después de la erradicación da resultados inconsistentes. Lo mismo ocurre con enfermedad de reflujo gastroesofágico, en la que la infección con la bacteria tiene un papel protector de acuerdo con algunos estudios, en tanto que otros indican que su erradicación tiene una influencia negativa. La terapia supresiva de ácido por tiempo prolongado puede agravar la gastritis de cuerpo mediada por *H. pylori* e incrementar el riesgo de carcinoma gástrico. *H. pylori* se ha relacionado también a la patogénesis de muchas enfermedades extra gástricas que van desde arteriosclerosis hasta enfermedades de la piel, pero la documentación sobre los casos ha sido pobre y las asociaciones controvertidas (Goodwin y cols., 1986; Nomura y cols., 1991; Blaser y Parsonnet, 1994; Correa y cols., 1997).

Patogénesis. La patogénesis es uno de los aspectos más controvertidos de la bacteria, ya que solo una minoría de las personas infectadas desarrolla lesiones gastroduodenales serias (Peek y

Blaser, 1997). La existencia de diferencias en su potencial patogénico, aunada a factores del huésped y medio ambiente, pueden influir en las manifestaciones clínicas, de leves a graves que se han asociado a la infección con esta bacteria (**Peek y Blaser, 1997**). Se han descrito numerosos probables factores de virulencia, entre los que destacan: producción de ureasa, catalasa, proteínas “heat shock” HspA y HspB (asociadas a respuesta inmune), movilidad, capacidad para adherirse a mucosa gástrica, lipopolisacarido, antígenos Lewis, toxina vacuolizante y presencia de diversos genes asociados a virulencia como *picB* (asociado a liberación de IL-8), *flaA* y *flaB* (asociados a movilidad), *babA* y *babB* (asociados a adhesinas y a antígenos Lewis) y los genes *cagA* y *vacA* (**Sharma y cols., 1998; Otterman y Lowenthal, 2002, Pride y cols., 2001, Lee y Hazell, 1993; Blaser, 1996; Tummuru y cols., 1993; Jenks y Clusters, 2000; Moran y Wadstrom, 1998**). Algunos de estos factores, además ayudan a *H. pylori* a evadir la actividad bactericida del contenido gástrico luminal y entrar a la capa mucosa. La producción de ureasa, la movilidad y la adherencia son esenciales para este primer paso de la infección. La ureasa hidroliza la urea en dióxido de carbono y amonio, permitiendo a la bacteria sobrevivir en el ambiente ácido. La movilidad permite a *H. pylori* a alcanzar sitios con un pH menos ácido en capas inferiores de la mucosa gástrica y una vez allí *H. pylori* puede adherirse estrechamente a las células epiteliales por múltiples componentes de su superficie de entre los cuales el mejor caracterizado es BabA.

La presencia de *cagA* (cytotoxin-associated gene), y la expresión de la actividad de la toxina vacuolizante codificada por el gene *vacA* son dos de los principales marcadores de virulencia descritos (**Blaser, 1996; Tummuru y cols., 1993; Covacci y cols., 1993; Atherton y cols., 1997; Censini y cols., 1996; Ito y cols., 1998; Warburton y cols., 1998; Donati y cols., 1997**). *cagA* esta presente en aproximadamente un 60% de las cepas de *H. pylori* en países

desarrollados y codifica para una proteína CagA de alto peso molecular (Tummuru y cols., 1993; Covacci y cols., 1993). Dicha proteína inmunodominante de ~128 kDa sirve como marcador serológico para la isla de patogenicidad de *cag* (*cag* PAI) de *H. pylori*, cuya región contiene al menos 31 genes que codifican para proteínas posiblemente asociadas a virulencia (Censini y cols., 1996, Telford y cols., 1994). CagA es transportada directamente a las células epiteliales por un sistema de secreción de tipo IV, codificado por *cag* PAI (Stein y cols., 2000; Segal y cols., 1999), donde induce que cínasas de las mismas células produzcan la fosforilación en sus residuos de tirosina, lo que a su vez activa rutas de transducción de señales y de plasticidad del citóesqueleto (Owen y cols., 2003). Estas señales se ven reflejadas por la aparición de la formación de “pedestales” (protrusions) en la superficie de la célula infectada que dependen a su vez, de la polimerización de actina en la membrana de la célula. El mecanismo de acción y similitud de la formación de pedestales semeja al descrito para *Escherichia coli* enteropatógena y otras bacterias como *Shigella* y *Listeria* (Stein y cols., 2000). Tanto el sistema de secreción de tipo IV como CagA son codificadas por *cag* PAI. Numerosos estudios han confirmado hallazgos previos en países desarrollados en los que la gastritis, úlcera duodenal, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, carcinoma gástrico y linfoma del tipo de tejido linfoide asociado a mucosas son más comunes en pacientes infectados con cepas CagA⁺ que con cepas CagA⁻ (Eck y cols., 1997 y van der Hulst y cols., 1997). Sin embargo en otros países, como China y Japón, la infección con cepas CagA⁺ no es un marcador útil de virulencia, ya que la prevalencia de infección con este tipo de cepas en controles y en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico es similar (Shimoyama y cols., 1997 y Panz y cols., 1997). Es discutible aún si CagA por si misma, es directamente importante o si simplemente actúa como un marcador de otros genes de *cag* PAI.

En contraste a *cagA*, el gene *vacA* se encuentra presente en virtualmente todas las cepas de *H. pylori* (Blaser, 1996; Atherton y cols., 1995). *vacA* codifica una citotoxina vacuolizante (VacA) de ~87 kDa, que induce vacuolización citoplásmica en varias líneas celulares de mamíferos y produce daño celular y ulceración en mucosa cuando se administra intragástricamente a ratones. La toxina se inserta a si misma dentro de la membrana de las células epiteliales y forma un canal hexámero dependiente de voltaje y anión selectivo, a través del cual aniones orgánicos y bicarbonato pueden ser liberados, posiblemente proveyendo a la bacteria con nutrientes. VacA tiene como blanco la membrana mitocondrial donde causa la liberación de citóchromo c e induce apoptosis. Aunque solo un 50% de las cepas de *H. pylori* inducen vacuolización de células *in vitro*, casi todas las cepas híbridan con sondas de *vacA* (Atherton y cols., 1995). Las cepas de *H. pylori* que producen la citotoxina vacuolizante (VacA) han sido asociadas frecuentemente con enfermedad severa, particularmente con úlcera péptica, en poblaciones americanas y europeas (Blaser, 1996, Atherton y cols., 1995, Atherton y cols., 1997). Sin embargo de manera similar que con *cagA*, en Japón una alta proporción de cepas de *H. pylori* son citotóxicas, y diversos estudios en ese país, han sido incapaces de relacionar a VacA con severidad de la enfermedad (Ito y cols., 1997; Takata y cols., 1998).

El gene *vacA* tiene una estructura en mosaico (Atherton y cols., 1995) del que al principio se describieron al menos tres tipos alélicos en la región de la secuencia señal (s1a, s1b, s2) y dos en la región media (m1, y m2) y que actualmente se han encontrado en todas las combinaciones posibles (Atherton y cols., 1995, Morales y cols., 1999, Letley y cols., 1999). Un estudio reciente describió una nueva variante de s llamada s1c, que solo se ha detectado en aislados de *H. pylori* de asiáticos (van Doorn y cols., 1998). Un estudio en los Estados Unidos

de América (Atherton y cols., 1995) mostró que las cepas s1a estuvieron asociadas más frecuentemente con inflamación gástrica y úlcera duodenal, en tanto que las cepas s2 estuvieron asociadas a menor inflamación y prevalencia de úlcera. Las cepas con el tipo m1 produjeron los niveles más altos de citotoxina vacuolizante y además daño epitelial más intenso que las del tipo m2. Aunque *cagA* se encuentra distante de *vacA* en el cromosoma de *H. pylori*, su presencia está cercanamente asociada, aunque no invariablemente, con los subtipos s1a y s1b (Atherton y cols., 1997).

Diversidad genética. *H. pylori* es una de las especies bacterianas más diversas reportadas hasta ahora. A esta diversidad contribuyen: mutaciones puntuales; grandes sustituciones - inserciones o deleciones - que pueden involucrar uno o más genes o segmentos multigenes, incluyendo genes de restricción/modificación y al menos una isla de patogenicidad (*cag* PAI). También se han observado rearrreglos cromosómicos, principalmente inversiones de una gran variedad de segmentos de DNA que incluyen varias secuencias de inserción y plasmidos. Sin embargo el factor más importante de los que contribuyen a la diversidad de *H. pylori* es su alta tasa de recombinación intraespecífica. De acuerdo a diversos reportes es la más alta entre distintas especies bacterianas entre las que destacan *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Esta tasa de recombinación es más alta aún que en especies no bacterianas como *Drosophila melanogaster* (Suerbaum, 1998; Achtman, 2001). En general esta diversidad genética puede manifestarse como micro- y macro-diversidad. La Micro-diversidad es causada por las mutaciones puntuales dentro de genes individuales, que pueden ser silenciosas/sinónimas o no-sinónimas. Mediante mutaciones sinónimas puntuales pueden aparecer sitios adicionales o desaparecer algunos existentes que pueden ser detectados por algunos métodos que se describen más adelante. El

mismo efecto puede producirse cambiando el orden de los genes en el cromosoma lo que genera la macro-diversidad de un genoma. Otros eventos que contribuyen a esta macro-diversidad son duplicación y/o transferencia horizontal de genes y recombinación homóloga que ya fueron mencionados con anterioridad.

Métodos usados para establecer diversidad genética en *H. pylori*. Métodos de genotipificación como por ejemplo RFLP (restriction fragment length polymorphism)(Akopyanz y cols., 1992a), RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Akopyanz y cols., 1992b; Marshall y cols., 1995), PFGE (pulse field gel electrophoresis) (Jiang y cols., 1996) o AFLP (amplification fragment length polymorphism) (Gibson y cols., 1998) que al principio se usaron únicamente para distinguir entre aislados clínicos y establecer la relación del genotipo bacteriano en las distintas presentaciones clínicas de la enfermedad por *H. pylori*, o establecer patrones de infección en familias o grupos, o elucidar mecanismos de colonización por periodos prolongados de tiempo y enfermedad recurrente, han servido además para mostrar la gran diversidad genética que la bacteria presenta, ya que casi siempre los patrones entre aislados independientes son distintos entre sí. Además de los métodos antes descritos usados para establecer el polimorfismo global del genoma de *H. pylori* se han usado otros que han mostrado la diversidad genética de la bacteria, nivel de genes. Uno de los más sobresalientes es el de electroforesis de enzima multilocus que en un estudio en el que se analizaron seis genes que codificaban para enzimas metabólicas “housekeeping” demostró que a este nivel la diversidad de *H. pylori* excede la registrada en virtualmente todas las especies bacterianas estudiadas por este método (Go y cols., 1996). Otros métodos usados que analizan únicamente diferencia en genes específicos son: análisis RFLP (restriction fragment length polymorphism) de fragmentos de productos de PCR de genes específicos, como por

ejemplo ureC-RFLP (PCR ureC-RFLP) (Fujimoto y cols. 1994) y el de PCR tipo-específico, basado en el uso de primers que permiten una alta discriminación específica entre variantes alélicas, del cual el mejor ejemplo es la genotipificación de distintas cepas para establecer los tipos alélicos de *vacA* o la determinación de la presencia del gene *cagA* (Atherton y cols 1995; Morales y cols., 1999; Letley y cols., 1999) y por último una variante de este último método conocido como PCR-Hibridación reversa (LiPA)(van Doorn y cols., 1998). Recientemente los estudios sobre diversidad genética, se han visto poderosamente favorecidos por el conocimiento de la secuencia completa del genoma de la bacteria (Tomb y cols., 1997). La secuenciación completa del genoma de dos cepas no relacionadas, J99 y 26695 permitió un análisis global del genoma de *H. pylori* que confirmó la diversidad genética que los métodos previamente descritos habían detectado (Alm y cols., 1999). *H. pylori* J99 fue aislada en los Estados Unidos en 1995 de un paciente con ulcera duodenal y fue sujeta a un pequeño número de pases antes de ser secuenciada. En contraste *H. pylori* 26695 aislada a principios de los 80's en el Reino Unido de un paciente con gastritis de "gravedad desconocida" fue extensivamente pasada antes de secuenciarse. El cromosoma de *H. pylori* J99 de 1,643, 831 pares de bases es 24, 036 pares de bases más pequeño que el de la cepa 26695. El contenido de G+C de ambas cepas es de un 39%. El análisis de la distribución de G+C a lo largo de los cromosomas hizo posible identificar 9 y 8 regiones respectivamente con diferente contenido de G+C. La comparación de las secuencias del genoma completo de estas 2 cepas, permitió establecer que si bien, el arreglo de genes entre los dos cromosomas es más similar de lo que se había predicho, entre 6 y 7% del total del genoma con capacidad para codificar de cada cepa presentaron algunas diferencias en organización y presencia de genes que fueron únicos a cada cepa. Además el conocimiento de la secuencia completa del genoma de estas 2 cepas

contribuyó al desarrollo de “microarreglos” para *H. pylori*, un método mucho más sofisticado que los antes descritos, (Salama y cols., 2000), con el cual es posible determinar simultáneamente niveles de transcripción y polimorfismos en las secuencias de cada uno de los genes que conforman a un organismo (cuando se conoce esta secuencia, como en el caso de *H. pylori*). Las ventajas de este método con respecto a los anteriores radica en que al poder monitorear la expresión de genes, se puede predecir la función de genes no caracterizados, probar las adaptaciones fisiológicas a distintas condiciones ambientales, identificar genes asociados a virulencia y probar el efecto de antibióticos y posiblemente con más precisión establecer si un paciente está infectado por más de una cepa.

Infección mixta. Originalmente se pensaba que las personas se infectaban con una sola cepa. Sin embargo algunos de los estudios de tipificación molecular que emplearon métodos como los descritos en la sección anterior tanto a nivel de de polimorfismo genómico como de genes individuales han mostrado que un individuo puede estar colonizado simultáneamente con dos o más distintas cepas. Uno de los primeros estudios de este tipo empleando UreC-RFLP para comparar aislados de *H. pylori* de pacientes antes y después de tratamiento antibiótico encontró además que la infección con más de un aislado de *H. pylori* en un mismo individuo no es un evento raro (Fujimoto y cols., 1994). Otro estudio de genotipos de *H. pylori* de familias lituanas mostró, infección mixta en uno de 13 individuos estudiados y no obstante que en este estudio se encontraron cepas resistentes y sensibles a metronidazol en 2 personas, sus patrones RAPD fueron idénticos (Chalkauskas y cols., 1998). Respecto a genotipos de genes individuales se ha descrito infección con aislados con múltiples genotipos de *vacA*, sobre todo en países en vías de desarrollo (van Doorn y cols., 1998; Morales y cols., 1999 Figueredo y cols., 2001)

Prácticamente todos los estudios descritos previamente se han enfocado a la existencia de infección múltiple en adultos (Akopyanz y cols., 1992; Fujimoto y cols., 1994, Hirschl y cols., 1994; Marshal y cols., 1995; Salama y cols., 1995; Taylor y cols., 1995, van Doorn y cols., 1998). Se desconoce que ocurre al respecto en niños. Tampoco se conoce claramente el significado y las implicaciones que una infección múltiple tiene en el huésped.

Inicialmente nuestros objetivos fueron estudiar la relación entre los genotipos de *vacA* y el tipo de *cagA* y enfermedad en adultos Mexicanos y establecer si las tasas de portador de cepas con los diferentes alelos de *vacA* eran diferentes en niños y adultos. Sin embargo fue evidente desde los primeros análisis que las biopsias gástricas de pacientes Mexicanos frecuentemente contenían más de una cepa de *H. pylori*. Por tal motivo decidimos establecer además, si la colonización múltiple se asociaba con la edad o con enfermedad. Para facilitar la comprensión del trabajo, este estudio se ha dividido en 2 partes. La **primera parte** esta enfocada al estudio de los genotipos de *vacA* y *cagA* (microdiversidad) en aislados de niños y adultos así como su relación con el tipo de presentación clínica y con colonización múltiple. La **segunda parte** se enfoca principalmente a la confirmación de la existencia de infección mixta en individuos de nuestra población por comparación de los genotipos de *vacA*, *cagA*, *picB* (microdiversidad) así como de patrones RAPD (macrodiversidad) y características fenotípicas de colonias aisladas del estómago de un mismo individuo.

PRIMERA PARTE

OBJETIVOS

- 1) Estudiar la relación entre los genotipos de *vacA* y tipo *cagA* de *H. pylori* con presentación clínica de la enfermedad en pacientes mexicanos
- 2) Establecer diferencias genotípicas entre cepas aisladas de adultos y de niños.
- 3) Establecer si la infección mixta esta asociada con la presentación clínica de la enfermedad y con la edad.

HIPOTESIS

- 1) Los genotipos *vacA* y *cagA* en adultos serán similares a los reportados en la literatura y los genotipos s1 de *vacA* y el tipo *cagA*⁺ serán más frecuentes en adultos con úlcera gástrica y duodenal que en niños con dolor abdominal recurrente.
- 2) Se encontrarán diferencias genotípicas entre cepas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos. Por ejemplo serán más frecuentes los tipos s1 y *cagA*⁺ en adultos que en niños.
- 3) La infección mixta estará más asociada a adultos con gastritis y ulcera duodenal que a niños con dolor abdominal recurrente.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes. Se estudiaron 90 pacientes, 56 adultos y 34 niños de los servicios de Gastroenterología del Hospital de Especialidades y del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS respectivamente (**Tabla 1**). Los niños cuya edad promedio fue de 11 años (rango de edad 2-16; 53% niñas y 47% niños) fueron diagnosticados con dolor

abdominal recurrente (DAR) y la endoscopia indico ausencia de úlcera. De los 56 pacientes adultos, 37 tenían úlcera péptica activa (edad promedio 50 años, rango 21-82; 27% sexo femenino, 73% masculino, 35 úlcera duodenal y 2 úlcera gástrica) y 19 no presentaban úlcera péptica activa o antecedentes de úlcera péptica (edad promedio 43 años, rango 20-78; 32% sexo femenino, 68% sexo masculino). En todos los pacientes se había comprobado clínica e histológicamente que la gastritis estaba asociada a *H. pylori*.

Tabla 1. Características de los pacientes estudiados.

	Pacientes		
	Niños con DAR sin úlcera (No. =34)	Adultos sin úlcera (No. = 19)	Adultos con úlcera (No. = 37)
Edad promedio±SD	11±4	43±8	50±16
Rango	(2-16)	(20-78)	(21-82)
Hombre/Mujer %	47/53	68/32	73/27

Procesamiento de las biopsias para cultivo de H. pylori. Se tomaron por duplicado biopsias de antro y cuerpo. Las biopsias transportadas al laboratorio a 4°C en viales conteniendo 300µl de solución salina estéril fueron procesadas en un lapso no mayor a 2 horas. Las biopsias fueron maceradas a uniformidad con homogeneizadores y 50µl de los homogenizados se sembraron en placas de agar soya tripticasa con 7.5% de sangre de carnero con y sin antibiótico que se incubaron hasta por 10 días a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂. Los cultivos con morfología colonial característica de *H. pylori* se confirmaron por apariencia microscópica típica con tinción de Gram y por pruebas bioquímicas de ureasa, catalasa y oxidasa, a las que *H. pylori* es positivo.

Para los cultivos de biopsias de los 90 pacientes, se tomó un barrido de múltiples colonias (pool), el cual fue suspendido en solución salina para posteriormente extraer DNA.

Extracción de DNA. La extracción de DNA se realizó por el método modificado de GES (Atherton, 1996). (Tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 0.1 M, Sarkocil 0.5%), el cual consistió en suspender el crecimiento de *H. pylori* de un cuarto de placa en 1 ml de solución salina al 0.9%, centrifugando a máxima velocidad en una microcentrífuga para obtener el paquete bacteriano que una vez resuspendido en 100 µl de buffer TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) se liso agregando 500 µl de GES incubando posteriormente a temperatura ambiente por 5 min, después de lo cual se adicionaron 250 µl de acetato de amonio 7.5 M frío (4°C) e incubó nuevamente en hielo por 5 min. Después de lo anterior se agregaron 750 µl de cloroformo centrifugando a máxima velocidad la mezcla por 5 min para recuperar la fase acuosa y precipitar el DNA agregando y mezclando 0.54 vol de isopropanol. El paquete obtenido después de una nueva centrifugación a máxima velocidad por 1 min se lavo 2 veces con etanol al 70%. Una vez seco el DNA se resuspendió en 100 µl de buffer TE y cuando no se usó inmediatamente para el PCR se congeló a -20°C para su posterior uso.

Métodos para determinar microdiversidad

PCR para tipificar vacA y detectar cagA. Se realizó PCR a DNA extraído de la bacteria usando juegos de primers específicos de las distintas regiones descritas previamente para el gene *vacA* consistentes en tres diferentes familias de secuencias de señal s1a, s1b, s2 y dos diferentes familias de alelos de la región media m1 y m2 (Tabla 2) (Atherton y cols., 1995; Atherton 1996; Atherton y cols., 1999). Las condiciones en el termociclador fueron fijadas, en el caso de los primers para tipificar *vacA*, a 95°C por 1 min, 52°C por 1 min 72°C por 1 min

para un total de 35 ciclos (Atherton y cols., 1995; Atherton 1996). Las mismas condiciones se aplicaron para los 2 pares de primers para detectar *cagA* con excepción del alineamiento que se fijó a 55°C. (Atherton y cols., 1995; Atherton 1996). Cabe mencionar que las secuencias de ambos juegos de primers de *cagA* se localizan en las posiciones 156-505 y 570-905 respectivamente de la región amino terminal. Para la detección de los productos de amplificación como previamente se ha descrito se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2% a 100V y se visualizaron con luz ultravioleta después de ser teñidos con bromuro de etidio (Atherton 1996). En la **Tabla 2** puede verse además el tamaño de los productos.

Tabla 2. Primers usados para la tipificación de *vacA* y *cagA*

*Gene y región tipificada, nombre del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto en pares de bases pb
Región media de <i>vacA</i>		
m1		
^a VA3-F	5'GGTCAAATGCGGTCATGG3'	290
^a VA3-R	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3	-
m2		
^a VA4-F	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3'	352
^a VA4-R	5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'	-
Región secuencia señal de <i>vacA</i>		
s1a		
^{a*} SS1-F	5'GTCAGCATCACACCGCAAC3'	190
s1b		
^{a*} SS3-F	5'AGCGCCATACCGCAAGAG3'	187
s2		
^{a*} SS2-F	5'GCTAACACGCCAAATGATCC3'	199
^a VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	-
<i>cagA</i>		
<i>cagA+</i>		
^a F1	5'GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG3'	349
^a B1	5'CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA3	-
^b B7628	5'AAGAAAGGCAAGAAGCAGAAAA3'	335
^b B7629	5'ACACAGAAGACAGAGCGTTATT3'	-

* usados con el primer VA1-R. ^a Atherton y cols., 1995; ^b González-Valencia y cols., 2000

Como controles para genotipificación de *cagA* y *vacA* se utilizaron cepas tipo de *H. pylori*, cuyos probables factores de virulencia han sido previamente determinados: las cepas 88-23 y 84-183 cuyos genotipos son *slam1/cagA*⁺ y *slbm1/cagA*⁺ respectivamente y las cepas 88-22 y 86313 cuyos genotipos son en ambas *s2m2/cagA*⁻.

Análisis estadístico. Para esta primera parte del trabajo se utilizó chi cuadrada con corrección de continuidad de Yates para buscar la posible asociación de los alelos de *vacA* o tipos *cagA* en los aislados de *H. pylori* de los tres grupos de pacientes y entonces para pares donde se encontraran resultados significativos. También para esta parte del trabajo se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar entre aislados de niños y adultos con tipos *vacAs* simples o múltiples dentro de un grupo.

RESULTADOS

Frecuencia de infección múltiple. Todos los DNAs de los aislados múltiples de *H. pylori* genotipificados para *vacA* por PCR amplificaron ≥ 1 productos del gene, confirmando la presencia de al menos alguno de los alelos de *vacA* en todas las muestras. En algunas muestras, se encontró más de un tipo de alelo tanto de la región de la secuencia señal como de la región media, indicando la presencia de múltiples cepas o subpoblaciones de estas, en muestras individuales de biopsias. Posiblemente el hallazgo más notable fue, que tal infección se encontró en 37 de 39 de los adultos con úlcera péptica (en 33 de 35 con úlcera duodenal y en los dos casos de úlcera gástrica; **(Tabla3)**). Además, el análisis estadístico mostró que las infecciones con *H. pylori* con tipos múltiples de *vacA* fueron significativamente más

frecuentes en adultos con úlcera péptica (95%), que en adultos sin úlcera (37%; $P < 0.001$) o niños con dolor abdominal recurrente pero sin úlceras (52%; $P < 0.01$; **Tabla 3**).

Tabla 3. Frecuencia de infección con múltiples cepas de *Helicobacter pylori* en niños y adultos definido por la detección de ≥ 2 alelos de *vacA* de diferentes tipo de región media o de secuencia señal en cultivos de biopsias gástricas.

Región de <i>vacA</i> con ≥ 2 tipos alélicos encontrados	Pacientes con múltiples tipos de <i>vacA</i>		
	Niños con dolor abdominal recurrente sin úlcera péptica (n= 34) No. (%)	Adultos sin úlcera péptica (n= 19) No. (%)	Adultos con úlcera péptica (n= 37) No. (%)
Secuencia señal	12 (35) ^a	5 (26) ^b	28 (76) ^{a,b}
Media	16 (47) ^c	4 (21) ^b	25 (68) ^{b,c}
Cualquiera	18 (52) ^a	7 (37) ^b	35 (95) ^{a,b}

^a $P < 0.01$ Niños vs. Adultos con úlcera péptica

^b $P < 0.001$ Adultos sin úlcera péptica vs. Adultos con úlcera péptica

^c $P < 0.05$ Niños vs. Adultos con úlcera péptica

También se determinó si había alguna asociación entre la presencia de múltiples tipos *vacA* (“infección múltiple”) y la edad. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia con la que se identificaron aislados con múltiples tipos de *vacA* entre adultos sin úlceras (37%) y niños con dolor abdominal recurrente (52%; $P = 0.2$). Asimismo no se encontró asociación estadísticamente significativa entre múltiples tipos de *vacA* y edad en ninguno de los 2 siguientes grupos: niños (mediana de edad para infección con aislados con un solo tipo de *vacA*, 11 años; mediana de edad para infección con aislados con múltiples tipos de *vacA*, 11 años) y adultos sin úlcera (mediana de edad para infección con aislados con un solo tipo de *vacA*, 34 años; mediana de edad para infección con aislados con múltiples tipos de *vacA*, 43 años).

Frecuencia de alelos s y m en grupos con diferente enfermedad. La frecuencia de diferentes tipos alélicos de *vacA* en los 3 grupos de pacientes se muestra en la **Tabla 4**. Los alelos de *vacA* de tipo s1a se encontraron menos frecuentemente (11-19%) que los alelos de los tipos s1b (47-92%) o s2 (32-78%) en los 3 grupos de pacientes estudiados. De los alelos de la región de la secuencia señal de *vacA*, los del tipo s1b fueron más frecuentes en los aislados de *H. pylori* de ambos grupos de adultos, un 72% de los que presentaron gastritis sin úlcera y un 92% de los que presentaron úlcera péptica. En contraste, los aislados de *H. pylori* de niños presentaron una frecuencia del 47% de este alelo. Esta diferencia fue estadísticamente significativa cuando se compararon los resultados de los aislados de *H. pylori* de niños con los de los dos grupos de adultos ($P < 0.01$).

Los alelos de los tipos s2 y m2 fueron encontrados significativamente menos frecuentemente ($P < 0.01$) en aislados de *H. pylori* de adultos sin úlcera (32 y 21% respectivamente) que en los aislados de *H. pylori* de niños (62 y 65% respectivamente) o de adultos con úlcera duodenal (78 y 78.4% respectivamente). Aunque en los 2 últimos grupos, colonias s2m2 fueron encontrados comúnmente asociados a los alelos s1b y m1. Los genotipos de las infecciones con *H. pylori* con genotipo único en los 2 pacientes con úlcera péptica (úlcera duodenal) fueron s1a/m1 y s1bm1.

Tabla 4. Frecuencia de los diferentes tipos de *vacA* de región de secuencia señal y media en *Helicobacter pylori* de cultivos de biopsia gástrica de niños y adultos Mexicanos

Tipo alélico de <i>vacA</i>	Cultivos de biopsia gástrica positivos para el alelo		
	Niños con dolor abdominal recurrente sin úlcera péptica (n= 34) No. (%)	Adultos sin úlcera péptica (n= 19) No. (%)	Adultos con úlcera péptica (n= 37) No. (%)
<i>Región de la secuencia señal</i>			
s1a ^a	4 (12)	2 (11)	7 (19)
s1b	16 (47) ^b	15 (79)	34 (92)
s2	21 (62)	6 (32) ^c	29 (78) ^c
No tipificable para la región de la secuencia señal	6 (18)	0	0
Región media			
m1	27 (79)	19 (100)	31 (84)
m2	22 (18)	4 (21) ^d	29 (78)
No tipificable para la región de la señal media ^e	1 (3)	0	2 (5)

^a $P < 0.01$ cuando se comparo con s1b y s2 en los 3 grupos de pacientes.

^b $P < 0.01$ para niños vs. ambos grupos de adultos.

^c $P < 0.01$ para adultos sin úlcera vs. adultos con úlcera.

^d $P < 0.01$ para adultos sin úlcera vs. niños sin úlcera y adultos con úlcera.

El aislado no tipificable para m1 o m2 fue tipificable para la región de la secuencia señal de *vacA*.

Detección de cagA en grupos con diferente enfermedad. En la **Tabla 5** se presenta la frecuencia de infección con aislados de *H. pylori cagA*⁺, detectada con dos juegos distintos de primers. De los resultados combinados con ambos juegos de primers, la frecuencia de los cultivos *cagA*⁺ fue significativamente ($P < 0.01$) más baja en niños (47%) que en cualquiera de los de los grupos de adultos sin y con úlcera péptica (90 y 81% respectivamente). En esta población, en general, el juego de primers B7628-B7629 fue más sensible para detectar *cagA* que el juego de primers F1-B1. Sin embargo el juego primers F1-B1 dio resultados

interesantes, ya que identificó eficientemente aislados *cagA* en adultos sin úlceras (100% de los aislados *cagA*+ con cualquiera de los dos juegos de primers fueron positivos con F1-B1) pero pobremente en aislados de adultos con úlceras pépticas (solo 30% de los aislados *cagA*+ con cualquiera de los dos juegos de primers fueron positivos con el juego F1-B1; $P < 0.01$).

Tabla 5. Frecuencia de infección con cepas *cagA*+ en niños y adultos Mexicanos determinado por PCR con 2 juegos diferentes de primers.

Juego de primers de <i>cagA</i>	Cultivos de biopsia gástrica positivos para el alelo		
	Niños con dolor abdominal recurrente sin úlcera péptica (n= 34) No. (%)	Adultos sin úlcera péptica (n= 19) No. (%)	Adultos con ulcera péptica (n= 37) No. (%)
F1-B1	8 (24)	17 (90)	9 (24)
B7628-B7629	15 (44)	14 (74)	29 (78)
Cualquiera	16 (47) ^a	17 (90)	30 (81)

^a $P < 0.01$ para niños vs. ambos grupos de adultos.

SEGUNDA PARTE.

OBJETIVOS

- 1) Documentar infección mixta por genotipificación y fenotipificación de clonas de *H. pylori* aisladas de diferentes regiones del estómago de un mismo paciente con enfermedad ulcero péptica.
- 2) Confirmar la infección mixta en adultos con enfermedad ulcero péptica mediante la caracterización de macrodiversidad mediante determinación de patrones RAPD de los aislados de *H. pylori* de distintas regiones del estómago.

HIPOTESIS

- 1) Los diversos genotipos de *vacA* y *cagA* y fenotipos Lewis y de sensibilidad a antibióticos de las clonas *H. pylori* aisladas de un mismo estómago de adultos con enfermedad ulcero péptica documentaran la existencia de infección mixta.
- 2) Se confirmara la infección mixta mediante la determinación de macrodiversidad por patrones RAPD en los aislados de *H. pylori* de distintas regiones del estomago de adultos con enfermedad ulcero-péptica.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes.* Se estudiaron 8 pacientes adultos (Tabla 6**) cuya edad promedio fue de 58 años (rango 28-71, 5 sexo masculino, 3 sexo femenino). Todos, excepto uno (dispepsia no ulcerosa) presentaron úlcera, 3 úlcera gástrica y 4 úlcera duodenal.

Procesamiento de las biopsias para cultivo de H. pylori. A los 8 pacientes se les tomaron por duplicado biopsias gástricas de antro, cuerpo, fondo e incisura. Las biopsias se transportaron y procesaron como se describió para la primera parte del trabajo. Después del cultivo de las biopsias de las 4 regiones del estómago de los 8 pacientes, se seleccionaron además del pool, 7 colonias del cultivo primario; cuando no fue posible hacer el subcultivo de los homogenizados de las biopsias de cada una de las regiones estudiadas, que una vez propagadas se suspendieron en solución salina para posterior extracción de DNA. La edad promedio fue de 58 años (rango 28-71, 5 sexo masculino, 3 sexo femenino). Todos excepto uno, dispepsia no ulcerosa, presentaron úlcera, 3 úlcera gástrica y 4 úlcera duodenal (**Tabla 6**).

*grupo seleccionado al azar basado en que al grupo del protocolo del estudio original pudieran tomárseles muestras de biopsias de 4 regiones del estómago y que además logaran obtenerse cultivos de esas misma regiones.

Tabla 6. Características de los 8 pacientes estudiados en la segunda parte

No.	Paciente	Presentación clínica	Edad	Sexo
1	248	Úlcera gástrica	62	M
2	249	Úlcera duodenal	71	M
3	251	Úlcera duodenal	88	M
4	252	Úlcera gástrica	48	F
5	254	Dispepsia no ulcerosa	38	F
6	256	Úlcera duodenal	59	F
7	259	Úlcera duodenal	28	M
8	261	Úlcera gástrica	68	M

Abreviaciones. M Masculino; F Femenino

Extracción de DNA. La extracción de DNA se realizó como en la primera parte, la única diferencia fue que la concentración de DNA se ajustó a ~20 pMol para la determinación del RAPD-PCR.

Caracterización genotípica. Se estudiaron un total de 226 DNAs de colonias de *H. pylori*, en promedio 28 por paciente, 7 por cada región. La genotipificación de regiones de genes

individuales (*vacA*, *cagA*, *picB*) sirvió para establecer la microdiversidad de las colonias aisladas. En tanto que el RAPD-PCR sirvió para determinar el polimorfismo a nivel genómico (macrodiversidad). La determinación de genotipos en colonias, así como el que se estudiaran 4 regiones del estómago de cada paciente sirvió para establecer la colonización simultánea por “variantes genotípicas” de *H. pylori* (¿cuasiespecies?) vs múltiples cepas en un mismo huésped.

Microdiversidad

PCR para tipificar vacA con primers conservados y detectar cagA, picB y cag PAI. Para la segunda parte del trabajo se usó una variante de la estrategia para la genotipificación de *vacA* ya que se utilizaron primers conservados. Con estos primers, basados en el tamaño del producto, se determinaron los tipos alélicos “s” s1/s2 o “m” m1/m2. (**Tabla 7**). Las condiciones del termociclador cuando se usaron estos primers fueron como se indica: Desnaturalización inicial de 94°C por 1.5 min, 35 ciclos de 94°C 0.5 min; 56°C 1min y 72°C 1.5 min; y una amplificación final de 72 °C por 5 min. Para la determinación del tipo *cagA* se usaron los primers F1 y B1 (**Tabla 2**) y las condiciones del termociclador fueron fijadas como se describió en la primera parte. Para esta segunda parte se determinaron además el tipo *picB* y la presencia de *cag PAI*. El gene *picB* es un marcador indirecto tanto de la presencia del gene *cagA* como de *cag PAI* y en el caso de esta última es un marcador directo de la presencia de *cagA* ya que su ausencia indicaría a su vez la ausencia de *cagA*. Los primers utilizados así como los tamaños de los productos para la determinación de la presencia de *picB* y de *cag PAI* pueden apreciarse en la **Tabla 7**. Las condiciones del termociclador para

picB fueron 35 ciclos a 94°C 1 min; 52°C 1min y 72°C 1 min, en tanto que para *cag PAI* fueron desnaturalización de 5 min a 94°C y 35 ciclos a 94°C 1 min ; 57°C 1min y 72°C 1 min. Como controles para la genotipificación de estos genes y de *cag PAI* se utilizaron básicamente los mismos DNAs de las cepas control descritas en la primera parte del trabajo. Los genotipos en este caso son como a continuación se describe: las cepas 88-23 y 84-183 genotipos *slam1/cagA⁺/picB⁺/cag PAI⁺* y *slbm1/cagA⁺/picB⁺/ cag PAI⁺* respectivamente y las cepas 88-22 y 86313 cuyos genotipos son en ambas *s2m2/cagA⁻/picB⁻/ cag PAI⁻*. La detección de los productos de amplificación se realizo como previamente se ha descrito por electroforesis en geles de agarosa al 2% a 100V

Tabla 7. Primers usados para la tipificación de *vacA* (conservados), *cagPAI* y *picB*

Gene y región tipificada, nombre del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto en pares de bases pb
Región media de <i>vacA</i>		
M1/m2^a		
VAG-F	5'CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG3'	570/645
VAG-R	5'GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG3'	-
Región de la secuencia señal		
s1/s2		
VA1-F	5'ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC3'	259/286 ^a
VA1-R	5'CTG CTT GAA TGC GCC AAAC3'	-
<i>cagPAI</i> negativo		
<i>cagPAI</i>		
2	5'ACA TTT TGG CTA AAT AAA CGC TG3'	360
25	5'TCA TGC GAG CGG CGA TGT G3'	-
<i>picB</i>		
picB 101	5'TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC3'	508
picB 102	5'GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C3'	-

^aLos tipos *vacA s1/s2* y *m1/m2* se distinguen en base a diferencias en tamaño de los productos del PCR.

Macrodiversidad

RAPD fingerprinting. Para el estudio complementario, se realizó RAPD-PCR a los DNAs de los aislados de *H. pylori* (pools y colonias) de las 4 regiones del estómago, con cuatro diferentes primers: 1281, 1254 (10 nucleótidos de longitud) y D14307 (20 nucleótidos de longitud) y D11344 (23 nucleótidos de longitud) todos ellos previamente descritos (Akopianz y cols., 1992b) (Tabla 8), como se describe a continuación. Se prepararon 25 µl de una mezcla de reacción que contenía 20 ng de DNA, 3 mM de MgCl₂, 20 pmoles de primer, una unidad de Taq polimerasa, 250 µM de cada dNTP. Las condiciones de PCR variaron de acuerdo a la longitud el primer como se indica; cuando se usaron primers de 10 nucleótidos de longitud se realizaron 4 ciclos de 94 °C, 5 min; 36 °C 5 min y 72 °C 5 min, 30 ciclos de 94 °C, 1 min; 36 °C 1 min y 72 °C 2 min y una amplificación final de 72 °C por 10 min. con los primers de 20 o más nucleótidos las condiciones fueron como se indica; 4 ciclos de 94 °C, 5 min; 40 °C 5 min y 72 °C 5 min- amplificación de baja astringencia, 30 ciclos de 94 °C, 1 min; 55 °C 1 min y 72 °C 2 min-amplificación de alta astringencia y amplificación final de 72 °C por 10 min. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% y en todos los casos se utilizó como marcador de tamaño molecular DNA Ladder de 1kb (Gibco, BRL) en el primero y en el último carril). El análisis automatizado de similitud o diferencia de los patrones electroforeticos se realizó con el software gene tools de syngene UK.

Tabla 8. Primers usados para el análisis de RAPD

RAPD Primers	%G+C	Longitud (nt*)	Secuencia
1254	70	10	CCG CAG CCA A
1281	60	10	AAC GCG CAA C
D11344	52	23	AGT GAA TTC GCG GTG AGA TGC CA
D14307	55	20	GGT TGG GTG AGA ATT GCA CG

*nt número de nucleótidos

Características fenotípicas

Pruebas de sensibilidad. Esta determinación solo se realizó para la segunda parte del trabajo. Se determinó la sensibilidad a amoxicilina, claritromicina y metronidazol a los pools de los aislados de biopsias de las 4 regiones del estómago por la prueba de E-test como previamente se ha descrito (**Glupeczynski y cols., 1991**). Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina con una turbidez equivalente al 0.5 del nefelómetro de McFarland la cual fue inoculada a uniformidad con un hisopo en la superficie de una placa de agar soya tripticasa con 7.5% de sangre de carnero sin antibiótico a la que se le colocó enseguida la tira E-test del antibiótico a probar. La incubación se llevó a cabo como previamente se ha descrito hasta por 5 días. La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue definida por el punto de intersección de la zona inhibitoria con la tira de antibiótico. Para confirmar los resultados cada cepa se probó al menos 2 veces. Los valores de corte para susceptibilidad fueron de 8 µg/ml para metronidazol, 4µg/ml para amoxicilina y 2µg/ml para claritromicina (**Glupeczynski y cols., 1991**).

Antígenos Lewis. Como en el caso anterior esta determinación se realizó solamente en la segunda parte del trabajo. Se utilizó un método inmunoenzimático (ELISA) previamente descrito (**Muñoz y cols., 2001**). El método consistió en sensibilizar toda la noche placas de microdilución de 96 pozos con células completas de *H. pylori* como antígeno (1µg por pozo). Se agregaron entonces anticuerpos monoclonales (Signet Laboratorios) anti-Lewis^x (1: 1000) y anti-Lewis^y (1: 2000) y se incubaron 1 h. Después se agregó IgM de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina y se reveló la reacción con P-nitrofenilfosfato (0.5%). Como controles se utilizaron dos cepas de *H. pylori* cuya composición química de Le ha sido ya reportada (**Monteiro y cols., 2000**). La cepa MO19 es Le^y positiva, Le^x negativa y la cepa J99 es Le^x positiva (niveles altos), Le^y positiva (niveles bajos). Como control negativo se incluyó a

la cepa de *Escherichia coli* Hb101. Los resultados fueron expresados en unidades de densidad óptica (UDO) como se ha hecho previamente (Wirth., 1997). Valores mayores de 100 UDOs fueron considerados positivos.

RESULTADOS

Genotipificación de colonias aisladas de cuatro regiones del estómago.

En 3 de los 8 pacientes (pacientes 248, 256, 261) se encontró que todas colonias de *H. pylori* de todas las regiones del estómago presentaron el genotipo *vacA* s1m1. En otros 3 pacientes (251, 252 y 254), todas las colonias de *H. pylori* de todas las regiones del estómago presentaron el genotipo *vacA* s2m2 (Tabla 9).

Solamente 2 de los pacientes (249 y 259) presentaron colonias de *H. pylori* con más de un genotipo de *vacA* en al menos una región del estómago. El paciente 249 presentó colonias de *H. pylori* en 3 de las regiones del estómago (cuerpo, fondo e incisura) con un único genotipo de *vacA* s1m2 y únicamente en antro se encontraron colonias de *H. pylori* con 2 genotipos de *vacA* s1m1 y s1m2. En el caso del paciente 259 todas las colonias de antro presentaron un único genotipo de *vacA* s1m1; en el resto de las regiones del estómago de este paciente se presentaron colonias de *H. pylori* con dos genotipos de *vacA* s1m1 y s2m2 (Tabla 9).

En relación con el tipo *cagA*, empleando los primers F1 y B1, que se usaron también para los aislados múltiples, se detectó infección simultánea con colonias *cagA*⁺ y *cagA*⁻ solo en el paciente 259, y esto ocurrió además en 3 de las 4 regiones del estómago. En los otros 7 pacientes todas las colonias de todas las regiones del estómago fueron o *cagA*⁺ (pacientes - 248, 249, 256 y 261-) o bien *cagA*⁻ (pacientes -251, 252, 254-) (Tabla 9).

En cuanto a los patrones RAPD empleando 4 primers diferentes (**Tabla 8**), el análisis de todas las colonias aisladas de antro, cuerpo, fondo e incisura de los 8 pacientes, detecto colonias con patrones RAPD claramente diferentes solamente del paciente 259. Lo cual de acuerdo a este método de genotipificación sugeriría infección por una sola cepa en cada uno de los otros 7 pacientes estudiados. Las colonias del paciente 259 presentaron 2 patrones diferentes RAPD (**Fig. 1, Tabla 9**) designados “a” “b”. El patrón “a” se encontró en colonias aisladas de las 4 regiones del estómago y el patrón “b” se encontró en 3 de las 4 regiones, cuerpo, fondo e incisura. De acuerdo a este método este paciente estaría colonizado con múltiples cepas.

Tabla 9. Genotipificación de colonias de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas de 4 regiones del estómago de 8 pacientes con enfermedad ulcero péptica.

Paciente	Presentación clínica	Región del estómago	Genotipo <i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>picB</i>	<i>cagPAI</i>	RAPD	
248	GU	Todas	s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
249	DU	Antro	s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
			s1m2	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
		Cuerpo	s1m2	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
		Fondo	s1m2	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
		Incisura	s1m2	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
251	DU	Todas	s2m2	<i>cagA</i> ⁻	<i>picB</i> ⁻	-	a	
252	GU	Todas	s2m2	<i>cagA</i> ⁻	<i>picB</i> ⁻	-	a	
254	NUD	Todas	s2m2	<i>cagA</i> ⁻	<i>picB</i> ⁻	-	a	
256	DU	Todas	s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
259	DU	Antro	s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
			s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
		Cuerpo	s2m2	<i>cagA</i> ⁻	<i>picB</i> ⁻	-	b	
			Fondo	s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a
			s2m2	<i>cagA</i> ⁻	<i>picB</i> ⁻	-	b	
		Incisura	s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	
			s2m2	<i>cagA</i> ⁻	<i>picB</i> ⁻	-	b	
261	GU	Todas	s1m1	<i>cagA</i> ⁺	<i>picB</i> ⁺	+	a	

Abreviaciones. UD ulcera duodenal. UG ulcera gástrica, DNU dispepsia no ulcerosa. RAPD patrones RAPD.

De los 7 pacientes cuyos aislados presentaron un mismo patrón RAPD, 3 (248, 249 y 256) estuvieron colonizados exclusivamente con cepas *cagA* y *picB* positivas (Tabla 9), y de estos 3 solamente las colonias de *H. pylori* del paciente 249 presentaron más de un genotipo de *vacA* (Tabla 10). Este paciente presentó colonias con 2 combinaciones de alelos de *vacA* (s1m1, s1m2) únicamente en antro ya que el resto de las colonias de las otras 3 regiones fueron s1m2 y todas las colonias de los pacientes 248 y 256 fueron s1m1 (Tabla 10).

Tabla 1|0. Pacientes donde todos los aislados fueron *cagA* y *picB* positivos y presentaron el mismo patrón RAPD

Paciente	Región	<i>vacA</i> (No.)*
248	Todas	s1m1 (29)
249	antro	s1m1 (5), s1m2 (2)
	cuerpo	s1m2 (7)
	fondo	s1m2 (7)
	incisura	s1m2 (7)
256	Todas	s1m1 (28)

*No. de colonias con el genotipo

Otros 3 pacientes, 251, 252 y 254 estuvieron colonizados con cepas de *H. pylori* que presentaron un solo patrón RAPD y todas las colonias de estos casos mostraron una combinación única de alelos de la región de la secuencia señal y región media s2m2 y todas las colonias de todas las regiones del estómago fueron negativas para *cagA*, *picB* y *cag* PAI. (Tabla 9).

Como se menciona con anterioridad las colonias de *H. pylori* del paciente 259 fueron las únicas de las de los 8 pacientes estudiados que presentaron 2 distintos patrones RAPD con cada uno de los 4 primers usados. En la **figura 1** se muestran los 2 patrones obtenidos usando los primers 1254 y 1281. Las colonias de *H. pylori* de este paciente presentaron además distintos genotipos de *vacA* y distintos tipos *cagA* y *picB*. (Tabla 11). Todas las colonias con patrón RAPD “a”, presentes en todas las regiones del estómago de este paciente presentaron el genotipo *vacA* s1m1 y tipo *cagA*⁺ pero algunas de ellas difirieron en los tipos *picB*, particularmente 2, 4, 4 y 6 colonias de antro, cuerpo, fondo e incisura respectivamente, fueron *picB*⁻. Concordantemente todas las colonias con patrón “b” fueron s2m2 y presentaron los tipos *cagA*⁻ y *picB*⁻. En todas ellas se confirmó además, la ausencia de *cag* PAI (Tabla 11).

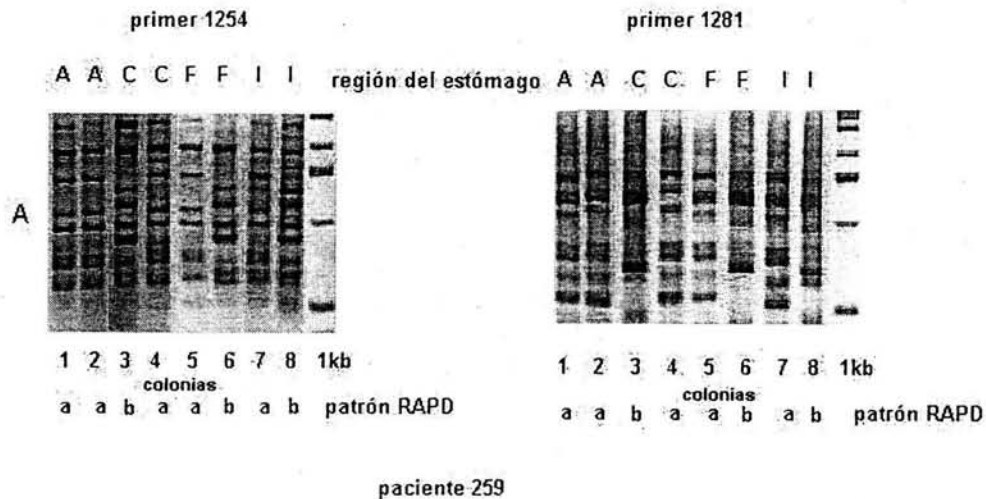


Figura 1. Patrones RAPD representativos (minúsculas a y b) de colonias de *H. pylori* del paciente 259 aisladas de 4 regiones del estómago (A antro, C cuerpo, F fondo, I incisura) determinados con los primers 1254 y 1281.

La ausencia de *cag* PAI en las colonias *cagA* y *picB* negativas fue confirmada por PCR para *cag* PAI. Un total de 94 (42%) de las colonias no presentaron *cag* PAI (de los pacientes 251, 252, 254 y 259), 125 (55%) de las colonias presentaron PAI (de los pacientes 248, 249, 256 y 261) (Datos no mostrados).

Tabla 11. Paciente 259 donde los aislados presentaron diferente patrón RAPD y tipos *vacA*, *cagA*, *picB* y *cag* PAI

Región	RAPD	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>picB</i>	<i>cag</i> PAI	No.*
antro	a	s1m1	+	+	+	7
cuerpo	a	s1m1	+	+	+	3
	b	s2m2	-	-	-	4
fondo	a	s1m1	+	+	+	3
	b	s2m2	-	-	-	4
incisura	a	s1m1	+	+	+	5
	b	s2m2	-	-	-	2

*No de colonias con el genotipo.

Caracterización fenotípica. En cuanto a las características fenotípicas la frecuencia de los fenotipos Lewis fue Le⁻>Le^y>Le^{xy}>Le^x 38, 27, 26 y 8% respectivamente. Todos los pacientes estuvieron colonizados por *H. pylori* con distintos fenotipos Lewis, 5 con 3 fenotipos Lewis distintos y 3 con 4 fenotipos Lewis distintos. No obstante lo anterior en general predominaron uno o dos de los fenotipos, presentándose casi siempre en las cuatro regiones del estómago estudiadas con una frecuencia muy similar. En relación con PAI de las 19 colonias que presentaron el fenotipo Le^x solamente 4 presentaron PAI, de las 62 colonias que presentaron el fenotipo Le^y 44 presentaron PAI, de las 60 que presentaron el fenotipo Le^{xy} 45 presentaron PAI y de las 85 que presentaron el fenotipo Le⁻ únicamente 2 tuvieron PAI (**Datos no mostrados**).

En cuanto a la susceptibilidad a antibióticos, los aislados de *H. pylori* (pools) de 6 de los pacientes presentaron susceptibilidad mixta a al menos uno (5 de 6) de los tres antibióticos utilizados. Los aislados de *H. pylori* de los otros 2 pacientes, 254 y 261, fueron sensibles y/o resistentes a alguno de los antibióticos probados (Tabla antibióticos). Los aislados de *H. pylori* del paciente 259 que presentaron diferentes tipos *vacA*, *cagA*+/*cagA*- simultáneamente y distintos patrones de RAPD presentaron susceptibilidad mixta únicamente a un antibiótico (metronidazol) (**Tabla 12**). En la misma tabla se resumen las características genotípicas y fenotípicas de los aislados de *H. pylori*

Tabla 12. Frecuencia de Tipos Lewis en antro, cuerpo, fondo e incisura de 8 pacientes con enfermedad ulcero péptica

Paciente	Presentación clínica	No. de patrones de ¹ RAPD	No. de genotipos de ² <i>vacA</i>	No. de tipos ³ <i>cagA</i>	No de tipos ⁴ Lewis	Resistencia mixta 1-3 ⁵ antibióticos
248	Úlcera gástrica	1	1	1	3	3
249	Úlcera duodenal	1	2	1	3	3
251	Úlcera duodenal	1	1	1	3	3
252	Úlcera duodenal	1	1	1	3	3
254	Dispepsia no ulcerosa	1	1	1	3	3
256	Úlcera duodenal	1	1	1	4	4
259	Úlcera duodenal	2	2	2	4	4
261	Úlcera gástrica	1	1	1	4	4

Esta tabla analiza globalmente, los aislados de 4 regiones del estómago. ¹Detectado con 4 primers diferentes; los números representan el número de patrones RAPD para las cuatro regiones del estómago establecido con 4 primers. ² Establecido por la combinación de los alelos “s” y “m” de *vacA*. ³ detectado con primers F1/B1 (ver tabla 2). ⁴Se consideraron 4 tipos Lewis: Le^x, Le^y, Le^{x/y} y Le⁻. ⁵Los valores muestran resistencia mixta de 1 a 3 de los antibióticos usados (amoxicilina, claritromicina,, y metronidazol).

DISCUSIÓN

De la primera parte de este trabajo los hallazgos centrales fueron 1) que la infección con más de una cepa de *H. pylori* (definida por diferentes tipos *vacA*) es muy común en México, 2) que tales infecciones son asociadas más comúnmente con úlcera péptica que las infecciones por una sola cepa y 3) que los adultos y los niños de la misma comunidad portan poblaciones de cepas con diferentes características. El hallazgo de que la infección con múltiples tipos de *vacA* es más común en México que lo que se ha reportado en países desarrollados (Prewett,

1992; Fujimoto, 1994; Hirschl y cols., 1994; Jorgensen, 1996; van Doorn y cols., 1998) confirma y extiende lo encontrado en un estudio previo con pacientes de un Hospital de alta especialidad de la ciudad de México, que mostró que 18 de 20 pacientes tenían cepas con múltiples tipos de *vacA* (Morales y cols., 1999). En ese estudio, se aislaron colonias del “barrido” original de la placa de cultivo y como se esperaba cada uno de estos presentó un solo tipo *vacA*. Esto confirmó que el aislado original contenía diferentes cepas y no una sola cepa de la cual *vacA* pudiera ser amplificado por el uso de varios diferentes juegos de primers.

El estudio previo de México fue demasiado pequeño (20 pacientes) para examinar asociaciones con enfermedad y estudios más grandes no han identificado suficiente pacientes infectados con cepas de *H. pylori* con múltiples tipos *vacA* como para examinar dicha asociación (Morales y cols., 1999). Por tanto la asociación de infección con múltiples cepas fue un hallazgo nuevo, no reportado con anterioridad, aunque estudios posteriores lo han confirmado (Figueroa y cols., 2001). Una posible razón para que se de dicha asociación podría ser que la infección con múltiples cepas incrementa las probabilidades de infección con una cepa más patógena. No obstante nuestros datos no apoyan esta idea ya que los marcadores conocidos de cepas patógenas que nosotros estudiamos como *cagA* y el genotipo *sl* del gene *vacA*, están presentes con la misma frecuencia en pacientes adultos con y sin úlceras. Analizando otras posibilidades, en la segunda parte del trabajo se estudiaron otros probables factores de virulencia, pero seguimos analizando la teoría de que la infección mixta con *H. pylori* pudiera actuar de manera sinérgica para persistir en el estómago y causar daño.

Un aspecto nuevo de este estudio fue la comparación de marcadores de virulencia en las cepas de *H. pylori* que infectaban a adultos y a niños. En los adultos estudiados, se encontraron principalmente cepas *cagA+* y *vacA slb*, pero entre los niños predominaron las cepas *cagA-*,

vacA s2. Esta diferencia persistió aun cuando se excluyeron los pacientes con úlcera péptica y por tanto no fue causada por la asociación de estos marcadores con la enfermedad. Tampoco fue debido a diferencias demográficas entre las poblaciones, dado que tanto los adultos como los niños provenían del mismo grupo socioeconómico de la ciudad de México.

Es posible que las cepas *cagA*⁻, *vacA* s2 infecten a los niños más fácilmente que a los adultos (y viceversa para *cagA*⁺, *vacA* s1b) o que la infección ocurre en México, principalmente en la infancia (como en la mayoría de las poblaciones) y que el genotipo más prevalente de las cepas que infectan a los niños haya cambiado de s1b/*cagA*⁺ a *vacA*s2/*cagA*⁻. Sin embargo esto no concuerda con el concepto de que los niños adquieren comúnmente la infección por *H. pylori* de sus padres; esto sugiere que la infección puede ser adquirida de fuentes fuera de la familia. Sin embargo una explicación alternativa es que los niños y los adultos son portadores de cepas con los mismos genotipos, pero que la carga bacteriana de los diferentes subtipos de *vacA* varia con el tiempo. De esta manera, las cepas s2/*cagA*⁻ alcanzarían cargas bacterianas mayores en niños que en adultos, en tanto que s1b/*cagA*⁺ alcanzarían cargas bacterianas mayores en niños que en adultos. Se pudo haber subestimado la infección con cepas *cagA*⁺ mediante el uso de metodología basada en PCR., debido a que ninguno de los 2 juegos de primers utilizados fue completamente sensible para detectar *cagA* cuando se compararon entre si. Sin embargo, la diferencia en los resultados entre los juegos de primers resulto interesante, particularmente los resultados del juego F1-B1, que fue mucho más sensible en la detección de *cagA* en la población sin úlceras que en la población con úlceras. Esto hace surgir la posibilidad de que la heterogeneidad de la secuencia nucleotídica en *cagA*, pueda estar asociada con enfermedad en pacientes Mexicanos. Con respecto a *vacA*, en contraste a reportes previos (Atherton y cols., 1997; Atherton 1998; van Doorn y cols., 1998; Strobel y cols.,

1998) se observó que las cepas *vacA* s2 fueron menos frecuentes en adultos sin úlceras que en adultos con úlceras. Sin embargo, el exceso de cepas *vacA* s2 en pacientes con úlceras estuvo asociado con múltiples tipos *vacA* por lo que aparentemente esto, más que el tipo *vacA* s2 por sí mismo fue el que se asoció con la úlcera péptica.

Los resultados de este estudio, y los del estudio previo con pacientes mexicanos (Morales y cols., 1999) demuestran que múltiples cepas con diferentes tipos *vacA* coexisten en las muestras de biopsias gástricas, pero la relación de estas entre sí cepas no es clara. Podrían no tener relación en absoluto, o bien podrían derivarse de una cepa común que recombinándose con otras cepas, resultarían en diferencias de tipo *vacA*. Tal recombinación entre cepas durante la infección natural se ha mostrado que resulta en cambios en varios loci genéticos, incluyendo *cag* PAI (Blaser, 2001). Cualquiera que sea la relación de las cepas que colonizan un estómago, esta parte del estudio pudo haber subestimado las diferencias genéticas totales por 3 razones: primero, se analizó una sola biopsia de la región antral del estómago; segundo la metodología utilizada no identificó otras diferencias, además de las de los genotipos de *vacA*; y tres al realizar cultivo de biopsias se pudo haber seleccionado algunas cepas.

En la segunda parte del estudio se analizaron las diferencias genéticas entre colonias (single-colony isolates) para aclarar la relación exacta de las cepas con diferentes tipos de *vacA*, *picB*, *cagA*, *cag* PAI y RAPD en un solo estómago. Como se demostró en la primera parte de este estudio, en la que se analizaron aislados múltiples, la infección múltiple determinada por genotipos de *vacA* y tipos *cagA* en *H. pylori*, es muy común en nuestro medio. Por ello es que en esta segunda parte, no resultó raro que a pesar de trabajar con colonias, se encontrara que algunas de estas presentarían más de un genotipo de *vacA* o de *cagA* en una o más regiones del estómago de un individuo; en nuestro caso particular así resultó en 2 de los 8 pacientes

estudiados. La existencia de este tipo de colonización por cepas con diferentes genotipos en un mismo individuo aunque poco común ha sido ya reportada (van Doorn y cols., 1998; van Doorn y cols., 1998b; Kim y cols., 2001; Yamaoka y cols., 2002, Ashour y cols., 2002). En cuanto al resto de los genes estudiados lo que se encontró concuerda con lo reportado en la literatura referente a la gran diversidad genética de la bacteria (Pride y cols., 2001; Atherton y cols., 1995; Ito y cols., 1997; van Doorn y cols., 1998; Akopyanz y cols., 1992a; Akopyanz y cols., 1992b; Marshall y cols., 1995; Fujimoto y cols., 1994; Go y cols., 1996; Salama y cols., 2000; Achtman y cols., 1999; Blaser y Berg 2001; Shu y cols., 2000). Se sabe que *H. pylori* adquiere su gran diversidad por poseer la tasa más alta de recombinación entre bacterias (Achtman y cols., 1999). La recombinación ocurre tan frecuentemente en *H. pylori* que ocasionalmente puede ser reconocida simplemente comparando diferentes aislados de un mismo paciente (Kersulyte y cols., 1999). A esta elevada tasa de recombinación contribuye grandemente la que ocurre entre alelos de genes individuales, entre los que *vacA* y otros genes como por ejemplo *flaA* y *flaB* han sido ampliamente estudiados (Suerbaum y cols., 1998). Por tanto, la existencia de esta diversidad de *vacA* podrían ser el resultado de una recombinación transitoria debida a la naturaleza panmítica de la bacteria y la presencia o ausencia de ciertos genes podría deberse más a eventos al azar durante la recombinación. Se sabe además que de modo redundante el polimorfismo tanto de genes individuales como de regiones del genoma resultado de los distintos eventos de recombinación o mutaciones en *H. pylori* se ve favorecido por la infección mixta (Suerbaum y cols., 1998; Achtman y cols 1999; Kersulyte y cols., 1999). Por ello no resulta extraño que se encontraran pacientes que estuvieran colonizados por *H. pylori* con más de un genotipo de *vacA*, *cagA*, y/o *picB* y que se encontraran tipos RAPD diferentes en las distintas regiones del estómago estudiadas de uno de

los pacientes (**Tabla 12**). La genotipificación de las cepas con otros genes distintos de *vacA* como *cagA* y *picB* nos permitió comprobar el polimorfismo de genes individuales en aislados de *H. pylori* en un mismo estómago. También nos permitió comprobar la relación que la presencia de algunos genotipos de *vacA*, combinación de alelos de las regiones s y m, guardan con *cagA*, como por ejemplo el que todas las colonias s2m2 fueran invariablemente *cagA*⁻ o que todas las colonias s1m1 fueran *cagA*⁺. Otra relación invariable en las colonias de *H. pylori* estudiadas, también ya reportada (**Blaser, 1996**) fue *cagA*⁺ y *picB*⁺ (**Tablas 9 y 11**). Por otra parte la infección simultánea con cepas *cagA*⁺ y *cagA*⁻ en un mismo estómago como lo que encontramos en uno de los pacientes ha sido descrita con anterioridad (**Fantry y cols., 1996**). La abundancia del polimorfismo en genes individuales, principalmente de *vacA*, de los aislados de distintas regiones del estómago de estos pacientes contrasta con lo encontrado con RAPD, que mide la heterogeneidad total del genoma y no de genes individuales (**Akopyanz y cols., 1992b**), ya que únicamente los aislados del paciente 259 presentaron más de un patrón RAPD. Esto confirma lo que previamente se ha reportado, resultado del análisis comparativo de los genomas de 2 cepas diferentes (**Alm y cols., 1999**), acerca de que las diferencias entre genomas de cepas distintas no son tan grandes como lo hacía suponer la gran diversidad genética de *H. pylori* que múltiples estudios han documentado ampliamente (**Pride y cols., 2001; Atherton y cols., 1995; Ito y cols., 1997; van Doorn y cols., 1998, Akopyanz y cols., 1992a; Akopyanz y cols., 1992b; Marshall y cols., 1995; Fujimoto y cols., 1994; Go y cols., 1996; Salama y cols., 2000; Achtman y cols., 1999; Blaser y Berg 2001; Xu y cols., 2000**). Estas radican principalmente en diferencias alelicas y presencia o ausencia de genes individuales (**Alm y cols., 1999**). Por ejemplo estudios previos han demostrado la generación de variantes genotípicas y cuasiespecies, comparando poblaciones apareadas de *H. pylori*

durante colonizaciones prolongadas en distintos individuos (Kuipers y cols., 2000) o en un mismo individuo (Israel y cols., 2001). Estas variantes genotípicas pueden ser el resultado de la evolución de distintas poblaciones de *H. pylori* que colonizan un mismo estómago o bien derivarse de una población homogénea. En nuestro estudio a diferencia de uno de los anteriores se demostró que la generación de dichas variantes no necesariamente esta relacionada a una infección prolongada ya que al estudiar simultáneamente los aislados (colonias) de 4 distintas regiones del estómago de los pacientes estos no siempre presentaron el mismo genotipo o patrón RAPD, lo cual pudo haber sido subestimado en dicho estudio al trabajar con pools en lugar de colonias (Kuipers y cols., 2000). Al menos en 2 de los pacientes estudiados pudieron encontrarse dichas variantes genotípicas al momento del análisis de la muestra. De acuerdo a los resultados de RAPD, solo uno los pacientes- 259 - presento infección con más de una cepa. Las colonias de este mismo paciente como se ha mencionado previamente, presentaron además variaciones genotípicas de *vacA* (s1m1, s2m2) y presentaron simultáneamente colonias *cagA*, *picB* y *cag* PAI positivas y negativas. Cabe recordar que todas las colonias con el patrón "a" fueron s1m1 o s1m2, *cagA*⁺, *picB*⁺, *cag* PAI⁺ en tanto que todas las colonias que presentaron el patrón "b" fueron o s2m2, *cagA*⁻, *picB*⁻, *cag* PAI⁻. Más allá de lo complejo que resulta establecer la relación de las colonias aisladas de un mismo estómago, basado en genotipos de genes individuales o patrones RAPD, es difícil establecer en sentido estricto si las "variantes genotípicas" o "cepas" son poblaciones de origen reciente y transitorio o son el resultado de una infección prolongada, ya que los pacientes a partir de los cuales se aislaron tenían una edad promedio de 60 años, muy posiblemente infectados por décadas. Otra posible explicación a el predominio de infección por variantes genotípicas en los individuos estudiados podría ser que aunque una cepa

predominante puede haberse seleccionado durante una infección crónica, al parecer la infección mixta y la recombinación ocurren continuamente aun después de décadas de colonización por *H. pylori*. Diversos estudios han demostrado lo anterior y han remarcado la importancia que la mutación y particularmente la recombinación juegan en la generación de polimorfismo de genes individuales (Fantry y cols., 1996; Kersulyte y cols., 1999; Xu y cols., 2000; Blaser y Berg 2001). De allí que se haya descrito que *H. pylori* existe como una población bacteriana que esta en constante flujo genético, por sus variaciones a nivel genéticos (Israel y cols., 2001). La importancia de esto último radica en las ventajas que estos eventos proporcionan a la bacteria para adaptarse a las características particulares del nicho que habita ya que es de esperar que como resultado de una infección prolongada se seleccionen los genotipos que favorezcan más dicha adaptación. Aunque también podrían ayudar a explicar las diferencias en el resultado de la infección del huésped y la distinta distribución mundial de ciertos alelos y genes particulares (van Doorn y cols., 1998; kersulyte y cols., 2000; Ashour y cols., 2002). La existencia de infección con más de una cepa en distintos sitios de un mismo estómago en un mismo paciente empleando RAPD como método de genotipificación, al igual, que lo que se encontró en este estudio en uno de los pacientes ha sido ya reportado (Prewett y cols., 1992). Un estudio reciente reporto polimorfismo en regiones particulares de *ribA*, *vacA* y *cagA* que diferenciaban aislados de *H. pylori* de cuerpo y antro en un mismo paciente (Bereswill 2000). En nuestro estudio sin embargo no encontramos el predominio de genotipos particulares en algún sitio del estómago, lo que sugiere que el polimorfismo de los genes de virulencia que estudiamos no es seleccionado específicamente para predominar en alguna de las 4 regiones del estómago estudiadas.

En cuanto a las características fenotípicas, nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura respecto a la coexistencia en un mismo individuo de cepas sensibles y resistentes a metronidazol (Berg y cols., 1997; Chalkauskas y cols., 1998; Hua y cols., 2000; Wong y cols., 2001). Uno de de estos estudios describe además que los aislados de la bacteria con un mismo patrón RAPD presentan diferente sensibilidad a metronidazol en diferentes partes del estómago como lo encontramos nosotros en varios de los pacientes estudiados (Hua y cols., 2000). Respecto a los antígenos Lewis, la otra característica fenotípica estudiada, no encontramos asociación de alguno de los tipos Lewis de los aislados de *H. pylori* de los pacientes estudiados a ninguna región del estómago a diferencia de un estudio previo en el que predominaron aislados de un tipo Lewis en duodeno comparado con los aislados de antro en uno de los pacientes estudiados, aunque también se encontraron distintos tipos Lewis en aislados del duodeno de un mismo paciente (Thoreson y cols., 2000). Tampoco se encontró relación con los genotipos estudiados. Cambios en la expresión de antígenos Lewis en aislados seriados de biopsias como lo han mostrado algunos estudios (Kuipers y cols., 2000; Rasko y cols., 2000) podrían explicar esto último, sin embargo solo podemos especularlo ya que en este estudio solo se trabajo con aislados únicos, no seriados. De todo lo anterior se podría concluir que la genotipificación de genes individuales, fragmentos de genoma como *cag* PAI y de genoma como RAPD y características fenotípicas son suficientes para demostrar que un paciente puede estar colonizado simultáneamente por distintas cepas o variantes genotípicas de *H. pylori*, sin embargo el surgimiento de “microarreglos” un método de genotipificación más sofisticado y fino que toma ventaja de la información de las secuencias completas de los genomas de dos cepas no relacionadas (J99 y 26695), ha provocado que se deban reconsiderar conclusiones similares. Por ejemplo en uno de los varios estudios en que

se ha aplicado este tipo de análisis en el que se compararon aislados recientes y de 6 años atrás de la cepa J99, una de las que se conoce su secuencia completa, revelo que a pesar de que todos los aislados parecían estar estrechamente relacionados a la cepa original, determinado esto por análisis de patrones RAPD, PCR de genes individuales, similar a lo que se realizo en este estudio, además de secuenciación, el análisis con microarreglos revelo diferencias en el contenido de los aislados recientes respecto a la cepa original (Israel y cols., 2001). Actualmente analizamos resultados de AFLP y microarreglos de colonias aisladas de los pacientes 249 (2 genotipos de *vacA*, todas *cagA*⁺ y un único patrón de RAPD), paciente 251 (todas s2m2, *cagA*⁻, y un único patrón de RAPD) y colonias del paciente 259 (diferentes genotipos de *vacA*, *cagA* positivas y negativas y diferentes patrones RAPD) (Datos no mostrados). Ambos métodos coinciden con el análisis empleando RAPD. Sin embargo cabe resaltar que el análisis con microarreglos nos ha proporcionando invaluable información adicional que nos ha permitido confirmar que efectivamente el paciente 259 esta colonizado por dos cepas diferentes y que el grado de diversidad genética de las colonias de *H. pylori* de este paciente es considerablemente mayor que las colonias de *H. pylori* del resto de los pacientes.

CONCLUSIONES

PRIMERA PARTE

- 1) Las frecuencias de *vacA* y *cagA* fueron similares a las reportadas en la literatura.
- 2) Se encontraron diferencias entre cepas aisladas de niños y adultos. Los alelos s1 de *vacA* y el tipo *cagA*⁺ fueron significativamente más frecuentes en adultos con ulcera que en adultos sin ulcera y niños.
- 3) La infección mixta fue más frecuente en adultos con ulcera que sin ulcera y también más frecuente en adultos que en niños.

SEGUNDA PARTE.

- 1) Se documentó la infección mixta tanto por genotipificación como por fenotipificación de clonas de *H. pylori* aisladas de diferentes regiones del estómago de un mismo paciente con enfermedad ulcero péptica.
- 2) Se confirmó la infección mixta en adultos con enfermedad ulcero péptica mediante determinación de patrones RAPD de los aislados de *H. pylori* de distintas regiones del estómago.

REFERENCIAS

- Achtman M. Population structure of *Helicobacter pylori* and other pathogenic bacterial species. En: *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. 2001. Achtman y Suerbaum (ed.). 2001. pp 15-28
- Achtman M, Azuma T, Berg D et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*. 1999. **5**: 981-984
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE. PCR-Based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucl Acids Res*. 1992a. **20**: 6221-6225
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 1992b. **20**: 5137-5142
- Alm RA, Ling L-S L, Moir DT et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1999. **397**: 176-180
- Ashour AAR, Magalhaes PP, Mendez EN, Collares GB, de Gusmao VR, Queiroz DMM, Nogueira AMMF, Rocha GA, de Oliveira CA. Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002. **33**: 173-178
- Atherton JC, Cao P, Peek Jr RM, Tummuru MKR, Blaser MJ and Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995. **270**: 1771-1777.
- Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, Gonzalez-Valencia G, Twells RJ, Peek RM, Thompson SA, Karita M, Hawkey JC, Blaser MJ. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol*. 1999. **39**: 211-218
- Atherton JC. *H. pylori* virulence factors. *Brit Med Bull*. 1998. **54**: 105-20.
- Atherton, J. C., R. M. Peek, K. T. Tham, T. L. Cover, and M. J. Blaser. Clinical and Pathological Importance of Heterogeneity in *vacA*, the Vacuolating Cytotoxin Gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1997. **112**: 92-99
- Atherton, JC. 1996. Molecular Techniques to Detect Pathogenic Strains of *Helicobacter Pylori*. In: *Methods in Molecular Medicine. Helicobacter Pylori Protocols*. Ed. Clayton CL, Mobley HLT Humana Press Inc.: 133-143.

Bereswill S, Schonenberger R, Thies C, Stahler F, Strobel S, Pfefferle P, Wille L, Kist M. New approaches for genotyping of *Helicobacter pylori* based on amplification of polymorphisms in intergenic DNA regions and the insertion site of the *cag* pathogenicity island. *Med Microbiol Immunol*. 2000. **189**:105-113

Berg DE, Gilman RH, Lelwal-Guruge J et al *Helicobacter pylori* populations in peruvian patients. *Clin Infect Dis*. 1997. **25**: 996-1002.

Blaser MJ and Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Inv*. 1994. **94**: 4-8.

Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Inv*. 2001. **107**: 767-773.

Blaser MJ. Role of *vacA* and *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996. **10** (suppl1): 73-77.

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovski M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Aca Sci*. 1996. **93**: 14648-14653.

Chalkauskas H, Kersulyte D, Capulienė I, Vaidotas U, Ruzeviciene D, Barakauskiene A, Raudonikiene A, Berg . Genotypes of *Helicobacter pylori* in Lithuanian families. *Helicobacter*. 1998. **3**: 296-302

Correa, P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1988. **48**: 3554-3360.

Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N and Rappuoli R. Molecular characterization of the 128- kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. **90**: 5791-5795.

Donati M, Moreno S, Storni E, Tucci A, Poli L, Mazzoni C et al. Detection of serum antibodies to CagA and VacA and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Clin Diag Lab Immunol*. 1997. **4**: 478-482.

Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Microbiol Rev* **1997**; 10:720-41.

Eck M, Schmausser B, Hass R, Greiner A, Czub S, Müller-Hermelink HK, MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. *Gastroenterol*. 1997. **112**: 1482-1486.

Fantry GT, Zheng QX, Darwin PE, Rosenstein AH, James SP. Mixed infection with *cagA*-positive and *cagA*-negative strains of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 1996. **2**: 98-106

Figueredo C, van Doorn LJ, Nogueira C, Soares JM, Pinho C, Figueira P, Quint WG, Carneiro F. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol.* 2001. **36**: 128-135

Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1994. **32**: 331-334

Gibson JR, Slater E, Xerry J, Tompkins DS, Owen RJ. 1998. Use of an amplified fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1998. **36**: 2580-2585

Glupczynski, Y., M. Labbe, H. Willy, and E. C. Yourassowsky. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 1991. **29**:2072-75.

Go, M. F., V. Kapur, D. Y. Graham, and J. M. Musser. Population Genetic Analysis of *Helicobacter pylori* by Multilocus Enzyme Electrophoresis: Extensive Allelic Diversity and Recombinational Population Structure. *J. Bacteriol.* 1996.**178**: 3934-3938

González-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo-de la Garza A, Torres J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis.* 2000. **182**: 1450-1454.

Goodwin CS, Armstrong JA and Marshal BJ. *Campylobacter pyloridis* gastritis and peptic ulceration. *J Clin Pathol.* 1986. **39**: 353-365.

Hirschl AM, Richter M, Makristathis A, Prückl PM, Willinger B, Schütze K, Rotter ML. Single and Multiple Strain Colonization in Patients with *Helicobacter pylori*-Associated Gastritis: Detection by Macrorestriction DNA Analysis. *J Infect Dis.* 1994. **170**: 473-47

Hua J, Ling KL, Ng HS, Ho B. Isolation of a single strain of *Helicobacter pylori* from the antrum and body of individual patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000. **12**: 1129-1134

Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek Jr RM. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *PNAS.* 2001. **98**: 14625-14630

Ito A, Fujioka T, Kodama K, Nishizono A, Nasu M. Virulence-associated genes as markers of strain diversity in *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997. **12**: 666-669.

Jenks PJ, Kusters JG. Pathogenesis and virulence factors of *Helicobacter pylori*. En: Malferteiner P, Mégraud F, Michetti P, Price A. (ed). *The Year in Helicobacter pylori* 2000. Supplement to *Current opinion in Gastroenterology*. Vol 16 (suppl 1 to issue 6). Lippincott Williams & Wilkins.

Jiang K, Hiratsuka K, Taylor DE. Variability in gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*. 1996. **20**: 833-842 .

Jorgensen, M., G. Daskalopoulos, V. Warburton, H. M. Mitchell, and S. L. Hazell. Multiple Strain Colonization and Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori*-Infected Patients: Identification from Sequential and Multiple Biopsy Specimens. *J Infect Dis*. 1996. **174**: 631-635.

Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol*. 1999. **31**: 31-43.

Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatiño B. et al. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol*. 2000. **182**: 3210-3218

Kim S-Y, Woo CW, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB, Youn SJ, Park SM. Genotyping CagA, VacA, subtype IceA1 and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci*. 2001. **16**: 579-584

Kuipers EJ, Israel DA, Kuster JG, Gerrits MM et al. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis*. 2000. **181**: 273-282

Lee A, Fox J and Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: A perspective. *Infect Immun*. 1993. **61**: 1601-1610.

Letley DP, Lastovica A, Louw JA, Hawkey CJ, Atherton JC. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: Rarity of the *vacA* sla genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *J Clin Microbiol*. 1999. **37**: 1203-1205

Marshall DG, Chua A, Keeling PWN, Sullivan DJ, Coleman DC, Smyth CJ. Molecular Analysis of *Helicobacter pylori* populations in antral biopsies from individual patients using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1995. **10**: 317-324

Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach o patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet*. 1984. **i**: 1311-1315

Monteiro MA, Appelmek BJ, Rasko DA et al. Lipopolysaccharide structures of *Helicobacter pylori* genomic strains 26695 and J99, mouse model *H. pylori* P466 carrying sialyl Lewis X, and *H. pylori* UA915 expressing Lewis B: classification of *H. pylori* lipopolysaccharides into glyco-type families. *Eur J Biochem*. 2000. **267**: 305-320.

Morales ER, Castillo RG, González-Valencia G, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton JC and López VY. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Bacteriol. 1999. **37**: 3001-3004

Moran AP, Wadstrom T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. En: Malfertheiner P, Mégraud F, Michetti P, Price A. (ed). The Year in *Helicobacter pylori* 1998. Supplement to Current opinion in Gastroenterology. Vol. 14 (suppl 1). Lippincott Williams & Wilkins.

Muñoz Pérez L, González-Valencia G, Giono CS, Muñoz O, Torres J. A comparison of Lewis x and Lewis y expression in *Helicobacter pylori* obtained from children and adults. J Infect Dis. 2001. **183**: 1147-1151.

Nomura A, Stemmermann GN, Chyou P-H, Kato, Pérez-Pérez GI et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. New Engl J Med. 1991. **325**: 1132-1136.

Ottemann KM, Lowenthal AC *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. Infect Immun. 2002. **70**:1984-90.

Owen RJ, Sharp SI, Chisholm SA, Rijpkema S. Identification of *cagA* tyrosine phosphorylation DNA motifs in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patients by novel-PCR restriction fragment length polymorphism and real-time fluorescence PCR assays. J Clin Microbiol. 2003. **41**: 3112-3318

Pan Z-J, van del Hulst RWM, Feller M, Xiao S-D, Tytgat GNJ, Dankert J, van der Ende A. equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. J Clin Microbiol. 1997. **35**: 1344-1347.

Peek Jr RM, Blaser MJ. Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-induced gastritis and peptic ulcer disease. Am J Med. 1997. **102**: 200-207

Prewett EJ, Bickley J, Owen RJ and Pounder RE. DNA patterns of *Helicobacter pylori* isolated from gastric antrum, body and duodenum. Gastroenterol. 1992. **102**: 829-833.

Pride DT, Meinersmann RJ, Blaser MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori babA* and *babB*. Infect Immun. 2001. **69**:1160-71

Rasko DA, Wilson TJ, Zopf D, Taylor DE. Lewis antigen expression and stability in *Helicobacter pylori* isolated from serial gastric biopsies. J Infect Dis. 2000. **181**: 1089-1095

Salama DM, Jiang Q, Chang N, Sherbaniuk RW, Taylor DE. Characterization of chromosomal DNA profiles from *Helicobacter pylori* strains isolated from sequential gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol. 1995. **33**: 2496-2497

Salama NR, Guillemin K, McDaniel T, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. PNAS. 2000. **97**: 14668-14673

Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci. 1999. **96**: 1459-1464

Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. J Immunol. 1998. **160**:2401-7

Shimoyama T, Fakuda S, Tanaka M, Mikami T, Saito Y, Munakata A. High prevalence of *cagA* positive *Helicobacter pylori* strains in Japanese asymptomatic patients and gastric cancer patients. Scand J Gastroenterol. 1997. **32**: 465-468.

Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine-phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cagA*-driven host cell translocation. 2000. Proc Natl Acad Sci. **97**: 1263-1268

Strobel S, Bereswill S, Balig P, Allgaier P, Sonntag, H-G, Kist M. Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. J Clin Microbiol. 1998. **36**: 1285-1289.

Suerbaum S, Maynard SJ, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Direk I, Atchmann M. Free recombination within *Helicobacter pylori* strains. Proc Natl Acad Sci. 1998. **95**: 12619-12624.

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med. 2002. **347**: 1175-1186

Takata T, Fujimoto S, Anzai K, Shirotani T, Okada M, Sawae Y, Ono J. Analysis of the expression of CagA and VacA and the vacuolating activity in 167 isolates from patients with either peptic ulcers or non-ulcer dyspepsia. Am J Gastroenterol. 1998. **93**: 30-34.

Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS, Berg DE, Thomson N, Shames B, Yan L, Fonham E, Janney F, Hunter FM, Pelayo C. Long-term Colonization with Single and Multiple Strain of *Helicobacter pylori* Assessed by DNA Fingerprinting. J Clin Microbiol. 1995. **33**: 918-923.

Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli C, Parente L and Rappuoli R. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* J Exp Med. 1994. **179**: 1653-1658.

Thoreson AC, Hosseini N, Svennerholm AM, Bolin I. Different *Helicobacter pylori* strains colonize the antral and duodenal mucosa of duodenal ulcer patients. Helicobacter. 2000. **5**: 69-78

Tomb Jean-F et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 1997. **388**: 539-547.

Torres J, Leal Y, Pérez-Pérez G Gómez A, Camorlinga M, Cedillo R, Tapía R, Muñoz O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J infect Dis. 1998. **178**: 1089-1094.

Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ, Atherton JC, Gold BD, Harris PR, De la Garza AM, Guarner J, Muñoz O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. Arch Med Res. 2000. **31**: 431-469

Tummuru MKR, Cover TL and Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter*: Evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun. 1993. **61**: 1799-1809.

van der Hulst RWM, van der Ende, Dekker FW, Ten Kate FJW et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastritis in relation to *cagA*: a prospective 1-year follow-up study. Gastroenterol. 1997. **113**: 25-30.

van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. J Clin Microbiol 1998a. **36**: 2597-603

van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneenberg P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *IceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 1998b. **115**: 58-66

Versalovic J, Fox JG. Taxonomy and Phylogeny of *Helicobacter*. En: *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. 2001. Atchman y Suerbaum (ed.). 2001. pp 15-28

Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon ATR, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. J Clin pathol. 1998. **51**: 55-61.

Wirth,HP, Yang M., Peek RM., Tham KT and Blaser MJ. *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. Gastroenterology. 1997. **113**:1091-1098.

Wong BC, Wang WH, Berg DE Fung FM, Wong KW, Wong WM, Lai KC, Cho CH, Hui WM, Lam SK. High prevalence of mixed infections by *Helicobacter pylori* in Hong Kong: metronidazole sensitivity and overall genotype. Aliment Pharmacol Ther. 2001. **15**: 493-503

Xu Q, Morgan RD, Roberts RJ, Blaser MJ. Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. PNAS. 2000. **97**: 9671-9676

Yamaoka Y, Orito E, Misokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, Osato MS, Kim JG, Ramirez FC, Mahachai V, Graham DY. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. FEBS Letters. 2002. **517**: 180-184

Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach o patients with gastric and peptic ulceration. Lancet. 1984. **i**:1311-1315

Versalovic J, Fox JG. Taxonomy and Phylogeny of *Helicobacter*. En: *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. 2001. Atchman y Suerbaum (ed.). 2001. pp 15-28

INDICE DE TABLAS Y FIGURA

Tabla	Página
1 Características de los pacientes estudiados.....	14
2 Primers usados para la tipificación de <i>vacA</i> y <i>cagA</i>	16
3 Frecuencia de infección con múltiples cepas de <i>Helicobacter pylori</i> en niños y adultos definido por la detección de ≥ 2 alelos de <i>vacA</i> de diferentes tipo de región media o de secuencia señal en cultivos de biopsias gástricas.....	18
4 Frecuencia de los diferentes tipos de <i>vacA</i> de región de secuencia señal y media en <i>Helicobacter pylori</i> de cultivos de biopsia gástrica de niños y adultos Mexicanos.....	20
5 Frecuencia de infección con cepas <i>cagA</i> + en niños y adultos Mexicanos determinado por PCR con 2 juegos diferentes de primers.....	21
6 Características de los 8 pacientes estudiados en la segunda parte	23
7 Primers usados para la tipificación de <i>vacA</i> (conservados), <i>cagPAI</i> y <i>picB</i>	25
8 Primers usados para el análisis de RAPD.....	26
9 Genotipificación de colonias de <i>H. pylori</i> aisladas de biopsias gástricas de 4 regiones del estómago de 8 pacientes con enfermedad ulcero peptica.....	29
10 Pacientes donde todos los aislados fueron <i>cagA</i> y <i>picB</i> positivos y presentaron el mismo patrón RAPD.....	30
11 Paciente 259 donde los aislados presentaron diferente patrón RAPD y tipos <i>vacA</i> , <i>cagA</i> , <i>picB</i> y <i>cag PAI</i>	32
12 Frecuencia de Tipos Lewis en antro, cuerpo, fondo e incisura de 8 pacientes con enfermedad ulcero peptica.....	33

Helicobacter pylori vacA and *cagA* Genotypes in Mexican Adults and Children

G. González-Valencia,¹ J. C. Atherton,⁴ O. Muñoz,¹
M. Dehesa,² A. Madrazo-de la Garza,³ and J. Torres¹

¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, ²Servicio de Gastroenterología del Hospital de Especialidades, and ³Servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México; ⁴Division of Gastroenterology and Institute of Infections and Immunity, University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom

Studies examining associations between *Helicobacter pylori* virulence markers and disease have concentrated on adults in developed countries. This study assessed adults and children in Mexico. Ninety patients were recruited, 56 adults (37 with active peptic ulceration and 19 with no ulcers) and 34 children (all with recurrent abdominal pain and no ulcers). *H. pylori* was cultured from gastric biopsy specimens, and *vacA* alleles and *cagA* were typed by use of polymerase chain reaction from multiple colony sweeps. Multiple *vacA* types were common in single-biopsy isolates and were more frequent in adults with ulcers (95%) than in adults without ulcers (37%; $P < .001$) or in children (52%; $P < .01$). *vacA* s1b and *cagA*+ strains were more frequent in adults than in children. *vacA* s1 and *cagA*+ strains had similar frequencies in adults with and without ulcers. In conclusion, infection with multiple *H. pylori* strains, defined by different *vacA* genotypes, is common in Mexico. Such mixed infection is associated with ulcer disease. Strain populations infecting Mexican adults and children differ.

Helicobacter pylori infection causes chronic superficial gastritis and is an important risk factor for peptic ulceration, gastric adenocarcinoma, and gastric lymphoma [1]. Two major bacterial virulence markers have been described, the presence of *cagA* (cytotoxin-associated gene A) and expression of vacuolating cytotoxin activity [2]. *cagA* is present in ~60% of *H. pylori* strains from developed countries and encodes a high-molecular-weight protein, CagA. This protein is thought to be transported directly into host epithelial cells by a type IV secretory system, where it is phosphorylated and induces various intracellular events that may underlie pathogenesis [3]. Both the type IV secretory system and CagA are encoded on a pathogenicity island (termed *cag*) [4]. *cagA*+ strains are more commonly associated with peptic ulceration, atrophic gastritis, and

adenocarcinoma of the stomach than are *cagA*- strains [2, 5], but it is unclear whether CagA itself is directly important or whether it is merely acting as an imperfect marker for other genes in the *cag* pathogenicity island. In contrast to *cagA*, the gene encoding the vacuolating cytotoxin, *vacA*, is present in essentially all *H. pylori* strains [6]. *vacA* has a mosaic structure, and in strains from the United States, each allele has 1 of 3 possible types of signal sequence region (s1a, s1b, and s2) and 1 of 2 possible types of midregion (m1 and m2), occurring in any combination [6–8]. Other variants of signal and midregion have been described in other populations—for example, the s1c signal region and m1b midregion in East Asia [9, 10]. In studies from the United States, *H. pylori vacA* s1 strains were more commonly associated with peptic ulceration than were *vacA* s2 strains [6, 11]. Strains with a type m1 *vacA* allele produced higher levels of cytotoxin activity in vitro, and more epithelial damage in the human stomach in vivo, than did strains with an m2 allele, although there was no clear association between *vacA* midregion type and peptic ulceration [11]. The original *vacA* and *cagA* typing systems described that used *H. pylori* strains from the United States have since been applied successfully (although sometimes with modifications) to other populations [8–10, 12–14].

In this study, our initial aims were 2-fold: to study the relationship between *vacA* genotypes, *cagA* status, and disease in Mexican adults and to assess whether carriage rates of strains with different *vacA* alleles or of different *cagA* status were different between adults and children. However, it became apparent from our preliminary findings and from an independent report [7] that gastric biopsy specimens from Mexican patients frequently contain >1 strain of *H. pylori*, as assessed by the

Received 22 March 2000; revised 19 July 2000; electronically published 9 October 2000.

Presented in part: XIth International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter pylori*. Budapest, Hungary, September 1998 (abstract 05/129).

Written informed consent to participate in this study was obtained from all patients or their parents. The study was approved by the ethics committees of both hospitals involved.

Financial support: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant 28040 M), Byk-Gulden-Mexico, and the Coordinación de Investigación, Instituto Mexicano del Seguro Social, México. J.C.A. was funded by a Clinician Scientist Fellowship and a Senior Clinical Fellowship from the Medical Research Council, United Kingdom.

Reprints or correspondence: Dr. J. Torres, Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI-IMSS, Av. Cuauhtemoc 330, CP 06725, Mexico (jtorresl@axtel.net).

Table 1. Oligonucleotide primers used for *vacA* and *cagA* typing.

Gene and region typed, genotype identified, primer designation	Primer sequence	Size of PCR product, base pair
<i>vacA</i> midregion		
m1		
VA3-F	5'-GGTCAAATGCGGTCATGG-3'	290
VA3-R	5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3'	—
m2		
VA4-F	5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3'	352
VA4-R	5'-CATAACTAGCGCCTTGAC-3'	—
<i>vacA</i> signal region		
s1a		
SS1-F ^a	5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3'	190
s1b		
SS3-F ^a	5'-AGCGCCATACCGCAAGAG-3'	187
s2		
SS2F ^a	5'-GCTAACACGCCAAATGATCC-3'	199
VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	—
<i>cagA</i>		
<i>cagA</i> +		
F1	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3'	349
B1	5'-CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA-3'	—
B7628	5'-AAGAAAGGCAAGAAGCAGAAAA-3'	335
B7629	5'-ACACAGAAGACAGAGCGTTATT-3'	—

NOTE. PCR, polymerase chain reaction.

^a Used with VA1-R.

finding of multiple *vacA* types. We thus took the opportunity also to assess whether such multiple-strain colonization was associated with disease or with age.

Materials and Methods

Patients. Ninety *H. pylori*-infected patients, 56 adults and 34 children, were studied. All patients were recruited from hospitals in the National Medical Centre, IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social), which serve the same medium-low income population in Mexico City. The children (median age, 11 years; range, 2–16 years; 47% boys) presented to the Gastroenterology Service of the Paediatric Hospital with recurrent abdominal pain; endoscopy indicated that none had peptic ulceration. The adult patients presented to the Gastroenterology Service of the General Hospital; 37 had active peptic ulceration (median age, 50 years; range, 21–82 years; 73% men; 35 duodenal ulcers and 2 gastric ulcers), and 19 had no active peptic ulceration or history of peptic ulcers (mean age, 43 years; range 20–78 years; 68% men). All patients had histologically proven *H. pylori*-associated gastritis.

***H. pylori* culture.** The biopsy specimen for culture was placed in 300 μ L of sterile 0.9% saline and transported on ice to the laboratory, where it was processed within 2 h. The biopsy specimen was homogenized with a tissue grinder and inoculated onto trypticase soy agar plates supplemented with 7.5% sheep blood. The plates were incubated at 37°C under microaerobic conditions for \leq 10 days. Cultures exhibiting typical *H. pylori* colony morphology were identified by positive urease, catalase, and oxidase tests and typical appearance on Gram's stain. From the primary growth, multiple colonies were swept and suspended in saline for later DNA isolation.

***vacA* and *cagA* typing by use of polymerase chain reaction (PCR).** DNA was isolated from the multiple colony sweeps, as described elsewhere [6, 15]. In brief, bacterial cells were lysed with

GES reagent (guanidinium thiocyanate, 60 g; 0.5 M EDTA, 20 mL; 10% water solution of N-lauroyl-sarcosine, 5 mL; and water to make 100 mL), and DNA was extracted with chloroform, precipitated with isopropanol, dissolved in Tris-EDTA buffer, and either used immediately or stored at -20°C. Primers for PCR typing of *vacA* and detecting *cagA* are shown in table 1. *vacA* signal sequence and midregion typing methods were slightly modified from those described by Atherton et al. [6]. All PCR mixtures consisted of 1 μ L of DNA template, 1 \times PCR buffer (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each deoxynucleotide (Gibco BRL), 0.5 μ M each specific primer, and 1.25 U of Taq polymerase (Gibco BRL) in a final volume of 25 μ L. The amplification cycles were performed in a GeneAmp PCR system (Perkin-Elmer, Foster City, CA) thermocycler. PCR conditions were 35 cycles of 94°C for 1 min, 52°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 6 min. For *cagA* typing, 2 sets of primers were used, F1-B1 [16] and B7628-B7629 (kindly donated by M. K. R. Tummuru, Vanderbilt University, Nashville, TN). For F1-B1, PCR conditions were the same as for *vacA*, except that annealing was at 55°C for 1 min. For B7628-B7629, PCR conditions were 25 cycles of 94°C for 1 min, 46°C for 1 min, and 72°C for 1 min. Specific strains used as positive controls were as follows: 60190 (ATCC 49503) genotype *cagA*+, *vacA* s1a/m1; Tx30a (ATCC 51932) genotype *cagA*-, *vacA* s2/m2; and 84-183 (ATCC 53726) genotype *cagA*+, *vacA* s1b/m1. DNA from control strains was included in each PCR assay, along with a no-DNA negative control. Thus each PCR reaction had a positive control (DNA from the strain with that *vacA* allelic type or *cagA* type) and several negative controls (the no-DNA control and DNA from control strains of different genotypes).

PCR amplification products from positive and negative controls and a 100-bp DNA ladder were run on gels with active samples, allowing a careful check that amplimers from samples were of the

Table 2. Frequency of multiple-strain *Helicobacter pylori* infection in children and adults, as defined by detection of ≥ 2 *vacA* alleles of different signal or midregion type in gastric biopsy cultures.

Region of <i>vacA</i> with ≥ 2 allelic types found	Patients with multiple <i>vacA</i> types		
	Children with recurrent abdominal pain but no peptic ulceration (n = 34)	Adults with no peptic ulceration (n = 19)	Adults with peptic ulceration (n = 37)
Signal	12 (35) ^a	5 (26) ^b	28 (76) ^{a,b}
Mid	16 (47) ^c	4 (21) ^b	25 (68) ^{b,c}
Either	18 (52) ^a	7 (37) ^b	35 (95) ^{a,b}

NOTE. Data are no. (%).

^a $P < .01$ for children vs. adults with peptic ulceration.

^b $P < .001$ for adults with no peptic ulceration vs. adults with peptic ulceration.

^c $P < .05$ for children vs. adults with peptic ulceration.

expected size. As an additional check, 8 selected PCR amplicons from samples were submitted for automated sequencing, to check that the expected section of *vacA* had been amplified (ABI 377 sequencer; Perkin-Elmer). These 8 samples included amplicons from 3 different multiple colony isolates, amplified with *s1a*-, *s1b*-, and *m2*-specific primers, and 5 different amplicons from a single isolate with specific products from *s1a*-, *s1b*-, *s2*-, *m1*-, and *m2*-specific primers. All 8 amplicons sequenced were found to be of the *vacA* type we expected and from the expected region of *vacA* [17, 18].

Statistics. The χ^2 test with Yates' continuity correction was used to compare all patient groups, then pairs of groups where a significant result was found. The Mann-Whitney *U* test was used to compare ages of patients with single or multiple *vacA* types within a group.

Results

H. pylori DNA from all biopsy specimen multiple-colony sweeps yielded PCR products from ≥ 1 of the *vacA* PCRs, confirming the presence of *vacA* in all *H. pylori* isolates. However, in contrast to studies based on populations from developed countries, >1 *vacA* signal sequence or midregion type was often identified in a single sample, indicating the presence of multiple strains or substrains in single biopsy specimens. The most striking finding was that such infection was found in all but 2 adults with peptic ulceration (33 of 35 with duodenal ulceration and 2 of 2 with gastric ulceration; table 2). Thus, multiple *vacA* types were significantly more frequent in adults with peptic ulceration (95%) than in either adults without ulcers (37%; $P < .001$) or children with recurrent abdominal pain but no ulcers (52%; $P < .01$; table 2).

Next, we assessed whether there was any association between the presence of multiple *vacA* types and age. There was no significant difference in the frequency with which multiple types were identified between adults without peptic ulcers (37%) and children with recurrent abdominal pain without peptic ulcers (52%, $P = .2$). To exclude confounding effects due to differences in symptoms or referral demographics between the adults and children, we next assessed the association between age and

multiple types within these 2 groups. Because there were only 2 single *vacA* type infections among the adult peptic ulcer patients, we could not study this third group. No significant associations between multiple *vacA* types and age were found in either children (median age for single *vacA* type, 11 years; multiple types, 11 years) or in adults without ulcers (median age for single type, 34 years; multiple types, 43 years).

The frequency of different *vacA* allelic types in the 3 groups of patients is shown in table 3. Note that this includes multiple *vacA* genotype infections and so does not have implications for whether specific *vacA* genotypes in single-strain infections are associated with disease. *vacA* alleles of type *s1a* were found less frequently than type *s1b* or *s2* alleles in all 3 groups of patients, in contrast to findings in the United States and the United Kingdom, where type *s1a* alleles predominate [9, 13]. Type *s1b* alleles were found more frequently in both groups of adults (duodenal ulcer and gastritis alone) than in children. Type *s2* and *m2* alleles were found significantly less frequently in adults with no ulcers than in adults with duodenal ulcer or in children, but in both the latter groups, they were usually found in conjunction with *s1b* and *m1* alleles. Previous studies have specifically excluded multiple genotype infections when analyzing associations between *vacA* genotypes and disease. In the current study, all but 2 adults with peptic ulcer disease had multiple genotype infections, making such an analysis impossible. The genotypes of the 2 single genotype infections in patients with peptic ulceration were *vacA s1a/m1* and *vacA s1b/m1*.

The frequency of infection with *cagA*+ strains, as detected with the 2 primer sets, is presented in table 4. The use of PCR to detect *cagA* may have resulted in an underestimate of the true prevalence, but our results concentrate on differences between groups rather than the absolute prevalence of *cagA* in our population. From the combined results with both primer sets, the frequency of *cagA*+ cultures was significantly lower in children than in either group of adults. In contrast to most studies from developed countries, there was no difference in the prevalence of *cagA*+ strains between adults with and without ulcers. Overall, the B7628-B7629 primer set was more sensitive than the F1-B1 set in this population. However, the F1-B1 primers produced interesting results in that they identified *cagA* efficiently in adults without ulcers (100% of those *cagA*+ with either primer set were positive with F1-B1) but poorly in adults with peptic ulcers (only 30% of those *cagA*+ with either primer set were positive with F1-B1; $P < .01$).

Discussion

The central findings in this study were (1) that infection with >1 strain of *H. pylori* (as defined by different *vacA* types) is very common in Mexico, (2) that such infections are more commonly associated with peptic ulceration than are single-strain infections, and (3) that adults and children from the same community carry strain populations with different characteristics. Our first finding,

Table 3. Frequency of the different types of *vacA* signal and midregions in *Helicobacter pylori* gastric biopsy cultures from Mexican children and adults.

Allelic type of <i>vacA</i>	Gastric biopsy cultures positive for the allele		
	Children with recurrent abdominal pain but no peptic ulceration (n = 34)	Adults with no peptic ulceration (n = 19)	Adults with peptic ulceration (n = 37)
Signal region			
s1a ^a	4 (12)	2 (11)	7 (19)
s1b	16 (47) ^b	15 (79)	34 (92)
s2	21 (62)	6 (32) ^c	29 (78) ^c
Signal region not typeable	6 (18)	0	0
Midregion			
m1	27 (79)	19 (100)	31 (83.8)
m2	22 (65)	4 (21) ^d	29 (78.4)
Not m1 or m2 ^e	1 (3)	0	2 (5.4)

NOTE. Data are no. (%).

^a *P* < .01, when compared with s1b and s2 in all 3 groups of patients.

^b *P* < .01 for children vs. both adult groups.

^c *P* < .01 for adults with no ulceration vs. adults with ulceration.

^d *P* < .01 for adults with no ulceration vs. both children with no ulceration and adults with ulceration.

^e The isolate not typeable for m1 or m2 was typeable for *vacA* signal region.

that *H. pylori* infection with multiple *vacA* types is more common in Mexico than has previously been reported in developed countries [9, 19–22], confirms and extends a separate previous study from Mexico, which showed 18 of 20 patients to have strains of multiple *vacA* types [7]. In that study, single colonies were isolated from the original sweep of the culture plate, and, as expected, each of these was of a single *vacA* type. This confirmed that the original isolate contained different strains, not a single strain from which *vacA* could be PCR amplified by use of several different sets of primers.

The earlier study from Mexico was too small to examine associations with disease, and larger studies have not identified sufficient patients infected with *H. pylori* of multiple *vacA* types to examine the association. Thus, the association of multiple strain infection with peptic ulceration in this study is a novel finding. One possible reason for such an association would be that multiple strain infection increases the chance of infection with a more pathogenic strain. However, our data do not support this, in that the known markers of pathogenic strains we examined, *cagA* and the *vacA* s1 genotype, were found at the same frequency in adult patients with and without ulcers. In examining other possibilities, we are looking for other virulence factors, but we are also exploring the theory that mixed *H. pylori* strains may act synergistically to persist in the stomach and cause damage.

A major novel aspect of our study was the comparison of virulence markers in *H. pylori* strains infecting adults and children. Among adults in Mexico we found principally *cagA*+ and *vacA* s1b strains, but among children, *cagA*– and *vacA* s2 strains predominated. This difference was maintained when peptic ulcer patients were excluded and so was not caused by the association of these markers with disease. Nor was it because of demographic differences between the populations,

since both adults and children came from the same socioeconomic and ethnic group in the same area of Mexico. It is possible either that *cagA*– and *vacA* s2 strains infect children more easily than adults (and vice versa for *cagA*+ and *vacA* s1b strains) or that infection occurs mainly in childhood in Mexico (as in most other populations) and that the most prevalent genotype of strains infecting children has changed from *vacA* s1b/*cagA*+ to *vacA* s2/*cagA*–. This is not immediately consistent with the concept that children acquire *H. pylori* infection most commonly from their parents; it suggests that infection may be acquired from sources outside the family. However, an alternative explanation is that children and adults carry the same genotypes, but bacterial load of the different *vacA* subtypes varies with time. Thus, s2/*cagA*– strains would reach higher bacterial loads in children than in adults, whereas s1b/*cagA*+ would reach higher bacterial loads in adults.

In this setting of multiple strain infection, we found no evidence of the frequently described associations between *cagA*+ or *vacA* s1 infection and peptic ulceration [1, 2, 6, 9, 11, 14]. We may have underdiagnosed *cagA*+ infection by use of the PCR-based

Table 4. Frequency of infection with *cagA*+ strains in Mexican children and adults, as determined by polymerase chain reaction with 2 different sets of primers.

Set of <i>cagA</i> primers	Gastric biopsy cultures positive for <i>cagA</i>		
	Children with recurrent abdominal pain but no peptic ulceration (n = 34)	Adults with no peptic ulceration (n = 19)	Adults with peptic ulceration (n = 37)
F1-B1	8 (24)	17 (90)	9 (24)
B7628-B7629	15 (44)	14 (74)	29 (78)
Either	16 (47) ^a	17 (90)	30 (81)

NOTE. Data are no. (%).

^a *P* < .01 for children vs. both groups of adults.

methodology, because neither primer set was completely sensitive for *cagA*, compared with the other. However, the difference in results between the sets was interesting, particularly the results from the F1-B1 set, which was much more sensitive for *cagA* detection in the population without ulcers than in the population with ulcers. This raises the possibility that nucleotide sequence heterogeneity in *cagA* may be associated with disease in Mexican patients, and we are investigating this further. With regard to *vacA*, in contrast to previous reports [2, 9, 11, 12], we observed *vacA* s2 strains to be less prevalent in adults without ulcers than in adults with ulcers. However, the excess *vacA* s2 strains in ulcer patients were associated with multiple *vacA* types, and we speculate that it was this, rather than *vacA* s2 strain type, that was associated with peptic ulceration.

Our results, and those of the previous Mexican study [7], show that multiple "strains" with different *vacA* types exist within gastric biopsy specimens, but the relatedness of these strains is unclear. They could be entirely unrelated, or they could be derived from the same parent strain, which has recombined with other strains, resulting in differences in *vacA* type. Such recombination between strains during natural infection has been shown to result in changes at several genetic loci, including the *cag* pathogenicity island [23]. Whatever the relatedness of strains colonizing a single stomach, this study will have given an underestimate of total genetic differences for 3 reasons: first, we analyzed only a single antral biopsy specimen; second, our methodology does not identify differences other than *vacA* genotype; and third, by culturing biopsy specimens, we may have selected against some strains. We are currently conducting a study of genetic differences between single-colony isolates, which will clarify the exact relatedness of strains with different *vacA* types within a single stomach.

In conclusion, the pattern of *H. pylori* infection in Mexico appears to be different from that in US and European populations, in that infection with multiple *vacA* types is common (and associated with peptic ulcer disease) and that, in this context, the previously identified virulence markers, *cagA* and *vacA* type s1, are not helpful in predicting disease outcome. To our knowledge, we have also found, for the first time, differences in strains isolated from adults and children in the same population. It is now important to determine whether these characteristics are peculiar to *H. pylori* infection in Mexico or are more widespread.

Acknowledgments

We thank Hilda Valdez and the Unidad de Secuenciación, Coordinación de Investigación, Instituto Mexicano del Seguro Social, for the sequencing studies.

References

- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;10:720-41.
- Atherton JC. *H. pylori* virulence factors. Br Med Bull 1998;54:105-20.
- Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:14559-64.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:14648-53.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. 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.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995;270:1771-7.
- Morales R, Castillo G, González G, et al. Colonisation of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Microbiol 1999;37:3001-4.
- Letley DP, Lastovica A, Louw JA, et al. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *vacA* s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. J Clin Microbiol 1999;37:1203-5.
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. J Clin Microbiol 1998;36:2597-603.
- Pan ZJ, Berg DE, van der Hulst RH, et al. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. J Infect Dis 1998;178:220-6.
- Atherton JC, Peek RM, Tham KT, et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1997;112:92-9.
- Strobel S, Bereswill S, Balig P, et al. Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. J Clin Microbiol 1998;36:1285-9.
- Stephens JC, Stewart JAD, Folwell AD, et al. *Helicobacter pylori-cagA* status, *vacA* genotypes, and ulcer disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 1998;10:381-4.
- Rudi J, Kolb C, Maiwald M, et al. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. J Clin Microbiol 1998;36:944-8.
- Atherton JC. Molecular techniques to detect pathogenic strains of *Helicobacter pylori*. In: Clayton CL, Mobley HLT, eds. Methods in molecular medicine: *Helicobacter pylori* protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 1996:133-43.
- Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun 1993;61:1799-809.
- Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem 1994;269:10566-73.
- Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, et al. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. J Bacteriol 2000;182:3219-27.
- Prewett EJ, Bickley J, Owen RJ, et al. DNA patterns of *Helicobacter pylori* isolated from gastric antrum, body and duodenum. Gastroenterology 1992;102:829-33.
- Hirschl AM, Richter M, Makristathis A. Single and multiple strain colonization in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. J Infect Dis 1994;170:473-5.
- Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1994;32:331-4.
- Jorgensen M, Daskalopoulos G, Warburton V, et al. Multiple strain colonization and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*-infected patients: identification from sequential and multiple biopsy specimens. J Infect Dis 1996;174:631-5.
- Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. Mol Microbiol 1999;31:31-43.

LOGROS

Artículos durante la Tesis:

Directamente relacionados:

Publicado

1. **González-Valencia G**, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo de la Garza A, Torres J. *Helicobacter pylori vacA y cagA genotypes* in mexican adults and children. J Infect Dis. 2000. **182**: 1450-1454

Sometido

1. Nina R. Salama , **Gerardo González-Valencia**, Brooke Deathridge, Francisco Aviles-Jiménez, John C Atherton and Javier Torres. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* strain populations colonizing different regions of the stomach. 2004.

Contribuciones, relacionados al tema:

1. Morales ER, Castillo RG, **González-Valencia G**, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton JC and López VY. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Microbiol. 1999. **37**: 3001-3004

2. Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, **González-Valencia G**, Peek Jr RM, Thompson SA, Hawkey CJ, Blaser MJ. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types m1 and m2, and have evolved through limited recombination. Current Microbiol. 1999. **39**: 211-218

3. Muñoz Perez L, **González-Valencia G**, Giono CS, Muñoz O, Torres J. A comparison of Lewis x and Lewis y expression in *Helicobacter pylori* obtained from children and adults. J Infect Dis. 2001. **183**: 1147-1151

4. Torres J, Camorlinga M, Pérez-Pérez G, **González G**, Muñoz O. Validation of the string test for the recovery of *Helicobacter pylori* from gastric secretions and correlation of its results with urea breath test results, serology, and gastric pH levels. J Clin Microbiol. 2001. **39**: 1650-1651

5. Torres J, Camorlinga M, Pérez-Pérez G, Madrazo-De La Garza A, Dehesa M, **González-Valencia G**, Muñoz O. Increasing Multidrug resistance in *Helicobacter pylori* isolated from children and adults in México. J Clin Microbiol. 2001. **39**: 2677-2680

6. Camorlinga-Ponce M, Romo C, **Gonzalez-Valencia G**, Muñoz O, Torres J. Topographical localisation of *cagA* positive and *cagA* negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an *in situ* hybridisation study. J Clin Pathol. 2004. **57**: 822-828

7. Aviles-Jimenez F, Letley DP, **Gonzalez-Valencia G**, Salama N, Torres J, Atherton JC. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. J Bacteriol. 2004. **186**: 5112-5185

Otros logros (ver currículum vitae)

-Durante la realización de este trabajo tuve la oportunidad de asesorar 3 tesis de licenciatura y una de maestría, todas concluidas exitosamente .

-Apoyo de CONACYT a Proyecto de Investigación

-Ingreso y promoción SNI

LOGROS

Artículos durante la Tesis:

Directamente relacionados:

Publicado

1. **González-Valencia G**, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo de la Garza A, Torres J. *Helicobacter pylori vacA y cagA genotypes* in mexican adults and children. J Infect Dis. 2000. 182: 1450-1454

Sometido

1. Nina R. Salama , **Gerardo González-Valencia**, Brooke Deathridge, Francisco Aviles-Jiménez, John C Atherton and Javier Torres. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* strain populations colonizing different regions of the stomach. 2004.

Contribuciones, relacionados al tema:

1. Morales ER, Castillo RG, **González-Valencia G**, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton JC and López VY. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Microbiol. 1999. 37: 3001-3004

2. Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, **González-Valencia G**, Peek Jr RM, Thompson SA, Hawkey CJ, Blaser MJ. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types m1 and m2, and have evolved through limited recombination. Current Microbiol. 1999. 39: 211-218

3. Muñoz Perez L, **González-Valencia G**, Giono CS, Muñoz O, Torres J. A comparison of Lewis x and Lewis y expression in *Helicobacter pylori* obtained from children and adults. J Infect Dis. 2001. 183: 1147-1151

4. Torres J, Camorlinga M, Pérez-Pérez G, **González G**, Muñoz O. Validation of the string test for the recovery of *Helicobacter pylori* from gastric secretions and correlation of its results with urea breath test results, serology, and gastric pH levels. J Clin Microbiol. 2001. 39: 1650-1651

5. Torres J, Camorlinga M, Pérez-Pérez G, Madrazo-De La Garza A, Dehesa M, **González-Valencia G**, Muñoz O. Increasing Multidrug resistanse in *Helicobacter pylori* isolated from children and adults in México. J Clin Microbiol. 2001. 39: 2677-2680

6. Camorlinga-Ponce M, Romo C, **Gonzalez-Valencia G**, Muñoz O, Torres J. Topographical localisation of *cagA* positive and *cagA* negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an *in situ* hybridisation study. J Clin Pathol. 2004. 57: 822-828

7. Aviles-Jimenez F, Letley DP, **Gonzalez-Valencia G**, Salama N, Torres J, Atherton JC. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. J Bacteriol. 2004. 186: 5112-5185

Otros logros (ver currículum vitae)

-Durante la realización de este trabajo tuve la oportunidad de asesorar 3 tesis de licenciatura y una de maestría, todas concluidas exitosamente .

-Apoyo de CONACYT a Proyecto de Investigación

-Ingreso y promoción SNI